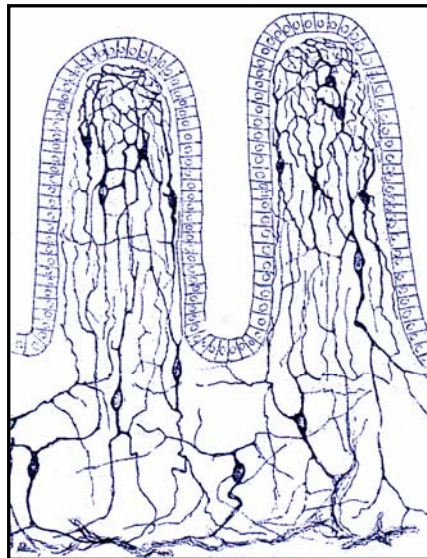


**INFLAMACIÓ INTES­TINAL Y DISMOTILIDAD EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD INFLAMATORIA
INTES­TINAL EN LA RATA: MECANISMOS DE ACCIÓ
IMPLICADOS EN LA CICLICIDAD Y CRONICIDAD**



**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, FISIOLÓGIA
E IMMUNOLOGÍA. UNIDAD DE FISIOLÓGIA ANIMAL
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA**

**Tesis Doctoral dirigida por:
Patrocínio Vergara Esteras
María Teresa Martín Ibañez**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA**

**INFLAMACIÓN INTESTINAL Y DISMOTILIDAD EN UN
MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD
INFLAMATORIA INTESTINAL EN LA RATA:
MECANISMOS DE ACCIÓN IMPLICADOS EN LA
CICLICIDAD Y CRONICIDAD**

**Memòria presentada per Mònica Porras Pardo
per optar al grau de Doctora en Veterinària**

Dra. Patrocinio Vergara Esteras
Professora Titular d'Universitat
Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

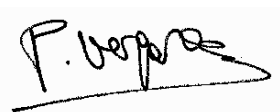
Dra. Maria Teresa Martín Ibañez
Professora Ajudant
Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia
Facultat de Veterinària
Universitat Autònoma de Barcelona

Fan constar que:


La memòria titulada “Inflamación intestinal y dismotilidad en un modelo experimental de enfermedad inflamatoria intestinal en la rata: mecanismos de acción implicados en la ciclicidad y cronicidad”, presentada per Mònica Porràs Pardo per optar al grau de Doctora en Veterinària, ha estat realitzada sota la nostra direcció, i considerant-la finalitzada autoritzem la seva presentació per tal que sigui jutjada pel tribunal corresponent.

I perquè així consti, signem aquest certificat.

Bellaterra, Abril de 2006



P. Vergara



M.T. Martín

Dibuix de la coberta procedent del llibre *Textura del Sistema Nervioso del hombre y de los vertebrados* de Santiago Ramon y Cajal (1904). Cèl.lules nervioses del plexe periglandular i vellositats de l'intestí del conill porquí.

AGRAÏMENTS

La realització d'aquesta tesi doctoral no hagués estat possible sense el suport professional i personal de moltes persones. M'agradaria expressar la meva gratitud:

A les directores d'aquest treball, les Dres. Patri Vergara i Maite Martín, per confiar en mi, pels seus bons consells i pel tracte afable i estimulants amb el que sempre m'han distingit.

Als Drs. Marcel Jiménez, Ester Fernández i Pere Clavé, components seniors del "Grup per l'Estudi de la Motilitat Intestinal", pel seu esperit crític i per les inestimables idees i suggerències que m'han ofert durant la realització d'aquest treball.

A les Dres Lourdes Abarca, Mercè Soler i a la Lina Terán per la seva col.laboració en la realització dels cultius microbiològics.

Al Dr. Alberto Marco, per la seva col.laboració en la realització de l'estudi histopatològic.

A la Dra. Rosa Torres per ensenyar-me una petita part dels seus coneixements en el camp de la biologia molecular i pel seu bon caràcter.

A tots els components del "Intestinal Disease Research Programme" de la Universitat McMaster de Canadà, on s'ha realitzat una part d'aquest treball. I molt especialment a la Dra. Mary Perdue, per haver posat part del seu laboratori a la meva disposició i pel seu valuós suport moral.

A tots i cadascun dels companys que han compartit poc o molt els meus anys a la Unitat: Yoli, Elena, Mariona, Anna Maria, Ricard, Hernán, Emma, Bego, Estefania, Diana, Esther, Lina, Carol i Joan. Moltes gràcies per la vostra amistat i pel recolzament que m'heu ofert durant la realització d'aquesta tesi.

A l'Antonio, pel seu valuós suport tècnic i per tenir cura dels animals; al Pepe pel seu suport administratiu.

Als membres del tribunal per acceptar la invitació i pel gran esforç que els ha suposat tot plegat.

Finalment, no vull oblidar-me de la meva família, i en especial de la meva mare. Moltes gràcies per tot el que has fet pels teus fills, i per continuar endavant a pesar de totes les adversitats que t'ha deparat la vida.

Per últim, i de manera més especial, a en Jesús, per haber estat al meu costat durant tots aquests anys i per la seva infinita paciència i comprensió.

A tots, moltes gràcies.

En memòria del meu pare

"La formulaci3n de un problema,
es m1s importante que su soluci3n. "

Albert Einstein

LISTA DE PUBLICACIONES

El trabajo de esta tesis doctoral ha estado publicado o está pendiente de publicarse en los siguientes artículos:

Porras M, Martín MT, Soler M & Vergara P. Intestinal motor disturbances associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G58-G64, 2004.

Porras M, Martín MT, Torres R & Vergara P. Cyclical up-regulated iNOS and long-term down-regulated nNOS are the basis for active and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G423-G430, 2006.

Porras M, Martín MT, Jury J, Yang PC, Perdue MH & Vergara P. Long-lasting epithelial barrier dysfunction allows the perpetuation of intestinal inflammation in a rat model of indomethacin-induced enteritis. (submitted to the *Am J Physiol*, 2006).

Abstracts publicados en relación con la Tesis:

Porras M, Martín MT, Soler M & Vergara P. A new chronic model of inflammatory bowel disease in the rat: cyclic motor disorders associated to the active and inactive phases. *Neurogastroenterology and Motility* 15: 589, 2003.

Porras M, Martín MT, Torres R & Vergara P. Motor disturbances are correlated with oscillation of COX-2 and iNOS expression in a chronic rat model of IBD. *Neurogastroenterology and Motility* 16: 842, 2004.

Porras M, Martín MT, Jury J, Yang PC, Perdue MH & Vergara P. Role of epithelial barrier dysfunction in the perpetuation of intestinal inflammation in the rat. *Neurogastroenterology and Motility* 17 (suppl.2): 48, 2005.

Porras M, Martín MT, Torres R & Vergara P. Nitric oxide and prostaglandins induce hypomotility during the active phase of IBD. *Neurogastroenterology and Motility* 17 (suppl.2): 47, 2005.

Porras M, Martín MT & Vergara P. Role of epithelial barrier dysfunction and changes in motor activity in the cyclical relapses of intestinal inflammatory disease. *Annals of N.Y. Acad Sci* 2006.

ABREVIATURAS

Ach	acetilcolina
APC	célula presentadora de antígeno
ATP	adenosín trifosfato
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CCK	colecistoquinina
CGRP	péptido relacionado al gen de la calcitonina
COX	ciclooxigenasa COX-1: ciclooxigenasa constitutiva COX-2: ciclooxigenasa inducible
Ddp	diferencia de potencial
EDRF	<i>endothelium-derived relaxing factor</i>
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
GALT	tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal
GCs	guanilato ciclasa soluble
GMC	<i>giant motor contraction</i>
GMPc	3' - 5' monofosfato de guanosina cíclico
HRP	<i>horseradish peroxidasa</i>
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
ICC	célula intersticial de Cajal
IFN- γ	interferón gamma
IL	interleucina
IPAN	<i>intrinsic primary afferent neuron</i>
IFAN	<i>intestinfugal afferent neuron</i>
I _{sc}	corriente de cortocircuito
ITF	<i>intestinal trefoil factor</i>
L-NIL	L-N6-(1-iminoethyl)-lysine
L-NNA	N-nitro-L-arginina
MALT	tejido linfoide asociado a la mucosa
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MMC	complejo motor migratorio
NDV	núcleo dorsal del vago

NO	óxido nítrico
NOD	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
NOS	sintetasa de óxido nítrico nNOS: sintetasa de óxido nítrico neuronal eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible
NPY	neuropéptido Y
NT	neurotransmisor
NTS	núcleo del tracto solitario
PACAP	polipéptido activador de la adenil ciclasa de pituitaria
RMC	<i>retrograde motor contraction</i>
SCID	inmunodeficiencia combinada severa
SNC	sistema nervioso central
SNE	sistema nervioso entérico
SP	sustancia P
TER	resistencia transepitelial
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
VIP	péptido intestinal vasoactivo

INTRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación se centra en la caracterización de un modelo experimental de Enfermedad Inflamatoria Intestinal en la rata con el objetivo de aportar nuevos conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad y ensayar nuevas estrategias terapéuticas. Concretamente, el estudio se ha centrado en la caracterización de los mecanismos responsables de la disfunción motora provocada por la inflamación intestinal, así como en el papel que juegan estas alteraciones motoras en la cronificación del proceso inflamatorio.

La inflamación intestinal es una de las causas más frecuentes de patología digestiva. Bajo el nombre de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII o IBD, del inglés *Inflammatory Bowel Disease*) se agrupan dos enfermedades inflamatorias crónicas y recidivantes de etiología desconocida: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Estas enfermedades se caracterizan porque, una vez que se han puesto de manifiesto, dan lugar a la aparición espontánea de recaídas, confiriendo a la enfermedad su carácter crónico de curso impredecible. A pesar de que la investigación clínica ha permitido profundizar de modo importante en el conocimiento de la enfermedad, hasta el momento no existe ningún tipo de tratamiento curativo y/o que prevenga la recidiva. Por este motivo, es imprescindible el desarrollo de modelos experimentales que permitan mejorar los conocimientos sobre la fisiopatología de la enfermedad y así disponer de nuevas dianas farmacológicas para su tratamiento.

En la etiología de estas patologías, que aún no se halla completamente definida, parecen intervenir factores genéticos, inmunológicos y ambientales (Fiocchi, 1998). Diferentes estudios han demostrado que los antígenos bacterianos presentes en la luz intestinal podrían desempeñar un papel clave en el desarrollo y/o la perpetuación de la EII en individuos genéticamente predispuestos (McPherson *et al.*, 1996). La integridad de la función de barrera epitelial es indispensable para evitar la excesiva penetración de antígenos alimentarios, microorganismos y toxinas bacterianas dentro del epitelio, por lo que alteraciones a este nivel pueden favorecer la continua estimulación del sistema inmunitario y provocar la cronificación del proceso inflamatorio.

Uno de los signos clínicos de la inflamación es la pérdida de funcionalidad. En el caso de la EII, hay evidencias de que algunos de los síntomas que presentan estos

pacientes, como son dolor abdominal, retortijones y diarrea, podrían estar relacionados con una alteración de la función motora intestinal. No obstante, son pocos los estudios realizados para valorar la función motora o la sensibilidad a los reflejos digestivos en estos pacientes (Rao *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1991; Annese *et al.*, 1997), por lo que se desconoce la implicación que pueden tener estos desórdenes en la patogénesis de la enfermedad.

Debido al importante papel que juegan las bacterias luminales en la patogénesis de la EII, y teniendo en consideración que la motilidad intestinal es la principal reguladora de la carga microbiana (Husebye, 1995) nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente: la liberación de mediadores inflamatorios tras un estímulo inflamatorio agudo produciría una reestructuración del sistema nervioso entérico que daría lugar a alteraciones funcionales crónicas, incluyendo cambios en la actividad motora intestinal. Estas alteraciones de la motilidad podrían facilitar el sobrecrecimiento y la translocación de bacterias luminales, perpetuando la agresión antigénica y dando lugar a la cronificación de la respuesta inflamatoria.

Seguidamente, para poder entender mejor el trabajo, revisaremos algunos de los conceptos anatómicos y fisiológicos del intestino, así como algunos aspectos relacionados con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y los modelos experimentales en uso. Al mismo tiempo, intentaremos resumir los conocimientos existentes respecto al efecto de los principales mediadores inflamatorios que han sido evaluados en este trabajo sobre la funcionalidad motora intestinal.

Estructura y función del intestino delgado

1.1 Anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal de los mamíferos es un órgano de forma tubular que va desde la boca hasta el ano y donde vacían su contenido toda una serie de glándulas anexas. De oral a aboral, el tracto gastrointestinal está formado por: la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado (dividido en duodeno, yeyuno e íleon), el intestino grueso o colon, el recto y el ano.

Histológicamente, se evidencia un plano arquitectónico común para todo el tracto gastrointestinal desde el esófago hasta el ano compuesto por cuatro capas concéntricas que constituyen la pared de este largo conducto: mucosa, submucosa, muscular y serosa (figura 1). Estas capas se describen desde el interior hacia el exterior de la luz gastrointestinal (Gartner & Hiatt, 2002):

- La capa más interna y en contacto directo con el medio externo es la mucosa, que está compuesta por tres capas concéntricas: [1] un revestimiento epitelial con funciones secretora y absorptiva; [2] la lámina propia, formada por tejido conectivo que contiene glándulas, vasos sanguíneos y una gran variedad de células con funciones defensivas y de comunicación intercelular y [3] una fina capa de células musculares lisas, la *muscularis mucosae*, que separa la mucosa de la submucosa.

- La submucosa es un componente de tejido conectivo grueso que sostiene físicamente la mucosa. En ella encontramos gran cantidad de glándulas de secreción, vasos sanguíneos, células del sistema inmunitario y el plexo submucoso o de Meissner, con neuronas que controlan la secreción.

- La muscular externa está formada por células musculares lisas distribuidas estructuralmente en dos capas: la circular, más interna, y la longitudinal, más externa. Entre ambas capas musculares se encuentra el plexo mientérico o de Auerbach, formado por estructuras nerviosas organizadas en ganglios y haces nerviosos interconectados, responsables de controlar las funciones motoras del tracto gastrointestinal.

- La serosa (adventicia en el esófago) es la capa más alejada de la luz, formada por una lámina continua de células epiteliales planas, llamada mesotelio, y por una capa de tejido conectivo elástico que la separa de la capa muscular subyacente.

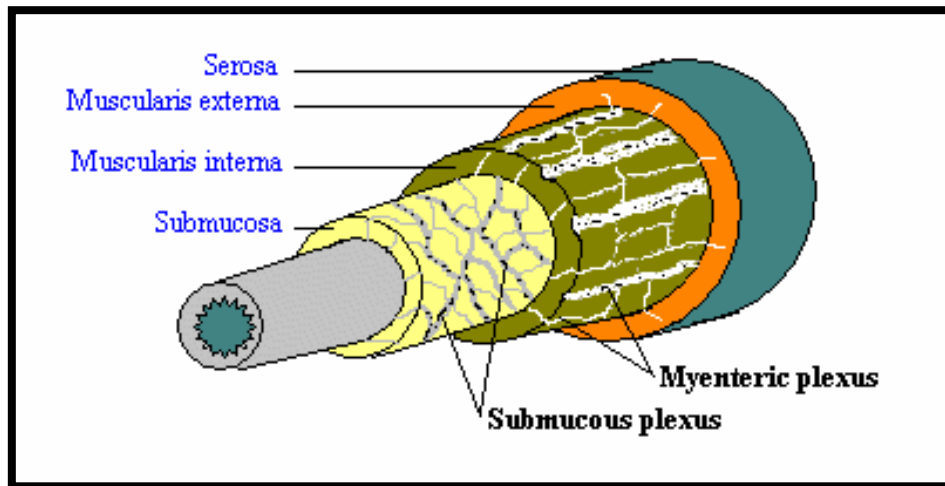


Figura 1. Anatomía de las diferentes capas que forman el tracto gastrointestinal.

(Christensen, 2001)

La función principal del aparato digestivo es permitir que los alimentos ingeridos puedan ser digeridos y absorbidos para proveer al organismo los nutrientes necesarios para el mantenimiento general de las funciones corporales, a la vez que protege frente a la intrusión de agentes nocivos. Estos objetivos se consiguen gracias a la respuesta integrada de tres sistemas que se hallan ampliamente distribuidos por todo el organismo: sistema nervioso, sistema inmunitario y sistema endocrino (Meyer, 1985; Tresguerres, 1992; Gartner & Hiatt, 2002).

De forma muy simplificada, el proceso digestivo se inicia cuando el alimento entra por la boca, donde es reducido de tamaño gracias a la masticación y donde se inicia la digestión gracias a la mezcla con la secreción salivar. Una vez deglutido, el alimento es conducido hasta el estómago a través del esófago. En el estómago, el bolo alimenticio es triturado y mezclado con las secreciones gástricas hasta obtener partículas lo suficientemente pequeñas (quimo) como para entrar en el intestino delgado a través del píloro. En el intestino delgado, las partículas de alimento son digeridas por diferentes enzimas y absorbidas a través del epitelio intestinal. Las partículas no digeridas son conducidas hasta el colon, donde se produce la reabsorción de una importante cantidad de agua, y finalmente son evacuadas al exterior a través del ano.

Los procesos motores son muy importantes en la función alimenticia, ya que aseguran una correcta trituración, mezcla y propagación del contenido a lo largo del tracto gastrointestinal, así como la expulsión final de la materia fecal

1.2 Barrera mucosa intestinal

La mucosa intestinal, que está en contacto inmediato con el contenido intestinal (medio externo), debe considerarse como un órgano sensitivo y de barrera que facilita la absorción de nutrientes al tiempo que protege frente a la intrusión de agentes nocivos, incluyendo microorganismos, antígenos proteicos y toxinas que entran en el tracto digestivo con la dieta, o que son producidos por las bacterias que colonizan el intestino.

La lámina propia del intestino delgado presenta toda una serie de evaginaciones digitiformes conocidas como vellosidades, cuyo objetivo es incrementar la superficie absorptiva del intestino (figura 2). Las vellosidades están cubiertas por un epitelio cilíndrico simple formado principalmente por enterocitos absorptivos, entre los que se sitúan células caliciformes productoras de mucus, células enteroendocrinas que liberan hormonas y células de Paneth productoras de defensinas. El epitelio que recubre los folículos linfoides también presenta células M especializadas, que fagocitan y transportan antígenos luminales hacia la lámina propia.

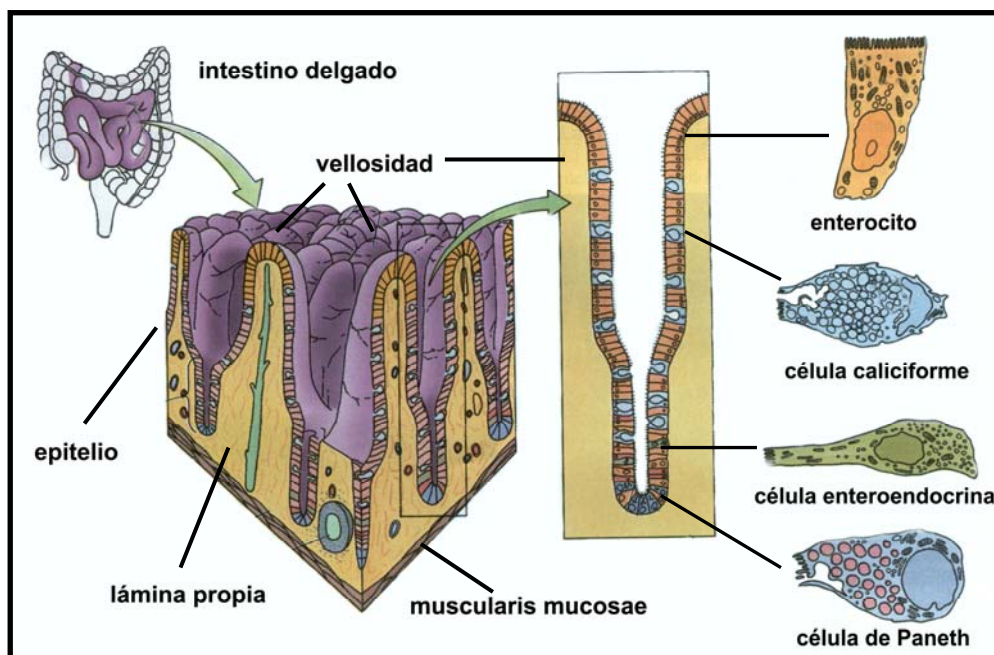


Figura 2. Esquema de la mucosa intestinal. (Adaptado de Gartner & Hiatt, 2002).

La lámina propia ejerce básicamente funciones de defensa y estructura, además de participar en el transporte de las sustancias absorbidas a nivel intestinal.

La muscularis mucosae interviene en el control de la absorción y secreción del epitelio intestinal, ya que durante la digestión sus fibras musculares se contraen rítmicamente modificando la extensión de las vellosidades (Madara & Trier, 1994).

1.2.1 Mecanismos defensivos

La mucosa intestinal es continuamente bombardeada por gran variedad de microorganismos y antígenos proteicos. Para hacer frente a estos agentes nocivos, el intestino dispone de diferentes sistemas de defensa, incluyendo mecanismos inmunológicos y no inmunológicos.

- Mecanismos de defensa no inmunológicos

El principal componente estructural que determina la integridad de la barrera intestinal es el propio epitelio, a través de la formación de fuertes uniones intercelulares. Otros componentes que ayudan a preservar la integridad de la barrera intestinal son:

-El glucocáliz, una red formada por mucopolisacárido ácido y glicoproteína que recubre toda la superficie epitelial, donde queda atrapado el mucus producido por las células caliciformes. Esta capa protege las células epiteliales de la fricción, de la digestión química y evita que se adhieran las bacterias lumbinales.

-Moléculas con capacidad defensiva, como las defensinas producidas por las células de Paneth que están dirigidas contra diferentes tipos de microorganismos, o el *intestinal trefoil factor* (ITF) sintetizado por las células caliciformes, que protege el epitelio frente a una gran variedad de agentes nocivos (toxinas bacterianas, compuestos químicos, fármacos) a la vez que juega un papel clave en la restitución de la mucosa.

-Secreción de agua e iones que dificultan la adherencia de las bacterias al epitelio, y enzimas que degradan las macromoléculas presentes en la luz intestinal evitando su captación.

A pesar de todos los mecanismos defensivos descritos anteriormente, la barrera intestinal no previene totalmente el paso de antígenos lumbinales, bien sea a través del epitelio por un mecanismo de endocitosis (vía transcelular) o a través de las uniones intercelulares (vía paracelular), por lo que es necesario un segundo nivel de control: el sistema inmune (Perdue, 1999; Farhadi *et al.*, 2003; MacDonald & Monteleone, 2005).

- Mecanismos de defensa inmunológicos

La inmunidad se puede definir como la reacción del organismo a sustancias extrañas, incluyendo microorganismos y macromoléculas de naturaleza diversa (proteínas, polisacáridos), sin consecuencias patológicas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, y su respuesta coordinada

y colectiva a la entrada de sustancias extrañas es la respuesta inmune, que puede ser de tipo innato o adquirido (Abbas *et al.*, 1997).

Los componentes celulares de la inmunidad innata (células fagocíticas como los neutrófilos y macrófagos, además de otros leucocitos como las células *natural killer*), se caracterizan por reaccionar de una manera general, no específica, frente a diferentes sustancias. Por contra, los componentes celulares de la inmunidad adquirida o específica (linfocitos), son estimulados por la exposición a un agente específico (antígeno), y su respuesta aumenta en magnitud y en capacidad defensiva con cada exposición sucesiva al mismo.

En condiciones normales la mucosa intestinal presenta un estado de “inflamación fisiológica” que se manifiesta por la presencia de abundantes leucocitos en los compartimentos intra y subepitelial, formando parte de una serie de especializaciones llamadas colectivamente GALT (tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal) (figura 3). Las células inmunitarias se pueden encontrar en tres compartimentos diferentes: [1] de manera no organizada en la lámina propia, donde se incluyen linfocitos T, células plasmáticas productoras de anticuerpos, células dendríticas, macrófagos, basófilos, eosinófilos y mastocitos, [2] entre las células epiteliales (linfocitos intraepiteliales), [3] en folículos linfoides organizados (placas de Peyer), donde se incluyen linfocitos T y B.

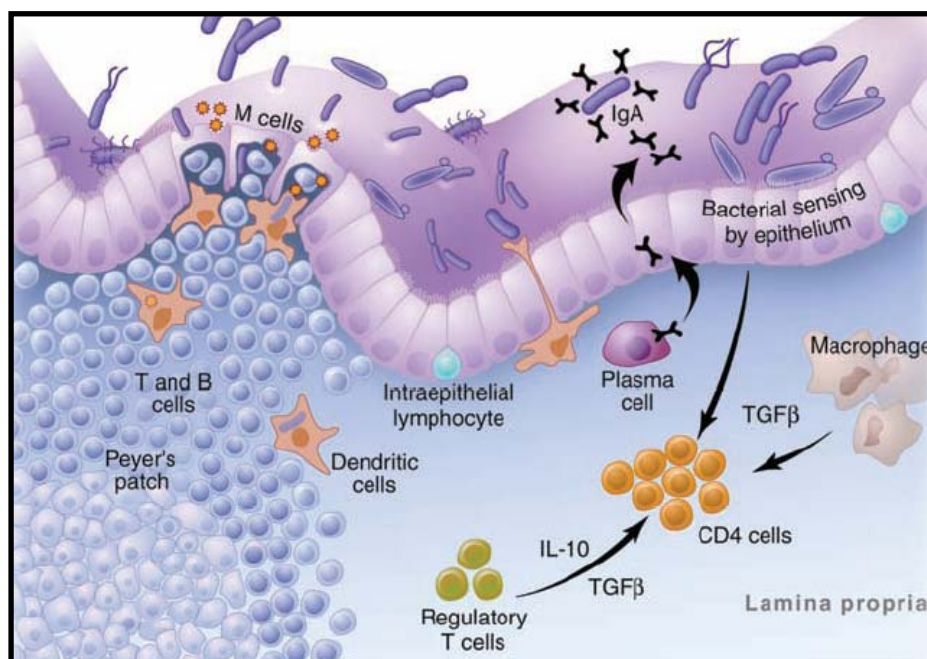


Figura 3. Representación esquemática dónde se muestran los principales componentes del sistema inmune intestinal. (MacDonald & Monteleone, 2005).

La respuesta inmune específica frente a agentes extraños, producida por linfocitos efectores localizados en la lámina propia y a nivel intraepitelial, se consigue gracias a un mecanismo previo de reconocimiento antigénico (inducción) que tiene lugar en las placas de Peyer.

El epitelio que recubre las placas de Peyer contiene células M especializadas que transportan antígenos lumbinales desde la luz intestinal hasta los folículos linfoides, donde son procesados por macrófagos y células dendríticas y después presentados a linfocitos T locales, que estimulan a su vez linfocitos B. Los linfocitos activados se diferencian en células efectoras (destinadas a la eliminación del antígeno) o en células de memoria (preparadas para responder a la re-exposición al antígeno). Cierta proporción de estos linfocitos activados migran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, desde donde pasan a la circulación y a localizarse en el MALT (tejido linfoide no intestinal asociado a la mucosa) y en el GALT, utilizando receptores específicos y vénulas postcapilares para guiar su localización.

Los diferentes tipos de linfocitos se diferencian en células efectoras distintas. La mayoría de linfocitos T que se localizan a nivel intraepitelial pertenecen al subtipo CD8+ (citotóxico) que lisa directamente las células que contienen los antígenos extraños, mientras que los situados en la lámina propia pertenecen mayoritariamente al subtipo CD4+ (inductor/colaborador) que secreta citocinas que aumentan las funciones de los fagocitos y estimulan la respuesta inflamatoria. Los linfocitos B se diferencian en células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas hacia la luz intestinal, principalmente IgA, que modulan e inhiben la colonización bacteriana del epitelio e impiden la entrada de antígenos lumbinales solubles (Brandtzaeg *et al.*, 1989; Kagnoff, 1994; Neutra 1998; Salminen *et al.*, 1998; Brandtzaeg, 2002).

El sistema inmune mucoso se halla fuertemente regulado para poder reaccionar frente a la entrada de agentes patógenos o sustancias nocivas, a la vez que permanece inactivo frente a la flora comensal y los antígenos inocuos de la dieta, hecho que se conoce como tolerancia oral (Mowat, 2003). Hoy en día todavía se desconoce cómo es capaz el sistema inmune de hacer esta discriminación, pero diferentes estudios han demostrado que alteraciones en la función de la barrera epitelial pueden provocar la pérdida de tolerancia hacia las bacterias comensales residentes en la luz intestinal y desencadenar la cronificación de los procesos inflamatorios (Duchmann *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1995, McPherson *et al.*, 1996; Schultz *et al.*, 1999).

1.2.2 Permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal es un proceso altamente regulado que limita de forma selectiva el paso de moléculas, tanto a nivel de los espacios intercelulares como a través del epitelio. En este punto es importante distinguir entre los conceptos de absorción y permeación, ya que mientras que el primero de ellos hace referencia a un tipo de transporte mediado por receptor con implicaciones nutricionales, el segundo hace referencia a la propiedad de la membrana celular de permitir el paso de solutos por difusión. Es este último concepto el que tiene interés en el contexto de este trabajo.

El paso de moléculas a través de la vía paracelular se halla limitado por las fuertes uniones que se forman entre las zonas apicales de las membranas laterales de las células epiteliales (*tight junctions*) (figura 4). Hasta hace relativamente poco tiempo se creía que estas uniones eran estructuras pasivas que limitaban el paso de todas aquellas moléculas que superaban un determinado peso molecular. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que las llamadas *tight junctions* son en realidad complejas estructuras dinámicas, que se abren o se cierran en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos, de forma que restringen de manera selectiva el paso de los solutos luminales (Balda, 1998; Matter & Balda, 2003).

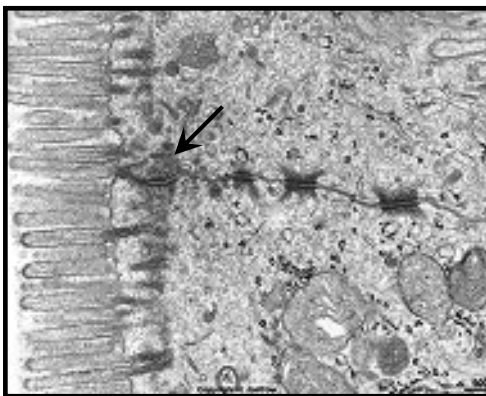


Figura 4. Microfotografía electrónica donde se puede observar una *tight junction* entre dos células epiteliales. (Matter & Balda, 2003).

El paso de moléculas a través de las células epiteliales (permeabilidad transcelular) se produce por un mecanismo de endocitosis. El evento inicial que desencadena este proceso es la interacción entre las moléculas luminales y componentes de la membrana celular, dando lugar a la invaginación de la membrana y la formación de pequeñas vesículas (endosomas). Tras su captación, las moléculas incluidas dentro de los endosomas migran hacia la región supranuclear, donde se unen a lisosomas y son digeridas enzimáticamente. No obstante, existe una pequeña proporción de moléculas que consiguen escapar a la acción de estas enzimas lisosomales, siendo posteriormente

transportadas al exterior de la célula y liberadas en la lámina propia por un mecanismo de exocitosis (Farhadi *et al.*, 2003).

1.2.3 Valoración de la permeabilidad intestinal: cámara de Ussing

La cámara de Ussing, una de las herramientas más utilizadas actualmente en el estudio *in vitro* de la función de la barrera epitelial, fue inventada en el año 1950 por Hans H. Ussing con el objetivo de estudiar el transporte iónico a través de la piel de la rana (Ussing & Zerhan, 1950). El propósito inicial que buscó Ussing al diseñar la cámara es simple: aplicar una corriente externa para conseguir que la diferencia de potencial entre las dos caras de un epitelio sea cero. Bajo estas condiciones, si la concentración de un determinado ion es la misma en ambos lados del epitelio y no hay fuerzas externas que provoquen su transporte, la ratio de su flujo a través de los compartimentos mucosal/serosal es uno. Al contrario, si el ion es transportado de forma activa, la ratio de su flujo es diferente a uno (Ussing & Zehram, 1951).

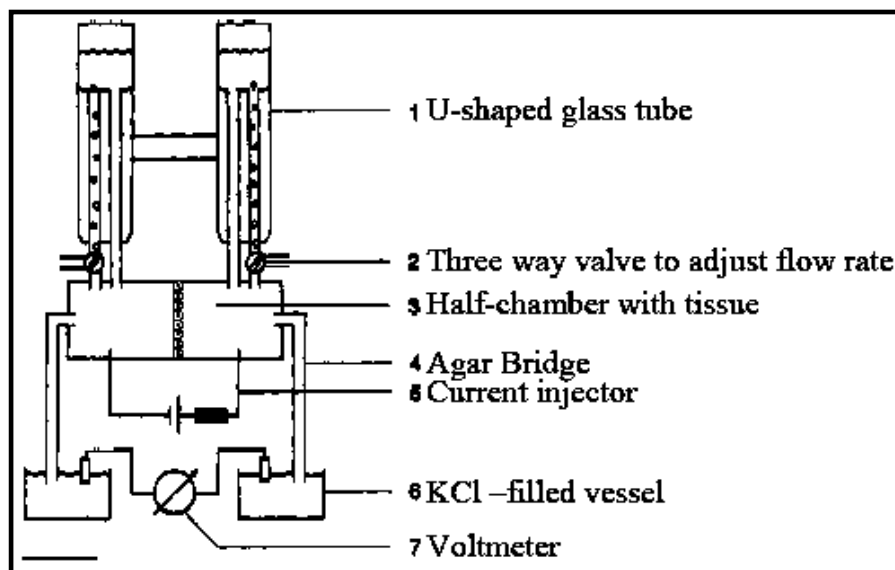


Figura 5. Representación esquemática de una cámara de Ussing. (Hug, 2002).

El diseño actual de la cámara de Ussing se muestra en la figura 5. Cada cámara consta de dos piezas separadas que permiten colocar, entre ambas, un epitelio aislado y crear dos compartimientos (mucosal/serosal). La cámara está conectada a un reservorio en el que se introduce solución nutritiva, permitiendo la continua perfusión del tejido. Dos pares de electrodos permiten medir la diferencia de potencial (ddp) entre ambas caras e inyectar la intensidad de corriente necesaria para conseguir que la ddp sea cero (corriente de cortocircuito).

Los parámetros más frecuentemente evaluados son la corriente de cortocircuito (I_{sc}), un reflejo del transporte activo de iones a través del epitelio (Holtug *et al.*, 1996), y la resistencia transepitelial (TER). El paso neto de iones y moléculas de bajo peso molecular a través de las *tight junctions* está directamente relacionado con la inversa de la resistencia (conductancia) por lo que este parámetro se considera un indicador de la permeabilidad paracelular (Karnaky, 1992).

Además de permitir la medición de diferentes parámetros eléctricos, las cámaras de Ussing se utilizan para determinar el grado de permeación de moléculas de diferente tamaño a través de la barrera epitelial. (Sun *et al.*, 1998). Para poder monitorizar su movimiento, estas moléculas (*tracers*) suelen estar marcados con fluorescencia (ej. FITC-dextrano) o radiactivamente (ej. ^{51}Cr -EDTA, ^3H -manitol). Otra opción consiste en utilizar proteínas que pueden ser fácilmente detectadas mediante técnicas enzimáticas, como la peroxidasa del rábano (*horseradish peroxidase*, HRP).

1.3 Control nervioso del intestino delgado

La compleja integración de la función gastrointestinal está controlada en primer lugar por neuronas intrínsecas del tracto digestivo, que constituyen el denominado sistema nervioso entérico (SNE). Aunque estas neuronas son responsables de la actividad refleja del sistema en ausencia de *inputs* procedentes del sistema nervioso central (SNC), también reciben influencia de vías nerviosas procedentes del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), formando conjuntamente un sistema coordinado e integrado de regulación funcional.

1.3.1 Inervación intrínseca

El SNE es una estructura altamente compleja, cuyas características morfológicas y funcionales lo hacen muy semejante al sistema nervioso central, por lo que también se le conoce como “el cerebro del intestino” (Gershon, 1998).

El SNE está formado por unos 100 millones de neuronas rodeadas de un tipo de células especiales, llamadas células gliales entéricas, que les sirven de apoyo y protección además de proveerles nutrientes (Ruhl *et al.*, 2004). Los cuerpos celulares de las neuronas entéricas se agrupan en dos grandes plexos ganglionares interconectados mediante fibras nerviosas: el plexo submucoso o de Meissner, situado en la submucosa, siendo sólo prominente a nivel intestinal, y el plexo mientérico o de Auerbach, situado

entre las capas musculares circular y longitudinal de todo el tracto digestivo (figura 6). La principal función de las neuronas del plexo mientérico es la de controlar la motilidad de todo el tracto gastrointestinal (Costa & Brookes, 1994; Olsson & Holmgren, 2001). Al contrario, el plexo submucoso juega un papel importante en el control de la absorción y secreción de agua e iones a través del epitelio intestinal, reflejos endocrinos y aporte sanguíneo de la mucosa (Cooke & Reddix, 1994; Surprenant, 1994). En el intestino existe un tercer plexo aganglionar situado en la profundidad de la musculatura circular, el plexo muscular profundo, formado por fibras nerviosas que intervienen en la regulación de la neurotransmisión inhibitoria a nivel local (Kunze & Furness, 1999).

Las neuronas del SNE pueden agruparse en tres categorías de acuerdo con su funcionalidad: neuronas sensitivas, interneuronas y motoneuronas (Furness, 2000). Estos tipos neuronales son elementos esenciales para la existencia de arcos reflejos intrínsecos independientes de un control central. De manera esquemática, los reflejos entéricos se inician cuando los diferentes estímulos captados por las terminaciones sensitivas se transforman en potenciales de acción que se transmiten a las interneuronas localizadas en los ganglios entéricos, donde son procesados e integrados. La activación de neuronas motoras específicas da lugar a una respuesta (excitatoria o inhibitoria) en los sistemas finales efectores, donde se incluyen las células epiteliales, la muscularis mucosae, los vasos sanguíneos, las capas musculares externas y las glándulas secretoras localizadas en la submucosa (Kunze & Furness, 1999; Furness *et al.*, 2004).

- Neuronas sensitivas

Las neuronas sensoriales intrínsecas reciben el nombre de IPANs (*intrinsic primary afferent neurons*). Los cuerpos celulares de estas neuronas se localizan tanto a nivel del plexo mientérico como del plexo submucoso, mientras que las áreas receptoras se localizan principalmente en la musculatura de la pared y en la mucosa. Las terminaciones libres de estas neuronas tienen receptores capaces de responder a estímulos químicos, térmicos o mecánicos, transformando cambios de energía en señales eléctricas. A nivel del plexo mientérico se ha visto que, además de hacer sinapsis con interneuronas, las IPANs están conectadas entre ellas formando una red funcional que responde simultáneamente ante un mismo estímulo, amplificando así la respuesta refleja (Furness *et al.*, 2004).

Un segundo tipo de neurona sensitiva cuyo cuerpo celular se localiza a nivel del plexo mientérico son las denominadas neuronas intestinofugales (IFANs) (Sharkey *et*

al., 1998; Szurszewski *et al.*, 2002). Mientras que las IPANs están involucradas en el control de reflejos nerviosos locales, las neuronas intestino-fugales establecen sinapsis con neuronas simpáticas a nivel de los ganglios prevertebrales, por lo que intervienen en el control de reflejos entero-entéricos entre diferentes regiones del tracto gastrointestinal (Furness, 2006).

- Interneuronas

Las interneuronas del plexo mientérico mantienen múltiples conexiones entre sí, formando largas cadenas en sentido oral (ascendentes) y aboral (descendentes) a lo largo de todo el tracto intestinal. Estos circuitos son capaces de descifrar y procesar la información proveniente de las neuronas sensoriales y generar programas de respuestas reflejas motoras mediante la activación de motoneuronas (Furness *et al.*, 2004).

- Motoneuronas

Las neuronas motoras son el brazo efector del sistema que transmite las señales, estimulantes o inhibitorias, a los distintos efectores. Las neuronas responsables del control de los reflejos motores intrínsecos se localizan a nivel del plexo mientérico e inervan a ambas capas musculares. Tras la aplicación de un estímulo eléctrico apropiado se produce la despolarización neural (mediada por canales de sodio operados por voltaje) y la liberación de neurotransmisores debido a la entrada de calcio a través de los terminales nerviosos. La interacción neurotransmisor-receptor muscular provoca toda una serie de cambios intracelulares en la célula muscular que pueden dar lugar a cambios en su potencial de membrana. El efecto final puede ser una despolarización, que da lugar a la contracción celular, o una hiperpolarización, que provoca la relajación de la célula (North, 1982; Galligan, 1998; Lecci *et al.*, 2002).

Hasta la fecha, han sido identificadas más de 25 sustancias capaces de actuar como neurotransmisores (NT) en las neuronas del tracto gastrointestinal, pudiendo ser de naturaleza tan diversa como aminas, aminoácidos, purinas, gases o péptidos. Los NT excitadores más importantes en la regulación de la función motora son la acetilcolina (ACh) y las taquiquininas (SP, neuroquinina A y B) (Yunker *et al.*, 1999), mientras que los principales NT inhibitorios son el óxido nítrico (NO), el ATP y los péptidos VIP, PACAP y CGRP (Vanneste *et al.*, 2004). Otros NT descritos a nivel intestinal participarían como co-transmisores o como moduladores de los citados anteriormente.

Mientras que la mayoría de las motoneuronas que inervan la capa muscular longitudinal son excitadoras, en la capa muscular circular existe un predominio de la

inervación inhibitoria. Este hecho da lugar al fenómeno conocido como “tono inhibitorio” que afecta a la capa circular y que tiene un significado funcional muy importante, ya que la disminución del tono muscular favorece el tránsito intestinal.

En la siguiente tabla se resumen los diferentes tipos de neuronas efectoras localizadas en el intestino de la rata (adaptado de Furness, 2000):

tipo de neurona	efector	principal NT	otros NT	efecto
plexo mientérico				
1. Motoneurona excitatoria	músculo circular músculo longitudinal	ACh	taquiquininas (SP, neurokinin A)	contracción muscular
2. Motoneurona inhibitoria	músculo circular músculo longitudinal	NO	ATP, VIP, PACAP, CGRP, CO	relajación muscular
plexo submucoso				
1. Motoneurona excitatoria	muscularis mucosae	ACh	?	contracción muscular
2. Motoneurona inhibitoria	muscularis mucosae	NO, ATP, VIP, PACAP, CGRP, CO		relajación muscular
3. Secretomotora vasodilatadora	células epiteliales, glándulas (mucosa)	tipo A: colinérgicas. Principal NT: acetilcolina. Otros NT: calretinina		secreción de agua y electrolitos
	vasos sanguíneos submucosa	tipo B: no-colinérgicas. Principal NT: VIP. Otros NT: ?		vasodilatación
4. Secretomotora	células epiteliales, glándulas (mucosa)	ACh	NPY	secreción de agua y electrolitos
5. Motoneurona	células endocrinas	variable en función de la célula involucrada		

Como puede observarse en la tabla anterior, la acetilcolina y el NO son los principales neurotransmisores involucrados en la contracción y en la relajación respectivamente del músculo liso intestinal en la rata. Por este motivo, y tal como veremos más adelante, en nuestros estudios hemos utilizado la respuesta motora tras la administración de L-NNA (un inhibidor de la síntesis de NO) o atropina (un inhibidor de los receptores colinérgicos) como parámetro para evaluar el estado del tono inhibitorio y excitatorio intestinal, respectivamente.

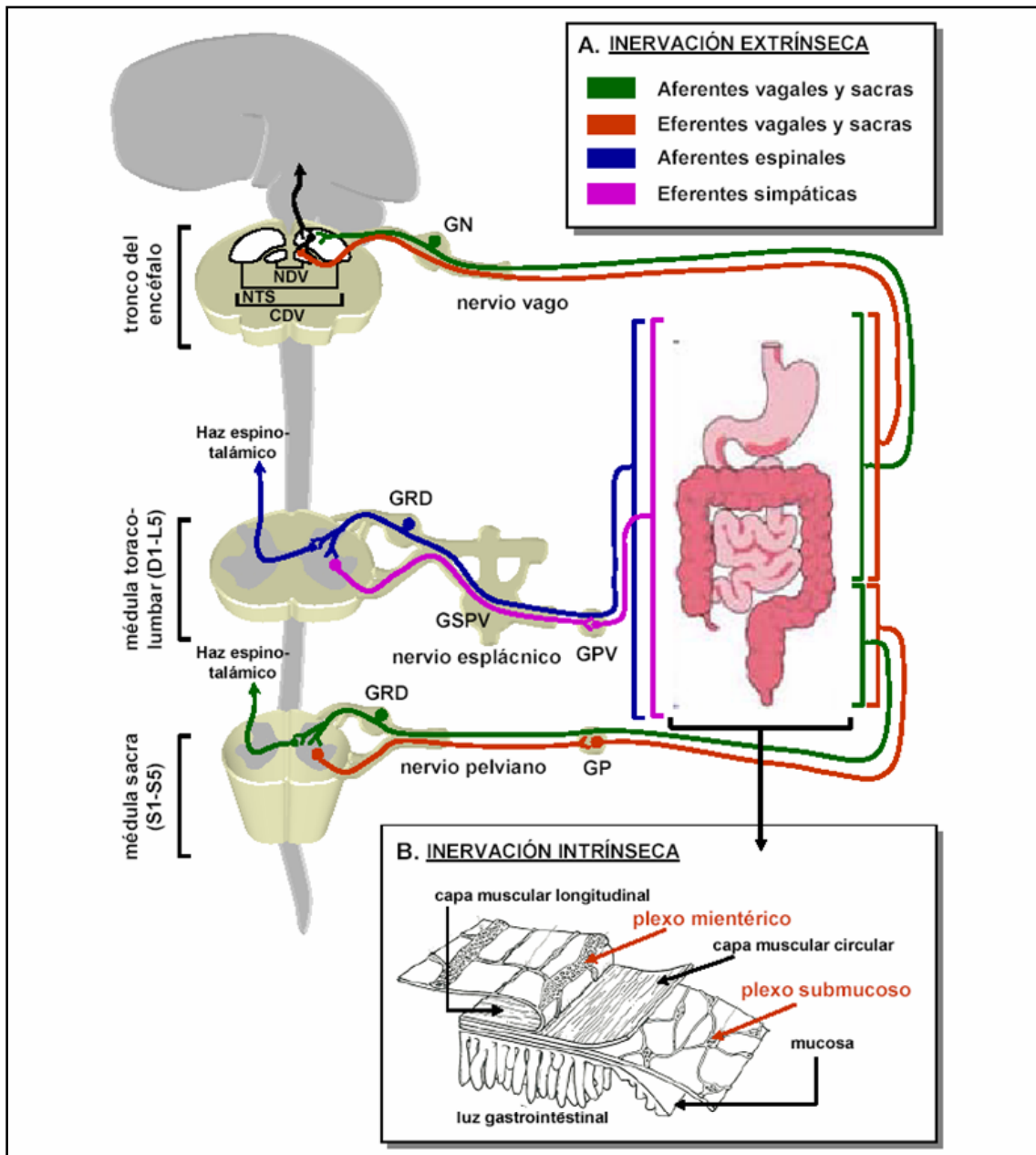


Figura 6. Inervación del tracto gastrointestinal. A: Vías aferentes y eferentes de los sistemas simpático y parasimpático que regulan la función gastrointestinal. B: Distribución de los plexos nerviosos entéricos en el tracto gastrointestinal. CDV, complejo dorsal vagal; NDV, núcleo dorsal del vago; NTS, núcleo del tracto solitario; GSPV, cadena simpática paravertebral; GN, ganglio nodoso; GP, ganglio pélvico; GPV, ganglios prevertebrales (celíaco, mesentérico superior e inferior y pélvico); GRD, ganglio de la raíz dorsal. (Adaptado de Furness & Costa, 1987).

1.4.1 Inervación extrínseca

La inervación extrínseca del intestino delgado procede del sistema nervioso autónomo o visceral. Tanto el sistema nervioso parasimpático como el simpático contienen fibras aferentes sensitivas que transmiten información al SNC, y fibras eferentes motoras que inervan los órganos efectores (figura 6).

- **Inervación vagal (parasimpático)**

El nervio vago es el principal nexo de unión entre el sistema nervioso central y entérico involucrado en la regulación de la función gastrointestinal.

-Fibras aferentes vagales: La vía aferente representa el 80-90% de todas las fibras del nervio vago. Son fibras amielínicas cuyos cuerpos celulares se encuentran en el ganglio nodoso y sus axones terminan en el núcleo del tracto solitario (NTS) situado en el tronco del encéfalo. En este núcleo convergen impulsos somáticos y viscerales de diferentes partes del organismo, contribuyendo a la integración de la información somática y visceral (Grundy, 2002). Las fibras sensitivas aferentes se distribuyen abundantemente por todo el recorrido intestinal y proyectan terminaciones a todas las capas de la pared intestinal. Estas terminaciones pueden responder a estímulos químicos, mecánicos u hormonales y, aunque envían la información al SNC, se ha visto que también pueden activar de forma refleja las vías eferentes motoras. Un buen ejemplo sería la mayor parte de acciones motoras intestinales que se desencadenan tras la secreción postprandial de colecistoquinina (CCK) y que son mediadas a través de un reflejo vago-vagal. Es por esto, tal como veremos más adelante, que en nuestros estudios hemos utilizado la respuesta motora a la administración de CCK exógena como parámetro para evaluar el estado de estos circuitos durante la inflamación intestinal.

-Fibras eferentes vagales: La vía eferente que va al intestino nace del núcleo motor dorsal del vago (NDV) situado en el tronco del encéfalo. Son fibras colinérgicas que no inervan directamente los efectores, sino que se proyectan hacia los ganglios del plexo mientérico, donde hacen sinapsis con las interneuronas excitatorias e inhibitorias. Esto explica que un número relativamente bajo de fibras eferentes (10-20% del total de fibras vagales) tenga efectos sobre un área tan extensa, influyendo de manera simultánea en cambios de la motilidad, secreción y microcirculación intestinal. El efecto básico de la estimulación parasimpática es un incremento general de la actividad intestinal, tanto motora como secretora (Berthoud *et al.*, 1995).

- Inervación espinal (simpática)

-Fibras aferentes espinales: La vía aferente simpática tiene sus cuerpos celulares en el ganglio de la raíz dorsal, en la porción torácica de la médula espinal, y su proyección central termina en el asta posterior de la médula espinal. Además de transmitir información visceral al SNC, estas neuronas también pueden actuar de forma directa sobre sistemas efectores gastrointestinales próximos, mediante la realización de sinapsis con fibras eferentes motoras en los ganglios prevertebrales (Grundy, 2002; Szurszewski *et al.*, 2002).

-Fibras eferentes espinales: Las fibras pre-ganglionares simpáticas (colinérgicas) que van hacia el intestino tienen sus cuerpos celulares en los segmentos espinales T5-T11 y envían sus axones hacia los ganglios prevertebrales celiaco y mesentérico superior, donde hacen sinapsis con las neuronas post-ganglionares (noradrenérgicas). Las fibras nerviosas pueden terminar directamente en las estructuras efectoras (vasos sanguíneos, glándulas) o hacer sinapsis con las interneuronas del plexo mientérico. El efecto básico de la estimulación simpática a nivel intestinal es una inhibición general, tanto de la secreción como de la motilidad (Gershon *et al.*, 1994; Renehan *et al.*, 1995).

1.4 Motilidad intestinal

Podríamos definir la motilidad intestinal como el conjunto de contracciones coordinadas de las capas musculares del intestino que permiten llevar a cabo la digestión de los alimentos, la asimilación de los nutrientes y la eliminación de los residuos no digeridos. Toda esta complejidad motora está coordinada por las propiedades intrínsecas de la célula muscular lisa del intestino, por la actividad eléctrica biogénica de las células intersticiales de Cajal (ICCs), por el SNE, por influencias nerviosas extrínsecas y por acciones hormonales e inmunitarias (Granger *et al.*, 1985).

1.4.1 Actividad marcapasos y ondas lentas

Las células musculares lisas intestinales presentan una propiedad eléctrica intrínseca que consiste en la oscilación cíclica de su potencial de membrana: son las denominadas ondas lentas (Makhlouf, 1994). La actividad contráctil intestinal está determinada por esta actividad eléctrica, de manera que siempre que la célula se despolariza por encima de un determinado umbral de descarga se produce un potencial de acción “en espiga” y la activación de los mecanismos involucrados en el proceso de acoplamiento excitación-contracción, con la consiguiente contracción de la célula muscular (figura 7).

El proceso de acoplamiento excitación-contracción es debido al incremento de los niveles de calcio intracelular y la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa quinasas involucradas en la fosforilación de proteínas contráctiles (Bolton *et al.*, 1999). Los principales mecanismos involucrados en este aumento son [1] la entrada de calcio a través de la apertura de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo-L, y [2] la liberación de calcio desde las reservas intracelulares (retículo sarcoplasmático y mitocondrias).

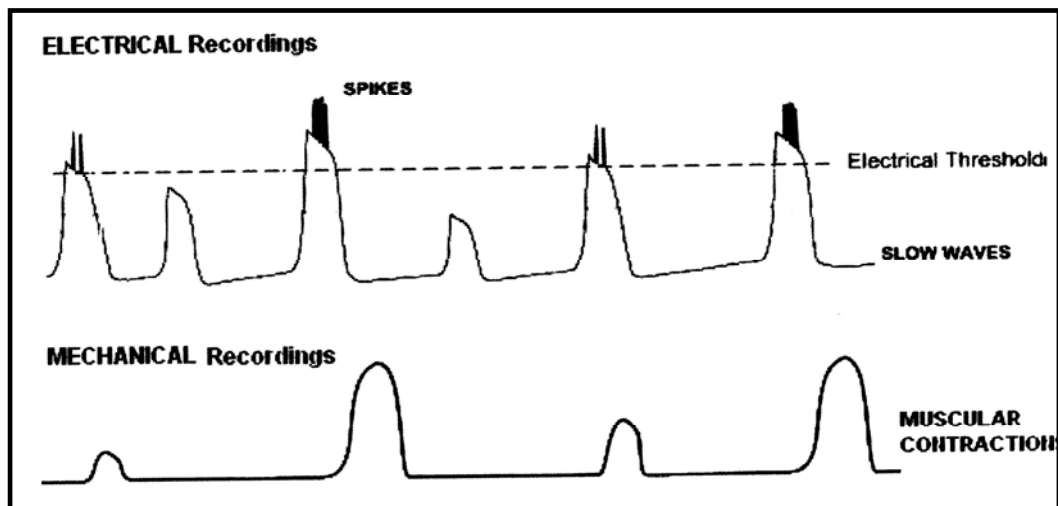


Figura 7. Relación entre actividad eléctrica (ondas lentas) y actividad contráctil del músculo liso gastrointestinal. (Adaptado de Sarna, 1989).

A pesar de que las contracciones y relajaciones del músculo liso gastrointestinal son debidas a la actividad de sus células musculares, numerosas evidencias sugieren que el origen y frecuencia de las ondas lentas depende de la actividad rítmica (marcapasos) de las células intersticiales de Cajal. Concretamente, en el caso del intestino delgado, se cree que son las ICCs localizadas en el plexo mientérico las responsables de esta actividad marcapasos (Liu *et al.*, 1994; Huizinga *et al.*, 1995; Rumessen & Thuneberg, 1996).

1.4.2 Patrones de motilidad intestinal

Los diferentes patrones de motilidad intestinal, que se caracterizan por presentar unas propiedades motoras, secretoras y vasculares estereotipadas, están determinados por la activación de programas motores específicos que se encuentran almacenados en los microcircuitos neurales del sistema nervioso entérico (Wood, 2004).

Los patrones motores pueden clasificarse en: [1] patrones interdigestivos, donde se incluye el complejo motor migratorio, [2] patrones digestivos, entre los que se incluyen

el reflejo peristáltico y los movimientos de segmentación, y [3] patrones defensivos, entre los que se incluyen la motilidad retrógrada durante la emesis y las contracciones migratorias gigantes.

- Patrón interdigestivo

En los períodos interdigestivos o de ayuno, se da un patrón de actividad motora cíclica conocido como complejo motor migratorio (MMC) (figura 8). Esta actividad motora, que en el caso de la rata se repite cada 15-20 minutos (Ruckebusch, 1977), se inicia prácticamente de manera simultánea en el estómago y en duodeno, y se propaga en sentido aboral a lo largo de todo el intestino delgado. Los MMCs poseen tres fases de actividad eléctrica/motora bien definidas: una primera fase, llamada fase I, donde se produce un silencio eléctrico con ausencia de actividad motora; una segunda fase, o fase II, en la cual aparece una actividad eléctrica irregular asociada a pequeñas contracciones; y una tercera fase, o fase III, en la que aparece una actividad eléctrica regular asociada a la aparición de una intensa actividad motora y de gran capacidad propulsora (Telford & Sarna, 1991).

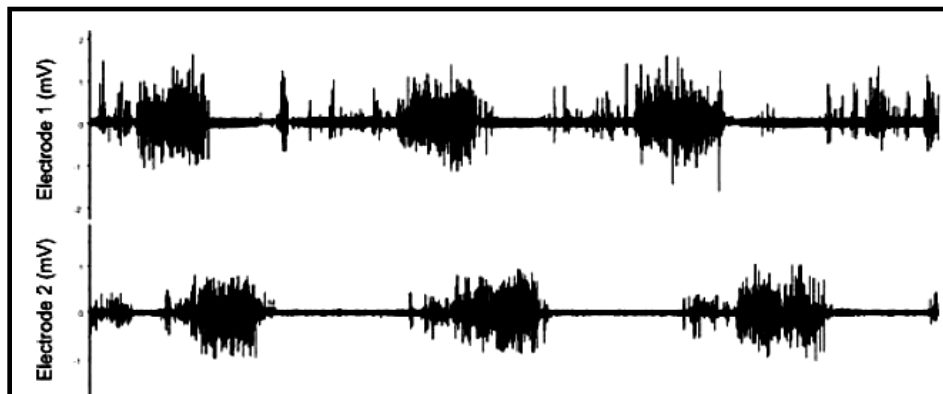


Figura 8. Registro electromiográfico mostrando la actividad mioeléctrica intestinal en fase de ayunas en rata. Eléctrodos implantados en [1] duodeno y [2] yeyuno, respectivamente. (Adaptado de Lesniewska *et al.*, 2006).

La principal función de estos complejos migratorios podría ser la de evitar paradas completas del sistema gastrointestinal durante períodos prolongados de tiempo, que pudieran permitir proliferaciones bacterianas indeseables (Telford & Sarna, 1991; Nieuwenhuijs *et al.*, 1998). Corroborando esta hipótesis, diferentes estudios han demostrado una estrecha correlación entre alteraciones en este patrón motor y un incremento de determinadas bacterias luminales normalmente ausentes en el tracto gastrointestinal superior (Husebye *et al.*, 1995; Stotzer *et al.*, 1996).

Aunque el desarrollo y propagación de los MMCs a lo largo del intestino está coordinada por el SNE (Galligan *et al.*, 1989; Frantzides *et al.*, 1990), su frecuencia está modulada por la inervación extrínseca (Torsoli & Severi, 1993). Diferentes péptidos gastrointestinales y otros mensajeros celulares también modulan los MMCs. Por ejemplo, la CCK liberada en situación postprandial provoca la disrupción de este patrón motor a través de la activación de un reflejo vago-vagal (Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995a). Este mecanismo inhibitorio es NO-dependiente, ya que los inhibidores de la síntesis de NO bloquean la disrupción de los MMCs en situación postprandial (Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995b). Otros estudios también han demostrado la importancia de este neurotransmisor inhibitorio en la génesis del MMC: mientras que algunas hormonas capaces de inducir fases III como la somatostatina o los opioides, inhiben la síntesis de NO en el intestino delgado (Jiménez *et al.*, 1995; Vergara *et al.*, 1995), los donadores de NO inducen la disrupción de los MMCs (Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995b)

- Patrón digestivo

Como puede observarse (figura 9), la ingestión de alimentos desorganiza el patrón de ayuno, interrumpiendo los complejos motores migratorios y dando lugar a un patrón nuevo caracterizado por contracciones fásicas irregulares e intermitentes. Estas contracciones se pueden clasificar en contracciones de segmentación, cuya finalidad es mezclar el bolo alimenticio para facilitar la digestión y absorción de los nutrientes, y en contracciones peristálticas que tienen como finalidad la propulsión del contenido luminal en sentido aboral.

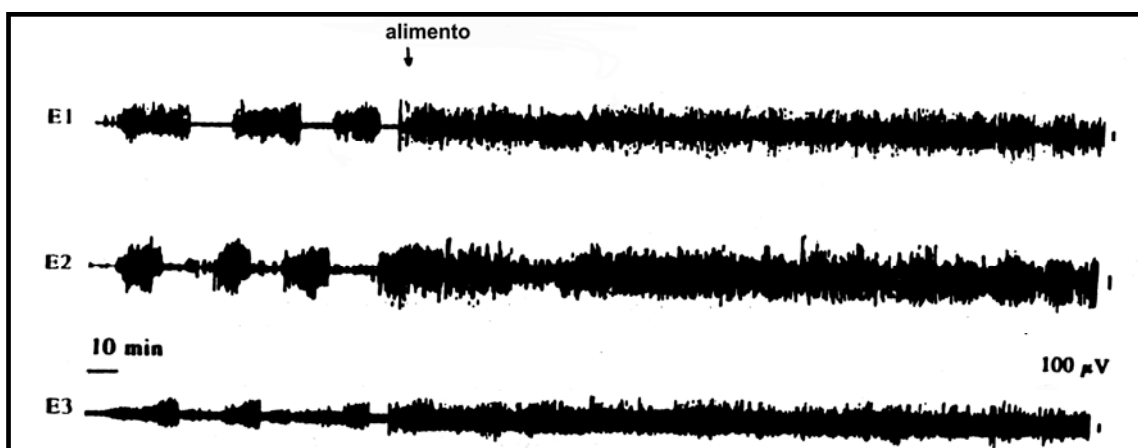


Figura 9. Registro electromiográfico de la actividad eléctrica intestinal de una rata en ayunas. Desorganización de los MMCs tras la administración de comida. E1, E2, E3: electrodos implantados a 2, 12 y 22 cm del ligamento de Treitz. (Juanola, 1999).

El reflejo peristáltico, estudiado por primera vez en el año 1899 por Bayliss & Starling, es el conjunto de movimientos coordinados de las capas musculares del intestino, y que tiene como finalidad propulsar el contenido luminal en sentido aboral. A pesar de su complejidad, se ha visto que está totalmente controlado y regulado por el SNE, manteniéndose intacto en segmentos aislados de intestino (Bayliss & Starling, 1899; Furness *et al.*, 1995). El reflejo peristáltico básico es el resultado de una serie de reflejos locales, cada uno de los cuales consiste en una primera contracción del músculo intestinal situado por encima de un estímulo intraluminal, que suele ser la distensión mecánica ejercida por el bolo, seguida de la relajación del músculo localizado por debajo del estímulo (figura 10). La suma de estos efectos provoca la propulsión del contenido en dirección anterógrada, y conforme el bolo avanza desencadena sucesivos reflejos (Grider & Jin, 1994; Kunze & Furness, 1999).

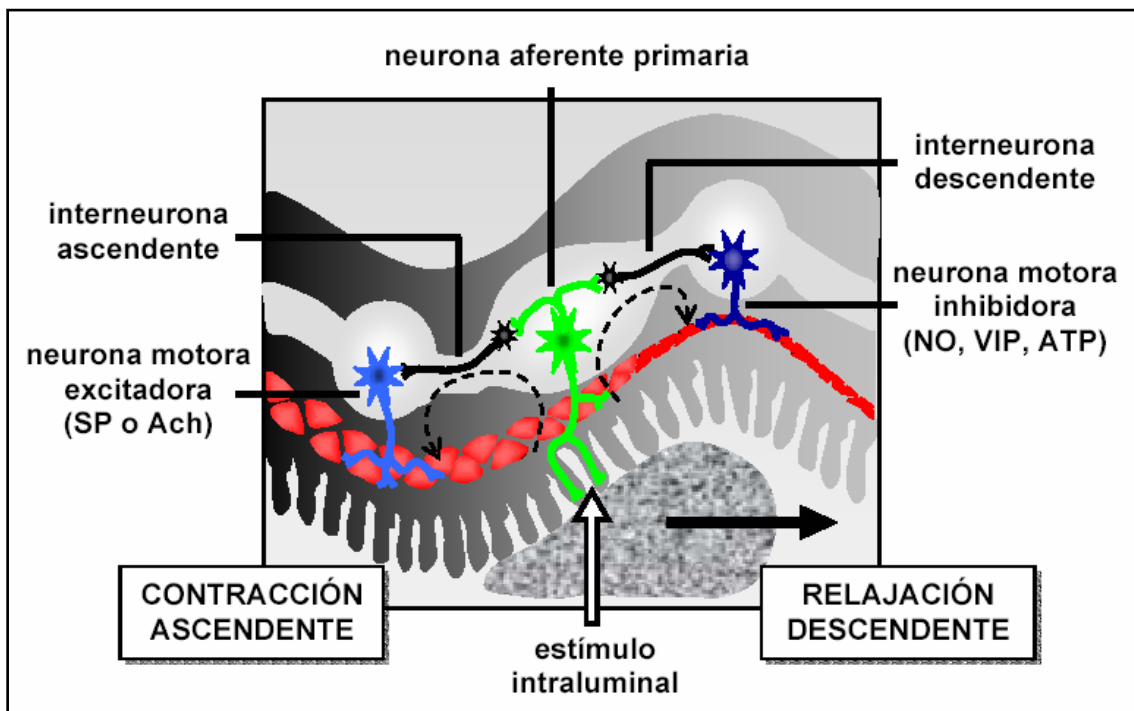


Figura 10. Esquema representando los componentes ascendente y descendente del reflejo peristáltico. El estímulo químico de la mucosa o la distensión mecánica de la luz intestinal dispara la actividad de las neuronas aferentes primarias. Éstas activan a su vez interneuronas colinérgicas en sentido oral, las cuales estimulan neuronas motoras excitadoras que liberan Ach o SP, provocando así la contracción de la capa del músculo circular que está por encima del estímulo (contracción ascendente). Simultáneamente, por debajo del estímulo, las interneuronas colinérgicas descendentes activan neuronas motoras inhibidoras que contienen NO, VIP o ATP y producen la relajación muscular (relajación descendente). El conjunto de estos efectos permite el avance del bolo intraluminal. (Hansen, 2003).

En este trabajo, y como veremos detalladamente más adelante, hemos utilizado la estimulación eléctrica intraluminal para desencadenar este reflejo, analizar la contracción ascendente de la capa muscular circular y evaluar así el estado de los reflejos controlados por la innervación intrínseca.

- Patrones defensivos

La activación del sistema inmune provoca toda una serie de cambios adaptativos en los patrones motores considerados “fisiológicos” (Word, 2004). Por ejemplo, mientras que la inflamación provoca la supresión de las contracciones fásicas asociadas a los patrones motores digestivo y postprandial, también incrementa la frecuencia de la actividad motora propulsiva, dando lugar a la aparición de dos nuevos patrones “patológicos”, las *giant migrating contractions* (GMCs) y las *retrograde giant contractions* (GRCs).

-GRCs: Este patrón motor se activa en el tracto gastrointestinal superior en respuesta a factores percibidos como potencialmente nocivos, y se caracteriza por una intensa actividad propulsora en sentido retrógrado, dando lugar a su eliminación por vía oral a través del vómito.

-GMCs: Este patrón motor se caracteriza por un incremento en la secreción de agua y electrolitos asociado a una intensa actividad propulsora, cuyo objetivo es la eliminación por vía fecal de componentes intraluminales percibidos como potencialmente nocivos. Las GMCs son contracciones ultrapropulsivas que se propagan rápidamente y de forma interrumpida desde su punto de origen en el intestino delgado hasta el íleon terminal, produciendo un movimiento en masa del contenido intestinal y un incremento de la carga osmótica colónica, por lo que juegan un papel clave en la aparición de dolor abdominal y diarrea asociados al proceso inflamatorio (Jouët & Sarna, 1996; Sarna, 2003)

La respuesta intestinal a la agresión: Inflamación

2.1 Generalidades

La inflamación constituye el mecanismo defensivo más importante del organismo contra una agresión, cualquiera que sea su origen. Se trata de una respuesta inespecífica de carácter protector, cuyo objetivo último es eliminar del organismo la causa inicial de una lesión celular así como de las células y restos tisulares necróticos.

De manera generalizada, los procesos inflamatorios pueden subdividirse en agudos y crónicos (Weissman, 1992; Collins, 1999):

-La reacción inflamatoria aguda es un fenómeno esencialmente vascular que se manifiesta por la extravasación y acumulación progresiva de plasma y células inflamatorias en la zona afectada. Histológicamente, los neutrófilos son las células predominantes en el exudado inflamatorio, aunque otros tipos celulares como monocitos, mastocitos y eosinófilos también pueden estar presentes. Generalmente, este tipo de respuesta consigue suprimir de manera completa y satisfactoria la causa de la agresión, produciéndose la recuperación histológica y funcional de la zona afectada.

-La inflamación crónica es fundamentalmente un concepto clínico, que implica una prolongada duración del proceso inflamatorio. Este tipo de reacción se produce cuando el organismo es incapaz de eliminar la causa de la agresión, bien sea debido a una deficiencia del sistema inmune o a la persistencia de la causa inductora de la inflamación. Histológicamente, la cronicidad de la inflamación se caracteriza por la escasa importancia de los fenómenos vasculares y por la presencia predominante de células inflamatorias mononucleares (macrófagos, linfocitos, células plasmáticas) y grados variables de fibrosis y/o tejido de granulación.

La frecuencia y extensión de la respuesta inflamatoria depende, al menos en parte, del grado de exposición al agente causal. En el intestino, dada su extensa superficie, la exposición a estímulos nocivos es todavía más elevada que en otros órganos, haciendo que el tracto intestinal tenga una elevada susceptibilidad a desarrollar procesos inflamatorios. A banda de los procesos inflamatorios provocados por agentes etiológicos bien definidos, como pueden ser microorganismos, parásitos o toxinas, existen otras patologías inflamatorias del intestino de las cuales se desconoce su etiopatogenia. Este sería el caso de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

2.2 Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un proceso inflamatorio crónico y recidivante de la pared intestinal, de etiología desconocida. Las dos formas más importantes de EII son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Típicamente, los periodos de exacerbación o brote de la EII se alternan con otros de remisión. Durante los brotes, los síntomas de ambas entidades son superponibles y, a grandes rasgos, consisten en dolor abdominal, diarrea sanguinolenta, disminución del peso corporal, fiebre y leucocitosis (Fiocchi, 1998; Oliver, 2002; Sands, 2004).

En la colitis ulcerosa el proceso inflamatorio afecta exclusivamente la mucosa del intestino grueso. La inflamación difusa se inicia en el recto, desde donde se extiende en sentido proximal en continuidad y afectando una extensión variable de colon. La mucosa suele presentar una superficie húmeda y brillante a causa de la presencia de moco y sangre. Puede haber pequeñas hemorragias de carácter petequial y úlceras de distinto tamaño. Histológicamente se aprecia un aumento difuso de la intensidad del infiltrado inflamatorio en la lámina propia, alteración del epitelio y atrofia progresiva con desestructuración del patrón arquitectónico habitual de la mucosa (Kleer & Appelman, 1998; Miner, 2000; Geboes & Jouret, 2002).

A diferencia de la colitis ulcerosa, en la enfermedad de Crohn la inflamación es transmural y puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal. Es una enfermedad segmentaria, por lo que es frecuente observar áreas afectadas separadas por áreas aparentemente sanas. Las localizaciones más frecuentes son el ileon terminal y el colon proximal. Macroscópicamente, la mucosa presenta un aspecto edematoso y suele estar surcada por múltiples ulceraciones lineales que le dan un aspecto de “empedrado”. Histológicamente se aprecia un engrosamiento de la pared, estenosis por fibrosis de la submucosa, úlceras, infiltrado inflamatorio y la presencia de granulomas no caseificantes (Tanaka & Riddell, 1990; Sanders, 1998; Geboes & van Eyken, 2002).

Aunque la patogénesis de la EII es compleja y multifactorial, evidencias actuales sugieren que en su desarrollo estaría involucrada una primera fase inflamatoria aguda tras una agresión de la mucosa intestinal, y una segunda fase de naturaleza inmunológica que sería responsable de la cronificación de la enfermedad. Esta segunda fase parece consistir en una excesiva respuesta del sistema inmune, genéticamente determinada, frente a diversos antígenos lumenales, incluida la flora intestinal comensal (Fiocchi, 1998; Boma & Strober, 2003).

Como ya se ha comentado anteriormente, el constante y masivo estímulo antigénico al que está sometida la mucosa intestinal da lugar a la denominada “inflamación fisiológica del intestino” (Kagnoff, 1994). En condiciones normales existe un equilibrio en la producción de moléculas inmunorreguladoras (pro-y antiinflamatorias) que permite mantener una respuesta local adecuada frente a los antígenos lumbinales. Este fenómeno está sometido a un estrecho control, de manera que situaciones en las que se produce una liberación inapropiada de estas moléculas inmunorreguladoras puede conducir a una situación de inflamación incontrolada.

En la EII, la cronificación de la respuesta inflamatoria parece estar asociada a una disregulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD4+. No obstante, existen importantes diferencias en función del tipo de patología: mientras que el perfil de citocinas producidas en la enfermedad de Crohn es predominantemente del tipo Th1 (IL-2, IFN- γ), la colitis ulcerosa está asociada a una mayor respuesta Th2 (IL-5, IL-10) (Fuss *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2000). La constante liberación de citocinas por parte de las células T da lugar a un aumento del reclutamiento de células inmunocompetentes en la mucosa intestinal, con el subsiguiente incremento de la liberación de mediadores inflamatorios (interleucinas, TNF- α , prostaglandinas, óxido nítrico, etc.) que contribuyen a la perpetuación del proceso inflamatorio (Panés, 2001).

Diferentes estudios han demostrado la existencia de una estrecha correlación entre los niveles sistémicos de algunos de estos mediadores inflamatorios, como el TNF- α , y el curso de la enfermedad, por lo que su monitorización durante la fase de remisión puede ayudar a la identificación de pacientes con un elevado riesgo de recaída (Niederau *et al.*, 1997; Scheiber *et al.*, 1999).

A pesar de que la existencia de una respuesta inmune local inapropiada frente a antígenos lumbinales parece ser la clave del desarrollo de la EII, los mecanismos involucrados en la pérdida de tolerancia a antígenos de la flora intestinal todavía no se conocen. No obstante, en los últimos años se han producido importantes avances en la identificación de genes de susceptibilidad al desarrollo de la EII, entre los que destaca el gen NOD2/CARD15, situado en el cromosoma 16 (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001). Este gen codifica para una proteína que actúa como receptor intracelular de un componente intrínseco de la pared celular bacteriana, sugiriendo que un adecuado reconocimiento antigénico mediado por este receptor es indispensable para la modulación de la respuesta inflamatoria dirigida contra la flora intestinal comensal.

Una alteración de la función barrera epitelial también podría intervenir en el desarrollo de una respuesta inmune local inapropiada frente a antígenos luminales. Corroborando esta hipótesis, diferentes estudios han demostrado la existencia de un incremento de la permeabilidad epitelial tanto en pacientes afectados de EII como en un elevado porcentaje de sus familiares de primer grado, un colectivo con una alta probabilidad de sufrir la enfermedad (Howden *et al.*, 1994; Munkholm *et al.*, 1994; Peeters *et al.*, 1997). Como ya se ha comentado anteriormente, la integridad de la barrera mucosa intestinal es indispensable para evitar una excesiva penetración de antígenos alimentarios, microorganismos y toxinas bacterianas a través del epitelio, por lo que alteraciones en esta función de barrera podrían ser la clave del desarrollo y/o la cronificación del proceso inflamatorio.

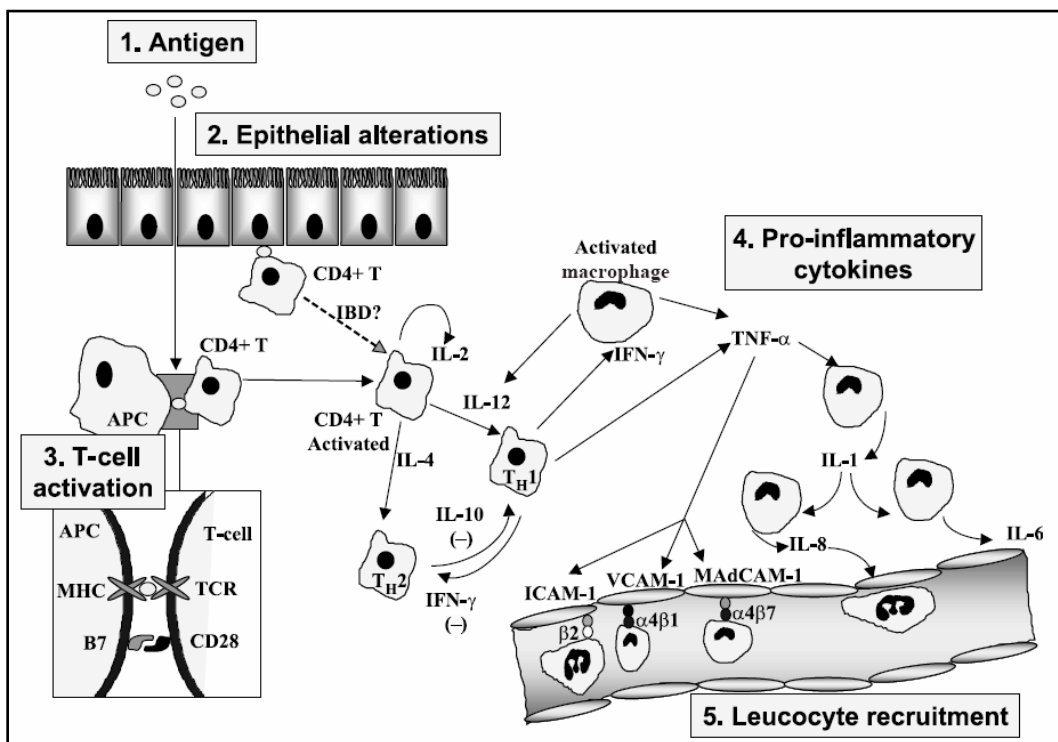


Figura 11. Esquema donde se muestra un resumen de los principales mecanismos implicados en la perpetuación de la EII. (1) La respuesta inmune se desencadenaría en respuesta a antígenos luminales, presumiblemente de origen bacteriano. (2) la captación de antígenos podría estar facilitada por alteraciones de la barrera epitelial. (3) La activación y diferenciación de las células T CD4+ se produciría tras la presentación de los antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) por células presentadoras de antígeno (APC). La activación de las células T daría lugar a la liberación de citocinas (4), que provocaría el reclutamiento de leucocitos circulantes hacia el foco inflamatorio por la acción secuencial y coordinada de diferentes moléculas de expresión (selectinas, integrinas, etc) (5). (Panés, 2001).

2.3 Modelos animales de EII

En la última década se ha producido una importante proliferación de nuevos modelos experimentales de EII que han ayudado de manera notable a comprender distintos aspectos de la patogenia de la enfermedad humana. En conjunto, los conocimientos derivados de estos modelos apoyan la hipótesis de que la cronificación de la inflamación intestinal es el resultado de una respuesta inmune exagerada mediada por linfocitos T CD4+ y macrófagos a antígenos bacterianos normalmente presentes en la luz intestinal. Los factores predisponentes serían de origen genético y condicionarían la alteración de la regulación de la respuesta inmune y de la permeabilidad intestinal, mientras que el inicio de la enfermedad estaría desencadenado por factores ambientales (Strober, 1985; Grisham, 1993; Elson *et al.*, 1995; Panés *et al.*, 2002)

A grandes rasgos, los modelos animales pueden clasificarse en cuatro categorías en función de como se produce la inflamación intestinal: 1) inflamación espontánea; 2) inflamación inducida mediante agentes exógenos; 3) inflamación inducida en animales manipulados genéticamente; 4) inflamación inducida en animales inmunodeficientes reconstituidos con células T CD4+.

- modelos de inflamación espontánea

Este grupo incluye modelos muy atractivos para el estudio de factores genéticos y desencadenantes de la EII, ya que la inflamación aparece sin manipulaciones exógenas, al igual que ocurre en la enfermedad humana. Dentro de este grupo se han caracterizado dos modelos de colitis, el primero en una especie de tití (tití de cabeza de algodón) (Chalifoux & Bronson, 1981) y el segundo en una cepa de ratón (CH3/HeJBir) (Sundberg *et al.*, 1994). Otra cepa de ratón, la SAMP1/Yit, desarrolla una ileitis transmural que presenta similitudes histológicas con la enfermedad de Crohn (Matsumoto *et al.*, 1998).

- Modelos de inflamación inducida experimentalmente

Este grupo incluye toda una serie de modelos en los que la inflamación intestinal es inducida mediante la administración de agentes exógenos. Son modelos relativamente simples que permiten estudiar los mecanismos responsables del desarrollo de la inflamación intestinal, que es variable para cada modelo. El principal inconveniente de estos modelos radica en la dificultad de reproducir la tendencia a la cronicidad con periodos de recaída espontánea características de la EII, por lo que la extrapolación de los resultados obtenidos en dichos modelos a la enfermedad humana es limitada.

Los agentes administrados pueden ser muy variados: irritantes locales, como el ácido acético o el etanol (Yamada *et al.*, 1992); fármacos, como ciertos antiinflamatorios no esteroideos (Whittle, 1981); tóxicos alimentarios, como la carragenina (Ling *et al.*, 1988); agentes biológicos, como el parásito *Trichinella Spirallis* (Vallance *et al.*, 1997); haptenos, como el TNBS (Morris *et al.*, 1989) o la oxazolona (Ekstrom & Andersson, 2000), y un largo etcétera.

- Modelos de inflamación inducida en animales manipulados genéticamente

El desarrollo de la metodología para la creación de animales transgénicos o con deficiencias genéticas (*knock out*) ha permitido descubrir que una amplia variedad de modelos de ratón manipulados genéticamente desarrollan procesos inflamatorios intestinales de manera espontánea. Aunque es poco probable que alguna de estas alteraciones genéticas sea la causante de la enfermedad humana, estos modelos han ayudado a comprender el papel que juegan determinadas moléculas, incluyendo citocinas específicas como la IL-2 o la IL-10, en la regulación de la respuesta inmune (Hammer *et al.*, 1990; Schorle *et al.*, 1991; Kuhn *et al.*, 1993; Mombaerts *et al.*, 1993)

- Inflamación en animales inmunodeficientes reconstituidos con células T CD4+.

Estudios recientes han demostrado que la transferencia de determinadas subpoblaciones de células T CD4+ a ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) provoca el desarrollo de una colitis fulminante, corroborando el papel central que parecen jugar las células T CD4+ en la patogenia de la inflamación intestinal en otros modelos experimentales (Simpson *et al.*, 1995; De Winter *et al.*, 1999).

2.4 Neuroinmunología

Aunque durante mucho tiempo los fenómenos inmunológicos se enfocaban considerando al sistema inmune como el elemento activo y al resto de componentes del organismo como el elemento pasivo que sólo actuaba o se alteraba en función de los efectos del primero, se ha demostrado que esta interacción es en realidad bidireccional. A nivel entérico, existe una gran interrelación entre el sistema nervioso y el sistema inmune gastrointestinal. Mientras que las células inflamatorio-inmunitarias responden a la liberación de neurotransmisores, las neuronas entéricas responden a la liberación de mediadores inflamatorios (Wood, 1992; Cooke, 1994).

Un gran número de estudios se han centrado en la caracterización del impacto que tienen los procesos inflamatorios sobre la funcionalidad motora intestinal, demostrando

que la inflamación puede provocar efectos diferentes en función de la capa muscular, el segmento intestinal y el modelo inflamatorio utilizado (Mayer & Collins, 2002; Mawe *et al.*, 2004). Por ejemplo, mientras que en un modelo de ileitis inducida por ácido acético en el perro se ha demostrado que la inflamación incrementa la frecuencia de las CMGs, un tipo de patrón motor propulsivo (Jouet *et al.*, 1995; Sarna, 2003), este tipo de actividad motora se encuentra severamente reducida en diferentes modelos de colitis (Li *et al.*, 2002; Linden *et al.*, 2003).

Las alteraciones motoras asociadas a la inflamación pueden ser debidas a un efecto directo de los mediadores inflamatorios sobre la actividad contráctil del músculo liso (Grossi *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1999), a cambios en el sistema de control miogénico como pueden ser alteraciones en las ICCs (Der *et al.*, 2000), o bien pueden ser consecuencia de cambios en la neurofisiología de los microcircuitos entéricos, hecho que se conoce con el termino de neuroplasticidad intestinal (Lomax *et al.*, 2005).

Los pacientes con EII presentan frecuentes alteraciones del sistema nervioso entérico que se asocian a cambios en la función gastrointestinal, incluyendo cambios en la secreción por parte de las células epiteliales (Musch & Chang, 1993), un incremento de la percepción sensorial (Bernstein *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000) y alteraciones en la actividad motora intestinal (Reddy *et al.*, 1991; Annese *et al.*, 1997).

- Alteraciones del sistema nervioso entérico

Las alteraciones del SNE descritas en pacientes afectados de EII incluyen tanto cambios morfológicos como modificaciones en el contenido de neurotransmisores a nivel neuronal (Geboes & Collins, 1998).

Los cambios morfológicos son mas frecuentes en la enfermedad de Crohn que en la colitis ulcerosa, y consisten en la presencia de hiperplasia e hipertrofia neuronal, hiperpliasis, degeneración ganglionar y degeneración/necrosis axonal (Dvorak *et al.*, 1993; Steinhoff *et al.*, 1998). Diferentes estudios han demostrado la presencia del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II tanto en neuronas como en células gliales de muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn, avalando la hipótesis de que estas alteraciones están mediadas inmunológicamente (Koretz *et al.*, 1987; Geboes *et al.*, 1992).

Respecto a los cambios en la composición neuroquímica de las neuronas y fibras nerviosas entéricas, los resultados son controvertidos y varían en función del estudio

realizado. Las alteraciones más consistentes son un incremento en la inmunoreactividad de neuronas mientéricas que contienen SP en pacientes con colitis ulcerosa (Vento *et al.*, 2001; Neunlist *et al.*, 2003), y un aumento en la inmunoreactividad tanto de neuronas mientéricas como submucosas que contienen mediadores involucrados en la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica no colinérgica, como el VIP, NO y PACAP, en muestras procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn (Belai *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 2001).

Además de estas alteraciones en el SNE, estudios morfológicos realizados tanto en muestras de intestino delgado procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn (Porcher *et al.*, 2002) como en muestras colónicas procedentes de pacientes con colitis ulcerosa (Rumessen, 1996) han demostrado una reducción en el número de ICCs. Esta reducción afecta tanto a las ICCs localizadas tanto entre las capas musculares externas longitudinal y circular como a las localizadas en los plexos mientérico y muscular profundo.

- Alteraciones de la motilidad intestinal

A pesar de que algunos de los síntomas característicos de la EII como son dolor abdominal y diarrea pueden ser debidos a la existencia de trastornos de la motilidad intestinal, son todavía pocos los estudios realizados en este campo.

La mayoría de los datos existentes proceden de estudios clínicos manométricos realizados en pacientes con colitis ulcerosa, demostrando una disminución de la actividad contráctil basal en el sigma de estos pacientes. Dado que, en este segmento, la actividad motora fundamental son las contracciones segmentarias que contribuyen a retardar el flujo fecal, la ausencia de motilidad observada en estos pacientes produce aceleración del tránsito y, en último término, diarrea (Reddy, 1991). Estas observaciones clínicas han sido posteriormente corroboradas mediante estudios *in vitro* que demuestran una disminución en la contractilidad del músculo liso en tiras procedentes de pacientes con colitis ulcerosa, posiblemente debida a una reducción en las reservas de Ca^{2+} intracelular o a un defecto intrínseco en el mecanismo de acoplamiento excitación contracción (Snape *et al.*, 1991; Cook *et al.*, 2000; Vrees *et al.*, 2002).

Los escasos estudios manométricos realizados en pacientes con enfermedad de Crohn demuestran importantes alteraciones en el patrón motor intestinal interdigestivo, que se caracteriza por: 1) una disminución en la frecuencia de propagación de los

MMCs, y 2) una reducción en la amplitud y número de contracciones (Summers *et al.*, 1983; Annesse *et al.*, 1997). Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en diferentes estudios clínicos que demuestran una prolongación del tiempo de tránsito oro-cecal (Gotze & Ptok, 1993; Castiglioni *et al.*, 2000). En condiciones normales, la intensa actividad contráctil asociada a los MMCs juega un papel clave en la propagación caudal de los restos de contenido y secreciones presentes en la luz intestinal, por lo que esta aparente disminución de la actividad motora podría explicar la relativamente elevada frecuencia de sobrecrecimiento bacteriano en estos pacientes (Husebye, 1995).

Esta aparente disminución de la actividad motora intestinal podría ser una consecuencia funcional de las alteraciones estructurales descritas a nivel entérico, ya que tanto la disminución de ICCs como el incremento en la producción de mediadores involucrados en la neurotransmisión inhibitoria, principalmente NO, se asocian con alteraciones de los patrones motores fisiológicos, tanto en diferentes modelos animales de inflamación intestinal (Lu *et al.*, 1997; Der *et al.*, 2000) como en algunas patologías humanas (Lui *et al.*, 1997; Wedel *et al.*, 2002).

2.5 Mediadores inflamatorios en la EII

En los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento de la patogenia de la EII, en gran parte debido a los progresos realizados tanto en el ámbito de la inmunología del sistema digestivo como en el de la fisiopatología de la inflamación.

El número de sustancias endógenas que parecen intervenir en el proceso inflamatorio es amplísimo, incluyendo quininas, citocinas, aminas biógenas, eicosanoides, neuropéptidos, y un largo etcétera. A pesar del creciente número de estudios realizados, es frecuente encontrar datos aparentemente contradictorios en la literatura sobre las acciones biológicas que desempeña cada uno de estos mediadores en el inicio y en la perpetuación del proceso inflamatorio. El motivo principal de esta discrepancia radica en el hecho de que la mayoría de trabajos se centran en el estudio individual de una determinada molécula, sin tener en consideración las constantes interacciones que se producen entre los diferentes mediadores en cada etapa del proceso inflamatorio.

Debido a la importancia que tienen algunos de estos mediadores inflamatorios en las alteraciones motoras asociadas a la inflamación, hemos creído conveniente profundizar en el estudio de algunas de estas moléculas. Concretamente los mediadores estudiados en este trabajo han sido dos: las prostaglandinas y el óxido nítrico.

2.5.1 Prostaglandinas

Las prostaglandinas, junto con los tromboxanos y los leucotrienos, se agrupan de forma conjunta en la familia de los eicosanoides.

- Síntesis

Los eicosanoides son sintetizados *de novo* en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos y patológicos. Los eicosanoides pueden ser sintetizados en muchos tipos celulares diferentes, siendo su precursor el ácido araquidónico. Para que el ácido araquidónico pueda ser metabolizado para la obtención de mediadores inflamatorios, es necesario que sea liberado previamente de su posición esterificada en la membrana plasmática. Esta acción es catalizada por la fosfolipasa A₂, enzima que puede ser activada por estímulos inmunológicos diversos. El ácido araquidónico libre en el citoplasma celular puede ser entonces metabolizado por dos vías diferentes: 1) vía de la ciclooxigenasa, dando lugar a prostaglandinas y tromboxanos, y 2) vía de la lipooxigenasa, dando lugar a leucotrienos (Konturek & Pawlik, 1986; Lauritsen, 1989).

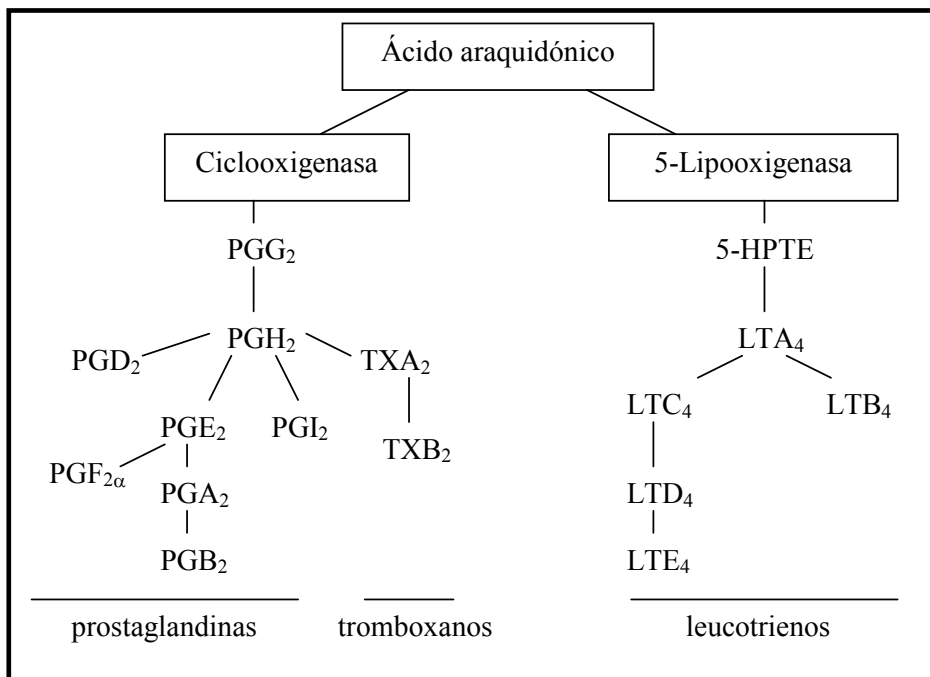


Figura 12. Esquema de la biosíntesis de eicosanoides. (Adaptado de Eberhart & Dubois, 1995).

Hasta la fecha, han sido identificadas dos isoformas de ciclooxigenasa (COX), una isoforma constitutiva (COX-1) que se expresa de manera fisiológica en muchos tejidos, incluido el intestino, y una inducible (COX-2) que se expresa mayoritariamente en procesos inflamatorios tras una inducción mediada por diferentes citocinas y mitógenos (IL-1, IL-6, TNF- α , LPS, etc.) (Vane *et al.*, 1998).

- Mecanismo de acción

A nivel intestinal, las prostaglandinas producidas por COX-1 juegan un papel clave en el mantenimiento de la integridad de la mucosa, ya que inhiben la secreción ácida gástrica, aumentan la secreción de mucus y aumentan el flujo sanguíneo (DuBois *et al.*, 1998). A través de la estimulación de sus respectivos receptores, las diferentes prostaglandinas también modulan la motilidad intestinal. Por ejemplo, la estimulación de receptores musculares EP2 o EP4 por la PGE2 resulta en un incremento del AMPc intracelular, provocando la relajación del músculo liso. (Eberhart & DuBois, 1995).

Aunque en situación fisiológica es posible observar un cierto grado de expresión de COX-2 en algunos tejidos, (Funk, 2001; Hinz & Brune, 2002) su expresión aumenta considerablemente en procesos inflamatorios (Wu, 1996; Mitchell & Warner, 1999). El papel de las prostaglandinas sintetizadas por esta isoenzima durante la inflamación aguda parece ser beneficioso, provocando vasodilatación local y favoreciendo la llegada de células inflamatorias al lugar de la agresión. En relación al efecto de las prostaglandinas en las alteraciones motoras asociadas a la inflamación intestinal, los resultados son controvertidos. Numerosos estudios *in vitro* han descrito un aumento de la contractibilidad muscular asociado a una sobre-expresión de COX-2 en diferentes modelos de colitis (Eberhart & Dubois, 1995). Al contrario, inhibidores COX-2 selectivos han resultado beneficiosos en el tratamiento del íleo paralítico asociado a la manipulación quirúrgica intestinal, sugiriendo que las prostaglandinas derivadas de la sobre-expresión de COX-2 tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad motora intestinal (Schwarz *et al.*, 2001).

- Prostaglandinas en la EII

Ya en el año 1975, Gould describió el incremento en la síntesis de prostaglandinas como un evento clave en la patogénesis de la EII, especialmente en la colitis ulcerosa. (Gould, 1975). Estudios posteriores han corroborado esta observación e incluso han demostrado que el curso de la enfermedad está correlacionado con los niveles de PGE2 en la mucosa intestinal (Smith *et al.*, 1979). La caracterización de la COX-2 en el año

1991 permitió demostrar que realmente son las prostaglandinas producidas por esta isoforma las que aumentan en el proceso inflamatorio. La expresión de COX-2 en la EII se localiza básicamente en la mucosa, especialmente en las células epiteliales y en las células del sistema inmune presentes en la lámina propia (Singer *et al.*, 1998).

A pesar de la importancia que parece tener la sobre-expresión de COX-2 en la patogénesis de la EII, los estudios realizados en modelos experimentales han proporcionado resultados controvertidos. Aunque de manera generalizada los inhibidores COX-2 selectivos parecen tener un efecto beneficioso y los inhibidores no selectivos parecen provocar una exacerbación de las lesiones inflamatorias, existen estudios que demuestran que la inhibición de COX-2 resulta perjudicial (Reuter *et al.*, 1996; Kandil *et al.*, 1999; Kameli *et al.*, 2000; Ajuebor *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001)

2.5.2 Óxido nítrico

El NO fue identificado en 1987 como un mediador endógeno liberado por las células endoteliales que inducía la relajación vascular, e inhibía la agregación plaquetaria y la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular (Palmer *et al.*, 1987). Desde entonces una gran cantidad de estudios se han centrado en caracterizar esta particular molécula, y actualmente sabemos que su papel fisiológico no sólo se circunscribe al sistema cardiovascular sino que está ampliamente distribuido y que posee una gran diversidad de funciones (Moncada *et al.*, 1991; Griffith & Stuehr, 1995).

- Síntesis

El NO es una molécula gaseosa que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina (figura 12) Esta reacción es catalizada por la enzima NO-sintetasa (NOS) y puede ser inhibida por derivados estructurales de dicho aminoácido, como la N-nitro-L-arginina (L-NNA).

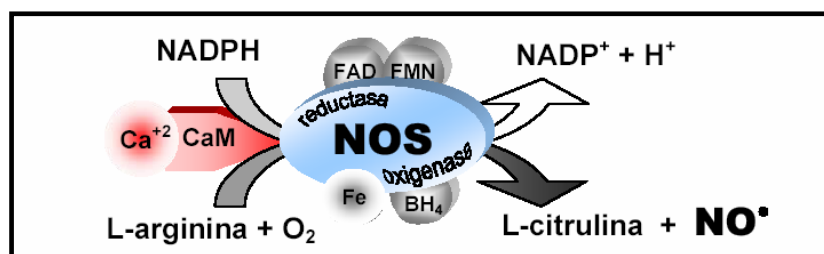


Figura 12. Reacción de síntesis del NO. El NADPH cede electrones al dominio reductasa de la enzima los cuales, gracias a los cofactores FAD y FMN, se transfieren al dominio oxigenasa, donde los capta el átomo de Fe del grupo hemo junto con el cofactor BH₄, catalizando así la reacción del O₂ con la L-arginina y generando L-citrulina y NO. (Quintana, 2004).

Hasta la fecha se han descrito tres isoformas de la enzima, cada una codificada por un gen distinto y expresada en diferentes condiciones y tipos celulares (Alderton *et al.*, 2001). Dos de ellas están expresadas constitutivamente y son responsables de la síntesis de pequeñas cantidades de NO en respuesta a estímulos puntuales. Su actividad está principalmente regulada por el Ca^{+2} intracelular, ya que es el responsable de la unión de la calmodulina a la enzima. De acuerdo al lugar donde se caracterizaron por primera vez se han denominado NOS endotelial (eNOS), localizada preferentemente en células endoteliales, plaquetas y mesangiales renales, y NOS neuronal (nNOS), de localización nerviosa, tanto central como periférica. Por otra parte se ha descrito la isoforma NOS inducible (iNOS), que se expresa únicamente cuando las células entran en contacto con endotoxinas o determinadas citocinas (IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α). Su acción requiere de un cierto tiempo para manifestarse (4-6 horas tras el estímulo inductor), pero una vez activada produce grandes cantidades de NO. A diferencia de las otras dos isoformas, la iNOS se une fuertemente a la calmodulina, por lo que es insensible a las concentraciones de Ca^{+2} intracelular, manteniéndose en un estado de activación tónica y dando lugar a la síntesis continua y prolongada de NO (horas/días). Inicialmente fue descrita en macrófagos y hepatocitos, si bien posteriormente se ha observado en numerosas células (músculo liso vascular, neutrófilos, células endoteliales, etc.).

A pesar de esta clara subdivisión, hay que tener en consideración que la terminología constitutiva frente a inducible es una simplificación, ya que se ha descrito que la expresión de las isoformas “constitutivas”, tanto eNOS como nNOS, puede ser inducida en determinadas condiciones fisiológicas (Forstermann *et al.*, 1998) y, por el contrario, se ha descrito que la iNOS se expresa de forma constitutiva en determinadas células (Alderton *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 1995).

- Mecanismo de acción

La diversidad de funciones que tiene el NO se debe a su capacidad de reaccionar con un rango amplio de moléculas distintas. Este mediador interactúa con “dianas” moleculares específicas localizadas en la propia célula donde es generado (regulación autocrina) o en células vecinas (regulación paracrina).

La principal diana del NO caracterizada hasta la fecha es la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs). El NO reacciona con el hierro del grupo hemo de esta enzima

activándola, y desencadenando así la liberación de GMPc, mediador final responsable de la mayoría de las acciones fisiológicas del NO (Southam & Garthwaite, 1993).

Otra enzima con la que interacciona el NO es la citocromo c oxidasa presente en el complejo terminal de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Nisoli *et al.*, 2004). Se ha visto que el NO compite con el oxígeno inhibiendo de manera reversible la cadena respiratoria, por lo que se ha sugerido que pudiera estar actuando como un regulador fisiológico de la respiración celular (Brown, 2000).

Por último, también se ha visto que el NO puede combinarse con metales de transición (hierro, cobre o zinc) presentes en determinadas enzimas como la ciclooxigenasa, lipooxigenasa, citocromo P-450 y la aconitasa, modulando su función (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano, 2000).

- Efecto citotóxico del NO

Debido a su condición de radical libre, el NO reacciona con el anión superóxido para generar peroxinitrito, compuesto altamente reactivo y con un potente efecto oxidante (Beckman & Koppenol, 1996). Esta reacción química se ve favorecida en circunstancias en las que existe una elevada concentración de NO como consecuencia de la inducción de la NOS.

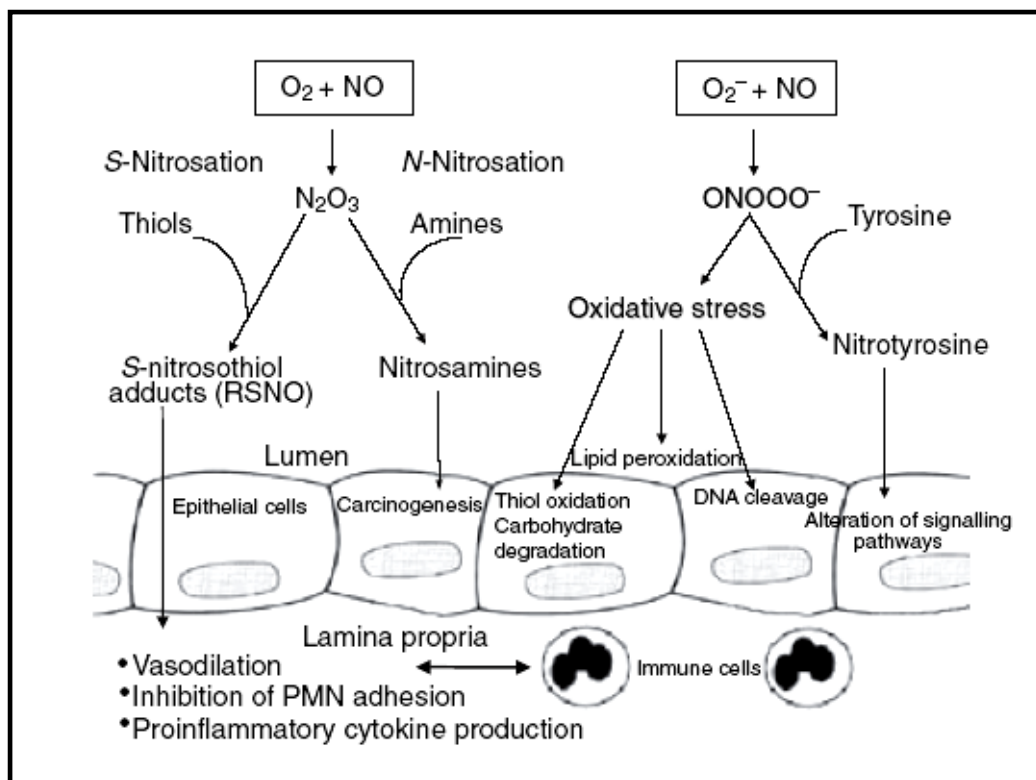
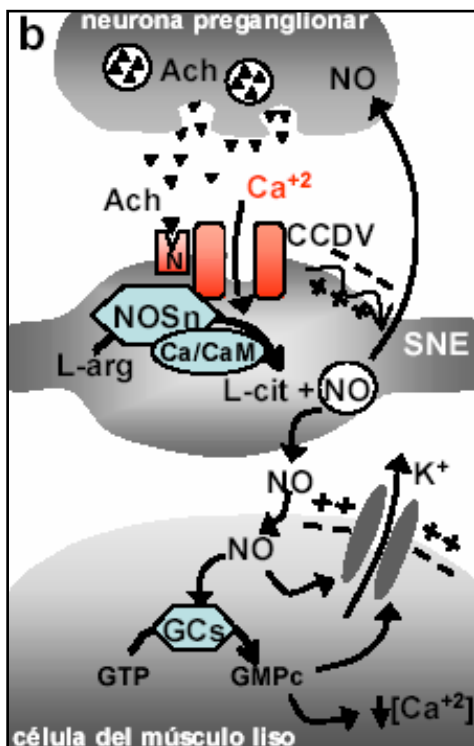


Figura 13. Efectos patológicos mediados por el óxido nítrico. (Kolios *et al.*, 2004).

- Óxido nítrico en el sistema nervioso

El descubrimiento del NO como neurotransmisor cambió radicalmente el concepto clásico de sinapsis nerviosa. El NO es de naturaleza gaseosa y posee una vida media muy corta (segundos). A diferencia de los neurotransmisores típicos, no se almacena en vesículas sinápticas sino que se sintetiza cuando es necesario, y no se libera por exocitosis sino que difunde libremente a través de las membranas (Allescher *et al.*, 1992; Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995).

La principal isoforma responsable de la síntesis del NO en el sistema nervioso, tanto central como periférico, es la nNOS (Esplugues, 2002). La activación enzimática está directamente regulada por la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, de manera que el incremento de Ca^{2+} intracelular activa la enzima a través de la interacción con la calmodulina, produciéndose la conversión de L-arginina en L-citrulina y la liberación de NO.



Como puede observarse en la figura 14, el NO liberado difunde a través de la membrana de la célula muscular lisa, donde activa a la enzima GCs dando lugar a la conversión de GTP en GMPc. El GMPc, a través de la activación de una serie de cinasas, reduce la concentración de Ca^{2+} intracelular por distintos mecanismos; además de provocar la activación de los canales iónicos de K^+ , hiperpolarizando a la célula (Carvajal *et al.*, 2000). Todas estas acciones conducen a la relajación de la célula del músculo liso.

Figura 14. Regulación sináptica de la actividad nNOS. (Adaptado de Quintana, 2004).

Debido a que la innervación nitrérgica juega un papel esencial en la relajación tónica de la musculatura lisa gastrointestinal, alteraciones en la producción de NO puede provocar importantes alteraciones motoras. Por ejemplo, mientras que la disminución en la liberación de NO debido a una pérdida selectiva de motoneuronas nitrérgicas se asocia a la presencia de un grado variable de obstrucción funcional en varias enfermedades humanas como la acalasia (Lui *et al.*, 1997), la estenosis pilórica infantil

(Vanderwinden *et al.*, 1992) y la enfermedad de Hirschprung (Vanderwinden *et al.*, 1992b), existen otras patologías, como la constipación crónica idiopática, que se caracterizan por todo lo contrario: un exceso en la producción de NO que da lugar a la inhibición de la actividad motora propulsiva colónica (Cortesini *et al.*, 1995).

- Óxido nítrico e inflamación intestinal

La liberación de citocinas al inicio de un proceso inflamatorio agudo provoca la inducción de iNOS y la subsiguiente liberación de grandes cantidades de NO. Bajo estas condiciones, el NO juega un papel fisiológico muy importante ya que, debido a sus potentes propiedades vasoactivas, interviene en el incremento del flujo sanguíneo local y, por tanto, favorece la llegada de células inflamatorias al lugar de la agresión. Además, el NO producido por esta isoenzima presenta una elevada capacidad citostática/citotóxica por lo que interviene en la lucha del organismo contra ciertos microorganismos y células tumorales (Hibbs *et al.*, 1988; Stuehr & Nathan, 1989). A pesar de este claro efecto beneficioso, el NO es una molécula muy reactiva, y por tanto lábil, que reacciona con mucha facilidad con diferentes compuestos dando lugar a productos que pueden resultar perjudiciales para las propias células (figura 13) (Virag *et al.*, 2003). Por este motivo, aunque en bajas concentraciones el NO tiene un papel básicamente anti-inflamatorio, un exceso puede dañar a las propias células, ejerciendo un papel pro-inflamatorio (Alican & Kubes, 1996).

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios, tanto en humanos como en modelos experimentales, que demuestran la importancia que tiene la formación de grandes cantidades de NO y de sus derivados tóxicos, como el peroxinitrito, en el desarrollo y/o la cronificación de los procesos inflamatorios gastrointestinales (Grisham & Yamada, 1992; Miller *et al.*, 1995). Concretamente, en el caso de la EII humana, esta sobreproducción de NO se correlaciona con un incremento en la expresión de iNOS en las células epiteliales de la mucosa intestinal (Singer *et al.*, 1996). La sostenida liberación de grandes cantidades de NO en el curso de la EII también puede tener relación con la elevada prevalencia tumoral observada en estos pacientes (Hordijk & Shivananda, 1989; Obrador & Riera, 2001), ya que la reacción del NO con ciertas aminas puede dar lugar a la formación de nitrosaminas, unos compuestos con gran potencial carcinogénico (Tamir & Tannenbaum, 1996).

Enteritis inducida por indometacina en la rata

3.1 Generalidades

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) tales como la indometacina, el ácido acetil salicílico o el diclofenaco sódico, causan lesiones inflamatorias intestinales tanto en animales como en el hombre, cuya intensidad depende de la dosis y de su potencia para inhibir la vía de la ciclooxigenasa (Whittle, 1981).

La enteritis inducida por la administración sistémica de indometacina en la rata se considera un buen modelo de enfermedad de Crohn, ya que presenta cierta similitud con algunas de las características clínicas e histopatológicas de esta enfermedad (Yamada *et al.*, 1993; Anthony *et al.*, 2000).

Mientras que la administración subcutánea de una dosis subletal de indometacina (7.5 mg/kg) produce una reacción inflamatoria aguda en el yeyuno distal y en el íleo proximal, que se caracteriza por la presencia de erosiones y úlceras en la mucosa, la administración de dos dosis en 24 horas provoca una cronificación de la reacción inflamatoria que puede llegar a persistir durante unas diez semanas en cepas de rata genéticamente susceptibles (Lewis) (Sartor *et al.*, 1992). En este caso, la enteritis inducida varía desde una inflamación difusa de la mucosa yeyuno-ileal con úlceras puntiformes en las primeras horas, hasta la presencia de nódulos inflamatorios con adherencias entre las asas intestinales adyacentes, inflamación granulomatosa transmural, úlceras lineales, serosa engrosada, abscesos de las criptas y fibrosis. La aparición de peritonitis debido a la formación de perforaciones es bastante frecuente, por lo que el índice de mortalidad en este modelo es elevado (cerca de un 20%) (Yamada *et al.*, 1993).

El mecanismo por el cual la indometacina induce la lesión intestinal es el resultado de múltiples factores, entre ellos la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Whittle, 1981) y la presencia de bacterias en la luz intestinal (Satoh *et al.*, 1983).

La disminución de la síntesis de prostaglandinas provoca una alteración en la permeabilidad de la mucosa, confiriéndole una menor resistencia a la penetración de agentes nocivos (Somasundaram *et al.*, 1995). El papel decisivo de las bacterias en este modelo se puso de manifiesto al observar que no aparecían lesiones en animales libres de gérmenes (*germ-free*) o en animales tratados con antibióticos (Reuter *et al.*, 1997).

Otros autores han demostrado que la lesión puede depender también de las condiciones de alimentación (Sato, 1982) y de la circulación enterohepática del fármaco (Banerjee & Peeters, 1990). Por otro lado, no hay que olvidar que los AINEs afectan a otras enzimas. Por ejemplo, la indometacina inhibe la fosfodiesterasa, la fosforilación oxidativa, la histidina descarboxilasa y las colagenasas, enzimas que también pueden participar en la fisiopatología de la lesión intestinal.

A pesar de las similitudes observadas entre este modelo y la enfermedad de Crohn, el daño intestinal inducido por la administración de indometacina es demasiado severo, por lo que este modelo experimental se utiliza básicamente en el estudio de los mecanismos que intervienen en la respuesta inflamatoria aguda (Konaka *et al.*, 1999). Sin embargo, una reducción de la agresividad de la respuesta inflamatoria a través de la modificación de la pauta de administración del fármaco podría dar lugar a la obtención de un modelo potencialmente útil de inflamación intestinal crónica.

3.2 *Evaluación de la motilidad intestinal*

La técnica utilizada en este estudio para valorar la motilidad intestinal (*strain-gauges*) se lleva a cabo en animales anestesiados a los que se les ha practicado una laparotomía, por lo que hay que tener en consideración las alteraciones que estos dos factores inducen en los patrones motores fisiológicos.

Ya en el año 1900, Bayliss & Starling describieron los efectos inhibitorios de la laparotomía sobre la actividad motora del intestino (Bayliss & Starling, 1900). Posteriormente se ha visto que este efecto es debido tanto a la incisión de las capas musculares abdominales y del peritoneo como al contacto de las asas intestinales con el aire, y que en los dos casos se inhiben los MMCs, que pueden tardar hasta siete horas en reaparecer (Kehlet & Holte, 2001). En lo que respecta a la anestesia, los efectos sobre la motilidad intestinal dependerán obviamente del protocolo anestésico utilizado en cada caso. En este estudio se ha utilizado tiopental sódico, que aunque se ha visto que reduce en un 20 % la velocidad de propagación de los MMCs (Bueno *et al.*, 1978), es uno de los anestésicos que menos efectos tiene sobre la transmisión nerviosa autónoma.

Debido a todo esto y a la duración de nuestros protocolos experimentales, en nuestro modelo la actividad motora no se presenta en forma de los patrones de motilidad descritos anteriormente. A pesar de todo, hay que destacar que estudios

previos en los que se ha utilizado esta técnica han demostrado la integridad tanto de los circuitos de control motor del intestino como de su reflejo más característico, el peristáltico (Giralt & Vergara, 1999; Torrents & Vergara, 2000). Los parámetros evaluados en este trabajo han sido los siguientes:

- Actividad motora espontánea (SMA): La motilidad intestinal en situación basal es el resultado de la integración funcional entre los diferentes componentes que intervienen en el control de la función motora, principalmente SNE, vías nerviosas extrínsecas, músculo liso intestinal e ICCs.

- Respuesta motora a la CCK: En este trabajo, se ha utilizado la respuesta motora a la administración exógena de CCK con el objetivo de evaluar el estado de los reflejos extrínsecos mediados a través de las vías vagales.

La CCK es una de las principales hormonas gastrointestinales que se libera en situación postprandial. Sus efectos sobre la actividad motora intestinal están mediados a través de vías aferentes vagales y pueden ser tanto excitatorios como inhibitorios dependiendo del mecanismo de acción implicado en la respuesta, y que está en función de la especie animal, del segmento intestinal y de la capa muscular (Lewis & Williams, 1990). En nuestro modelo experimental se ha visto que la infusión intra-arterial del octapéptido carboxiterminal de la CCK (CCK-8) provoca una estimulación de la motilidad duodenal debida a la activación de motoneuronas excitadoras que liberan Ach y SP. Por el contrario, en el yeyuno la administración de CCK tiene un efecto predominantemente inhibitorio (Giralt & Vergara, 1999).

- Contracción ascendente inducida por estimulación eléctrica: La estimulación eléctrica de la mucosa intestinal induce una respuesta excitadora craneal al punto de estimulación: el componente ascendente del reflejo peristáltico (Giralt & Vergara, 2000). En este trabajo hemos utilizado esta respuesta para valorar tanto la funcionalidad de las motoneuronas excitatorias como el tono de las motoneuronas inhibitorias, ya que aunque este reflejo está mediado por la liberación de NT excitadores (Ach, SP), la inhibición nitrérgica induce un incremento de la respuesta (Allescher *et al.*, 1992).

- Respuesta motora a la administración de L-NNA: El L-NNA es un inhibidor inespecífico de la NOS, por lo que la evaluación de la actividad motora tras su administración exógena proporciona una visión general del estado del tono inhibitorio nitrérgico.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La utilización de modelos experimentales permite profundizar en el estudio de algunos de los mecanismos implicados en el desarrollo de ciertas patologías de gran importancia en la clínica humana, como sería el caso de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

A pesar de que en los procesos inflamatorios intestinales se producen alteraciones funcionales tanto de la barrera epitelial como de la motilidad digestiva, se desconoce la implicación que pueden tener estos desordenes en la cronificación de la enfermedad humana. En este sentido, nuestra hipótesis de trabajo es la siguiente: las alteraciones de la motilidad digestiva juegan un papel fundamental en la cronificación de los procesos inflamatorios intestinales, ya que facilitan el sobrecrecimiento bacteriano y la captación de antígenos lumenales a través del epitelio, probablemente también alterado, perpetuando la respuesta inflamatoria.

Por todo ello, este trabajo de investigación se ha centrado en la caracterización de algunos de los mecanismos involucrados en la pérdida del control de la función motora en un modelo experimental de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, y en determinar qué papel juegan tanto estas alteraciones motoras como la disfunción de la barrera mucosa intestinal en la cronificación del proceso inflamatorio.

Los objetivos concretos de este estudio han sido los siguientes:

- Obtener un modelo adecuado de Enfermedad Inflamatoria Intestinal crónica en la rata.
- Describir las posibles alteraciones en la actividad motora intestinal observadas en este modelo de inflamación, centrándonos en el estudio de la motilidad espontánea, el reflejo peristáltico y la respuesta motora a la administración de CCK.
- Estudiar el efecto de las alteraciones motoras en la concentración de bacterias presentes tanto en la luz como en la pared intestinal.
- Determinar la posible afectación de la inervación inhibitoria nitrérgica en el curso del proceso inflamatorio.

- Determinar la participación de prostaglandinas y óxido nítrico en el desarrollo de las alteraciones motoras asociadas al proceso inflamatorio.
- Valorar el estado de la función barrera epitelial en las diferentes fases del proceso inflamatorio.

Capítulo 1

“Intestinal motor disturbances associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis”

Mònica Porras, María Teresa Martín, Mercè Soler & Patri Vergara

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 287:G58-G64, 2004.

ABSTRACT

The aims of this study were: 1) to obtain an experimental model reproducing the characteristics of chronicity and spontaneous relapses found in inflammatory bowel disease; and 2) to correlate these changes with intestinal motility and bacteria translocation.

Methods: For this purpose, two groups of Sprague-Dawley rats were used: a treated group, that received two sc injections of indomethacin (7.5 mg/kg) 48 hours apart, and a control group, that received saline. Blood leukocytes, TNF and fecal parameters were monitored for 90 days after treatment. In treated rats a cyclic oscillation of blood leukocytes and TNF concomitant with an inverse correlation of fecal output was observed. Treated rats were then selected either during their highest or lowest blood leukocyte values for motor activity and microbiological evaluation. Controls were obtained in age-matched rats.

Results: Rats with high leukocyte levels showed a decrease of motor activity. In contrast, animals with low leukocyte levels presented hypermotility. Bacterial overgrowth accompanied by bacterial translocation was found in the group with high leukocytes, whereas no differences were observed between control and indomethacin group during the lowest leukocyte phase.

Conclusions: We obtained a model of inflammatory bowel disease characterized by a chronic cyclic oscillation of intestinal motility, flora and inflammatory blood parameters. During the high leukocyte stage, motor activity decrease is related to bacterial translocation. This phase is followed by a reactive one characterized by hypermotility associated with a decrease in both bacterial growth and leukocytes. However, as in IBD, this reaction seems unable to prevent a return to relapse.

Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis

Monica Porras,¹ María Teresa Martín,¹ Mercè Soler,² and Patri Vergara¹

¹Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, and ²Centre de Recerca en Sanitat Animal, Universitat Autònoma de Barcelona 08193, Spain

Submitted 10 December 2003; accepted in final form 7 February 2004

Porras, Monica, María Teresa Martín, Mercè Soler, and Patri Vergara. Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G58–G64, 2004. First published February 12, 2004; 10.1152/ajpgi.00513.2003.—The aims of this study were: 1) to obtain an experimental model reproducing the characteristics of chronicity and spontaneous relapses found in inflammatory bowel disease (IBD) and 2) to correlate these changes with intestinal motility and bacteria translocation. For this purpose, two groups of Sprague-Dawley rats were used: a treated group that received two subcutaneous injections of indomethacin (7.5 mg/kg) 48 h apart and a control group that received saline. Blood leukocytes, TNF, and fecal parameters were monitored for 90 days after treatment. In treated rats, a cyclic oscillation of blood leukocytes and TNF concomitant with an inverse correlation of fecal output was observed. Treated rats were then selected either during their highest or lowest blood leukocyte values for motor activity and microbiological evaluation. Controls were obtained in age-matched rats. Rats with high leukocyte levels showed a decrease of motor activity. In contrast, animals with low leukocyte levels presented hypermotility. Bacterial overgrowth accompanied by bacterial translocation was found in the group with high leukocytes, whereas no differences were observed between the control and indomethacin groups during the lowest leukocyte phase. We obtained a model of IBD characterized by a chronic cyclic oscillation of intestinal motility, flora, and inflammatory blood parameters. During the high-leukocyte stage, motor activity decrease is related to bacterial translocation. This phase is followed by a reactive one characterized by hypermotility associated with a decrease in both bacterial growth and leukocytes. However, as in IBD, this reaction seems unable to prevent a return to relapse.

inflammatory bowel disease; gastrointestinal motility; gut flora; leukocytes

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) in its more common forms, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis, is characterized by presenting alternative phases of activity and quiescence and by its chronicity (11). Several studies (12, 22, 29) indicate an abnormal immune reactivity to intestinal flora as the cause for the inflammation, probably caused by impairment of the mucosal barrier function.

Systemic administration of indomethacin in the rat has been used to cause inflammation of the small intestine, which presents some histopathological similarities to lesions found in CD (5, 37). It has been suggested that inhibition of cyclooxygenase activity induced by this drug alters mucosal permeability (7), facilitating the entry of bacteria and other harmful substances into the lamina propria and producing inflammation (24). Luminal bacteria seems to be critical to the induction of

intestinal damage, because both germ-free rats (24) and animals treated with antibiotics (8) develop minimal lesions after the administration of indomethacin.

Although IBD patients present symptoms such as abdominal pain and diarrhea that suggest motor alterations, few motility studies have been performed (2). Moreover, it has been demonstrated that changes in motility are concomitant with inflammation, constituting a self-defense mechanism against the aggression (10, 34). Morphological and functional changes at the neuroendocrine structures controlling intestinal motility have also been observed using other models of inflammation such as those induced by nematode infection (30, 34).

Thus the objectives of our study were 1) to obtain a chronic model of enteritis using indomethacin, 2) to look for indicators of both active and reactive phases of the disease that can be easily determined, 3) to characterize small intestinal motility during both phases of the disease, 4) to evaluate the physiological mechanisms involved in the cyclical motor changes, and finally 5) to correlate motor changes with markers of inflammation, bacterial growth, and changes in bacteria location in the intestinal area.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Lyon, France), 8–10 wk old and weighing 300–350 g, were kept under conventional conditions in an environmentally controlled room (20–21°C, 12:12 h light-dark cycle) with water and standard laboratory rat chow available ad libitum. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Experimental Model

Rats were randomized in two groups: 1) indomethacin group ($n = 25$) receiving two subcutaneous injections of indomethacin (7.5 mg/kg) 48 h apart and 2) control group ($n = 12$) receiving saline. Dosage of indomethacin was decided according to a preliminary validation study designed to indicate a dosage that would produce a moderate inflammatory reaction with absence of ascitis and a average body weight loss of not more than 10%. Body weight, food consumption, and number of fecal pellets were monitored daily. Blood samples were taken every 3 days between 10:00 and 11:00 AM to monitor both blood leukocytes (BL) by using a Neubauer chamber and TNF by a specific ELISA (rat TNF- α ; Biosource International, Camarillo, California) with a minimum detectable concentration of 4 pg/ml. The BL cyclic oscillation observed in indomethacin-treated rats enabled the selection of animals according to their BL level: 50% at high blood level (Hbl) and 50% at low blood level (Lbl). Studies were performed

Address for reprint requests and other correspondence: M. T. Martín, Edificio V, Unidad de Fisiología, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain (E-mail: maite.martin@uab.es).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

at different times, starting 15 days after and ≤ 90 days after treatment. An additional group of rats ($n = 8$) was studied just 2 days after indomethacin treatment to evaluate the lesions induced and the acute motility changes.

Motility Studies

Motor activity was evaluated in indomethacin-treated rats at acute phase ($n = 4$), Hbl ($n = 8$), and Lbl ($n = 9$) as well as in the control group ($n = 8$).

Animal preparation. At 12:00 AM, after a fasting period of 6 h, animals were anaesthetized by inhalation of halothane to allow cannulation of the right jugular vein as previously described (34). Level III of anesthesia was maintained with intravenous thiopental sodium as required. A laparotomy was performed to suture three strain gauges (3×5 mm; Hugo Sachs Elektronik) to the wall of the duodenum (at 2 cm from the pylorus), proximal jejunum (at 2 cm from Treitz's ligament), and ileum (at 10 cm from cecum) to record circular muscle activity. Strain gauges were connected to high-gain amplifiers (MT8P; Lectromed), and signals were sent to a recording unit connected to a computer (PowerLab/800; ADInstruments). Finally, two electrode holders provided with two platinum electrodes each (World Precision Instruments, Sarasota, FL) were placed in the lumen 1 cm distally to the strain gauges of the duodenum and ileum, respectively, to induce ascending excitation of the peristaltic reflex by electrical mucosal stimulation (EMS) as previously described (14).

Evaluation of motor parameters. A protocol that has proven useful to investigate some mechanisms involved in the control of intestinal motor activity (32, 33, 34) was used. After an equilibration period of 10 min, spontaneous motor activity (SMA) was evaluated for 1 h. Afterward, CCK in octapeptide-sulfated form (CCK-8) (3×10^{-9} mol/kg) was intravenously infused during 10 min. After at least 1 h to allow the return to basal conditions, evaluation of both ascending inhibitory and excitatory innervation was performed by mucosal electrical stimulation of the duodenum and ileum at 30 V, 0.6 ms, and at 2 and 6 Hz (13). Each stimulus was applied for 30 s, and the polarity of the stimulating electrodes was reversed at 15 s. The interval between stimuli was 2 min. To evaluate the functionality of the nitrergic pathways, *N*^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) (10^{-5} mol/kg) was administered intravenously, and the electrical stimulation protocol was repeated 15 min later. Finally, atropine (0.3 mg/kg) was intravenously infused as a bolus, and 5 min later the electrical stimuli were repeated to assess the contribution of both cholinergic and noncholinergic components in the excitatory motor response.

Microbiological Studies

Both luminal bacteria and intestinal wall bacteria were evaluated in indomethacin-treated animals [acute ($n = 4$), Hbl ($n = 4$), and Lbl ($n = 4$)] and in a control group ($n = 4$). Samples were obtained at different time intervals after treatment in a similar way to the motility studies. Rats were killed by CO₂ inhalation, and pieces of distal duodenum, jejunum, ileum, and colon were obtained under sterile conditions.

Luminal bacteria. Intestinal contents from 2-cm pieces of each intestinal segment were weighted and diluted 1:10 in sterile saline solution. Homogenates were incubated under aerobic and anaerobic conditions at appropriate dilution volumes. Aerobic media consisted of blood agar and McConkey agar, and plates were incubated for 24 h at 37°C. Anaerobic media consisted of Schaedler agar with 5% lamb blood (Biomerieux), and plates were incubated in an anaerobic chamber for 48–72 h at 37°C. After incubation, colonies were identified by studying their morphological and biochemical properties. Final counts of colonies were referred to a gram of intestinal contents.

Intestinal wall bacteria. This protocol was performed as previously described (12). Briefly, 3-cm pieces of each intestinal segment previously rinsed with sterile saline solution were sonicated twice for 60 s

using a sterile container with 3 ml sterile saline each time. Specimens were frozen in liquid nitrogen, powdered in a mortar kept at -80°C on dry ice, and weighted. Samples were homogenized in 9 ml milk (Difco, Detroit, MI) and incubated at appropriate dilution volumes following the same protocol as described above. Colony-forming units were also referred to a gram of intestinal tissue.

In both protocols, the mean concentration of isolated species found in each segment from control animals was considered to be the value of reference for that segment. Samples from indomethacin rats showing a result 10-fold higher than the control group were considered positive.

Histopathological Study

Samples of duodenum, jejunum, ileum, and colon were taken from the same animals used in microbiological studies. Tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed for histopathology according to standard procedures. Signs of inflammation were evaluated after hematoxylin and eosin staining.

Drugs and Solutions

Indomethacin (Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in absolute ethanol (50 mg/ml) and diluted in a 0.1 M NaHCO₃ solution to obtain a 7.5 mg/kg dose in 0.3 ml final volume. CCK-8 (Peptide Institute, Osaka, Japan), was diluted in 1% NaHCO₃ solution to a concentration of 10^{-4} M and in buffered saline solution to work concentration. Atropine (Merck, Darmstadt, Germany) and L-NNA (Sigma) were diluted in saline solution.

Data Analysis

Data were expressed as means \pm SE. Motor response was quantified measuring the area under the curve delimited by the tracing, and the results were expressed in square millimeters. Results of animal monitoring and of motility obtained in acute studies were analyzed using an unpaired *t*-test. Data obtained from motility studies at chronic stages were analyzed using ANOVA and Bonferroni's post hoc test. In all cases, differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Animal Monitoring

Two days after treatment, the indomethacin group showed a decrease of food consumption (9.0 ± 1.9 vs. 29.4 ± 0.6 g in control group, $P < 0.05$) related to a reduced body weight gain (expressed as percentage of the initial weight) (-8.3 ± 1.2 vs. $5.9 \pm 0.5\%$, $P < 0.01$). After the first week, these parameters returned to normal values. Moreover, a high increase of blood leukocyte levels was also observed, from $10,872 \pm 140$ to $25,695 \pm 707$ cells/mm³, followed by a cyclic oscillation of this parameter (Fig. 1A). This oscillation determined a high leukocyte ($19,614 \pm 222$ cells/mm³; Hbl) and a low leukocyte ($15,369 \pm 259.7$ cells/mm³; Lbl) phase. Despite observation of a steady decrease over the monitored 90 days, no animal was free of this cyclical oscillation. In contrast, BL concentration was quite constant in the control group ($10,872 \pm 140$ cells/mm³; Fig. 1B), except for the normal decrease observed with aging (28). In a similar way, TNF in the same blood samples showed a parallel cyclical oscillation of its value in indomethacin rats, whereas TNF concentration was undetectable in control animals (Fig. 1, A and B).

Fecal pellets increased 24 h after the first dose of indomethacin (51.0 ± 0.8 pellets vs. 45.0 ± 1.2 pellets in control group, $P < 0.05$). Afterward, a cyclical oscillation in this parameter

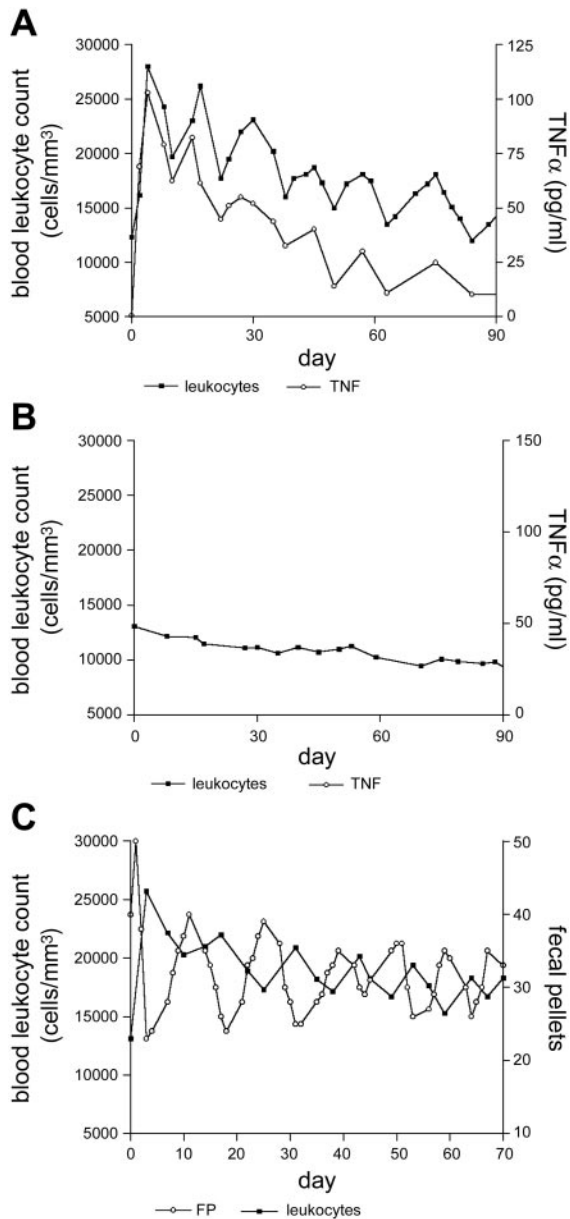


Fig. 1. *A*: representative graph showing blood leukocytes (BL) and TNF evolution after indomethacin treatment in an individual animal. *B*: representative graph showing BL evolution in a control animal. TNF was not detectable in this and other control animals. *C*: representative graph showing the oscillatory inverse correlation between BL and fecal pellets (FP) in an individual rat after indomethacin treatment.

was also observed, showing an inverse correlation with leukocyte and TNF values (Fig. 1C).

Motility Studies

Chronic-phase rats were studied from 15 to 90 days after treatment, and animals were selected at Hbl or Lbl phases. Acute-phase rats were studied at 2 days after indomethacin treatment.

Chronic phase. SMA. In the control group, SMA was characterized by isolated phasic contractions occurring at regular frequency. Treated rats at the Lbl phase presented an increase

of SMA, with higher frequency of contractions and the appearance of clustered phasic contractions, whereas SMA during the Hbl phase was practically nonexistent (Fig. 2).

RESPONSE TO CCK AND L-NNA. In control rats, CCK caused an increase in motor activity in the duodenum (from 18.6 ± 7.3 to 602.8 ± 120.2 mm², $P < 0.001$). In the indomethacin group, CCK response was higher at the Lbl phase and lower during the Hbl phase, compared with the response observed in control animals (Fig. 3). CCK has an inhibitory effect in the jejunum similar to that observed in previous studies (13, 14, 34). This inhibitory response was not modified in indomethacin rats.

The increase of motor activity induced by L-NNA in control rats showed a tendency to be greatest at the Lbl phase of indomethacin-treated animals. However, the differences only reached statistical significance in the jejunum (242.4 ± 41.7 vs. 117.0 ± 23.4 mm² in control group, $P < 0.05$). By contrast, no differences were observed in the response to L-NNA between the Hbl and the control group.

RESPONSE TO EMS. In control rats, EMS at 2 and 6 Hz always induced an ascending contraction recorded at the oral strain gauge, both in the duodenum and ileum. This response was

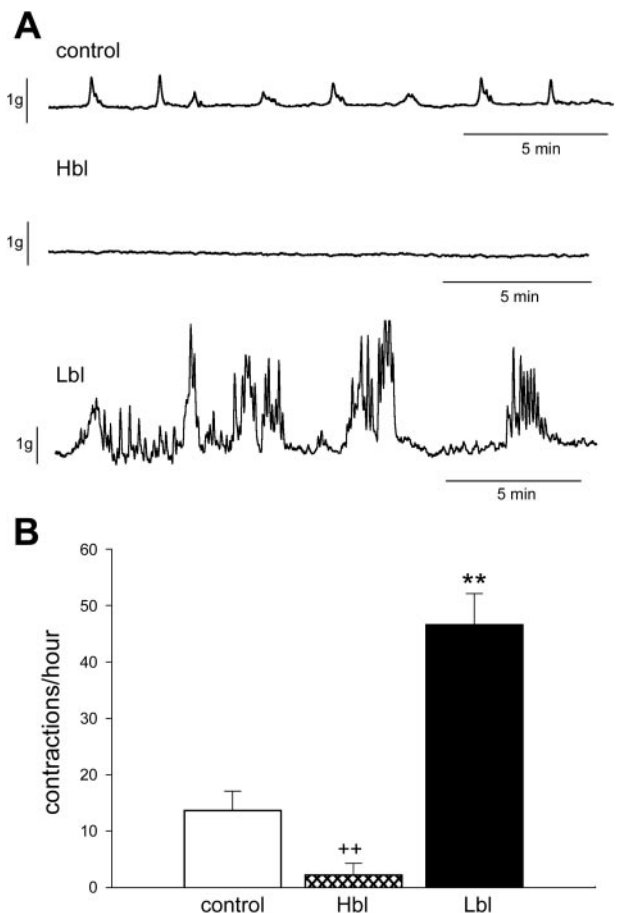


Fig. 2. *A*: representative recordings of mechanical activity showing the spontaneous motor events in the duodenum of one animal for each experimental group. Similar recordings were found in all the animals of the same group. *B*: average of frequency of contraction observed in the duodenal spontaneous motor activity in each group. **Significant difference ($P < 0.01$) vs. control group; ++significant difference ($P < 0.01$) between high blood level (Hbl) and low blood level (Lbl) groups.

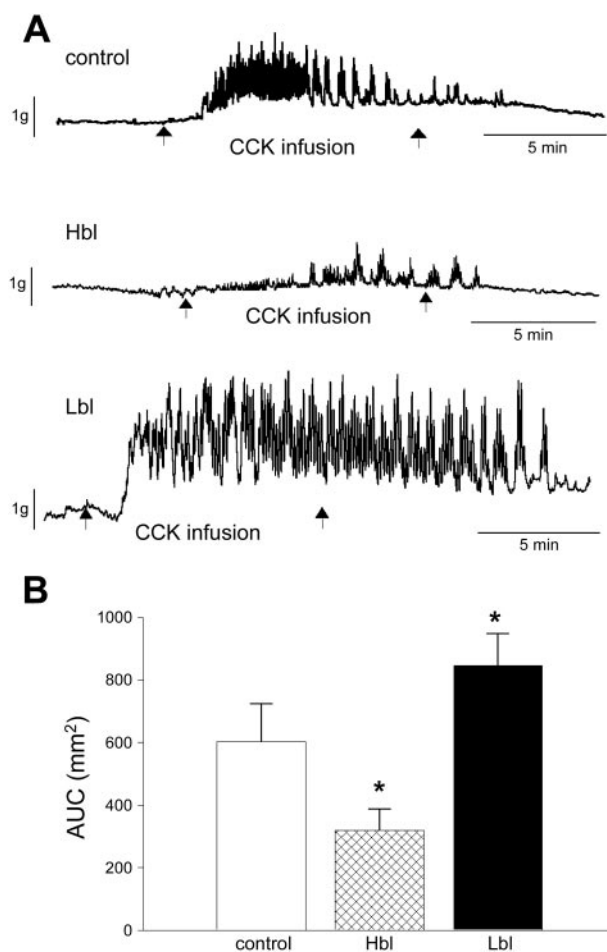


Fig. 3. A: representative recordings of mechanical activity showing motor activity in duodenum in response to CCK-8 infusion (3×10^{-9} mol/kg) in one animal of each experimental group. Arrows indicate beginning and end of infusion. Similar recordings were found in all the animals of the same group. B: quantitative analysis of the response to CCK in the duodenum in each group. AUC, area under the curve. *Significant difference $P < 0.05$ vs. control group (unpaired t -test).

increased by L-NNA and reduced by atropine. Differences in the response to EMS were observed according to the blood leukocyte stage of the animals.

In the Hbl group, a decrease in the magnitude of the response to EMS was observed in both studied segments at both frequencies of stimuli (Fig. 4). However, after L-NNA administration, the response to EMS was similar to the response after L-NNA in the duodenum of the control group. The ileal response after L-NNA was still lower than in the control group. In all cases, ascending contraction elicited after atropine administration was similar to the control group.

In the Lbl group, the response induced by stimulation at 2 Hz was not modified, whereas the contraction obtained after stimulation at 6 Hz was higher compared with the control group, especially in the ileum (Fig. 4). The response to EMS after L-NNA administration significantly increased in this group compared with the control group, and the magnitude of the remaining response after atropine in the ileum was also significantly higher.

Acute phase. The intestine of the indomethacin group did not show any SMA 2 days after the treatment. In contrast, no changes were observed in the CCK response in relation to the control group (490.9 ± 79.2 mm²), whereas a significant increase of activity was found after L-NNA infusion, both in the jejunum (343.4 ± 47.2 vs. 131.3 ± 35.4 mm² in control, $P < 0.01$) and ileum (323.0 ± 33.4 vs. 65.0 ± 31.3 mm² in control, $P < 0.01$). Response to EMS after L-NNA administration also significantly increased both in duodenum (2 Hz: 24.7 ± 5.1 vs. 7.8 ± 2.5 mm² in control, $P < 0.01$; 6 Hz: 56.0 ± 11.1 vs. 30.3 ± 10.0 mm² in control, $P < 0.05$) and ileum (2 Hz: 22.7 ± 6.7 vs. 3.0 ± 1.7 mm² in control, $P < 0.01$; 6 Hz: 48.8 ± 7.1 vs. 30.1 ± 6.8 mm² in control, $P < 0.05$), whereas no differences were observed after atropine administration in relation to the control group.

HISTOLOGICAL STUDY. Indomethacin induced an important acute inflammatory reaction in the small intestine, especially in the distal jejunum and proximal ileum. No changes were observed in the colon.

Macroscopically, alterations were observed until 15 days after treatment, characterized by a severe distention of the small bowel loops with an edematous appearance. White nodules were located on the serosal side of the mid-small intestine and multiple adhesions were also found. Microscopically, damage was maximal at 4 days after treatment, showing an inflammatory infiltrate with neutrophil and macrophage cells, accompanied by an extensive edema that affected both the mucosa and serosa. Multifocal subepithelial vacuolization and multiple mucosal ulcers on the mesenteric side of the small intestine were also found.

In contrast, 15 days after treatment no evident microscopic differences were observed between control and treated rats at Hbl or Lbl phases using the conventional staining procedure previously described.

MICROBIOLOGICAL STUDIES. Despite the normal appearance of the intestine from 15 days after treatment, marked changes in both bacterial luminal load (Table 1) and enteric bacterial wall colonization (Table 2) were observed in the small intestine as well as in the colon.

Species isolated under anaerobic conditions were mainly facultative anaerobes (gram-positive flora) both in small intestine and colon. In addition, a few strict anaerobes were also identified in the colon (*Clostridium*). Isolated gram-positive flora identified include the following: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus*, and *Lactobacillus*. The main enterobacteria cultured was *Escherichia coli*. Similarity of results from anaerobic and aerobic cultures allowed us to discard the anaerobic cultures and focus only on aerobic cultures.

In the acute phase, luminal enterobacteria increased in duodenum, jejunum, ileum, and colon, whereas a significant increase of gram-positive flora was only observed in colon. Moreover, bacterial translocation of both enterobacteria and gram-positive flora was found in all intestinal segments studied.

In the chronic phase, results obtained during the Lbl phase were similar to those observed in the control group. During the Hbl phase, an increase in the luminal enterobacteria was observed 30 days after treatment. Moreover, intestinal wall colonization of both enterobacteria and gram-positive flora was also detected in all segments studied.

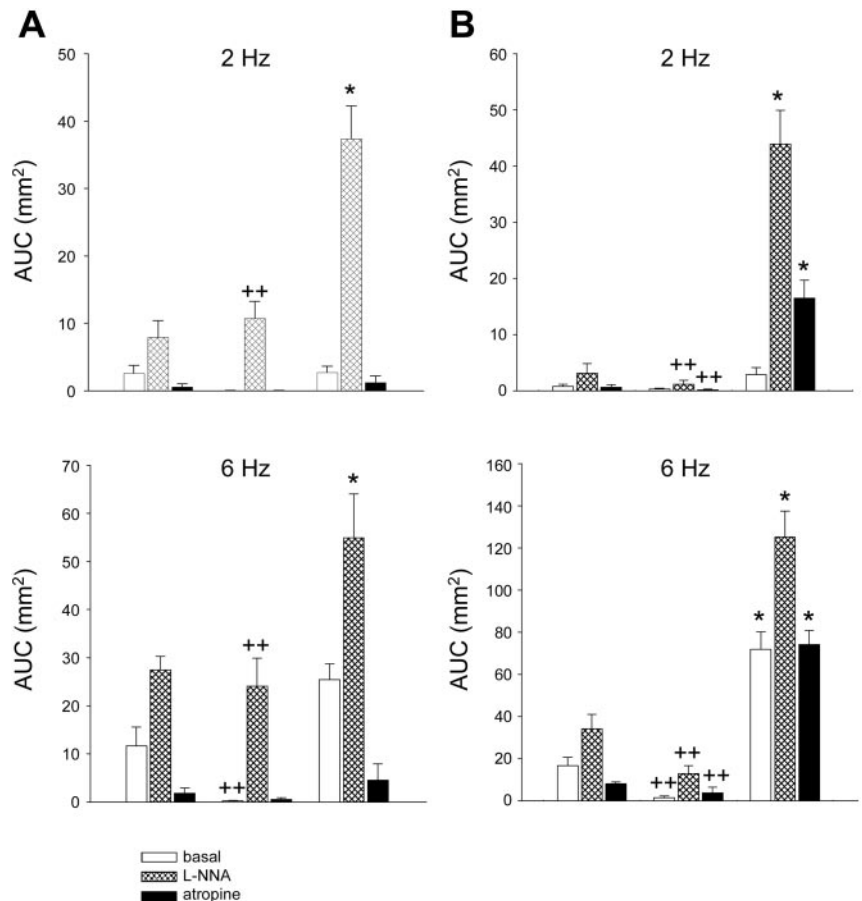


Fig. 4. Response to electrical stimulation at 2 and 6 Hz in basal conditions and after *N*^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) and atropine administration in duodenum (A) and ileum (B) in each experimental group. *Significant difference ($P < 0.05$) vs. control group. ++Significant difference ($P < 0.01$) between the Hbl and the Lbl group.

DISCUSSION

This study demonstrates that there is a high correlation between intestinal motor activity, bacterial translocation, and indicators of inflammation. We reproduced in an experimental model the chronic relapses reported in IBD patients. In this model, alternative phases of motor activity and quiescence occurred. These phases could be predicted by blood leukocyte

monitoring, as well as by the cyclic oscillation of TNF in serum. Hypomotility was related to high blood leukocyte and TNF concentration, whereas hypermotility was observed when leukocyte counting decreased to normal levels. Our results also show that high leukocyte values and hypomotility coincided with bacterial invasion of the intestinal wall.

Histological similarities between the rat indomethacin model and CD are well known (3, 5). However, because the described protocols using indomethacin cause extensive intestinal damage (19, 37), studies could only be performed a few

Table 1. Results from cultures of luminal specimens 2 days (acute) and 30 days (Hbl and Lbl) after indomethacin treatment

Intestinal Area	MC	Acute	Hbl	Lbl
<i>Group 1: Gram + Flora*</i>				
Duodenum	10 ⁷	0/4	0/4	0/4
Jejunum	10 ⁷	0/4	4/4 (10 ⁸)	0/4
Ileum	10 ⁸	0/4	0/4	0/4
Colon	10 ⁸	3/4 (10 ⁹)	0/4	0/4
<i>Group 2: Enterobacteria</i>				
Duodenum	10 ³	3/4 (10 ³ –10 ⁸)	3/4 (10 ³)	0/4
Jejunum	10 ³	3/4 (10 ⁴ –10 ⁸)	2/4 (10 ⁴)	0/4
Ileum	10 ⁵	4/4 (10 ⁷ –10 ⁹)	4/4 (10 ⁷)	0/4
Colon	10 ⁶	4/4 (10 ⁸ –10 ⁹)	0/4	0/4

Results from luminal cultures in both acute and chronic studies are expressed as positive cases/total number of rats. Positive cases are samples showing bacterial concentrations 10-fold higher than the control group; MC, mean concentration of control group; Hbl, high blood level; Lbl, low blood level. *Includes facultative anaerobes.

Table 2. Results from cultures of intestinal wall specimens 2 days (acute) and 30 days (Hbl and Lbl) after indomethacin treatment

Intestinal Area	MC	Acute	Hbl	Lbl
<i>Group 1: Gram + Flora*</i>				
Duodenum	10 ²	4/4 (10 ⁴)	4/4 (10 ³)	0/4
Jejunum	10 ³	2/4 (10 ⁴)	2/4 (10 ⁴)	0/4
Ileum	10 ⁴	4/4 (10 ⁵)	2/4 (10 ⁵)	0/4
Colon	10 ³	4/4 (10 ⁴)	4/4 (10 ⁴)	0/4
<i>Group 2: Enterobacteria</i>				
Duodenum	0	4/4 (10 ² –10 ³)	2/4 (10 ²)	0/4
Jejunum	0	4/4 (10 ² –10 ³)	2/4 (10 ²)	0/4
Ileum	10 ²	4/4 (10 ³ –10 ⁴)	2/4 (10 ⁴)	0/4
Colon	10 ²	4/4 (10 ⁴)	1/4 (10 ³)	0/4

Results from luminal cultures both in acute and chronic studies are expressed as positive cases/total number of rats. *Includes facultative anaerobes.

days after treatment. By modifying a previously reported protocol (27), we obtained rats with less-severe lesions, which allowed us to perform chronic studies. As previously reported (37), an initial inflammatory reaction was observed especially in the mid-small intestine, which was concomitant with enterobacteria overgrowth and wall invasion by both enterobacteria and gram-positive bacteria. Interestingly, a marked increase in wall invasion by bacteria was also observed in the colon despite the absence of any sign of inflammation, suggesting that functional alteration might also happen in noninflamed areas. As previously described (31), indomethacin markedly enhanced motility within 4 h (data not shown), an effect related to the increased number of fecal pellets observed 24 h after treatment. This hypermotility was transitory, as shown by a significant decrease in motor activity observed 2 days after treatment. L-NNA reverted this hypomotility, indicating an overexpression of nitric oxide synthase induced by the inflammatory process, similar to other models of inflammation (32).

In our model, evident morphological signs of inflammation disappeared in the second week after indomethacin treatment, whereas cyclical oscillation of motility, bacterial translocation, and inflammatory mediators continued to be present in the chronic phase. These findings agree with previous studies demonstrating that inflammation induces chronic changes at the structures controlling intestinal motor activity (6, 16). Moreover, our studies demonstrate that structures controlling motor activity react to bacterial translocation and inflammation.

The differentiated motility patterns observed in the indomethacin group indicate cyclical changes in the mechanisms controlling gastrointestinal motility. For instance, in the Lbl group, CCK response that is mediated by vagal afferent innervation (26, 32) was higher than that observed in healthy animals, indicating an increase in sensitivity of afferent mucosal fibers. Moreover, whereas the nitrergic innervation was preserved, as indicated by the increase in EMS response after L-NNA treatment, the remaining response after atropine was greater in response to EMS. This result is in agreement with other studies indicating the existence of functional changes in the excitatory acetylcholine/substance P neurons as a reaction to intestinal inflammation (1, 34) and with elevated levels of SP and increased expression of NK-1R in the myenteric plexus described in CD (15, 21).

In contrast, the lower response induced by CCK observed in the Hbl group suggests an impairment of excitatory pathways and/or an increase of the tonic nitrergic innervation. However, the basal ascending contraction elicited by EMS is decreased and significantly increased after L-NNA administration, further indicating that the hypomotility observed in these animals is related to an increase of the tone of nitrergic innervation. Moreover, the fact that no differences were observed in the response after atropine treatment indicates the preservation of excitatory pathways.

Luminal microflora is important for physiological gut motility (17), and its effect depends on the species involved (18). In addition to the role of pathogenic bacteria to induce motility disorders (20, 23), there is increasing evidence that luminal bacteria are implicated in the pathogenesis of IBD (9, 22, 36). Our results clearly show that both leukocytes and TNF increases (Hbl group) are concomitant with an enterobacterial overgrowth and a bacterial translocation. In contrast, during the

reactive phase (Lbl group), the microbiological results were similar to those observed in the control group, indicating that gut microflora was back to normal. It is well documented that bacterial overgrowth might be present in motility disorders (35). In our study, active phases of the inflammatory response (Hbl group) are concomitant with hypomotility, which contributes to the luminal enterobacteria overgrowth and allows the wall invasion by the flora. In contrast, the bacterial load decreases during the Lbl stage most probably as a result of the hypermotility observed in these animals. The lack of bacteria inside the wall reduces the inflammatory reaction as shown by the return to basal values of both leukocytes and TNF values.

Unfortunately, our results do not explain why, after a period of relative normality, the intestine returns to the active inflammatory phase. A prolonged period of intestinal permeability alteration has been demonstrated after inflammation (4). In consequence, our hypothesis is that bacterial translocation induces inflammatory reaction and thus hypermotility. Once hypermotility is established, both bacterial translocation and inflammatory reaction decrease, reducing the drive for hypermotility. However, if permeability remains altered, the decrease of motility could then favor a new bacterial translocation and the perpetuation of the disease. The high correlation between motility and active and reactive phases opens a new perspective on the study of the mechanisms implicated in IBD and its treatment.

In conclusion, we have obtained a chronic model of enteritis characterized by spontaneous cyclical alternation of active and reactive phases that are correlated with cyclical long-lasting motor changes. During the active phase, there is a decrease in motor activity that coincides with wall invasion by intestinal flora and an increase in the blood level of inflammatory indicators. This phase is followed by a reactive phase characterized by hypermotility that helps to restore both flora and BL values. However, as in IBD, this reaction seems unable to prevent a return to cyclic relapse.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Marco for the histological study, A. Acosta for care of the animals, and A. C. Hudson for editorial revision of the manuscript.

GRANTS

This study has been financially supported by the Generalitat de Catalunya (to M. Porras), Dirección General de Investigación, Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant SAF2002-03463, and Comissionat per a Universitats i Recerca, Generalitat de Catalunya Grant 2001SGR-00214.

REFERENCES

1. **Agro A and Stanis AM.** Inhibition of murine intestinal inflammation by anti-substance P antibody. *Reg Immunol* 5: 120–126, 1993.
2. **Annesse V, Bassotti G, Napolitano G, Usai P, Andriulli A, and Vantrappen G.** Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 32: 1107–1117, 1997.
3. **Anthony A, Ponder RE, Dhillon AP, and Wakefield AJ.** Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 241–245, 2000.
4. **Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard C, Chadee K, and Wallace JL.** Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G635–G644, 2001.
5. **Banerjee AK and Peters TJ.** Experimental nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in the rat: similarities to inflammatory bowel disease an effect of thromboxane synthetase inhibitors. *Gut* 31: 1358–1361, 1990.

6. **Belai A, Boulos PB, Robson T, and Burnstock G.** Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40: 767–774, 1997.
7. **Bjarnason I.** Intestinal permeability. *Gut* 35, Suppl 1: S18–S22, 1994.
8. **Bjarnason I, Hayllar J, Smethurst P, Price A, and Gumpel MJ.** Metronidazole reduces intestinal inflammation and blood loss in non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy. *Gut* 33: 1204–1208, 1992.
9. **Campieri M and Gionchetti P.** Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 48: 132–135, 2001.
10. **Castro GA, Badial-Aceves F, Smith JW, Dudrick SJ, and Weisbrodt NW.** Altered small bowel propulsion associated with parasitism. *Gastroenterology* 71: 620–625, 1976.
11. **Fiocchi C.** Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182–205, 1998.
12. **García Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, Laguarda M, Gavaldà J, Baena JA, Vilaseca J, and Malagelada JR.** Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272: G10–G15, 1997.
13. **Giralt M and Vergara P.** Both afferent and efferent nerves are implicated in cholecystokinin motor actions in the small intestine of the rat. *Regul Pept* 12: 73–80, 1999.
14. **Giralt M and Vergara P.** Inhibition by CCK of ascending contraction elicited by mucosal stimulation in the duodenum of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 12: 173–180, 2000.
15. **Goode T, O'Connell J, Anton O, Wong H, Reeve J, O'Sullivan GC, Collins JK, and Shanahan F.** Neurokinin-1 receptor expression in IBD: molecular quantitation and localisation. *Gut* 47: 387–396, 2000.
16. **Grossi L, Mchugh K, and Collins SM.** On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 104: 1049–1056, 1993.
17. **Husebye E, Hellstrom PM, and Midtvet T.** Intestinal microflora stimulates myoelectric activity of rat small intestine by promoting cyclic initiation and aboral propagation of migrating myoelectric complex. *Dig Dis Sci* 39: 946–956, 1994.
18. **Husebye E, Hellstrom PM, Sundler F, Chen J, and Midtvedt T.** Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G368–G380, 2001.
19. **Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, and Takeuchi K.** Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res* 40: 517–524, 1999.
20. **Lind CD, Davis RH, Guerrant RL, Lind CD, Davis RH, Guerrant RL, Kaper JB, and Mathias JR.** Effects of *Vibrio cholerae* recombinant strains on rabbit ileum in vivo. Enterotoxin production and myoelectric activity. *Gastroenterology* 101: 319–324, 1991.
21. **Mantyh CR, Vigna SR, Bollinger RR, Mantyh PW, Maggio JE, and Pappas TN.** Differential expression of substance P receptors in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 109: 850–860, 1995.
22. **McPherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, and Bjarnason I.** Mucosal antibodies in IBD are directed against intestinal bacteria. *Gut* 38: 365–375, 1996.
23. **Reeves-Darby VG, Turner JA, Prasad R, Chopra AK, Chary P, Clench MH, Peterson JW, and Mathias JR.** Effect of cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin on rabbit intestinal motility. *FEMS Microbiol Lett* 134: 239–244, 1995.
24. **Reuter BK, Davies NM, and Wallace JL.** Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 112: 109–117, 1997.
25. **Robert A and Asano T.** Resistance of germ-free rats to indomethacin-induced intestinal inflammation. *Prostaglandins* 14: 333–341, 1977.
26. **Rodriguez-Membrilla A and Vergara P.** Endogenous CCK disrupts the MMC pattern via capsaicin-sensitive vagal afferent fibers in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272: G100–G105, 1997.
27. **Ruh J, Schmidt E, Vogel F, and Klar E.** Indomethacin-induced disturbances in villous microcirculation in the rat ileum. *Microvas Res* 58: 137–143, 1999.
28. **Sanderson JH and Phillips CE.** Atlas of laboratory animal hematology. Oxford, UK: Oxford University Press, 1981.
29. **Sartor RB.** Review article: role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 3 Suppl 11: 17–23, 1997.
30. **Stead RH.** Nerve remodeling during intestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci* 664: 443–455, 1992.
31. **Takeuchi K, Miyazawa T, Tanaka A, Kato S, and Kunikata T.** Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion* 66: 30–41, 2002.
32. **Torrents D, Prats N, and Vergara P.** Inducible nitric oxide synthase inhibitors ameliorate hypermotility observed after *T. spiralis* infection in the rat. *Dig Dis Sci* 48: 1035–1049, 2003.
33. **Torrents D, Torres R, De Mora F, and Vergara P.** Antinerve growth factor treatment prevents intestinal dysmotility in *Trichinella spiralis*-infected rats. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 659–665, 2002.
34. **Torrents D and Vergara P.** In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G543–G551, 2000.
35. **Vantrappen G, Janssens J, Hellemans J, and Ghooys Y.** The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J Clin Invest* 59: 1158–1166, 1977.
36. **Videla S, Vilaseca J, Salas A, Salas A, Treserra F, Crespo E, Antolin M, and Malagelada JR.** Key role of intestinal microflora in sustaining chronic inflammation of the rat colon. *Gut* 35: 1090–1097, 1994.
37. **Yamada T, Deitch E, Specian R, Perry MA, Sartor RB, and Grisham MB.** Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 17: 641–662, 1993.

Capítulo 2

“Cyclical up-regulated iNOS and long-term down-regulated nNOS are the basis for active and quiescent phases in a rat model of IBD”

Mònica Porras, María Teresa Martín, Rosa Torres & Patri Vergara

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 290:G423-G430, 2006.

ABSTRACT

We previously reported that indomethacin induces a chronic intestinal inflammation in the rat where the cyclical characteristic phases of Crohn's disease are manifested with a few days' interval and lasting for several months: active phase (high inflammation, hypomotility, bacterial translocation) and reactive phase (low inflammation, hypermotility, no bacterial translocation). In this study we investigated the possible role of both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX) in the cyclicity of active and reactive phases in rats with chronic intestinal inflammation.

Methods: Rats selected at either active or reactive phases and from 2 to 60 days after indomethacin treatment were used. mRNA expression of both constitutive and inducible NOS and COX isoforms in each phase was evaluated by RT-PCR and cellular enzyme localization by immunohistochemistry. The effects of different COX and NOS inhibitors on the intestinal motor activity were tested.

Results: mRNA expression of COX-1 was not modified by inflammation whereas mRNA expression of nNOS was reduced in all indomethacin treated rats. In contrast, NOS and COX inducible forms showed a cyclical oscillation. mRNA expression and protein of both iNOS and COX-2 increased only during active phases. The intestinal hypomotility associated with active phases was turned into hypermotility after the administration of selective iNOS inhibitors.

Conclusions: Sustained down-regulation of constitutive NOS caused hypermotility, possibly as a defense mechanism. However, this reaction was masked during the active phases due to the inhibitory effects of nitric oxide resulting from the increased levels of inducible NOS isoform.

Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD

M. Porras,¹ M. T. Martín,¹ R. Torres,² and P. Vergara¹

¹Cell Biology, Physiology and Immunology Department, and ²Pharmacology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Submitted 13 July 2005; accepted in final form 18 October 2005

Porras, M., M. T. Martín, R. Torres, and P. Vergara. Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G423–G430, 2006. First published October 20, 2005; doi:10.1152/ajpgi.00323.2005.—We previously reported that indomethacin induces a chronic intestinal inflammation in the rat where the cyclical characteristic phases of Crohn's disease are manifested with a few days' interval and lasting for several months: active phase (high inflammation, hypomotility, bacterial translocation) and reactive phase (low inflammation, hypermotility, no bacterial translocation). In this study, we investigated the possible role of both constitutive and inducible isoforms of nitric oxide (NO) synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX) in the cyclicity of active and reactive phases in rats with chronic intestinal inflammation. Rats selected at either active or reactive phases and from 2 to 60 days after indomethacin treatment were used. mRNA expression of both constitutive and inducible NOS and COX isoforms in each phase was evaluated by RT-PCR and cellular enzyme localization by immunohistochemistry. The effects of different COX and NOS inhibitors on the intestinal motor activity were tested. mRNA expression of COX-1 was not modified by inflammation, whereas mRNA expression of neuronal NOS was reduced in all indomethacin-treated rats. In contrast, NOS and COX inducible forms showed a cyclical oscillation. mRNA expression and protein of both iNOS and COX-2 increased only during active phases. The intestinal hypomotility associated with active phases was turned into hypermotility after the administration of selective iNOS inhibitors. Sustained downregulation of constitutive NOS caused hypermotility, possibly as a defense mechanism. However, this reaction was masked during the active phases due to the inhibitory effects of NO resulting from the increased levels of the inducible NOS isoform.

nitric oxide; prostaglandins; intestinal inflammation; dysmotility; inducible nitric oxide synthase; neuronal nitric oxide synthase

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD) includes two chronic pathologies characterized by alternation of active and quiescent phases of inflammation: ulcerative colitis and Crohn's disease (9). Although its pathogenesis has not been well established, it has been suggested that some clinical manifestations frequently observed in IBD patients, such as abdominal pain, nausea, vomiting, ileus, or diarrhea, could be attributed to the deranged gastrointestinal motility associated with inflammation (5). Furthermore, an overproduction of nitric oxide (NO) and prostaglandins has been detected in inflamed intestinal samples in both human and experimental IBD (1, 7).

In a healthy state, constitutive neuronal NO synthase (nNOS) produces basal levels of NO to maintain the physiological tonic inhibition of the intestine (6). Moreover, NO

derived from nNOS also plays a role in the control of small intestinal motor parameters, i.e., inducing the conversion of fasting motility into a postprandial pattern (23). Prostaglandins produced by constitutive COX (COX-1) also modulate some gastrointestinal functions under physiological conditions, inducing contractibility of smooth muscles and neurotransmitter release (10).

During inflammation, inducible isoforms of NOS (iNOS) and COX (COX-2) are produced in response to different stimuli, such as LPS and proinflammatory cytokines (8, 13). Although several studies (14, 15, 26) have focused on the relationship between overproduction of NO and prostaglandins derived from iNOS and COX-2 and the disturbed motor activity related to intestinal inflammation, their specific pathophysiological effect on gut motility is still controversial.

By modifying a previously reported protocol (24), we have obtained a new chronic model of IBD induced by indomethacin and characterized by spontaneous cyclical alternation of active and reactive phases of inflammation, which are correlated with long-lasting motor disturbances (21). In this model, active phases of inflammation were related to high blood leukocyte and TNF concentration as well as a reduced motor activity, bacterial overgrowth, and bacterial translocation into the intestinal wall. In contrast, reactive phases were related to a reduction of inflammatory parameters, hypermotility, and normal bacterial load. This reactive phase is equivalent to the quiescent periods in IBD disease.

Because of the relevant role of NO during inflammatory states, we hypothesized that hypomotility associated with the active inflammatory phases of our model is related to an overproduction of NO derived from increased levels of iNOS. However, because coexpression of iNOS and COX-2 has been reported in intestinal inflammation, a putative role of prostaglandins in the disturbed motor activity cannot be dismissed. Thus the aims of the present study were 1) to evaluate the mRNA expression of the constitutive and inducible isoforms of both NOS and COX by RT-PCR in both active and reactive phases of inflammation; 2) to confirm and localize iNOS and COX-2 protein by immunohistochemistry; and 3) to determine the specific contribution of these enzymes on the deranged motor activity by testing the effects of different NOS and COX enzyme inhibitors on the intestinal motility of anesthetized rats.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Lyon, France), 8–10 wk old and weighing 300–350 g, were used. They were kept

Address for reprint requests and other correspondence: M. T. Martín, Edificio V, Unidad de Fisiología, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain (e-mail: maite.martin@uab.es).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

under conventional conditions in an environmentally controlled room (20–21°C, 60% humidity, 12:12-h light-dark cycle) with tap water and standard laboratory rat chow ad libitum. All experimental protocols were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Experimental model. Intestinal inflammation was induced by administration of two subcutaneous injections of indomethacin (7.5 mg/kg in a 0.3-ml volume) 48 h apart, as previously described (21). This model shows a spontaneous alternation of active and reactive phases of inflammation, where active phases are characterized by a generalized hypomotility, bacterial overgrowth, and increase of blood leukocytes and TNF levels, whereas reactive phases are associated to hypermotility, recovery of the normal intestinal flora load, and reduction of blood leukocytes and TNF levels. Blood leukocyte monitoring allowed the selection of animals during active (high blood leukocytes) and reactive (low blood leukocytes) phases of inflammation.

Experimental groups. Two groups of animals were used: 1) the indomethacin-treated group ($n = 44$) and 2) the control group ($n = 12$), which received saline. Studies were performed 2 days after indomethacin administration (acute stage) as well as 15 ± 3 , 30 ± 3 , and 60 ± 3 days after treatment (chronic stage), with the animals selected in active and reactive phases according to their blood leukocyte values.

RT-PCR studies. Ten-centimeter samples from the distal jejunum and the midileum of control and indomethacin-treated rats were taken immediately after the animals were killed by CO₂ inhalation. As a positive control of iNOS and COX-2 mRNA expression, four additional rats exposed to LPS (15 mg/kg ip) were used (16). Intestinal segments were divided into four equal parts, and each sample was frozen in liquid nitrogen and stored immediately at -80°C until use.

RNA extraction. Total RNA was extracted from samples using RNAwiz (Ambion, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions and treated with DNA-free (Ambion) for 30 min at 37°C to remove any genomic DNA contamination.

RT-PCR. First-strand cDNA was synthesized from 5 μg total RNA in a reaction mixture of 50 μl containing 0.5 μg of oligo18(dT) primer (Ambion), 2 mM dNTP (Ecogen, Barcelona, Spain), and 10 units Moloney murine leukemia virus (Ambion). The resultant cDNA was amplified in a total volume of 50 μl with 1 units of *taq*DNA, 1 mM dNTP mixture, and 0.5 μM primers (Proligo). The sequences of sense and antisense primers for rat iNOS, nNOS, COX-2, COX-1, and GAPDH (a constitutively expressed gene used as a control of the efficiency of cDNA synthesis) are listed in Table 1. The PCR amplification protocol was as follows: 35 cycles with 1 min of denaturation at 95°C ; 1 min of annealing at 56°C (COX-2), 53°C (nNOS), or 50°C (COX-1, iNOS, and GAPDH); and 1 min of extension at 72°C on a thermal cycler. Amplified products were

electrophoresed on 1.5% agarose gel in TAE buffer, stained with ethidium bromide, photographed under ultraviolet light, and quantified using image-analyzing software (Quantity-One, Bio-Rad Laboratories). For semiquantification, the ratio of the optical density of each PCR product and GAPDH was determined.

Immunohistochemistry of iNOS and COX-2. Immunohistochemistry of iNOS and COX-2 was performed in tissue sections (5 μm) of both the jejunum and ileum prepared on adhesive-coated slides, deparaffined, and rehydrated. Sections were treated for antigen retrieval by boiling in 10 mM citrate buffer (pH 6) for 15 min. After being washed with PBS, sections were incubated in 5% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity and washed again with PBS. Nonspecific binding was blocked with a 20% goat (for detecting iNOS) or rabbit (for detecting COX-2) serum solution in PBS for 1 h at room temperature. Sections were incubated overnight at 4°C with anti-iNOS antibody (1:100; Neo-markers, Fremont, CA) or anti-COX-2 antibody (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). In additional control sections, the primary antibody was omitted. A biotinylated goat anti-rabbit (for detecting iNOS) or rabbit anti-goat (for detecting COX-2) IgG (Santa Cruz Biotechnology) was used as a secondary antibody diluted in PBS at 1:200. Sections were then treated with an avidin-biotin horseradish peroxidase kit (Vector Laboratories), and reaction products were detected using a diaminobenzidine substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories).

Motility studies. Motor activity was evaluated in the indomethacin group 30 ± 3 days after treatment in both active and reactive phases of inflammation as well as in the control group. Surgical procedure was performed as previously described (21). Briefly, animals fasted for 6 h were anesthetized by halothane inhalation. The right jugular vein was cannulated to maintain level III of anesthesia by administration of thiopental sodium as required. A laparotomy was performed to suture three strain gauges (3×5 mm, Hugo Sachs Elektronik, Germany) to the wall of the duodenum (at 2 cm from the pylorus), proximal jejunum (at 2 cm from Treitz's ligament), and ileum (at 10 cm from cecum) to record circular muscle activity. Strain gauges were connected to high-gain amplifiers (MT8P; Lectromed, UK), and signals were sent to a recording unit connected to a computer (PowerLab/800; ADInstruments).

After an equilibration period of 10 min, spontaneous motor activity was recorded for 1 h. To evaluate the effects of NOS inhibitors, motility was recorded for 1 h after intravenous administration of L-N^G-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL), a selective iNOS inhibitor (4 mg/kg). Immediately after, N^G-nitro-L-arginine (L-NNA; 10^{-5} mol/kg), a nonselective NOS inhibitor, was injected, and motor activity was recorded for 1 h more. To test the effect of COX-2 inhibition, a separated set of animals was used and motility was recorded for 1 h after the administration of SC-58125 (10 mg/kg sc), a selective

Table 1. Sequences of sense and antisense primers for rat COX-1, COX-2, nNOS, iNOS, and GAPDH

Enzyme	Sequence	PCR Product, bp	cDNA Position	NCBI Refseq
COX-1				
Sense	5'-CCTCAACACCAAGACCTG-3'	402	1765–1782	
Antisense	5'-CACCCCTGCCCTGTGATAT-3'		2149–2167	S67721
COX-2				
Sense	5'-CAACAGCCCATCTCTCAA-3'	483	2996–3013	
Antisense	5'-CCCACTAACTGACTCTCT-3'		3462–3479	S67722
nNOS				
Sense	5'-CCTCTCTGGCCACTAATG-3'	335	3541–3558	
Antisense	5'-GACTACATCGTCAGCCTG-3'		3858–3875	NM-052799
iNOS				
Sense	5'-CGGATATCTCTTGAAGTC-3'	272	493–511	
Antisense	5'-GTGTCTGCAGATATGCTGG-3'		848–865	NM-012611
GAPDH				
Sense	5'-CGGCCCTTCGGCTGATGCC-3'	140	1208–1227	
Antisense	5'-ATGAGCCCTTCCACGATGCC-3'		1348–1367	NM-017008

COX, cyclooxygenase; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase.

COX-2 inhibitor. Motor responses were quantified by measuring the area under the curve per minute and are expressed in square millimeters.

Drugs and solutions. Lipopolysaccharide 0111:B4 (*Escherichia coli*), L-NNA, and L-NIL from Sigma (St. Louis, MO) were dissolved in saline solution. Indomethacin (Sigma) was dissolved in absolute ethanol (50 mg/ml) and diluted in a 0.1 M NaHCO₃ solution. 5-(4-Fluorophenyl)-1-[4-(methylsulfonyl)-phenyl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole (SC-58125) from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI) was dissolved in DMSO (20 mg/ml).

Data analysis and statistics. Data are expressed as means ± SE. Differences in mRNA expression between groups were compared using one-way ANOVA and Bonferroni's post hoc analysis. In motility studies, a paired *t*-test was used to compare the effects of COX and NOS inhibitors vs. spontaneous motor activity. Results were considered to be statistically significant when *P* < 0.05.

RESULTS

iNOS and nNOS mRNA expression. After 35 cycles of PCR using specific primers for iNOS, nNOS, and GAPDH as an internal standard, single bands for each cDNA at the expected size were observed. The ratios of iNOS and nNOS to GAPDH for each group are shown in Fig. 1.

In control animals, a low expression of iNOS mRNA was detected in the ileum. Indomethacin rats selected 2 days after treatment showed a high increase in both jejunal and ileal iNOS mRNA expression, whereas in the chronic stage, an oscillation of iNOS expression was found according to the phase in which animals were selected. As shown, iNOS mRNA expression significantly increased during the active phases of

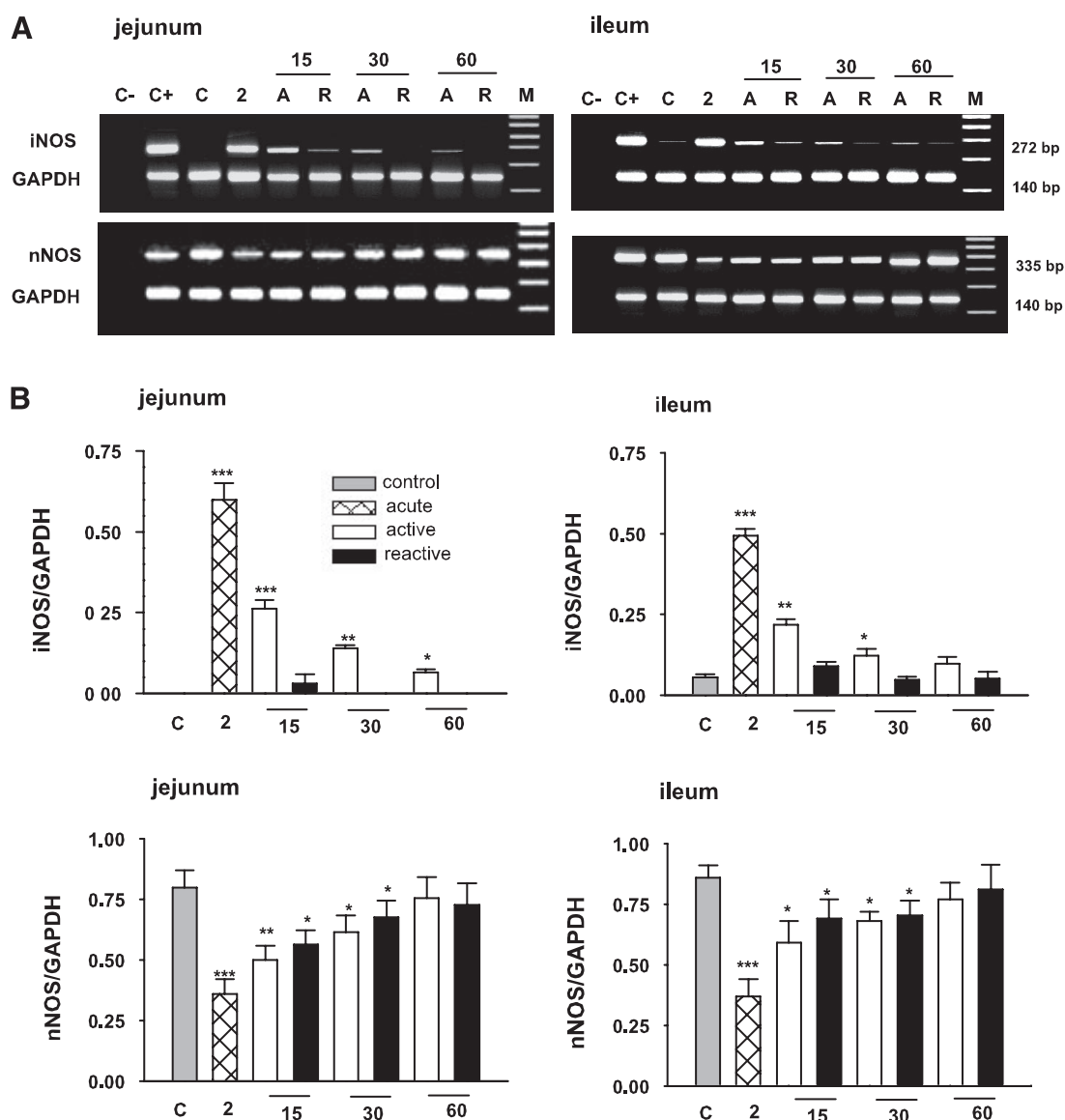


Fig. 1. A: representative photographs showing the expression of inducible and neuronal isoforms of nitric oxide synthase (iNOS and nNOS, respectively) mRNA in jejunum-treated and ileum (J) from control and indomethacin (I) rats selected in acute (day 2) and chronic inflammatory stage (days 15, 30, and 60 after treatment). Rats with chronic inflammation were selected in active and reactive phases, according to their blood leukocyte levels. C-, negative PCR control; C+, positive control (LPS group); C, control animal; A, active phase; R, reactive phase; M, molecular weight marker. B: bar diagrams showing semiquantitative analysis by RT-PCR of iNOS and nNOS mRNA in J and I of control and indomethacin-treated rats. Values are means ± SE of *n* = 4–6 in each group. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 vs. the control group.

inflammation, whereas a return to normal levels was observed during the reactive phases.

Regarding the constitutive NOS isoform, a similar expression of the enzyme was observed in control animals in both jejunal and ileal segments. By contrast, a reduction in the expression of nNOS was found in animals 2 days after indomethacin administration. This decrease of nNOS mRNA expression was maintained until 30 days after indomethacin treatment, independently of the phase in which animals were selected.

COX-2 and COX-1 mRNA expression. Similarly to iNOS expression, a high increase in both the jejunal and ileal COX-2 mRNA expression was observed in indomethacin-treated animals 2 days after administration, whereas differences in the COX-2 mRNA expression were observed in the chronic stage according to the phase in which animals were selected (Fig. 2). Whereas COX-2 mRNA expression was significantly increased

during the active phases of inflammation, a return to normal levels was observed during the reactive phases.

Regarding the constitutive COX isoform, a similar expression was found in control and indomethacin-treated rats, independently of the phase in which they were selected.

iNOS and COX-2 immunohistochemistry. In control animals, no immunostaining of any inducible isoform was observed in jejunal tissues, whereas only weak iNOS and COX-2 immunoreactivity was detectable in the cytoplasm of enterocytes located in the apical side of ileal villi, as shown in Fig. 3. In animals selected 2 days after indomethacin treatment, marked COX-2 and iNOS immunoreactivity was evident throughout the gut wall in both intestinal segments but was particularly noticeable in the cytoplasm of epithelial cells. In the chronic stage, a similar distribution of both proteins was observed in samples from animals selected at active phases of inflammation. In these animals, positive staining was intense in the

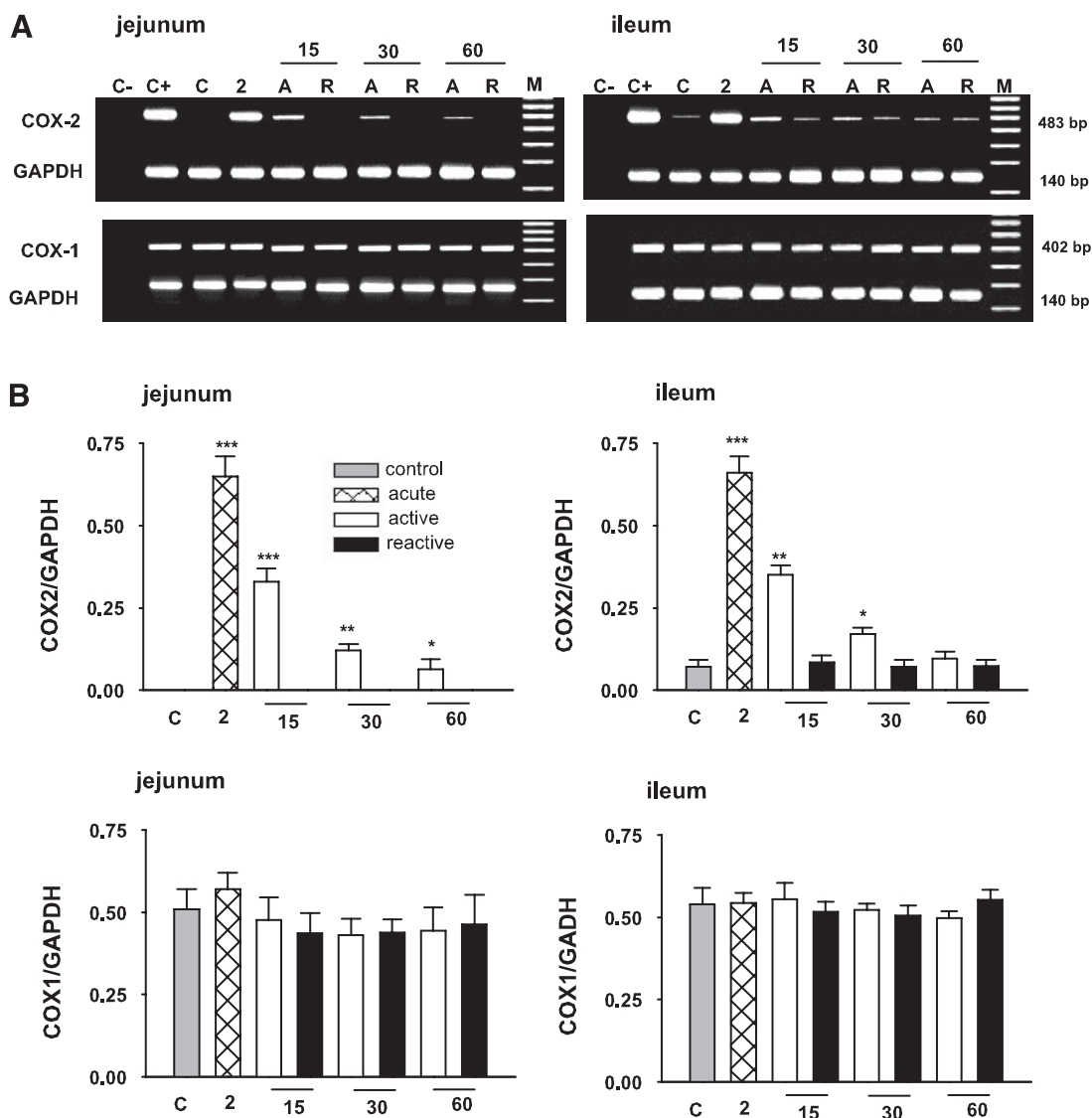


Fig. 2. A: representative photographs showing the expression of cyclooxygenase (COX)-2 and COX-1 mRNA in J and I from control and indomethacin-treated rats selected in acute (day 2) and chronic inflammatory stage (days 15, 30, and 60 after treatment). Rats with chronic inflammation were selected in active and reactive phases, according to their blood leukocyte levels. B: bar diagrams showing semiquantitative analysis by RT-PCR of COX-2 and COX-1 mRNA in J and I of control and indomethacin-treated rats. Values are means \pm SE of $n = 4-6$ in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. the control group.

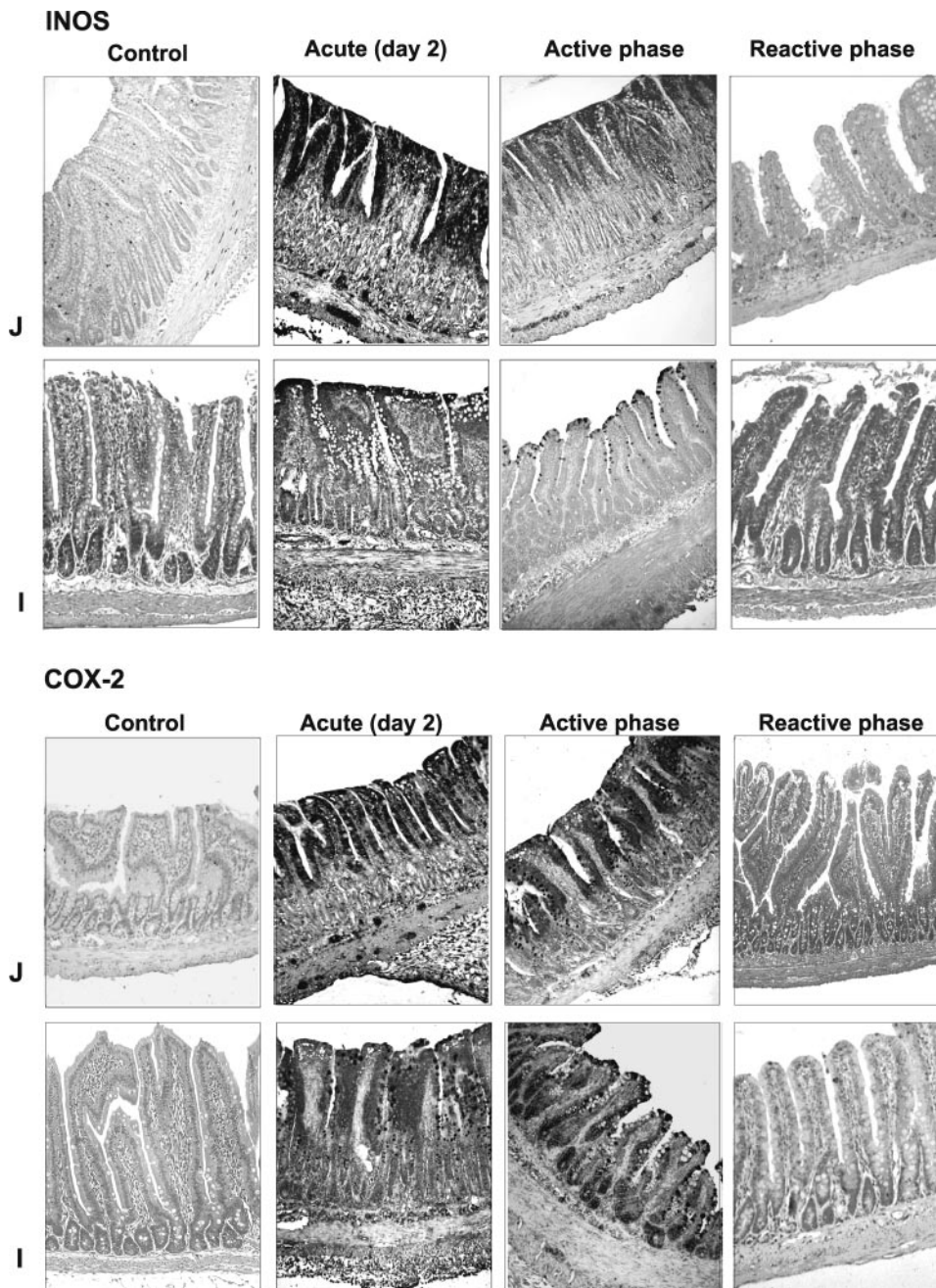


Fig. 3. Immunohistochemical localization of iNOS and COX-2 proteins in J and I from control and indomethacin-treated rats selected 2 and 30 days after treatment. Control animals and indomethacin-treated rats selected during the reactive phase of inflammation showed only a weak staining in the apical side of ileal villi, whereas indomethacin-treated rats selected 2 days after the treatment (acute stage) and those selected during the active phases of inflammation showed an extensive staining throughout the intestinal walls, particularly in the epithelia. Original magnification, $\times 100$.

mucosa, including the cytoplasm of enterocytes and cells in the lamina propria. Additional staining in cells located in the submucosa, muscle layers, and serosa was also observed. By contrast, during the reactive phases, only a weak immunostaining was observed in the cytoplasm of some enterocytes located in the apical side of villi, similar to that found in control animals.

Motility studies. As previously described (21), spontaneous motor activity in control animals was characterized by isolated phasic contractions occurring at regular frequency. All indomethacin-treated rats selected at different phases of inflammation showed an alteration of this typical motor pattern. Whereas motor activity increased significantly during the reactive phases, a severe hypomotility was observed during the

active phases of inflammation. As shown in Fig. 4, administration of L-NIL (a selective iNOS inhibitor) failed to modify motor activity in control and indomethacin-treated rats selected during the reactive phase, whereas during the active phase of inflammation, L-NIL induced a significant increase of motor activity, with this induced motility similar to that observed during the reactive phases. Administration of L-NNA (a non-selective NOS inhibitor) resulted in an increase in the motor activity in all groups studied. However, the effect of L-NNA was higher in the control group than in treated animals.

With respect to the results obtained after COX-2 activity inhibition, administration of SC-58125 did not change the motor activity in neither control nor indomethacin-treated rats selected during the reactive phase, whereas a slight increase of

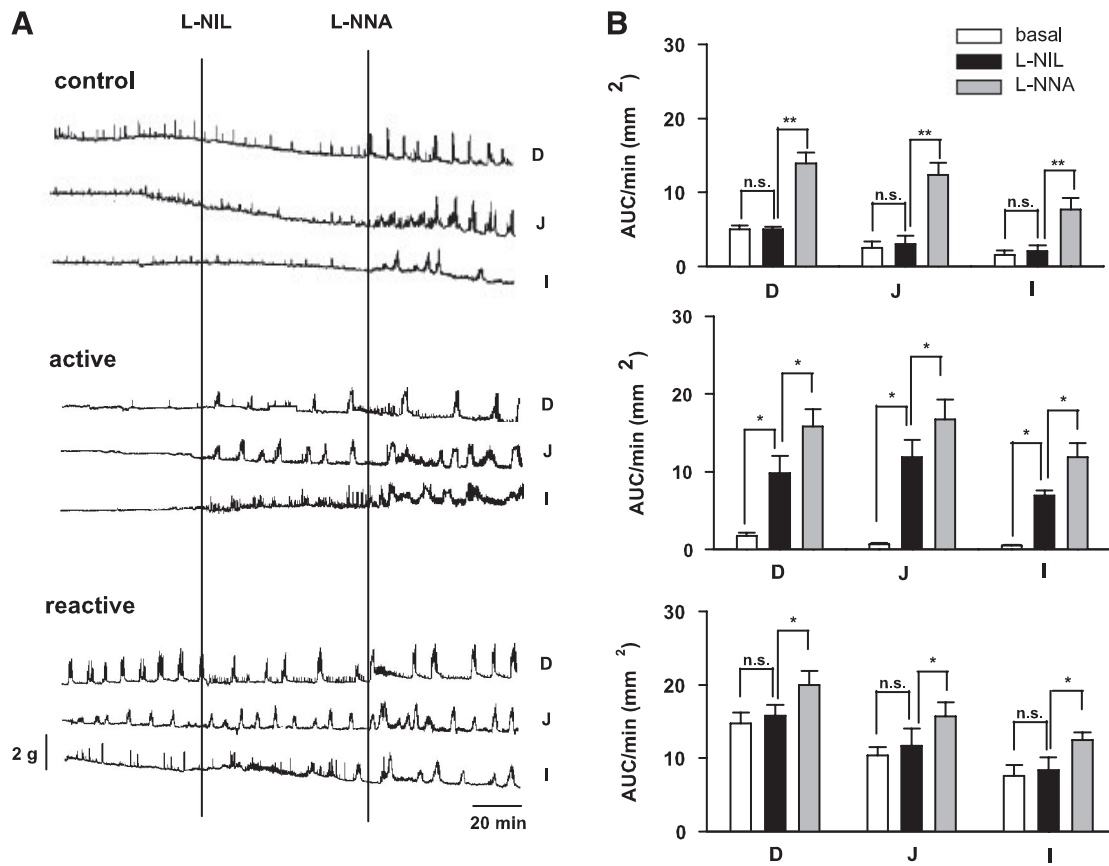


Fig. 4. *A*: representative recordings showing motor activity in the duodenum (D), J, and I of control and indomethacin-treated rats selected during the active and reactive phases of inflammation. Motor activity was evaluated in the basal situation and after the administration of *L*-*N*⁶-(1-iminoethyl)-lysine (L-NIL), a selective iNOS inhibitor, and *N*^ω-nitro-*L*-arginine (L-NNA), a nonselective NOS inhibitor. *B*: quantitative analysis of the motor activity in each group. Values are means \pm SE of $n = 4$ in each group. Significant difference ($*P < 0.05$) vs. basal motor activity or vs. motor activity after L-NIL administration (paired *t*-test). AUC, area under the curve; ns, nonsignificant difference.

motor activity was observed in rats selected during the active phase, with this induced motility similar to that observed in control animals (Fig. 5).

DISCUSSION

Using an experimental model of intestinal inflammation induced by indomethacin, we previously described oscillations of active and reactive phases of inflammation that are similar to the active and quiescence episodes observed in IBD patients. During the active phases, an increase of inflammatory parameters associated with hypomotility and bacterial translocation was observed in indomethacin-treated rats, whereas the reactive phases were characterized by a decrease of these inflammatory parameters, hypermotility, and normal bacterial load (21).

In the present study, the results derived from using this model demonstrate that NO derived from the upregulated iNOS is responsible for the hypomotility associated with the active phases of the disease. Furthermore, this study shows a downregulation of nNOS that is maintained through the chronic inflammatory state and causes a decrease in the inhibitory tone of the intestine. Both isoenzymes seem to be responsible for the cyclical hypo-hypermotility pattern.

The upregulation of both iNOS and COX-2 mRNA observed during the active phases suggests that both pathways are

coexpressed as previously reported using other models of inflammation (20, 28). However, in contrast to previous reports relating the coexpression of both enzymes to the disturbed motor activity observed in the course of intestinal inflammation (14, 15), our results do not corroborate an equal participation of both coenzymes in the hypo-hypermotility cycle. Our motility results clearly demonstrate that hypomotility is mainly a consequence of an overproduction of NO. In contrast, COX-2 inhibitor at the dose used did not substantially modify motility parameters. This dose has been reported to be effective in other inflammatory studies (25, 29). In consequence, and in contrast to that suggested in other studies (14, 26), prostaglandins induced by COX-2 seem to play a nonsignificant role in either the hypomotility or during hypermotility. This discrepancy may indicate that the mechanisms controlling motor activity are more susceptible to prostaglandins induced by COX-2 in the course of acute inflammation than to prostaglandins produced in a more chronic inflammatory state. Intestinal motor activity is an important regulator of luminal bacterial load (11, 19), and, in consequence, hypomotility induced by NO overproduction during the active phases of inflammation could be the cause of the bacterial overgrowth observed in our previous study with indomethacin-treated rats (21) as well as in IBD patients (12).

Another interesting finding of the present study is that, in contrast to the unchanged COX-1 expression, a long-lasting

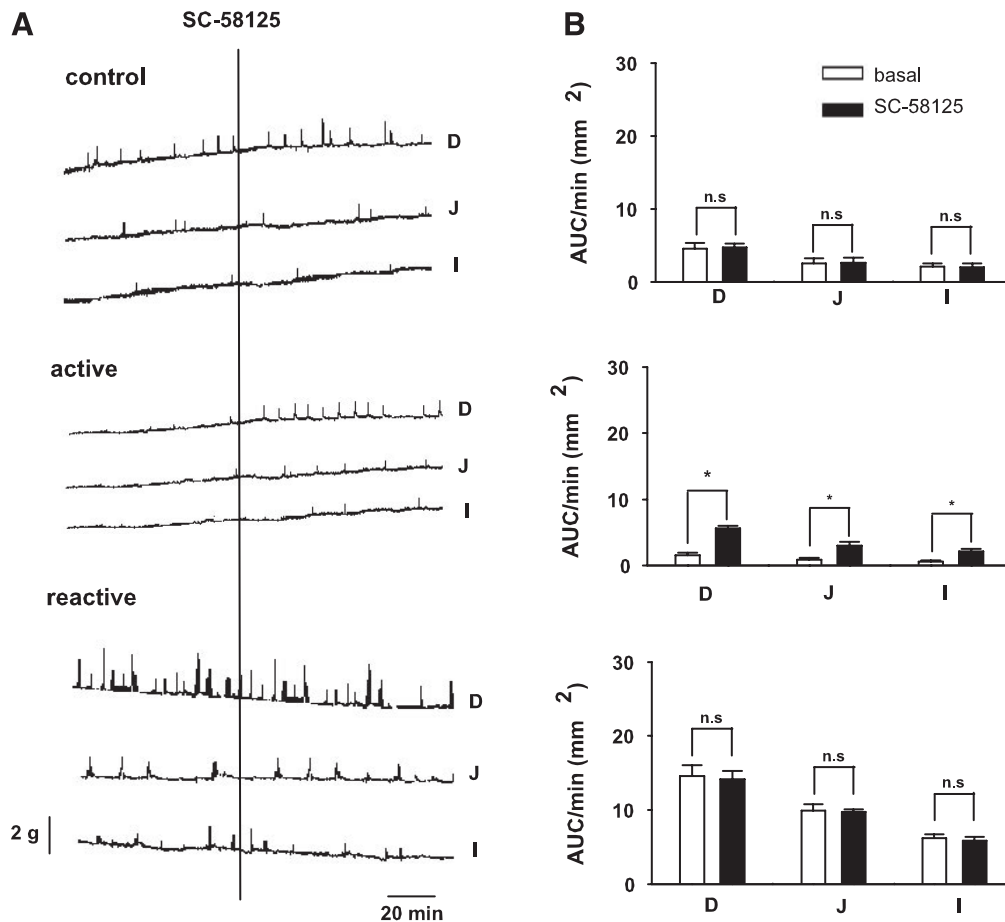


Fig. 5. A: representative recordings showing motor activity in the D, J, and I of control and indomethacin-treated rats selected during the active and reactive phases of inflammation. Motor activity was evaluated in the basal situation and after the administration of SC-58125, a selective COX-2 inhibitor. B: quantitative analysis of the motor activity in each group. Values are means \pm SE of $n = 4$ in each group. Significant difference ($*P < 0.05$) vs. basal motor activity (paired t -test).

decrease in the mRNA expression of nNOS was observed during both phases of inflammation. This result is in agreement with previous reports describing impaired synthesis of NO caused by reduction of immune-reactive nNOS cells in experimental models of colitis (4, 18). However, to our knowledge, this is the first study demonstrating downregulation of nNOS expression by RT-PCR in a model of enteritis. We observed this downregulation 2 days after induction of inflammation, suggesting that it is an early event, probably occurring as soon as the inflammatory process is initiated.

In comparison to NO derived from iNOS, the role of NO released from nNOS has been poorly studied. However, NO derived from nNOS is responsible for the physiological inhibitory tone of the intestine (3, 6). In consequence, the downregulation of this enzyme during intestinal inflammation causes hypermotility and could be part of the integrative defensive mechanisms existing in the gut to expel a noxious cause. A defensive reaction of the gut consisting on hypermotility is observed in inflammatory experimental models of nematode infection (27), facilitating the parasite expulsion and spontaneous cure. Our results show that nNOS downregulation causes hypermotility in a similar way as in those models of inflammation with spontaneous cure. Moreover, this reaction seems to be present for as long as the inflammation persists, but

it is cyclically masked by the overexpression of iNOS causing hypomotility.

The suppression of nNOS gene expression has been attributed to large amounts of cytokines released during the acute phase of inflammation (2). In addition, it has been suggested that NO derived from nNOS activity keeps iNOS suppressed under normal conditions, whereas in the course of intestinal inflammation, downregulation of nNOS is a necessary condition to facilitate the expression of iNOS and the release of large amounts of NO (22). However, our results show that iNOS regulation is more complex. nNOS downregulation could induce iNOS overexpression, but our results also show that iNOS has a cyclical expression, whereas nNOS expression remains continuously downregulated. Another study (17) suggests that the large amounts of NO as the result of the overexpression of iNOS constitute a negative feedback mechanism of iNOS expression. Our results could be in agreement with this hypothesis: downregulation of nNOS induces upregulation of iNOS; however, iNOS expression could be downregulated when NO production is high.

Previous studies from our laboratory have demonstrated sustained impairment of epithelial barrier function in animals with induced inflammation (unpublished data). Our hypothesis is that whereas antigen load is maintained at lower level, due to

normal or enhanced motility (as in reactive phases), there is no inflammatory response despite the increased intestinal permeability. However, when motor activity decreases and bacterial load rises, a higher proportion of antigens can interact with the mucosal surface and traverse through the dilated tight junctions, resulting in the activation of the immune system and the upregulation of iNOS (and COX-2).

In conclusion, regulation of both iNOS and nNOS plays a fundamental role in the course of intestinal inflammation. Whereas nNOS is long term downregulated, iNOS expression only increases cyclically during the active phases of inflammation. Downregulation of nNOS could act as a defensive mechanism by reducing intestinal tonic inhibition and, hence, by allowing the increase of gastrointestinal motility in an attempt to eliminate luminal noxious agents. However, as in IBD, this reaction seems unable to stop the cyclical relapse into another active phase, whereas upregulation of iNOS causes overproduction of NO-inducing intestinal hypomotility and then bacterial overgrowth.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to A. C. Hudson for the editorial revision of the manuscript and to A. Acosta for the care of the animals.

GRANTS

This work was supported by Generalitat de Catalunya (financial support to M. Porras) Grant SAF2002-03563 from Direcció General de Investigació, Ministerio de Ciencia y Tecnología, and Grant 2991SGR-00214 from Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica, Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Alican I and Kubek P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 270: G225–G237, 1996.
- Bandyopadhyay A, Chakder S, and Rattan S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon- γ and VIP. *Am J Physiol Cell Physiol* 272: C1790–C1797, 1997.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maerckel YM, and Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346–347, 1990.
- Cho SH, Park H, Chung JP, Lee YH, Ji SW, No TW, and Lee SI. Altered colonic transit in TNBS-induced experimental colitis in guinea pig and distribution of nitric oxide synthase in the colonic wall. *Korean J Gastroenterol* 44: 308–313, 2004.
- Collins SM. Immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111: 1683–1699, 1996.
- Daniel EE, Haugh C, Woskowska Z, Cipris S, and Jury J. Fox-Threlkeld: role of nitric oxide-related inhibition in intestinal function: relation to vasoactive intestinal peptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 266: G31–G39, 1994.
- Eberhart CE and DuBois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 109: 285–301, 1995.
- Farrell AJ and Blake DR. Nitric oxide. *Ann Rheum Dis* 55: 7–20, 1996.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182–205, 1998.
- Frantzides CT, Lianos EA, Wittmann D, Greenwood B, and Edmiston CE. Prostaglandins and modulation of small bowel myoelectric activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262: G488–G497, 1992.
- Gunnarsdottir SA, Sadik R, Shev S, Simren M, Sjøvall H, Stotzer PO, Abrahamsson H, Olsson R, and Björnsson ES. Small intestinal motility disturbances and bacterial overgrowth in patients with liver cirrhosis and portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 98: 1362–1370, 2003.
- Husebye E. Gastrointestinal motility disorders and bacterial overgrowth. *J Intern Med* 237: 419–427, 1995.
- Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, and Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxidase synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268: 9049–9054, 1993.
- Josephs MD, Cheng G, Ksontini R, Moldawer LL, and Hocking MP. Products of cyclooxygenase-2 catalysis regulate postoperative bowel motility. *J Surg Res* 86: 50–54, 1999.
- Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, and Bauer AJ. Role of inducible nitric oxide synthase in postoperative intestinal smooth muscle dysfunction. *Gastroenterology* 118: 316–327, 2000.
- Liang YC, Liu HJ, Chen SH, Chen CC, Chou LS, and Tsai LH. Effect of lipopolysaccharide on diarrhea and gastrointestinal transit in mice: roles of nitric oxide and prostaglandin E2. *World J Gastroenterol* 11: 357–361, 2005.
- Mariotto S, Cussolin L, Adami A, Del Soldato P, Suzuki H, and Benoni G. Inhibition by sodium nitroprusside of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 114: 1105–1106, 1995.
- Mizuta Y, Isomoto H, and Takahashi T. Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 118: 714–723, 2000.
- Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H, Visser MR, Verhoef J, Gooszen HG, and Akkermans LM. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora. Bacterial overgrowth and bacterial translocation in rats. *Ann Surg* 228: 188–193, 1998.
- Payà M, García Pastor P, Coloma J, and Alcaraz J. Nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. *Br J Pharmacol* 120: 1445–1452, 1997.
- Porras M, Martín MT, Soler M, and Vergara P. Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G58–G64, 2004.
- Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld RA, and Hsueh W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB J* 15: 439–446, 2001.
- Rodríguez-Membrilla A, Martínez V, Jiménez M, Goñalons E, and Vergara P. Is nitric oxide the final mediator regulating the migrating myoelectric complex cycle? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 268: G207–G214, 1995.
- Ruh J, Schmidt E, Vogel F, and Klar E. Indomethacin-induced disturbances in villous microcirculation in the rat ileum. *Microvasc Res* 58: 137–143, 1999.
- Slogoff MI, Ethridge RT, Rajaraman S, and Evers BM. COX-2 inhibition results in alterations in nuclear factor (NF)-kappa B activation but not cytokine production in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 8: 511–519, 2004.
- Tanaka A, Matsumoto M, Hayashi Y, and Takeuchi K. Functional mechanism underlying cyclooxygenase-2 expression in rat small intestine following administration of indomethacin: relation to intestinal hypermotility. *J Gastroenterol Hepatol* 20: 38–45, 2005.
- Torrents D and Vergara P. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G543–G551, 2000.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, and Willoughby DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2046–2050, 1994.
- Wallace JL, Chapman K, and McKnight W. Limited anti-inflammatory efficacy of cyclooxygenase-2 inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. *Br J Pharmacol* 126: 1200–1204, 1999.

Capítulo 3

“Long-lasting epithelial barrier dysfunction allows the perpetuation of intestinal inflammation in a rat model of indomethacin-induced enteritis”

Mònica Porras, María Teresa Martín, Jennifer Jury, Ping-Chang Yang

Mary H. Perdue & Patri Vergara

ABSTRACT

Although several factors have been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease (IBD), the mechanisms underlying the recurrent relapses have not yet been clarified. We hypothesized that epithelial barrier dysfunction, associated with intestinal motor disturbances, could play a key role in exacerbation of inflammatory illness due to an increased uptake of luminal antigen.

Methods: Indomethacin administration to rats induced a long-lasting oscillation of active and quiescent phases of inflammation associated with phases of hypo and hypermotility. To study epithelial barrier function, control rats and rats with induced inflammation in both phases of the disease were used. Short-circuit current; conductance and HRP flux were evaluated in small intestinal segments mounted in Ussing Chambers. Enterocyte endosomes containing HRP and ultrastructural damage were assessed by electron microscopy.

Results: Rats with induced enteritis in both phases of inflammation demonstrated a long-lasting increase of epithelial paracellular permeability. In contrast, transcellular permeability was only disturbed during the active phase, coinciding with the increase in inflammatory parameters. Furthermore, although mitochondrial damage was observed throughout the inflammatory state, alterations were worse during the active phase.

Conclusions: The sustained enhancement of paracellular permeability could facilitate the constant passage of luminal antigens through the mucosa, and hence, be the basis for chronicity. By contrast, transcellular permeability only increases during the active phases, when hypomotility and bacterial overgrowth are also present, suggesting this factor may play a critical role in the course of acute relapses in IBD.

INTRODUCTION

The intestinal epithelium consists of a single layer of epithelial cells (mainly transporting enterocytes, but also goblet, enteroendocrine and Paneth cells) joined together by tight junctions, forming a selective restricting barrier which facilitates nutrient absorption while limiting uptake of antigenic or potentially toxic material from the lumen (20). Under normal circumstances, the epithelial barrier restricts both transcellular and paracellular permeation of antigens, allowing only minute quantities of molecules to cross into the mucosa, where they interact with the mucosal immune system to downregulate inflammation (known as oral tolerance) (25). However, epithelial cells respond to several neuronal and immune mediators modifying their function, i.e. permeability (37). As a consequence, the excessive penetration of antigens through the epithelial layer may result in inappropriate immune stimulation, leading to chronic intestinal inflammation (10, 24).

Inflammatory bowel disease (IBD) includes two pathologies characterized by chronic spontaneous alternation of active and quiescent phases of inflammation: ulcerative colitis and Crohn's disease. Several elements have been implicated in the pathogenesis of the illness, including genetic, environmental and immune factors (11). Between these, breakdown of epithelial barrier function has been reported as a key factor implicated in the development of the disease (45). It has been demonstrated that intestinal permeability increases not only in IBD patients, but also in 10-20% of their first degree healthy relatives, a sub-group with an increased risk of developing the illness (21, 26, 28). Moreover, it also seems that relapses in IBD patients are preceded by an increase in intestinal permeability (43).

We previously developed a chronic model of IBD induced by indomethacin (30). This model is characterized by spontaneous cyclical alternation of active and quiescent

phases of inflammation which are correlated with long-lasting motor disturbances. Active phases of inflammation are related to high blood leukocytes and TNF concentration, as well as a reduced motor activity, bacterial overgrowth and bacterial penetration into the intestinal wall. In contrast, quiescent phases are related to a reduction of inflammatory parameters, hypermotility and normal bacterial load.

A large body of evidence indicates that mast cells play an important role in the regulation of epithelial transport function (5, 9). Moreover, mast cells have been implicated in several pathological conditions, including intestinal inflammation (23), hypersensitivity (44) and stress (34, 35). Evidence for their role in IBD includes increased number of activated mast cells on inflamed tissues in relation to healthy specimens (12) as well as elevated levels of mast cell-released mediators in luminal perfusates (19, 27) and urine (42). In addition, a relationship between stressful events and relapses of inflammation has been demonstrated in IBD patients (14), suggesting that enhancement of intestinal permeability due to mast cell activation could be implicated in the pathogenesis of the illness.

Despite the importance of increased intestinal permeability in the perpetuation of IBD, the mechanisms underlying the relapses of acute intestinal inflammation are, however, largely unknown. We hypothesized that a leaky intestinal barrier in conjunction with motility dysfunction may cause relapses of intestinal inflammation by allowing a massive uptake of luminal antigens which activates cells in the lamina propria.

Using this model, the specific aims of this study were (1) to evaluate epithelial barrier function during the active and quiescent phases of inflammation; (2) to assess if the disturbed permeability is related to increased bacterial translocation, myeloperoxidase concentration, and mast cell numbers, and (3) to determine if intestinal physiological abnormalities are accompanied by ultrastructural changes in enterocytes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Sprague-Dawley rats (Charles River, Lyon, France), 8-10 weeks old and weighing 300-350g were used. Animals were maintained under pathogen-free conditions on a 12-h light/dark cycle and provided with food and water ad libitum. The Animal Care Committees at McMaster University and Universitat Autònoma de Barcelona approved all procedures.

Experimental model

Intestinal inflammation was induced by administration of two subcutaneous injections of indomethacin (7.5 mg/kg in a 0.3-ml volume) 48 hours apart, as previously described (30). This model shows a spontaneous alternation of active and quiescent phases of inflammation, where active phases are characterized by a generalized hypomotility, bacterial overgrowth and increased blood leukocytes and TNF levels, whereas quiescent phases are associated to hypermotility, recovery of the normal intestinal flora load, and reduction of blood leukocytes and TNF levels. Blood leukocytes monitoring allowed the selection of animals during either active (high leukocytes) or quiescent (low leukocytes) phases of inflammation.

Experimental groups

Two groups of animals were used: 1) the indomethacin group (n=36) and 2) the control group (n=12), which received saline. Studies were performed 2 days after indomethacin administration (acute stage) as well as 15±3, 30±3 and 60±3 days after treatment (chronic stage), with the animals selected in advance according to their blood

leukocyte values. Blood leukocytes were monitored every three days between 10:00 and 11:00 a.m using a Neubauer chambre.

Permeability studies

Rats were killed by cervical dislocation. A laparotomy was performed, and a 15-cm segment of jejunum (beginning 5-cm distal to the ligament of Treitz) and a 15-cm segment of ileum, (ending at 10-cm from cecum) were excised and placed in warmed oxygenated Krebs solution (in mM: 115 NaCl, 1.25 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 2.0 KH₂PO₄, and 25 NaHCO₃, pH 7.35±0.02).

Intestinal segments were placed on a plastic rod, stripped of external muscle layers, opened along the mesenteric border and cut into four flat sheets. The pieces were mounted in Ussing Chambers (opening of 0.6 cm²) and bathed in 37°C oxygenated Krebs buffer (8 ml in each side). The serosal buffer contained 10 mM glucose as an energy source, osmotically balanced by 10 mM mannitol in the mucosal (luminal) buffer. The chambers contained agar-salt bridges to monitor the potential difference across the tissue and to inject the required short circuit current (I_{sc} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) to maintain a zero potential difference as registered via an automated voltage clamp (W-P Instruments, Narco Scientific, Mississauga, ON, Canada). The tissues were voltage clamped at 1 mV (for duration of 1 s) at 5-min intervals, and the I_{sc} deflection was used to determine the conductance (G , ms/cm^2) according to Ohm's law. Tissues were allowed to equilibrate for 20 min before baseline values were recorded. Tissues with abnormal baseline values of I_{sc} or G were considered damaged and were excluded.

Mucosal to serosal transport of macromolecules was assessed by measuring transepithelial flux of horseradish peroxidase (HRP), as previously described (18). Briefly, fifteen minutes after mounting the tissues, HRP (type VI, Sigma Chemical, St Louis,

Missouri, USA) was added to the mucosal buffer at a final concentration of 10^{-5} M. Duplicate samples of serosal buffer (500 μ l) were obtained at 30 min intervals for two hours and were replaced with appropriate buffer solution. HRP activity was measured by assaying enzyme activity using a modified Worthington method (18). Briefly, 150 μ l of sample was added to 800 μ l of phosphate buffer containing 0.003% H_2O_2 and 80 μ g/ml o-dianisidine (Sigma Chemical). The HRP concentration was calculated using enzyme activity (the rate of increase in optical density at 460 nm during a 2-min period). Fluxes were calculated according to standard formulae and were expressed as $pmol/cm^2/h$.

Bacterial translocation

Detection of viable enteric bacteria in mesenteric lymph nodes (MLN) is considered key evidence of bacterial translocation from the intestine (21).

MLN from the ileocecal region were removed under sterile conditions from rats immediately after being killed by decapitation. The nodes were rinsed with sterile saline solution and sonicated twice for 60 s using a sterile container with 3 ml sterile saline each time. Specimens were frozen in liquid nitrogen, powdered in a mortar kept at $-80^\circ C$ on dry ice, and weighted. Samples were homogenized in ten parts of milk (Difco, Detroit, MI) and incubated under aerobic conditions onto blood agar and McConkey agar for 48 h at $37^\circ C$. After incubation, colonies were identified by studying their morphological and biochemical properties. Bacterial translocation was expressed as the number of positive cultures with respect to the total number of samples in each group.

Tissue myeloperoxidase (MPO) determination

Ileal tissues were obtained from rats immediately after being killed by decapitation, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Tissue samples were powdered in a mortar kept at -80°C on dry ice, weighted and homogenized in lysis buffer (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% glycine, 1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptide, 28 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin; pH 7.4). Homogenized tissue samples were centrifuged at 1000 g for 15 min at 4°C . Supernatant was removed and recentrifuged at 1000 g for 10 min. Myeloperoxidase concentration was evaluated using a specific ELISA (HK210 MPO ELISA kit, HyCult biotechnology, Uden, The Netherlands) with a minimum detectable concentration of 1 ng/ml.

RMCP II immunohistochemistry and mucosal mast cell count

Tissue samples were obtained from rats immediately after being killed by decapitation and fixed in 10% buffered formalin. Immunohistochemistry to detect the rat mast cell protease II was performed in tissue sections (5 μm) prepared on adhesive-coated slides, deparaffined and rehydrated. After washing with PBS, sections were incubated in 5% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity and washed again with PBS. Nonspecific binding was blocked with horse serum for 30-min at room temperature. Sections were incubated overnight at 4°C with a monoclonal mouse anti-RMCP-II antibody (1:500; Moredun Animal Health, Edinburgh, UK). Additional sections where the primary antibody was omitted were used as control. A biotinylated horse anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) was used as a secondary antibody diluted in PBS at 1:200. Sections were then treated with an avidin-biotin horseradish peroxidase kit (Vector Laboratories, Burlingame, USA) and reaction products were detected using a diaminobenzidine substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Sections were counterstained with haematoxylin and counted at $\times 400$ magnifications. Positively stained mast cells were counted in three to five sections per animal. Seven to 10 well-oriented villus-crypt units (VCU) were examined per section using an Olympus CH2 microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Analysis of all morphological data was performed blinded to prevent observer bias.

Morphologic studies

Light microscopy

Tissue samples were obtained from rats immediately after being killed by decapitation, fixed in buffered formalin, embedded in paraffin and processed for histopathology according to standard procedures. Signs of inflammation were evaluated by the same observer, who was unaware of the treatment group, in triplicate sections from each rat.

Electron microscopy

Ileal tissues were obtained from rats immediately after being killed by decapitation and also from the chambers 2 hours after exposure to luminal HRP. Tissues were immediately fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/l sodium cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 hours at room temperature, transferred to sodium cacodylate buffer and stored at 4°C overnight.

Quantitative analysis of HRP uptake in intracellular endosomes was evaluated as previously described (18). Briefly, tissues were washed three times in 0.05 mol/l Tris buffer and then incubated for 30 min in 5 mg of 3,3'-diaminobenzadine tetrahydrochlorine (Sigma Chemical, St Louis, Missouri, USA) in 10 ml of 0.05 mol/l Tris buffer and 0.01% hydrogen peroxide. Tissues were subsequently processed for electron microscopy, and

photomicrographs were prepared of well-oriented epithelial cells. The total area occupied by HRP product-containing endosomes located within a 120 μm^2 window was measured in coded photomicrographs using a computer-supported image analysis system. Ten photomicrographs for each animal, 40 for each experimental group, were analyzed by the same observer (P.C. Yang), who was unaware of the treatment group

Ultrastructural epithelial damage was evaluated in enterocytes by a general morphological assessment and by the presence of mitochondrial changes such as enlargement, swelling, disorientation, and disappearance of cristae. The mean of individual mitochondria within the apical region of enterocytes was measured in three rats per group, 15 sections per rat, using a computerized image analysis system as described above. In addition, mast cells were evaluated for signs of activation/degranulation.

Statistical Analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistics were performed with Graph Pad Prism v.4.0 software (San Diego, CA, USA). Differences between groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni's post hoc analysis. Single comparisons were performed using Student's t-test. Results from bacterial translocation were analyzed using Chi-square test. In all cases, the results were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Blood leukocytes monitoring

Indomethacin induced a sharp increase of blood leukocyte levels, from $11,250 \pm 161$ cells/mm³ to $20,160 \pm 792$ cells/mm³. Leukocyte counts decreased after 5-7 days and then, new peaks were periodically observed (figure 1A). Animals were selected when leukocytes were at the highest or lowest level around days 15, 30 and 60. Figure 1B shows the average number of blood leukocytes in each group.

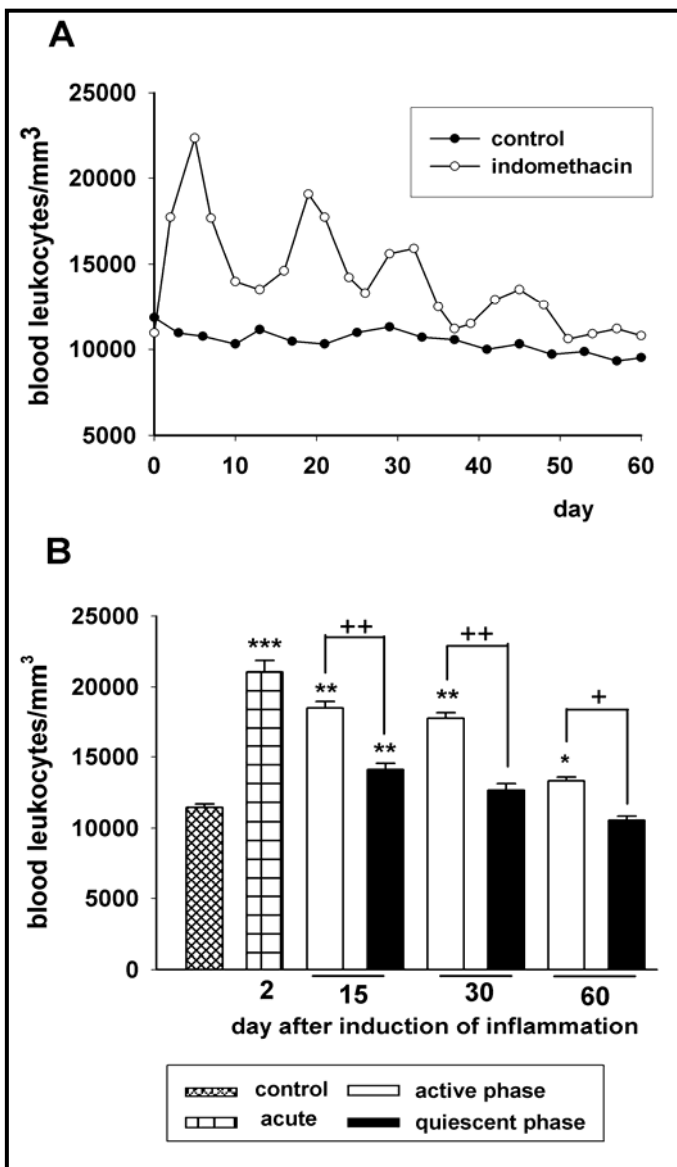


Figure 1. Blood leukocytes monitoring. A) Representative graph showing blood leukocyte evolution after indomethacin treatment in an individual animal and in a control animal. B) Bar diagram representing the average of blood leukocytes in each group. Bars represent the mean \pm SEM; n=4-6 rats/group. *P<0.05 vs. control group; +P<0.05 between active and quiescent phases of inflammation.

Epithelial electrophysiology

A significant increase in the baseline short-circuit current (I_{sc}) and conductance (G) was found in animals during the acute stage of inflammation (day 2) both in jejunum and ileum (Figure 2A and B, respectively). The baseline I_{sc} returned to normal values between 15 and 30 days after induction of inflammation. By contrast, a significant increase in G was still present at day 30, independent of the phase of inflammation.

Macromolecular transport

As with electrophysiological parameters, a significant increase in the mucosal to serosal HRP flux was found in rats two days after induction of inflammation, both in jejunum and ileum (Figure 2A and B, respectively). Regarding the chronic stage, an oscillation of HRP flux was found according to the phase in which animals were selected. In animals with active inflammation, a significant increase in the HRP flux was observed, whereas this parameter was reduced in animals in the quiescent phase.

With respect to electron microscopy, HRP was evident within endosomes in enterocytes of both control and indomethacin rats. However, the number and size of HRP containing endosomes were significantly higher in rats two days after induction of inflammation. During the chronic stage, an increase in the number and size of HRP-containing endosomes was also found in animals selected in the active phase. In contrast, these parameters were similar in animals selected during their quiescent period and in the control group, as indicated by the HRP-endosomal area (Table 1, Figure 3)

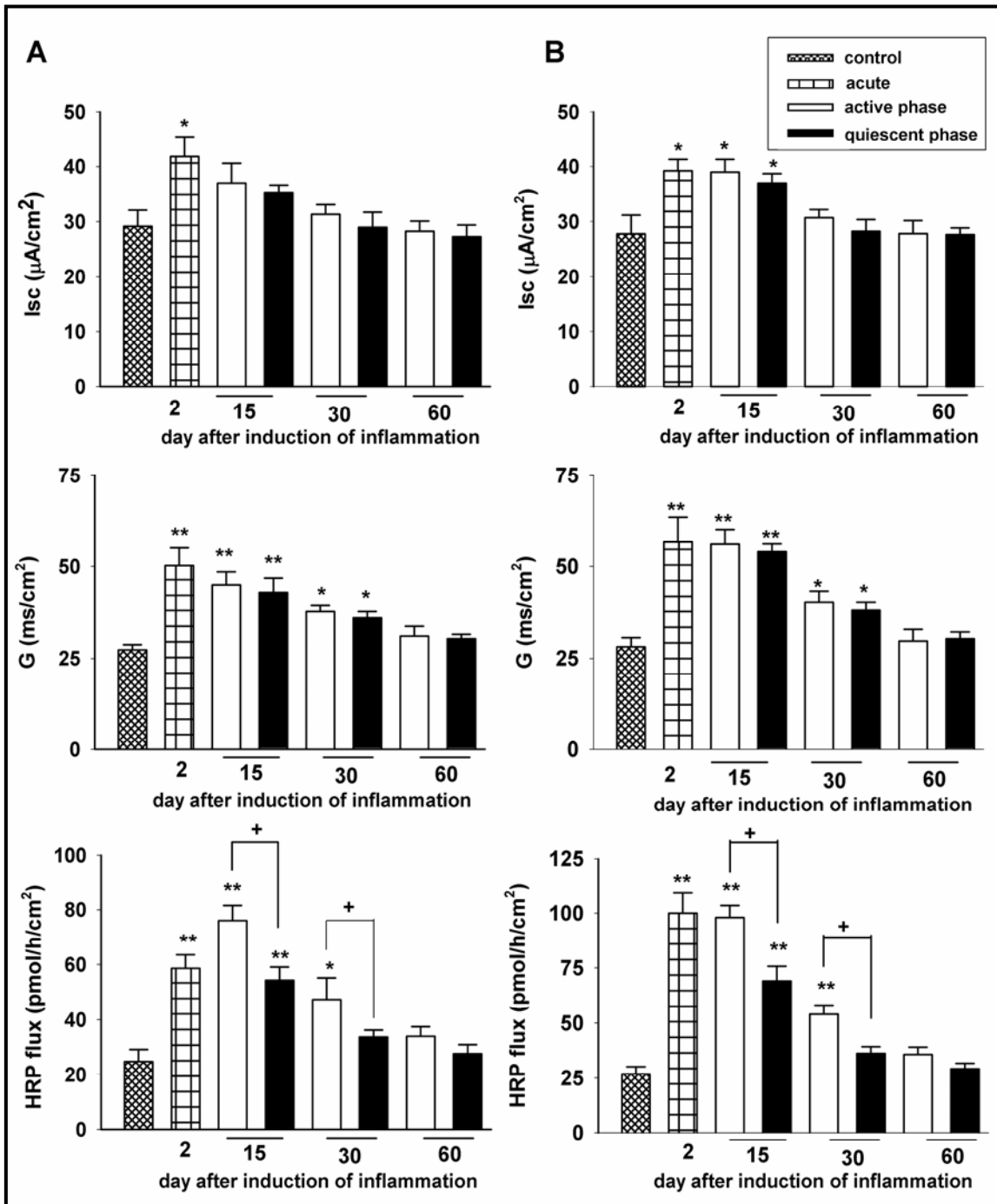


Figure 2. Effects of inflammation on intestinal barrier function. Left panels (A): jejunum. Right panels (B): ileum. Basal Short-circuit current (Isc), conductance (G) and mucosal-to-serosal flux of HRP were studied in controls and in indomethacin-treated rats (2, 15, 30 and 60 days after treatment). Bars represent the mean \pm SEM; n=4-6 rats/group, with 2 tissues averaged per rat. *P<0.05 vs. control group; +P<0.05 between active and quiescent phases of inflammation.

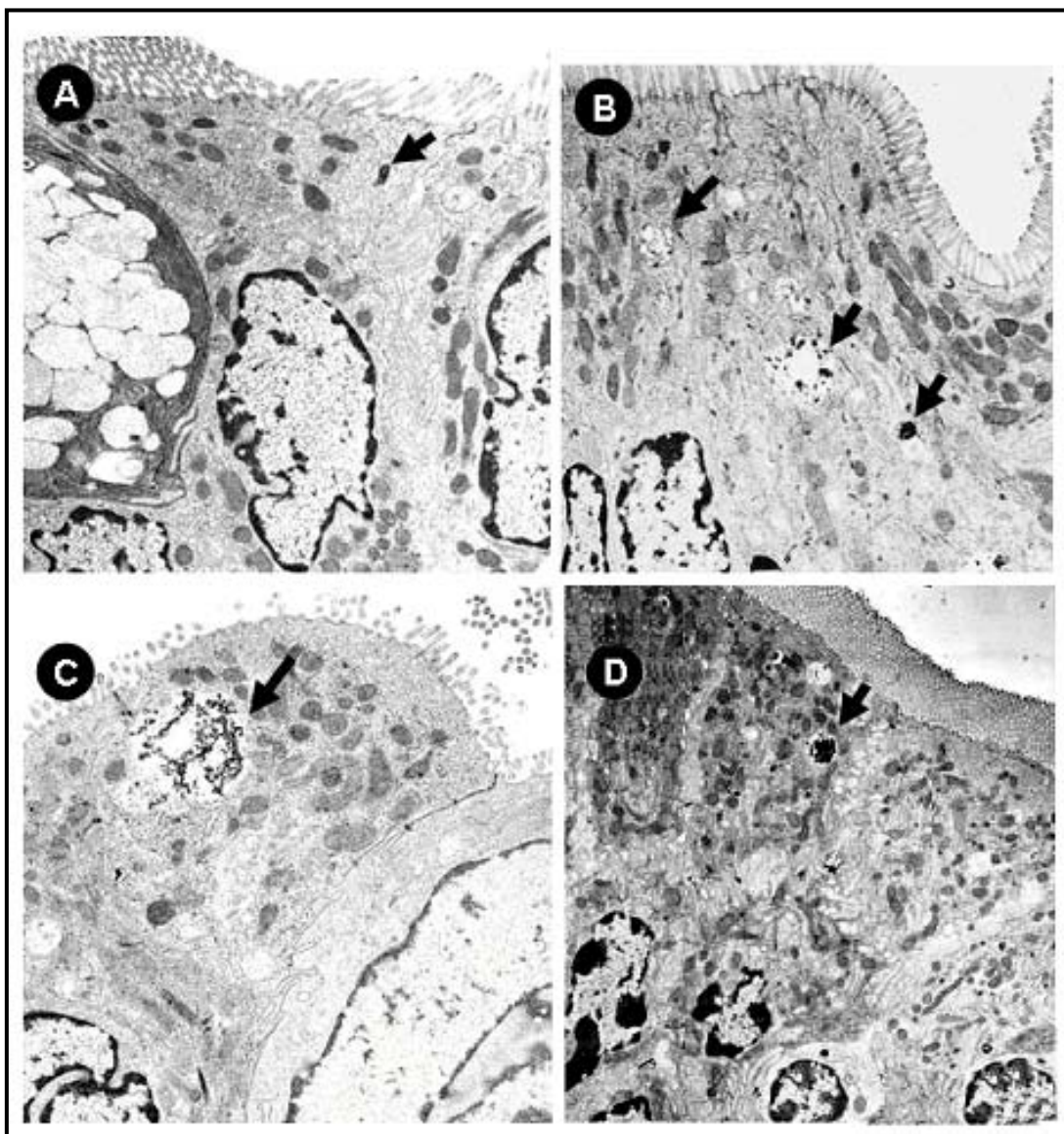


Figure 3. Electron photomicrographs of ileal tissues showing HRP uptake in endosomes of control and indomethacin-treated rats. (A) Photomicrograph from a control rat showing an HRP filled endosome in apical region of a villus enterocyte. (B) Larger and more numerous HRP filled endosomes were observed in indomethacin-treated rats in acute stage of inflammation (2 days after treatment). Animals selected during the chronic stage (30 days after inflammation induction) showed a huge endosomal uptake of HRP during the active phase of inflammation (C), whereas a smaller proportion of enterocytes containing HRP-endosomes was observed in animals selected during the quiescent phase (D). Arrows indicate HRP-containing endosomes. Magnification: x5000.

Table1. Electron microscopy findings in the enterocytes of control and treated rats selected 2 days (acute stage) and 30 days (chronic stage) after indomethacin treatment

	Control group	Acute stage	Chronic stage (day 30)	
			Active phase	Quiescent phase
HRP-endosome area ($\mu\text{m}^2/120 \mu\text{m}^2$ cell area)	0.25 \pm 0.03	3.61 \pm 1.58*	5.72 \pm 0.44**	0.38 \pm 0.04+
Mitochondrial area (μm^2)	0.10 \pm 0.02	0.22 \pm 0.07*	0.36 \pm 0.06**	0.22 \pm 0.09*+

Data are shown as mean \pm SEM; n=4 rats/group, 10 sections/rat

Endosomal area is expressed as total area of horseradish peroxidase (HRP) containing endosomes in an area of $120 \mu\text{m}^2$ in the apical region of the enterocytes.

Mitochondrial area is expressed as mean area of individual mitochondria within enterocytes.

*p<0.05 compared with control group. +p<0.05 between active and quiescent phases of inflammation.

Bacterial translocation

Results from aerobic bacteria isolated from the mesenteric lymph nodes in all groups are summarized in table 2. As shown, a significant increase of positive cultures was found in MLN from rats selected during the acute stage of inflammation compared to the control group. Regarding the chronic stage, incidence of positive cultures was different according to the phase in which animals were selected. Whereas animals with active inflammation showed a high incidence of bacterial translocation to MLN, this parameter was reduced in animals in the quiescent phase.

Table 2. Presence of bacterial translocation for a specific organism in control group and rats with induced-inflammation in acute (day 2) and chronic stages (day 30).

	Control group	Acute stage	Chronic stage (day 30)	
			Active phase	Quiescent phase
<i>E. coli</i>	1/6	6/6*	4/6	1/6
<i>Enterococcus sp</i>	0/6	5/6*	4/6*	2/6
<i>Lactobacillus sp</i>	0/6	3/6*	2/6	1/6

Results are expressed as positive cases/number total of rats

*p<0.05 compared with control group

Myeloperoxidase concentration

A significant increase in the MPO concentration was found in ileal tissues from rats selected during the acute stage of inflammation compared to the control group. Regarding the chronic stage, an oscillation of MPO levels was found according to the phase in which animals were selected. In animals with active inflammation, a significant increase in the MPO concentration was observed, whereas this parameter was reduced in animals in the quiescent phase (figure 4). Although peak of MPO was decreasing with time, cyclical differences were still observed 60 days after induction of inflammation.

Mucosal mast cells

As shown in Figure 5, the number of mucosal mast cells (expressed per villus-crypt unit) increased significantly in rats selected during the acute stage of inflammation compared with control animals both in jejunum and ileum. However, no ultrastructural evidence of mast cells activation/degranulation was observed by electron microscopy, as

shown in Figure 6. A slight increase in the number of mucosal mast cells was still observed at 15 days after the induction of inflammation at both active and quiescent phases. After this period, mucosal mast cell numbers returned to values similar to those found in the control group.

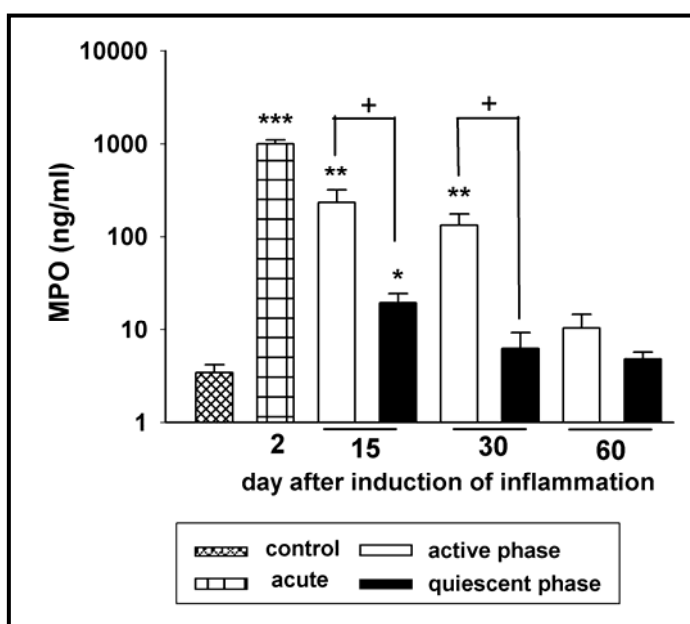


Figure 4. Bar diagram showing MPO concentration in each group. Bars represent the mean \pm SEM; n=4-6 rats/group. *P<0.05 vs. control group; +P<0.05 between active and quiescent phases of inflammation

Histological study

As previously described (30), indomethacin induced an important acute inflammatory reaction in the small intestine, especially in the distal jejunum and ileum. Macroscopically, alterations were observed until 15 days after treatment, characterized by a severe distention of the small bowel loops with an edematous appearance. Multiple adherent regions were also found. The inflammatory reaction in the acute stage was characterized by the presence of inflamed ulcerated and non-ulcerated areas, inflammatory infiltration in the lamina propria, submucosa and serosa, shorter crypts and mucin depletion. Multifocal subepithelial vacuolization was also found. In the chronic stage, inflamed areas were observed only at day 15 in samples from rats selected in active phase, characterized by inflammatory infiltration in the submucosa, long abnormal crypts and increased numbers of goblet cells.

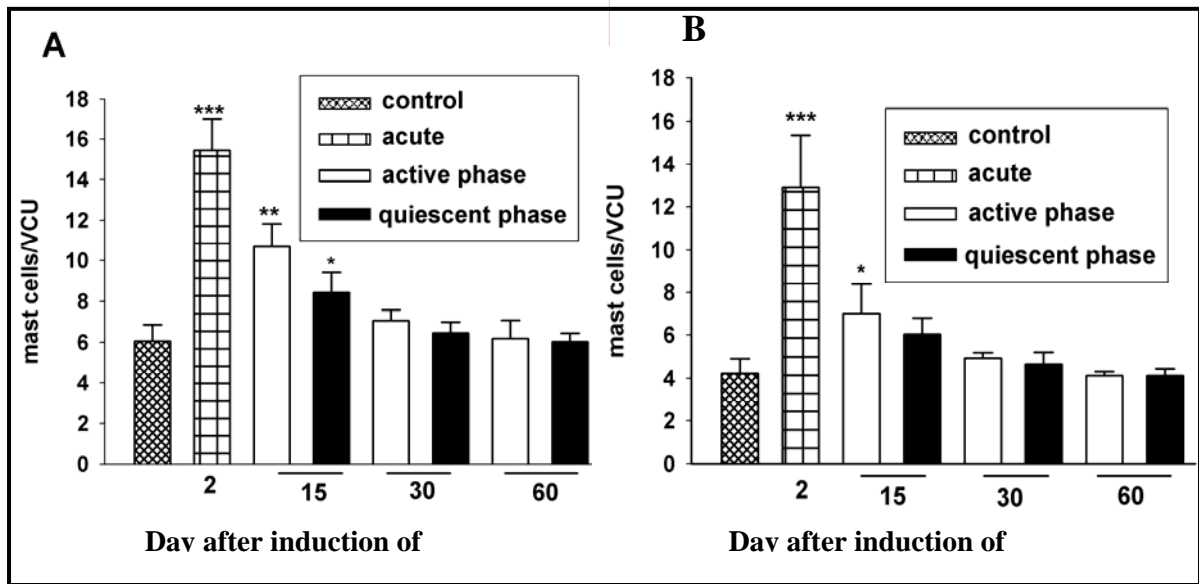


Figure 5. Bar diagrams representing the number of mucosal mast cells per villus-crypt unit (VCU) stained with anti-RMCP-II antibody in jejunum (A) and ileum (B) of control and indomethacin-treated rats. Bars represent the mean \pm SEM. Positively stained mast cells were counted in three to five sections per animal. Seven to 10 well-oriented VCU were examined per section; n=6 animals/group. *P<0.05 vs. control group.

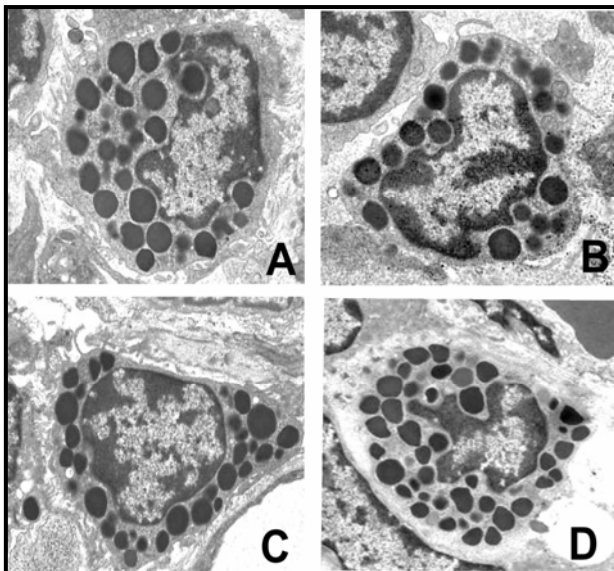


Figure 6. Electron photographs of control and indomethacin rats showing non-activated mast cells in the mucosa. (A) control, (B) indomethacin rat in acute stage of inflammation, (C, D) indomethacin rats in chronic stage of inflammation (active and quiescent phases, respectively). In all cases, mast cells showed numerous homogeneous electron dense granules, indicative of absence of activation. x5000.

indicative of absence of activation. x5000.

Epithelial ultrastructural morphology

Severe ultrastructural epithelial damage was observed two days after induction of inflammation. Epithelial alterations were characterized by the presence of micro-ulcers, loss of microvilli and mitochondrial enlargement with disruption of cristae. In the chronic stage, the appearance of the small intestine mucosa was normal from 15 days on by light microscopy. However, using electron microscopy, ultrastructural signs of epithelial damage were clear. Enterocytes in all animals at day 30 showed enlarged mitochondria with loss of cristae (Figure 7), whereas this abnormality was not found in epithelial cells from control rats. Moreover, the mitochondrial damage was significantly higher in those animals selected during their active phase of inflammation than in those selected during their quiescent phase (Table 1).

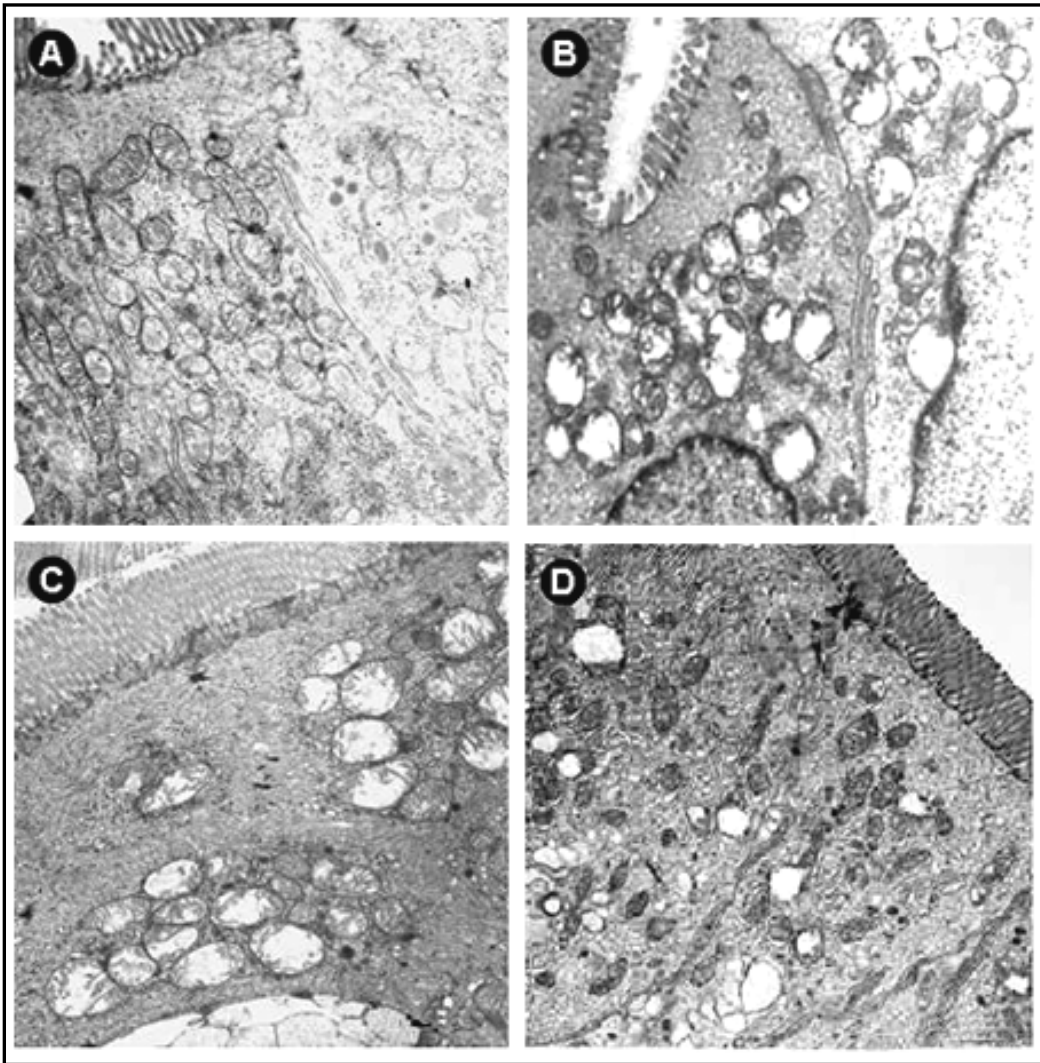


Figure 7. Electron photomicrographs of control rats and rats with induced inflammation showing epithelial ultrastructure of ileal tissues. (A) Photomicrograph from a control rat showing normal electron-dense mitochondria. **(B)** Swollen disrupted mitochondria with irregular cristae were observed in enterocytes from indomethacin rats in acute stage of inflammation (2 days after treatment), as well as in animals selected during the chronic stage (30 days after treatment) in both active phase **(C)** and quiescent phase of inflammation **(D)**. Magnification: x5000.

DISCUSSION

While it has been reported that intestinal barrier dysfunction may play a key role in the course of IBD, its specific contribution to the relapses of inflammation is still unknown. This study shows that intestinal permeability remains altered for prolonged periods of time and that the degree of intestinal permeability alteration differs between the active and quiescent phases of inflammation in a chronic rat model of IBD. Whereas during the quiescent periods only the paracellular permeability remained enhanced, both paracellular and transcellular pathways were altered in the active phases. Furthermore, there is a clear correlation between the cyclical enhancement of transcellular permeability and bacterial translocation. Thus, changes in the intestinal barrier function correlate with the course of IBD.

We previously reported that indomethacin could induce long-lasting oscillation of active and quiescent phases of inflammation, characterized by changes in blood leukocytes and TNF (30). However, in spite of the long-lasting cyclical oscillation of blood parameters, intestinal tissue showed a normal appearance when visualized by light microscopy from 15 days on. In this study both MPO determination and electron microscopy analysis demonstrate alterations in the intestinal tissue that correlate well with the blood parameters, corroborating that a sustained subclinical low grade inflammation remains chronically as in many IBD patients in clinical remission (1, 15).

Studies evaluating side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on small intestine have previously demonstrated that acute administration of indomethacin to rats (5-30 mg/kg) induces changes in mitochondrial energy production, leading to disruption of enterocyte intercellular junctions and permeability enhancement, similar to those observed in IBD (36, 38, 39). In this study, we confirmed that indomethacin-induced enteritis is

associated with abnormalities of epithelial function, as shown by a rise in the short-circuit current (indicating increased net ion transport) and conductance (indicating ion permeability). However, to our knowledge, this is the first report showing that intestinal inflammation induced by indomethacin results in prolonged impairment of intestinal epithelial electrophysiology as previously described in other experimental models (2).

Ultrastructural evidence of mitochondrial changes in enterocytes of animals with induced enteritis in both phases of inflammation was found. Swollen and irregular mitochondria have been reported to be indicators of perturbed function and predictive of reduced ATP levels (8). Furthermore, these alterations are associated with increased paracellular permeability due to the rearrangement of F-actin and tight junction proteins (40). Integrity of tight junctions is fundamental to prevent the access of luminal antigens to the gut-associated lymphoid system (3). Thus, disruption of this structure could lead to an imbalance in the normal interaction between luminal aggressive factors and mucosal defense, resulting in a persistent low-grade inflammation (24). Additional experiments are needed to confirm the involvement of tight junctional proteins on the sustained enhancement of paracellular permeability reported in this study.

Although small quantities of macromolecules can traverse the intestinal mucosa under physiological conditions, there is evidence that an excessive uptake could disrupt and cause direct toxic or immunologic reactions resulting in local or systemic disease, i.e. IBD (6, 33). In our study, the flux of horseradish peroxidase protein (HRP) was used to determine the transport of macromolecules across the epithelium. HRP can be visualized by electron microscopy, allowing identification of the transport pathway of this protein across the epithelium (41). We found a significant increase in the mucosal to serosal flux of HRP in all inflamed animals. Electron microscopic analysis revealed that HRP did not cross the epithelium through the tight junctions or paracellular regions. In contrast, a

significant increase in the size of HRP endosomes in epithelial cells was found, indicating that HRP transport to the lamina propria occurred mainly via the transcellular route. This observation is consistent with findings from previous studies showing that HRP is taken up by endocytosis and is transported exclusively through enterocytes by vesicles and vacuoles in both IBD and in normal control specimens (4, 7). However, one interesting finding of our study is that the increased transcellular transport observed at active phases of inflammation is concomitant with bacterial translocation.

Although our study did not explore the mechanisms accounting for the enhancement of transcellular permeability found in animals with induced enteritis, results could be explained by the morphological changes observed in enterocytes at the ultrastructural level. It has been reported that, in addition to normal enterocytes, atypical enterocytes termed “rapid antigen uptake into the cytosol enterocytes” (RACE cells) are present at the intestinal level of both healthy and IBD patients. These cells are characterized by an electron-lucent cytoplasm containing a high amount of antigens, and it has been suggested that they are involved in the presentation of antigens by MHC class I antigen. Intestinal inflamed samples obtained from IBD patients show an increased number of RACE cells compared with healthy mucosa specimens (17). It has been proposed that due to lowered energy metabolism, these cells are more susceptible to a direct uptake of antigens into the cytosol than normal enterocytes. As a consequence, the passage of molecules through the intestinal barrier may be enhanced, leading to the stimulation of the mucosal immune system and subsequent increase in mucosal levels of pro-inflammatory cytokines as seen in IBD (16,29).

We have previously reported that active and quiescent phases in our model are related to cyclic changes in intestinal motor activity (30, 31). Whereas active phases of inflammation are characterized by a generalized hypomotility, increased motor activity is

related to the quiescent periods. In consequence, the enhancement of transcellular permeability seems to be correlated to hypomotility and bacterial translocation. Our hypothesis is that while antigen load is maintained at lower level, due to normal or enhanced motility, there is no inflammatory response despite the increased intestinal permeability (mainly paracellular). However, when motor activity decreases and bacterial load raises, a higher proportion of antigens can interact with the mucosal surface and traverse through the tight junctions, resulting in the activation of the immune system. Both inflammatory mediators, and compounds released by microbes have been described to have a direct cytotoxic effect on the epithelial cells (16, 29, 32), resulting in an increase of transcellular vesicular transport, and hence, leading to massive antigenic uptake and the appearance of symptoms characteristic of IBD. Thus, whereas altered paracellular permeation could be considered as a predisposing factor for suffering from IBD, enhancement of transcellular permeability seems to be responsible for relapses of the illness.

With respect to the putative role of mast cells in IBD, it has been described that these cells are involved in the induction of permeability alterations that occurs during the relapses of the illness (13). However, our results do not corroborate the importance of mast cells on the sustained enhancement of intestinal permeability. An increase in the number of mast cells was observed a few days after induction of inflammation, but no differences were observed in this parameter during the active and quiescent phases of inflammation later at the chronic stage. Furthermore, 15 days after induction of inflammation the number of mast cells did not differ from that in control animals. It is interesting to point out that while morphological changes in epithelial cells were modified by phase of inflammation and paracellular permeability was still enhanced, mast cells as seen by electron microscopy did not show signs of activation.

In conclusion, this study shows that intestinal permeability remains altered for prolonged periods of time and that the degree of intestinal permeability alteration differs between the active and quiescent phases of inflammation in a chronic rat model of IBD. Whereas sustained enhancement of paracellular permeability could facilitate constant passage of luminal antigens through the mucosa and in consequence be the base for chronicity, relapses of the illness could be related to massive uptake of luminal antigens and bacterial translocation due to the aggravated effect of disrupted motility together with a deranged epithelial barrier function. Finally, at the chronic stage of the disease mast cells do not seem to be directly involved in the cyclical changes of transcellular permeability.

GRANT SUPPORT

Canadian support: grants from the Crohn's and Colitis Foundation of Canada, Canadian Institutes for Health Research.

Spanish support: grant SAF2002-03563 from Direcció General de Investigació, Ministerio de Ciencia y Tecnología, and grant 2991SGR-00214 from Comissionat per a Universitats i Recerca. M. Porras was the recipient of a Predoctoral Fellowship from the Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

1. Arber N, Hallak A, Dotan I, Bujanover Y, Liberman E, Santo M, Moshkowitz M, Tiomny E, Aronson M, Berliner S, Gilat T. Increased leukocyte adhesiveness/aggregation in patients with inflammatory bowel disease during remission. *Dis Colon Rectum* 39(6): 632-635, 1996.
2. Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard C, *et al.* Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G635-G644, 2001.
3. Balda MS, Matter K: Tight junctions. *J Cell Sci* 111: 541-547, 1998.
4. Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Kitamura Y, Perdue MH: The influence of mast cells on pathways of transepithelial transport in rat intestine. *J Immunol* 161(5):2561-2566, 1998.
5. Berin MC, Kiliaan AJ, Yang PC, Groot JA, Taminiou JA, Perdue MH: Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* 113: 856-864, 1997.
6. Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D: Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 108: 1566-1581, 1995.
7. Cornell R, Walker WA, Isselbacher KJ: Small intestinal absorption of horseradish peroxidase: a cytochemical study. *Lab Invest* 25: 42-48, 1971.
8. Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341: 233-249, 1999.
9. Crowe SE, Luthra GK, Perdue MH: Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 41: 785-792, 1997.

10. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 479-497, 2003.
11. Fiocchi C: Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205, 1998.
12. Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Kollinger M, Scholmerich J, Falk W: Strictures in Crohn's disease are characterized by an accumulation of mast cells co-localized with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 45: 210-217, 1999.
13. He SH: Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10(3): 309-318, 2004.
14. Hollander D: Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. *J Physiol Pharmacol* 54 Suppl 4:183-190, 2003.
15. Indaram AVK, Nandi S, Weissman S, Lam S, Bailey B, Blumstein M, Greenberg R, Bank S. Elevated basal intestinal mucosal cytokine levels in asymptomatic first-degree relatives of patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 6(1): 49-52, 2000.
16. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka WE, Kagnoff MF: A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95: 55-65, 1995.
17. Kersting S, Bruewer M, Schürmann G, Klotz A, Uteh M, Hansmerten M, Krieglstein CF, Senninger N, Schulzke JD, Naim HY, Zimemr JP. Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *Am J Pathol.* 2004; 165(2):425-37.

18. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA, Perdue MH: Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol* 275: G1037-G1044, 1998
19. Knutson L, Ahrenstedt O, Odling B, Hallgren R: The jejunal secretion of histamine is increased in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 98: 127-133, 1990.
20. Madara JL, Trier JS: The functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. Edited by Johnson LR. New York: Raven Press, 1994, pp. 1577-1622
21. Mainous MR, Tso P, Berg RD, Deitch EA. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 126: 33-37, 1991.
22. May GR, Sutherland LR, Meddings JB: Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease?. *Gastroenterology* 104(6): 1627-1632, 1993.
23. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK: Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(13): 7761-7766, 2003.
24. McDonald TT, Monteleone G: Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307: 1920-1925, 2005.
25. Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F: Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 1029: 1-8, 2004.

26. Munkholm P, Langholz E, Hollander D, Thornberg K, Orholm M, Katz KD, Binder V: Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut* 35: 68-72, 1994.
27. Nolte H, Spjeldnaes N, Kruse A, Windelborg B: Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* 31: 791-794, 1990.
28. Peeters M, Greypens B, Claus D, Nevens H, Ghooos Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietick R, Rutgeerts P: Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 113(3): 802-807, 1997.
29. Perdue MH, McKay DM: Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am J Physiol* 267: G151-G165, 1994.
30. Porras M, Martín MT, Soler M, Vergara P: Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287: G58-G64, 2004.
31. Porras M, Martín MT, Torres R, Vergara P. Cyclical up-regulated iNOS and long-term down-regulated nNOS are the basis for active and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290: G423-G430, 2006.
32. Pothoulakis C, Lamont JT: Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to *Clostridium difficile* toxins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280(2): G178-183, 2001.
33. Sanderson IR, Walker WA: Uptake and transport of macromolecules by the intestine: possible role in clinical disorders (an update). *Gastroenterology* 1993, 104(2):622-639

34. Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M, Perdue MH: Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 2001, 48:630-636
35. Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH: Acute stress stimulates ion secretion and increases epithelial permeability in rat intestine. *Am J Physiol* 267: G794-G799, 1994.
36. Schürmann G, Brüwer M, Klotz A, Schmid KW, Senninger N, Zimmer KP: Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int J Colorect Dis* 14: 41-46, 1999.
37. Sharkey KA, Mawe G: Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* 2: 669-677, 2002.
38. Soderholm JD, Olaison G, Peterson KH, Franzen LE, Lindmark T, Wiren M, Tagesson C, Sjobahl R: Augmented increase in tight junction permeability by luminal stimuli in the non-inflamed ileum of Crohn's disease. *Gut* 50: 307-313, 2002.
39. Somasundaram S, Rafi S, Hayllar J, Sigthorsson G, Jacob M, Price AB, McPherson A, Mahmood T, Scott D, Wrigglesworth JM, Bjarnason I: Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine. *Gut* 41: 344-353, 1997.
40. Tsukamoto T, Nigam SK: Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J Biol Chem* 272: 16133-16139, 1997.

41. Walker WA, Cornell R, Davenport LM, Isselbacher KJ: Mechanism of horseradish peroxidase uptake and transport in adult and neonatal rat intestine. *J Cell Biol* 54: 195-205, 1972.
42. Winterkamp S, Weidenhiller M, Otte P, Stolper J, Schwab D, Hahn EG, Raithel M: Urinary excretion of N-methylhistamine as a marker of disease activity in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 97(12): 3071-3077, 2002.
43. Wyatt J, Vogelsang H, Hubi W, Waldhoer T, Lochs H: Intestinal permeability as the predictor of relapse in Crohn's disease. *Lancet* 19341: 1437-1439, 1993.
44. Yu LC, Perdue MH: Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol reviews* 179: 61-73, 2001.
45. Yu Y, Sitaraman S, Gewirtz AT: Intestinal epithelial cell regulation of mucosal inflammation. *Immunol Res* 29: 55-68, 2004.

DISCUSIÓN GENERAL

Una de las mayores limitaciones en la profundización del conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal radica en la dificultad de encontrar modelos experimentales que reproduzcan las principales características de dicha enfermedad: recaídas espontáneas y cronicidad (Elson *et al.*, 1995; Hibi *et al.*, 2002; Jurjus *et al.*, 2004).

El modelo de enteritis inducida por la administración sistémica de indometacina es uno de los modelos experimentales de Enfermedad Inflamatoria Intestinal más utilizado debido a su simplicidad y adaptabilidad a pequeñas especies de mamíferos como la rata (Yamada *et al.*, 1993) y el ratón (Boushey *et al.*, 1999). Sin embargo, los protocolos de administración de indometacina descritos hasta el momento provocan una respuesta inflamatoria muy severa con un elevado índice de mortalidad, por lo que este modelo se utilizaba básicamente para el estudio de los mecanismos implicados en el desarrollo de la inflamación aguda (Konaka *et al.*, 2002).

Una de las principales aportaciones de esta Tesis Doctoral ha sido la obtención y caracterización de un nuevo modelo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal en el cual hemos logrado reproducir las recidivas que se producen de forma espontánea en los pacientes humanos. Dicho modelo se ha obtenido a partir de una modificación del protocolo clásico de enteritis inducida por indometacina en la rata (Ruh *et al.*, 1999). Las principales ventajas de este modelo son: la obtención de una respuesta inflamatoria crónica, homogénea y reproducible, la oscilación espontánea de fases activas y quiescentes de inflamación, y el uso de una especie animal relativamente asequible.

El modelo clásico de enteritis inducida por indometacina en la rata se considera un buen modelo de enfermedad de Crohn, ya que presenta cierta similitud con algunas de las características histopatológicas de esta enfermedad (Yamada *et al.*, 1993; Anthony *et al.*, 2000). Al igual que sucede en el modelo original, la pauta de administración de indometacina utilizada en este estudio provoca una intensa respuesta inflamatoria en el intestino delgado, que se desencadena a las pocas horas tras su administración. Esta lesión aguda se caracteriza por la presencia de edema tanto en la serosa como en la mucosa, úlceras y múltiples adherencias entre las asas intestinales.

Histológicamente destaca la presencia de infiltrado inflamatorio transmural, microúlceras, acortamiento de las vellosidades y vacuolización subepitelial.

Otros hallazgos observados en nuestro modelo durante la fase aguda también concuerdan con los descritos en la bibliografía en referencia al modelo clásico, incluyendo el incremento de la expresión génica de iNOS (Konaka *et al.*, 1999; Saud *et al.*, 2005), la alteración de la permeabilidad paracelular (Bjarnason *et al.*, 1995), el incremento de la síntesis de TNF- α (Bertrand *et al.*, 1998) y el sobrecrecimiento y translocación de bacterias luminales (Yamada *et al.*, 1993). Sin embargo nuestro modelo ofrece tres grandes ventajas respecto al modelo clásico: [1] la lesión intestinal aguda es menos severa, por lo que el índice de mortalidad es prácticamente cero, [2] la cronificación del proceso inflamatorio permite el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de las alteraciones funcionales crónicas producidas por la inflamación, y [3] la oscilación espontánea de fases activas y quiescentes de inflamación permite el estudio de los mecanismos responsables de las recaídas.

A pesar de que durante la fase crónica de este modelo no se aprecian lesiones histológicas evidentes, la medición de diferentes parámetros inflamatorios (leucocitos totales, TNF- α y concentración de MPO intestinal) demuestra la existencia de una alternancia cíclica entre fases de inflamación activa con otras de aparente recuperación que persiste alrededor de 6-8 semanas tras la inducción del proceso inflamatorio. Además, esta cronificación de la respuesta inflamatoria se asocia a una alteración funcional prolongada tanto de la actividad motora como de la permeabilidad intestinal.

Tal y como se ha descrito previamente, las alteraciones motoras que se producen durante los procesos inflamatorios intestinales son complejas y pueden variar en función del modelo experimental, el segmento intestinal y la fase del proceso inflamatorio (Mayer & Collins, 2002; Mawe *et al.*, 2004). Los diferentes estudios realizados en nuestro modelo demuestran claramente esta complejidad, ya que mientras que durante la fase activa se produce una hipomotilidad generalizada, la fase de recuperación se asocia a un incremento de la actividad motora intestinal.

El protocolo experimental utilizado en este estudio para valorar la actividad motora intestinal se realiza en animal anestesiado y permite analizar toda una serie de parámetros que reflejan tanto el estado de los mecanismos intrínsecos como extrínsecos de regulación de la actividad motora (Giralt & Vergara, 1999). El incremento de la

actividad motora intestinal asociado a la fase de recuperación se caracteriza por un aumento de la actividad motora espontánea en forma de *clusters* de contracciones fásicas, una mayor respuesta motora a la CCK y un incremento del valor de las contracciones inducidas por la estimulación eléctrica intraluminal. Estos datos sugieren tanto una alteración funcional en el estado de la neurotransmisión entérica (incremento del tono excitatorio y/o disminución del tono inhibitorio) como una alteración de la sensibilidad aferente vagal. Por el contrario, la disminución de la motilidad intestinal durante las fases de inflamación activa se produce por un incremento del tono inhibitorio nitrérgico.

Tal y como se indica en la introducción de esta tesis, la inervación inhibitoria nitrérgica es la principal responsable de la relajación tónica de la musculatura lisa intestinal en situación fisiológica (Allescher *et al.*, 1992). Su afectación puede dar lugar a importantes alteraciones motoras, tal y como sucede tanto en diferentes modelos de inflamación intestinal (Hogaboam *et al.*, 1995; Mizuta *et al.*, 2000), como en ciertas patologías humanas (Lui *et al.*, 1997; Wedel *et al.*, 2002). Gracias al uso de herramientas farmacológicas y técnicas moleculares e inmunohistoquímicas este trabajo demuestra que la regulación de la síntesis de NO juega un papel clave en el curso de las alteraciones motoras asociadas al proceso inflamatorio. Así, la reducción del tono inhibitorio intestinal derivado de la inhibición de la expresión de nNOS juega un papel fundamental en el incremento de motilidad observado durante las fases de recuperación. Por el contrario, la disminución de motilidad asociada a las fases activas parece ser debida a un incremento de la síntesis de NO producido por un incremento transcripcional de iNOS.

A pesar del creciente número de estudios realizados, es frecuente encontrar datos aparentemente contradictorios en la literatura sobre los mecanismos que intervienen en la autorregulación de la expresión génica entre las diferentes isoformas de NOS. Al igual que sucede en nuestro modelo, diferentes estudios han demostrado una disminución en la expresión de nNOS en el curso de la inflamación aguda, posiblemente debido al incremento en la liberación de diversos mediadores inflamatorios, principalmente citocinas (Bandyopadhyay *et al.*, 1997; Mizuta *et al.*, 2000). Los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión génica de iNOS son más controvertidos. Mientras que existen varios estudios que demuestran que el NO sintetizado por las isoformas constitutivas de NOS juega un papel clave en la supresión

fisiológica de la expresión génica de iNOS (Qu *et al.*, 2001), existen otros trabajos que demuestran que tanto la administración exógena de NO (Mariotto *et al.*, 1995) como el propio NO liberado por iNOS (Eberhart & Dubois, 1995) pueden provocar la inhibición de su expresión génica. Nuestros resultados demuestran que ambos mecanismos pueden estar actuando de manera simultánea en la regulación de la expresión de iNOS en las diferentes fases de nuestro modelo. Mientras que la inhibición sostenida de la expresión de nNOS puede facilitar la expresión génica de iNOS, esta misma expresión de iNOS puede ser inhibida por la liberación de grandes cantidades de NO, tal y como hemos confirmado recientemente en nuestro laboratorio mediante la administración de un donador exógeno de NO.

Además del óxido nítrico, existen otros mediadores inflamatorios capaces de modular de manera importante la función motora intestinal. En este trabajo nos propusimos estudiar el papel que juegan las prostaglandinas en las diferentes fases del modelo, ya que además de existir una estrecha regulación entre las actividades COX y NOS (Payà *et al.*, 1997; Goodwin *et al.*, 1999; Posadas *et al.*, 2000), la síntesis endógena de prostaglandinas se ha asociado con la inhibición de la motilidad durante el íleo parálítico post-quirúrgico (Josephs *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2001). En nuestros experimentos, la inhibición enzimática de COX-2 tras la administración del inhibidor selectivo SC-58125 incrementó levemente la motilidad intestinal en animales durante la fase activa, indicando que a pesar de que las prostaglandinas contribuyen a la disminución de la actividad motora durante las fases activas del modelo, su papel es proporcionalmente menos importante al que juega el NO

Una de las funciones de la motilidad intestinal es regular la carga bacteriana luminal. Así, la disminución de la motilidad intestinal que se produce en ciertos procesos clínicos como el íleo parálítico post-quirúrgico (Behm & Stollman, 2003) o la pancreatitis, tanto aguda (Van Felius *et al.*, 2003) como crónica (Trespi & Ferrieri) puede provocar sobrecrecimiento bacteriano, siendo éste una de las principales complicaciones que pueden producirse en dichos procesos. A nivel intestinal existe un patrón motor defensivo que aparece tras la activación del sistema inmune y cuyo objetivo es la rápida expulsión del tracto digestivo de agentes potencialmente nocivos. Dicho patrón consiste en un incremento de la actividad motora propulsiva del intestino delgado, que da lugar a las denominadas *giant migrating contractions* (Cowles & Sarna, 1990; Jouët & Sarna, 1996; Husebye, 1999; Sarna, 2003; Wood, 2004). El hecho de que

este tipo de patrón motor aparezca tras la colonización del tracto gastrointestinal superior por parte de enterobacterias y especies anaerobias estrictas, que en condiciones normales se hallan ausentes en estas zonas, sugiere que la flora microbiana puede desencadenar el inicio de la actividad motora propulsiva (Husebye *et al.*, 1997)

En este estudio hemos puesto claramente de manifiesto la estrecha correlación existente entre la actividad motora y la concentración de bacterias presentes en la luz intestinal. Además, este es el primer estudio experimental que, hasta donde llega nuestro conocimiento, demuestra una oscilación cíclica de la carga microbiana luminal en función del aumento o la disminución de la actividad motora.

El incremento de la actividad motora intestinal asociado a las fases de recuperación de nuestro modelo posiblemente también sea, al menos en parte, un mecanismo defensivo secundario al sobrecrecimiento y translocación de bacterias lumbinales que se produce durante las fases activas de inflamación. No obstante, la técnica utilizada en nuestros estudios de motilidad no permite valorar si esta hiperomotilidad es realmente una actividad motora organizada equivalente a las *giant migrating contractions*, por lo que sería interesante la utilización de otras técnicas que permitieran valorar esta coordinación de la actividad motora, como por ejemplo la electromiografía.

Una de las claves en la cronificación de la respuesta inflamatoria en los pacientes afectados de Enfermedad Inflamatoria Intestinal parece ser la existencia de una respuesta inmune local inapropiada frente a antígenos lumbinales (Chadwick & Anderson, 1990; Fabia *et al.*, 1993; Duchmann *et al.*, 1995). Diferentes estudios realizados tanto en el modelo clásico de enteritis inducida por indometacina en la rata como en otros modelos experimentales de Enfermedad Inflamatoria Intestinal sugieren la participación de la flora intestinal en la patogénesis de la lesión (Okayasu *et al.*, 1990; Taurog *et al.*, 1994; Rath *et al.*, 1996). Así, tanto los animales *germ free* con inflamación inducida por indometacina como los que reciben tratamiento antibiótico de manera simultánea a la administración del fármaco apenas desarrollan lesiones inflamatorias (Robert & Asano 1977; Satoh *et al.*, 1983; Davis *et al.*, 1990; Yamada *et al.*, 1993; Colpaert *et al.*, 2001). Los diferentes estudios microbiológicos realizados en este modelo corroboran la implicación de las bacterias lumbinales en el desarrollo de la respuesta inflamatoria inicial tras la administración de indometacina. Sin embargo, la importancia de la flora bacteriana no se limita al desarrollo inicial de la lesión intestinal.

Este estudio también proporciona evidencias significativas de que tanto el sobrecrecimiento bacteriano como su posterior translocación juegan un papel clave en los relapsos de inflamación espontánea que se observan durante las fases activas del modelo. Si bien este trabajo no determina el mecanismo por el cual actúan las bacterias, la demostración de la estrecha correlación existente entre la actividad motora, la concentración de bacterias presentes en la luz intestinal y la translocación bacteriana enfatiza la potencial relevancia de este factor en el control de la respuesta inflamatoria.

Al igual que sucede en el modelo original, la intensa respuesta inflamatoria que se desencadena a las pocas horas tras la administración de indometacina se asocia a una ruptura física de la barrera epitelial. Tal y como hemos comentado anteriormente, la integridad de la función de la barrera epitelial es indispensable para evitar una excesiva penetración de antígenos alimentarios, microorganismos y toxinas bacterianas dentro del epitelio, por lo que la vulnerabilidad de esta función de barrera podría ser uno de los principales factores involucrados en la perpetuación del proceso inflamatorio. Esta correlación se ha sugerido tanto en la enfermedad humana como en diferentes modelos experimentales de Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Bjarnason *et al.*, 1995; Farhadi *et al.*, 2003). No obstante, una observación interesante de este estudio es que el grado de afectación de la función de la barrera difiere a lo largo del proceso inflamatorio. Mientras que la administración de indometacina provoca un aumento sostenido de la permeabilidad paracelular, posiblemente debido a una pérdida en la integridad de las *tight junctions*, la permeabilidad transcelular aumenta de manera significativa durante las fases activas de inflamación.

Existen diferentes mecanismos por los que la inflamación puede provocar un aumento de la permeabilidad transcelular. En primer lugar, la respuesta inflamatoria induce un incremento del *turnover* celular, dando lugar a cambios en el fenotipo de las células epiteliales y al desarrollo del fenómeno conocido como “síndrome del enterocito enfermo” (*sick enterocyte*). Esta disfunción de la barrera epitelial se asocia a un incremento en el transporte macromolecular, debido a que las células epiteliales inmaduras son más susceptibles a la captación de antígenos lumbales por endocitosis (Pácha, 2000). Este mecanismo podría ser responsable del aumento del transporte transcelular asociado a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (Schürmann *et al.*, 1999), ya que en esta patología se ha demostrado un incremento en el número de células RACE (*rapid antigen uptake into the cytosol enterocytes*), un tipo de célula epitelial que

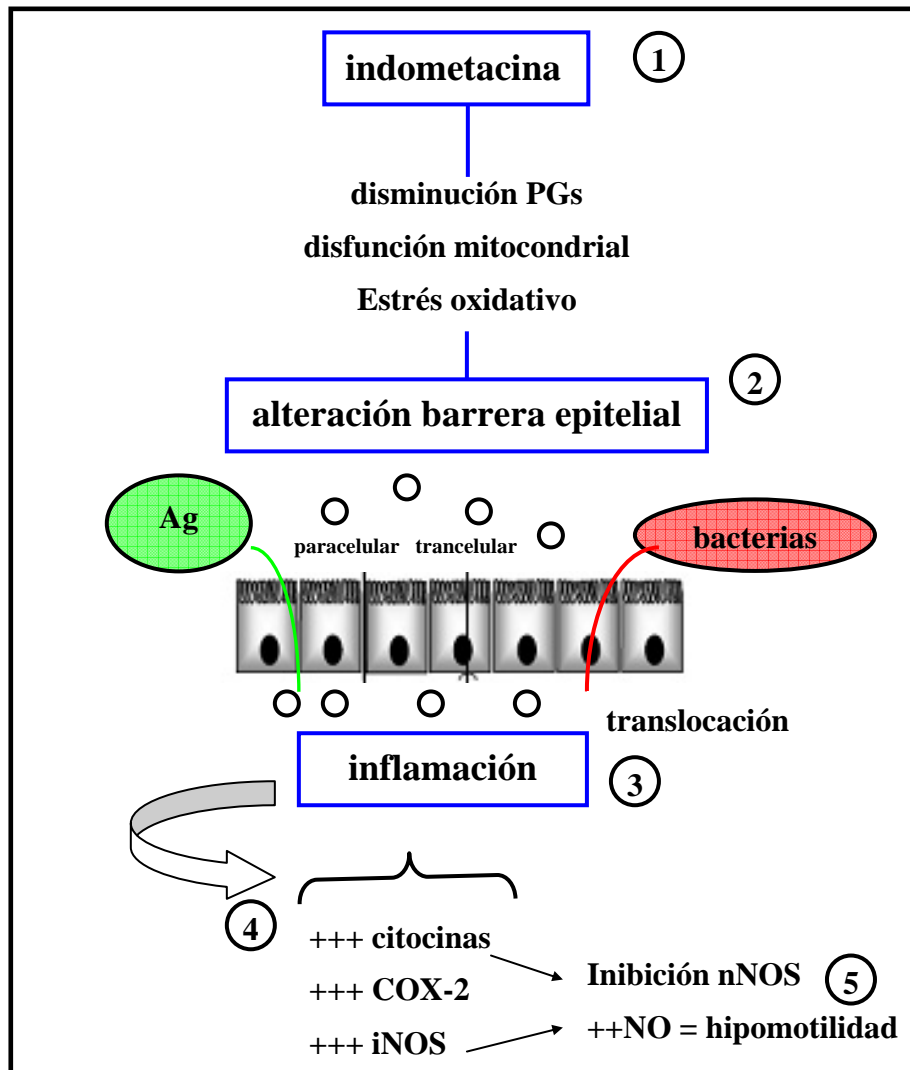
presenta signos de inmadurez funcional (Kersting *et al.*, 2004). En nuestro modelo, el incremento de permeabilidad transcelular también se asocia con cambios morfológicos a nivel de los enterocitos que son compatibles con una reducción del metabolismo energético mitocondrial.

Las células M epiteliales, un fenotipo celular especializado que se localiza en el epitelio que recubre las placas de Peyer, se encargan de transportar antígenos desde la luz intestinal hasta el tejido linfoide subyacente por un mecanismo de transporte vesicular transepitelial (Neutra, 1998). El incremento del transporte macromolecular que se produce durante los procesos inflamatorios intestinales podría ser debido a un aumento en el número de células M, tal y como sucede tanto en la patología humana como en diferentes modelos experimentales, incluido el modelo clásico de enteritis inducida por indometacina (Fujimura *et al.*, 1992; Cuvelier *et al.*, 1994; Kucharzik *et al.*, 2000; Lügering *et al.*, 2004). Las células M también pueden servir de puerta de entrada para la invasión epitelial de ciertos microorganismos (Siebers & Finlay 1996), por lo que ésta podría ser una de las vías de entrada de las bacterias lumbales hacia los ganglios linfáticos en nuestro modelo.

Uno de los factores determinantes en la captación de antígenos lumbales es el grado de interacción entre los compuestos presentes en la luz intestinal y el borde apical de las células epiteliales, por lo que la actividad motora juega un papel clave en la regulación del paso de macromoleculas a través del epitelio. El enlentecimiento del tiempo de tránsito intestinal puede favorecer el contacto antígeno-mucosa y promover, por tanto, la captación de antígenos lumbales por un mecanismo de endocitosis inespecífico (Valori, 1992; Sun *et al.*, 1998). La estrecha correlación existente entre hipomotilidad, aumento de la permeabilidad transcelular, translocación bacteriana e inflamación, refleja la importancia que tienen las alteraciones funcionales motoras en los relapsos de inflamación asociados a las fases activas del modelo.

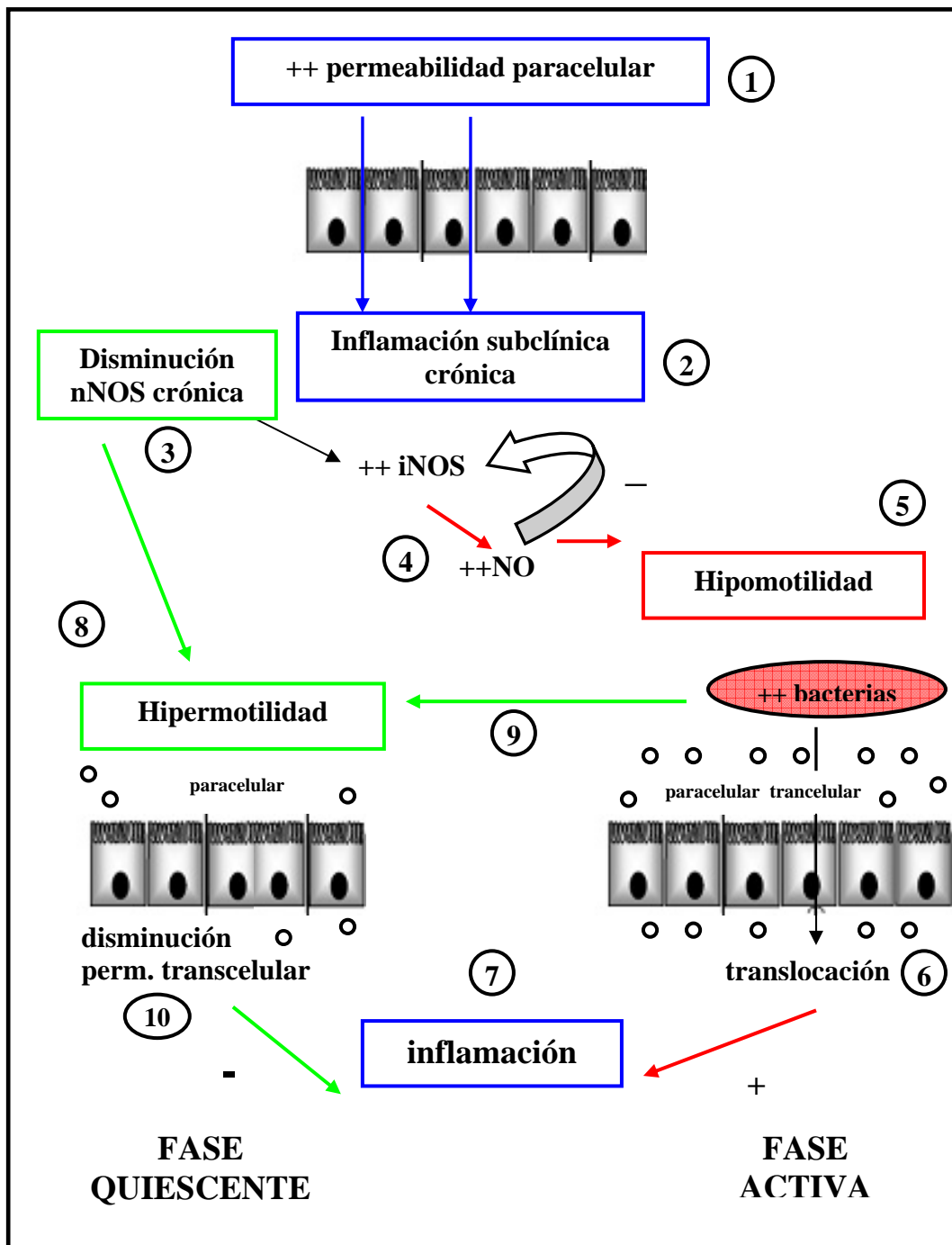
Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en este estudio podrían resumirse en los siguientes esquemas:

- **Inflamación aguda**



La administración de indometacina provoca una inhibición de la COX, y por tanto la disminución de la síntesis de prostaglandinas (PGs) [1]. La reducción de PGs protectoras en conjunción con otros mecanismos, tales como la disfunción mitocondrial asociada a la inhibición de la fosforilación oxidativa y el estrés oxidativo provocan la disrupción de la barrera epitelial [2]. Esta alteración provoca la entrada masiva de antígenos a través de las vías paracelular y transcelular, incluidas bacterias, lo que provoca una respuesta inflamatoria aguda [3]. La inflamación provoca un aumento de citocinas, así como la inducción de la expresión génica de iNOS y COX-2 [4]. El proceso inflamatorio se asocia con alteraciones en la síntesis de NO [5]. Mientras que las citocinas provocan la inhibición de la nNOS, la sobre-expresión de la iNOS provoca la liberación de grandes cantidades de NO y por tanto hipomotilidad.

• **Inflamación crónica**



Fase activa: Posiblemente, el aumento en el paso de antígenos luminales debido al incremento sostenido de permeabilidad paracelular [1] condiciona el desarrollo de un estado inflamatorio crónico subclínico [2]. Tanto la inflamación como la disminución de la nNOS [3] pueden provocar un incremento en la expresión génica de iNOS [4]. La disminución de la actividad motora intestinal, mediada por la sobreproducción de NO, facilita el incremento de la carga antigénica luminal [5] y la captación de macromoléculas por un mecanismo de endocitosis

inespecífico [6]. La translocación de bacterias lumbales provocaría la activación del sistema inmune y la liberación de mediadores inflamatorios [7].

Fase quiescente: tanto la disminución de nNOS [8], como la activación del patrón motor defensivo debido al sobrecrecimiento de bacterias lumbales [9] se asocian a un incremento de la actividad motora intestinal. La hipermotilidad facilita la desaparición de los estímulos pro-inflamatorios [10] ya que provoca la disminución de la carga antigénica luminal, así como la disminución en el paso de macromoléculas a través del epitelio.

CONCLUSIONES

1. La modificación realizada sobre el modelo clásico de enteritis inducida por indometacina en la rata da lugar a la obtención de un nuevo modelo de Enfermedad Inflamatoria Intestinal crónico que reproduce la oscilación espontánea de fases activas y quiescentes de inflamación intestinal características de la enfermedad humana. Este nuevo modelo constituye una herramienta útil para el estudio de los factores fisiopatogénicos implicados tanto en la ciclicidad como en la cronicidad del proceso inflamatorio.
2. La inflamación intestinal induce cambios funcionales crónicos en la actividad motora intestinal. Estos cambios se caracterizan por un incremento de la actividad motora espontánea en forma de clusters de contracciones fásicas, un aumento de la respuesta a la CCK y un incremento de la contracción ascendente del reflejo peristáltico. Estas alteraciones son debidas a la disminución crónica del tono inhibitorio intestinal mediado por NO y a cambios en la sensibilidad de las vías aferentes vagales. También existen evidencias de cambios en la componente excitatoria no colinérgica.
3. El proceso inflamatorio se asocia a una oscilación cíclica de la expresión génica de la iNOS y de la COX-2, principalmente en la mucosa intestinal.
4. El incremento cíclico del tono inhibitorio nitrérgico provoca una disminución generalizada de la actividad motora intestinal durante las fases de inflamación activa. La hipomotilidad enmascara el incremento de la actividad motora espontánea debido a la disminución crónica de la expresión génica de la nNOS.
5. La motilidad intestinal regula la concentración de bacterias presentes tanto en la luz como en la pared intestinal.
6. La inflamación intestinal provoca una alteración crónica en la función de la barrera epitelial, caracterizada por un incremento sostenido de la permeabilidad paracelular. Esta alteración podría contribuir a la cronificación del proceso inflamatorio, ya que permite un mayor paso de antígenos lumenales a través del epitelio.

7. Durante las fases de inflamación activa se produce un incremento de la permeabilidad transcelular. Esta alteración funcional se correlaciona con la disminución de la actividad motora intestinal y con cambios morfológicos a nivel de los enterocitos que son compatibles con una reducción del metabolismo energético mitocondrial.
8. Existe una estrecha correlación entre el incremento de la permeabilidad transcelular, la translocación de bacterias a través del epitelio y los relapsos de inflamación intestinal.

Conclusión final:

La inflamación intestinal provoca una alteración crónica en los circuitos neuronales implicados en la regulación de la actividad motora intestinal, así como en los mecanismos de control de la función de la barrera epitelial. Ambas alteraciones intervienen tanto en la ciclicidad como en la cronicidad del proceso inflamatorio.

Mientras la carga antigénica se mantiene dentro de unos límites, debido a una normal o incrementada motilidad, no hay respuesta inflamatoria a pesar de la disfunción de la barrera epitelial (fase quiescente). Sin embargo, el incremento cíclico en la expresión génica de iNOS provoca la disminución de la actividad motora intestinal. El éstasis del contenido luminal facilita el sobrecrecimiento bacteriano, la interacción antígeno-mucosa y el incremento de la permeabilidad transcelular, dando lugar a la activación del sistema inmune y a la exacerbación del proceso inflamatorio (fase activa).

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. General properties of immune responses. In: cellular & molecular immunology. Edited by WB Saunders Company. Philadelphia, 1997, pp. 3-15

Ajuebor MN, Singh A, Wallace JL. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 2000; 279:G238-G244

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 2001; 357: 593-615.

Alican I & Kubes P. A critical role for nitric oxide in intestinal barrier function and dysfunction. *Am. J. Physiol.* 1996; 33:G225-G237.

Allescher HD, Tougas G, Vergara P, Lu S, Daniel EE. Nitric oxide as a putative nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am. J. Physiol.* 1992; 262:G695-G702.

Annese V, Bassotti G, Napolitano G, Usai P, Andriulli A, Vantrappen G. Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease. *Scand. Journal Gastroenterol.* 1997; 32:1107-1117.

Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ. Similarities between ileal Crohn's disease and indomethacin experimental jejunal ulcers in the rat. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000; 14:241-245.

Balda MS & Matter K. Tight junctions. *J Cell Sci.* 1998; 111:541-547.

Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S. Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol* 1997;272:C1790-C1797

Banerjee AK & Peeters TJ. Experimental non-steroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in the rat: similarities to inflammatory bowel disease and effect of thromboxane synthetase inhibitors. *Gut* 1990; 31:1358-1361.

Bayliss WM & Starling EH. The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol* 1899; 24:99-143.

Bayliss WM & Starling EH. The movements and the innervation of the large intestine. *J. Physiol.* (London) 1900; 26:107-118.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 1996; 271: C1424-C1437.

Behm B & Stollman N. Postoperative ileus: etiologies and interventions. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 1:71-80.

- Belai A, Boulos PB, Robson T.** Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 1997; 40:767-774.
- Bernstein CN, Niazi N, Robert SM.** Rectal afferent function in patients with inflammatory and functional intestinal disorders. *Pain* 1996; 66:151-161.
- Berthoud HR, Kressel M, Raybould HE, Neuhuber WL.** Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by in vivo Dil-tracing. *Anat. Embryol.* 1995; 191:203-212.
- Bertrand V, Guimbaud R, Tulliez M, Mauprivez C, Sogni P, Couturier D, Giroud GP, Chaussade S, Chauvelot-Moachon L.** Increase in tumor necrosis factor-alpha production linked to the toxicity of indomethacin for the rat small intestine. *Br. J. Pharmacol.* 1998; 124:1385-1394.
- Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D.** Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108: 1566-1581.
- Blumberg RS, Gerdes D, Chott A, Porcelli SA, Balk SP.** Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol. Rev.* 1995; 147, 5-29.
- Blumberg RS & Strober W.** Prospects for research in inflammatory bowel disease. *JAMA* 2001; 7:643-647.
- Bouma G & Strober W.** The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3:521-533.
- Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ.** Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:E937-E47.
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM.** Immunobiology and immunopathology of the human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 1989; 97:1562-1584.
- Brandtzaeg P.** Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 964:13-45.
- Brown GC.** Nitric oxide as a competitive inhibitor of oxygen consumption in the mitochondrial respiratory chain. *Acta. Physiol. Scand.* 2001; 168: 667-674.
- Bueno L, Ferre JP, Ruckebusch Y.** Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Am. J. Dig. Dis.* 1978; 23(8):690-695.
- Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP.** Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* 2000; 184: 409-420.
- Castiglioni E, Del Vecchio Blanco G, Rispo A, Petrelli G, Amalfi G, Cozzolino A, Cuccaro I, Mazzacca G.** Orocaecal transit time and bacterial overgrowth in patients with Crohn's disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 2001; 32:274-275.

Chadwitz VS & Anderson RP. Microorganisms and their products in Inflammatory Bowel Disease. In: Inflammatory Bowel Disease. Edited by MacDermott RP & Stenson WF. New York, 1992, pp. 241-258.

Chalifoux LV & Bronson RT. Colonic adenocarcinoma associated with chronic colitis in cotton top marmosets, *Saguinus oedipus*. *Gastroenterology* 1981; 80:942-946.

Chang J, Munakata J, Mayer EA. Perceptual responses in patients with inflammatory and functional bowel disease. *Gut* 2000; 47:497-505.

Christensen J. Structure of the motor apparatus of the gut. In: the motility of the gastrointestinal tract. 2001. Peer review status.

Collins T. Acute and chronic inflammation. In: Robbins pathologic basis of disease. 6th edition. Edited by Cotran RS, Kumar V, Collins T. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999, pp 50-88.

Colpaert S, Liu Z, De Greef B, Rutgeerts P, Ceuppens JL, Geboes K. Effects of anti-tumour necrosis factor, interleukin-10 and antibiotic therapy in the indomethacin-induced bowel inflammation rat model. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001; 15:1827-1836.

Cook TA, Brading AF, McC Mortensen NJ. Abnormal contractile properties of rectal smooth muscle in chronic ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000; 14:1287-1294.

Cooke HJ & Reddix RA. Neural regulation of intestinal electrolyte transport. In: Physiology of the Gastrointestinal tract. Edited by Johnson LR. New York: Raven Press, 1994, pp.2083-2132.

Cortesini C, Cianchi F, Infantino A, Lise M. Nitric oxide synthase and VIP distribution in enteric nervous system in idiopathic chronic constipation. *Dig. Dis. Sci.* 1995; 40:2450-2455.

Costa M & Brookes SJ. The enteric nervous system. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89(8):S129-S13.

Cowles VE & Sarna SK. Relation between small intestinal motor activity and transit in secretory diarrhea. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1990; 259:G420-G429.

Cuvelier CA, Mielants H, De Vos M, Quatacker J, Veys E. M-cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa. *Histopathology* 1994; 24(5):417-26.

De Winter H, Cheroutre H, Kronenberg M. Mucosal immunity and inflammation. II. The yin and yang of T cells in intestinal inflammation: pathogenic and protective roles in a mouse model of colitis. *Am. J. Physiol.* 1999; 276:G1317-G1321.

Der T, Bercik P, Donnelly G, Jackson T, Berezin I, Collins SM, Huizinga JD. Interstitial cells of Cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 2000; 119:1590-1599.

DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simons LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 1998; 12:1063-1073.

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfede KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102:448-455.

Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS. Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches: possible implications for pathogenesis of crohn's disease. *Ann. Surg.* 1993; 217:260-271.

Eberhart CE & DuBois RN. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1995; 109:285-301.

Ekstrom GM & Andersson SE. Plasma exudation, hyperaemia, and epithelial permeability in rats with oxazolone-induced colitis: modulatory effects of budesonide. *Scand. J. Gastroenterol.* 2000; 35:190-197.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109:1344-1367.

Esplugues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 135: 1079-1095.

Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, Molin G, Benmark S. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 1993; 54(4):248-55

Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18:479-497.

Fiocchi C. Inflammatory Bowel Disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115:182-205.

Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB. J.* 1998; 12: 773-790.

Fujimura Y, Hosobe M, Kihara T. Ultrastructural study of M cells from colonic lymphoid nodules obtained by colonoscopic biopsy. *Dig. Dis. Sci.* 1992; 37(7):1089-98.

Funk CD. Prostaglandins and leukotriens: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294:1871-1875.

Furness JB & Costa M. The Enteric Nervous System. Edited by: Churchill Livingstone. Edinburgh, 1987.

Furness JB, Hohanson PJ, Pompolo S, Bornstein JC. Evidence that enteric motility reflexes can be initiated through entirely intrinsic mechanisms in the guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* 1995; 7:89-96.

Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system, *J. Auton. Nerv. Syst.* 2000; 81:87-96.

Furness JB. Novel gut afferents: Intrinsic afferent neurons and intestinofugal neurons. *Aut. Neu.* 2006. Article in Press.

Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog. Neurobiol.* 2004; 72:143-164.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas Ulcerative Colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J. Immunol.* 1996; 157:1261-1270.

Galligan JJ. Mechanisms of excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J. Exp. Clin. Med.* 1998; 23:129-136.

Gartner LP & Hiatt JL. Aparato digestivo. En: Texto atlas de histología. Editado por McGraw-Hill Interamericana. 2ª edición. 2002.

Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 103:439-447.

Geboes K & Collins S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol. Motil.* 1998; 10:189-202.

Geboes K & Jouret A. Histopatología de la colitis ulcerosa. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, segunda edición. Editado por Ediciones Ergon S.A.. Madrid, 2002, pp. 81-98.

Geboes K & van Eyken P. Histopatología de la enfermedad de Crohn. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, segunda edición. Editado por Ediciones Ergon S.A.. Madrid, 2002, pp. 193-207.

Gershon MD. The second brain. Edited by HarperCollings. New York, 1998.

Giralt M & Vergara P. Both afferent and efferent nerves are implicated in the cholecystikinin motor actions in the small intestine of the rat. *Reg. Pep.* 1999; 81:73-80.

Giralt M, Vergara P. Inhibition by CCK of ascending contraction elicited by mucosal stimulation in the duodenum of the rat. *Neurogastroenterol. Motil.* 2000;12:173-180.

Goodwin DG, Landino LM, Marnett LJ. Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxidase synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* 1999; 13:1121-1136.

Gotze H & Ptok A. Orocaecal transit time in patients with Crohn's disease. *Eur. J. Pediatr.* 1993; 152:193-196.

Gould SR. Prostaglandins, ulcerative colitis and sulphasalazine. *Lancet* 1975; 2:988.

Granger DN, Barrowman JA, Kvietys PR. The small intestine. In: Clinical Gastrointestinal Physiology. Edited by W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1985, pp. 189-201.

Grider JR & Jin JG. Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *J. Neurosci.* 1994; 14:2854-2860.

Griffith OW & Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* 1995; 57:707-736.

Grisham MB & Yamada T. Neutrophils, nitrogen oxides and inflammatory bowel disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 664:103-115.

Grisham MB. Animal models of inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1993; 9:524-533

Grossi L, McHugh K, Collins SM. On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993; 104:1049-1056.

Grundy D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 2002; 51 (suppl1):i2-i5.

Guo X, Liu ES, Ko JW, Wong BC, Ye Y, Lam S, Cho C. Protective role of cyclooxygenase inhibitors in the adverse action of passive cigarette smoking on the initiation of experimental colitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2001; 411:193-203.

Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang JP, Taurog JD. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human beta 2m: an animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 1990; 63:1099-1112.

Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol. Res.* 2003; 52:1-30.

Hibi T, Ogata H, Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 2002; 37(6):409-17.

Hibbs JB, Tanitor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 157:87-94.

Hinz B & Brune K. Cyclooxygenase-2. 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 300:367-375.

Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhasset MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* 1995; 268:G673-84

Holtug K, Hansen MB, Skadhauge E. Experimental studies of intestinal ion and water transport. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996; 31 (suppl.216):95-110.

Hordijk ML & Shivananda S. Risk of cancer in inflammatory bowel disease: why are the results in the reviewed literature so varied? *Scand. J. Gastroenterol.* 1989; 170:70-74.

Howden CW, Gilanders I, Morris AJ, Duncan A, Danesh B, Russell RI. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first-degree relatives. *Am. J. Gastroenterol.* 1994; 89:1175-1176.

Hug MJ. Transepithelial measurements using the Ussing chamber. Provided through: The European Working Group on CFTR Expression, 2002.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:599-603.

Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/Kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373:347-349.

Husebye E. Gastrointestinal motility disorders and bacterial overgrowth. *J. Intern. Med.* 1995; 237:419-427.

Husebye E. The patterns of small bowel motility: physiology and implications in organic disease and functional disorders. *Neurogastroenterol. Mot.* 1999; 11:141-161.

Husebye E, Skar V, Hoverstad T, Iversen T, Melby K. Abnormal intestinal motor patterns explain enteric colonisation with Gram negative bacilli in late radiation enteropathy. *Gastroenterology* 1995; 109:1078-1089.

Jiménez M, Vergara P, Christinck F, Daniel EE. Mechanism of action of somatostatin on the canine ileal circular muscle. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1995; 269:G22-G28.

Josephs MD, Cheng G, Ksontini R, Moldawer LL, Hocking MP. Products of cyclooxygenase-2 catalysis regulate postoperative bowel motility. *J Surg Res* 1999; 86:50-54.

Jouët P, Sarna SK, Singaram C. Immunocytes and abnormal gastrointestinal motor activity during ileitis in dogs. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1995; 269:G913-G924.

Jouët P & Sarna SK. Platelet-activating factor (PAF) stimulates giant migrating contractions during ileal inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 279(1):207-213.

Juanola C. Interrelacions fisiològiques en el sistema gastrointestinal de la rata, entre els mastòcits, el sistema immune neuroendocrí i l'activitat motora. Tesis Doctoral. 1999.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2004; 50(2):81-92

Kagnoff MF. Immunology of the digestive tract. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Edited by Johnson LR, New York: Raven Press, 1994, pp. 1699-1728.

Kameli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2000; 12:223-231.

Kandil HM, Argenzio RA, Sartor RB. Low endogenous prostaglandin E2 predisposes to relapsing inflammation in experimental rat enterocolitis. *Dig. Dis. Sci.* 1999; 44:2110-2118.

Karnaki KJ. Electrophysiological assessment of epithelia. In: Cell to cell interactions: a practical approach. Edited by Stevenson BR, Gallin WJ, and Paul DL. Oxford, UK: IRL Press, 1992, pp. 257-274.

Kehlet H & Holte K. Review of postoperative ileus. *Am. J. Surg.* 2001; 182(5A Suppl):3S-10S.

Kersting S, Bruewer M, Schürmann G, Klotz A, Uteh M, Hansmerten M, Krieglstein CF, Senninger N, Schulzke JD, Naim HY, Zimemr JP. Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *Am. J. Pathol.* 2004; 165(2):425-37.

Kleer CG & Appelman HD. Ulcerative colitis: patterns of involvement in colorectal biopsies and changes with time. *Am. J. Surg. Pathol.* 1998; 22:983-989.

Kolios G, Valatas V, Ward S. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* 2004; 113:427-437.

Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi R. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacological research* 1999; 40:517-524.

Konturek SJ & Pawlik W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. *Dig. Dis. Sci.* 1986; 31:65-195.

Koretz K, Momburg F, Otto HF, Moller P. Sequential induction of MHC antigens on autochthonous cells of ileum affected by Crohn's disease. *Am. J. Pathol.* 1987; 19:493-502.

Kucharzik T, Lügering A, Lügering N, Rautenberg K, Linnepe M, Cichon C, Reichelt R, Stoll R, Schmidt MA, Domschke W. Characterization of M cell development during indomethacin-induced ileitis in rats. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2000; 14(2):247-56.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75:263-274.

Kunze WAA & Furness JB. The Enteric Nervous System and regulation of intestinal motility. *Annu. Rev. Physiol.* 1999; 61:117-142.

Lauritsen K. Cyclo-oxygenase products. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 1989; 1:150-154.

Lecci A, Santicoli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2002; 2:630-641.

Lesniewska V, Rowland I, Laerke HN, Grant G, Naughton PJ. Relationship between dietary-induced changes in intestinal commensal microflora and duodenojejunal myoelectric activity monitored by radiotelemetry in the rat *in vivo*. *Exp. Physiol.* 2005; 91: 229-237.

Lewis LD & Williams JA. Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat. *Am. J. Physiol.* 1990; 258:G512-G518.

Li M, Johnson CP, Adams MB, Sarna SK. Cholinergic and nitrenergic regulation of *in vivo* giant migrating contractions in rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2002; 283:G44-G52.

Linden DR, Chen JX, Gershon MD, Sharkey KA, Mawe GM. Serotonin availability is increased in mucosa of guinea pigs with TNBS-induced colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; 285:G207-G216.

Ling KY, Bhalla D, Hollander D. Mechanisms of carrageenan injury of IEC18 small intestinal epithelial cell monolayers. *Gastroenterology* 1988; 95:1487-1495.

Liu LW, Thuneberg L, Huizinga JD. Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am. J. Physiol.* 1994; 266:G485-G496.

Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli* and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1995;108:1396-1404.

Lomax AE, Fernández E, Sharkey KA. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol. Motil.* 2005; 17:4-15.

Lu G, Qian X, Berezin I. Inflammation modulates *in vitro* colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am. J. Physiol* 1997; 273:G1233-G1245.

Lu G, Mazet B, Sun C. Inflammatory modulation of calcium-activated potassium channels in canine colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1999; 116:884-892.

Lügering A, Floer M, Lügering N, Cichon C, Schmidt MA, Domschke W, Kucharzik T. Characterization of M cell formation and associated mononuclear cells during indomethacin-induced intestinal inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2004; 136(2):232-8.

Lui H, Vanderwinden JM, Ji P, De Laet MH. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. *Chin. Med. J.* 1997; 110(5):358-61

- Makhlouf GM.** Neuromuscular function of the small intestine. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Edited by Johnson LR. New York: Raven Press, 1994, pp. 977-990.
- Matter K & Balda MS.** Functional analysis of tight junctions. *Methods* 2003; 30:228-234.
- MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF.** Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand. J. Immunol.* 2000; 51:2-9.
- MacDonald TT & Monteleone G.** Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005; 307:1920-1925.
- Madara JL & Trier JS.** The functional morphology of the mucosa of the small intestine. In: Physiology of the gastrointestinal tract. Edited by Johnson LR. New York: Raven Press, 1994, pp. 1577-1622.
- Mariotto S, Cussolin L, Adami A, Del Soldato P, Suzuki H, Benoni G.** Inhibition by sodium nitroprusside of the expression of inducible nitric oxide synthase in rat neutrophils. *Br J Pharmacol* 1995; 114:1105-1106.
- Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, Umesaki Y.** Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 1998; 43:71-78
- Mawe GM, Collins SM, Shea-Donohue T.** Changes in enteric neural circuitry and smooth muscle in the inflamed and infected gut. *Neurogastroenterol. Motil.* 2004; 16 (suppl. 1):133-136.
- Mayer EA & Collins SM.** Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2002; 122:2032-2048.
- Meyer P.** La digestión. En: Fisiología humana. Editado por Salvat. Barcelona, 1985, pp. 159-311.
- McDonald LJ & Murad F.** Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1996; 211(2):1-6.
- McPherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I.** Mucosal antibodies in IBD are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996; 38:365-375.
- Miller MJS, Thompson JH, Zhang XJ.** Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995; 109:1475-1483.
- Miner PB.** Clinical features, course, laboratory findings, and complications in ulcerative colitis. In: Inflammatory Bowel Disease. Edited by Kirsner JB. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000, pp. 299-304.
- Mitchell JA & Warner TD.** Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br. J. Pharmacol.* 1999; 128:1121-1132.

Mizuta Y, Isomoto H, Takahashi T. Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 2000; 118:714-723.

Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK, Tonegawa S. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993; 75:274-282.

Moncada S, Palmer MJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1991; 43:109-142.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96:795-803.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:331-341.

Munkholm P, Langholz E, Hollander D, Thornberf K, Orholm M, Katz KD. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis and their first-degree relatives. *Gut* 1994; 35:68-72.

Musch MW & Chang EB. Diarrhea in Inflammatory Bowel Disease. In: Inflammatory Bowel Disease From bench to bedside. Edited by Targan S & Shanahan F. Baltimore: Williams and Wilkins, 1993, pp.239-254.

Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP. Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 2003; 52:84-90.

Neutra MR. Current concepts in mucosal immunity V. Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1998; 274:G785-G791.

Niederau C, Backmerhoff F, Schumacher B. inflammatory mediators and acute phase proteins in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44(13):90-107.

Nieuwenhuijs VB, Verheem A, van Duijvenbode-Beumer H. The role of interdigestive small bowel motility in the regulation of gut microflora, bacterial overgrowth and bacterial translocation in rats. *Ann. Surgery* 1998; 228:188-193.

Nisoli E, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. Mitochondrial biogenesis as a cellular signaling framework. *Biochem. Pharmacol.* 2004; 67: 1-15.

North RA. Electrophysiology of the enteric nervous system. *Neuroscience* 1982; 7:315-325.

Obrador A & Riera J. Cáncer y enfermedad inflamatoria intestinal. En: Enfermedad Inflamatoria Intestinal, segunda edición. Editado por Ediciones Ergon S.A.. Madrid, 2002, pp. 335-349.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411:603-606.

Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990; 98:694-702.

Oliver JR. Definiciones conceptuales de la enfermedad inflamatoria intestinal. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, segunda edición. Editado por Ediciones Ergon S.A.. Madrid, 2002, pp. 3-6.

Olsson C & Holmgren S. The control of gut motility. *Comp. Biochem. Physiol. Part* 2001; 128:481-503.

Ortega Mateo A & Amaya Aleixandre De Artinano M. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. *Pharmacol. Res.* 2000; 42: 421-427.

Pácha J. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol. Rev.* 2000; 80(4):1633-67.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-526.

Panés J. Inflammatory bowel disease: pathogenesis and targets for therapeutic interventions. *Acta Physiol. Scand.* 2001, 173, 159-165.

Panés J, Vilaseca J, Videla S. Modelos animales de inflamación intestinal y su relación con la enfermedad inflamatoria intestinal humana. En: *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*, segunda edición. Editado por Ediciones Ergon S.A.. Madrid, 2002, pp. 417-431.

Payà M, García Pastor P, Coloma J, Alcaraz J. Nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. *Br J Pharmacol* 1997;120:1445-1452.

Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghooos Y, Verbeke G. Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997; 113:802-807.

Perdue MH. Mucosal immunity and Inflammation III. The mucosal antigen barrier: cross talk with mucosal cytokines. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 1999; 277:G1-G5.

Porcher C, Baldo M, Henry M, Orsoni P, Julé Y, Ward SM. Deficiency of interstitial cells of Cajal in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2002; 97:118-124.

Posadas I, Terencio MC, Guillén I, Ferrándiz ML, Coloma J, Payà M, Alcaraz MJ. Co-regulation between cyclo-oxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in the time-course of murine inflammation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2000; 361:98-106.

Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld RA, Hsueh W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa B. *FASEB J* 2001; 15(2):439-446.

Quintana E. Regulación nitrérgica de la función motora gastrointestinal en la endotoxemia. Tesis Doctoral. 2004.

Rao SS, Read NW, Brown C, Bruce C, Holdsworth CD. Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1987; 93:934-940.

Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, Grenther WB, Hamm TE, Balish E, Taurog JD, Hammer RE, Wilson KH, Sartor RB. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J. Clin. Invest.* 1996; 98(4):945-53.

Reddy SN, Bazzochi G, Chan S, Akashi K, Villanueva-Meyer J, Yanni G, Mena I, Snape WJ. Colonic motility and transit in health and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1991; 101:1289-1297.

Renehan WE, Zhang X, Beierwaltes WH, Fogel R. Neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus may integrate vagal and spinal information from the GI tract. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1995; 268:G780-G790.

Reuter BK, Asfaha S, Buret A, Sharkey KA, Wallace JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:2076-2085.

Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 1997; 112:109-117.

Robert A & Asano T. Resistance of germfree rats to indomethacin-induced intestinal lesions. *Prostaglandins* 1977; 14:333-341.

Rodríguez-Membrilla A, Martínez V, Vergara P. Peripheral and central cholecystinin receptors regulate postprandial intestinal motility in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995a; 275:486-493.

Rodríguez-Membrilla A, Martínez V, Jiménez M, Goñalons E, Vergara P. Is nitric oxide the final mediator regulating the migrating myoelectric complex cycle? *Am J Physiol.* 1995b; 268:G207-G214.

Rodríguez-Membrilla A. Regulación de la motilidad intestinal por colecistoquinina: vías y mecanismos implicados. Tesis Doctoral. 1996.

Ruckebusch Y. Electromyographic analysis of small intestinal motility in domestic animals. *Zentralbl. Veterinarmed.* 1977; 24:1-12.

Ruh J, Schmidt E, Vogel F, Klar E. Indomethacin-induced disturbances in villous microcirculation in the rat ileum. *Microvas Res* 1999;58:137-143.

Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA. Enteric glia. *Neurogastroenterol. Motil.* 2004; 16 (suppl 1):44-49.

Rumessen JJ & Thuneberg L. Pacemaker cells in the gastrointestinal tract: interstitial cells of Cajal. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996; 31(suppl 216):82-94

Rumessen JJ. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996; 111:1477-1455.

Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 1998; 80:S147-S171

Sanders DSA. The differential diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Baill. Clin. Gastroenterol.* 1998; 12:19-23.

Sands B. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2004; 126:1518-1532.

Sarna SK. In vivo myoelectric activity. In: Handbook of physiology. Section 6: the gastrointestinal system. Edited by American Physiological Society. Bethesda, 1989, page 820.

Sarna SK. Neuronal locus and cellular signaling for stimulation of ileal giant migrating and phasic contractions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; 284:G789-797.

Sartor RB, Bender DE, Holt L. Susceptibility of inbred rat strains to intestinal inflammation induced by indomethacin. *Gastroenterology* 1992; A690 (abstract).

Satoh H, Inada I, Takeo H, Yoshitaka M. Indomethacin produces gastric antral ulcers in the re-fed rat. *Gastroenterology* 1981; 81:719-725.

Satoh H, Guth PH, Grossman MI. Role of bacteria in gastric ulceration produced by indomethacin in the rat: cytoprotective action of antibiotics. *Gastroenterology* 1983; 84:483-489.

Saud B, Nandi J, Ong G, Finocchiaro S, Levine A. Inhibition of TNF- α improves indomethacin-induced enteropathy in rats by modulating iNOS expression. *Dig. Dis. Sci.* 2005; 50(9):1677-1683.

Schneider J, Jehle E, Starlinger M. Neurotransmitter coding of enteric neurons in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol. Motil.* 2001; 13:255-264.

Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* 1991; 352:621-624.

Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J, Hämling J, Koop I, Groessner B, Lochs H, Raedler A. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 1999; 353:459-461.

Schultsz C, Van Den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GA, Dankert J. The intestinal mucus layer from patients with inflammatory bowel disease harbors high numbers of bacteria compared with controls. *Gastroenterology* 1999;117:1089-1097.

Schürmann G, Bruwer M, Klotz A, Schmid KW, Senninger N, Zimmer KP. Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int. J. Colorectal Dis.* 1999; 14(1):41-6.

Schwarz NT, Kalff JC, Türler A, Engel BM, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ. Prostanoid production via COX-2 as a causative mechanism of rodent postoperative ileus. *Gastroenterology* 2001; 121:1354-1371.

Sharkey KA, Lomax AEG, Bertrand PP, Furness JB. Electrophysiology, shape and chemistry of intestinofugal neurons projecting from guinea pig distal colon to inferior mesenteric ganglia. *Gastroenterology* 1998; 115:909-918.

Siebers A & Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol.* 1996; 4(1):22-9.

Simpson SJ, Mizoguchi E, Allen D, Bhan AK, Terhorst C. Evidence that CD4+, but not CD8+ T cells are responsible for murine interleukin-2-deficient colitis. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25:2618-2625.

Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehs T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998; 115:297-306.

Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996; 111:871-885.

Smith PR, Dawson DJ, Swan CH. Prostaglandin synthetase activity in acute ulcerative colitis: effects of treatment with sulphasalazine, codeine phosphate and prednisolone. *Gut* 1979; 20:802-805.

Snape WJ, Williams R, Hyman PE. Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:G987-G991.

Somasundaram S, Hayllar H, Rafi S, Wrigglesworth JM, MacPherson AJS, Bjarnason I. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand. J. Gastroenterol.* 1995; 30:289-299.

Southan E & Garthwaite J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. *Neuropharmacology* 1993; 32: 1267-1277.

Steinhoff MM, Kodner IJ, DeSchryver Keckemeti K. Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural marker for Crohn's disease. *Mod. Pathol.* 1988; 1:182-187.

Stotzer PO, Björnsson ES, Abrahamsson H. Interdigestive and postprandial motility in small intestinal bacterial overgrowth. *Scand. J. Gastroenterol.* 1996; 31:875-880.

- Strober W.** Animals models of inflammatory bowel disease: an overview. *Dig. Dis. Sci.* 1985; 30 (suppl.12):3S-10S.
- Stuehr DJ & Nathan CF.** Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 1989; 169:1543-1555.
- Summers RW, Anuras S, Green J.** Jejunal manometry in health, partial intestinal obstruction and pseudoobstruction. *Gastroenterology* 1983; 85(6):1290-1300.
- Sun Z, Wang X, Andersson R.** Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. *Dig. Surg.* 1998; 15:386-397.
- Sundberg JP, Elson CO, Bedigian H, Birkenmeier EH.** Spontaneous, heritable colitis in a new substrain of C3H/HeJ mice. *Gastroenterology* 1994; 107:1726-1735.
- Surprenant A.** Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 1994; 56:11-140.
- Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM.** Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 2002; 51:i6-i10.
- Takeuchi K, Miyazawa T, Tanaka A, Kato S.** Pathogenic importance of intestinal hypermotility in NSAID-induced small intestinal damage in rats. *Digestion* 2002; 66:30-41.
- Tamir S & Tannenbaum SR.** The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochem. Biophys. Acta* 1996; 1288:F31-F36.
- Tanaka M & Riddell RH.** The pathological diagnosis and differential diagnosis of Crohn's disease. *Hepathogastroenterol.* 1990; 37:18-31.
- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE.** The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J. Exp. Med.* 1994;180(6):2359-2364.
- Telford GL & Sarna SK.** The migrating myoelectric complex of the small intestine. *CHAOS* 1991; 1(3):299-302.
- Torrents D & Vergara P.** In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2000; 279(3):G543-51
- Torsoli A & Severi C.** The neuroendocrine control of gastrointestinal motor activity. *J. Physiol.* 1993; 87:367-374.
- Tresguerres JAF.** Fisiología del sistema digestivo. En: Fisiología humana. Editado por McGraw-Hill. Madrid, 1992, pp. 756-830.
- Trespi E & Ferrieri A.** Intestinal bacterial overgrowth during chronic pancreatitis. *Curr. Med. Res. Opin.* 1999; 15(1):47-52.

Ussing HH & Zerhan K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 1950; 19:43-56.

Ussing HH & Zerhan K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 1951; 23:110-127.

Valori R. Small intestinal motility. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 1992; 8:257-261.

Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *Am. J. Physiol.* 1997; 272:G321-G327.

Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verhemm A, Harnsen W, Visser MR, Gooszen HG. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil.* 2003; 15(3):267-76.

Vanderwinden JM, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen JJ, De-Laet MH. Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327:511-515.

Vanderwinden JM, De-Laet MH, Schiffmann SN, Mailleux P, Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of Hirschsprung's disease. *Gastroenterology* 1992; 105:969-973.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998; 38:97-120.

Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA. Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br. J. Pharmacol.* 2004; 143:107-118.

Vantrappen G, Janssens J, Hellemans J, Ghoois Y. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of the small intestine. *J. Clin. Invest.* 1977; 59:1158-1166.

Vento P, Kiviluoto T, Keranen U, Jarvinen HJ, Kivilaakso E, Soinila S. Quantitative comparison of growth-associated protein-43 and substance P in ulcerative colitis. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49:749-75.

Vergara P, Woskowska Z, Cipris S, Fox-Threlked JET, Daniel EE. Somatostatin excites canine ileum ex vivo: role for nitric oxide?. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 1995; 269:G12-G21.

Virag L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Perxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol. Letters* 2003; 140:113-124.

Vrees M, Pricolo V, Potenti F, Cao W. Abnormal motility in patients with ulcerative colitis: the role of inflammatory cytokines. *Arch. Surg.* 2002; 137:439-446.

Wedel T, Spiegler J, Soellner S, Roblick UJ, Schiedeck THK, Bruch HP, Krammer HJ. Enteric nerves and interstitial cells of Cajal are altered in patients with slow-transit constipation and megacolon. *Gastroenterology* 2002; 123:1459-1467.

Weissman G. Inflammation: historical perspectives. In: Inflammation: basic principles and clinical correlation. 2nd edition. Edited by Gallin JL. New York: Raven press, 1992, pp. 5-13.

Whittle BJ. Temporal relationship between cyclooxygenase inhibition, as measured by prostacyclin biosynthesis, and the gastrointestinal damage induced by indomethacin in the rat. *Gastroenterology* 1981; 80:94-98.

Wood JD. Histamine signals in enteric neuroimmune interactions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992; 664:275-283.

Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology* 2004; 127:635-657.

Wu KK. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. *J. Lab. Clin. Med.* 1996; 128:242-245.

Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102:1524-1534

Yamada T, Deitxh E, Specian RD, Perry MA, SartorRB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993; 17 (6):641-662.

Yunker AM, Krause JE, Roth KA. Neurokinin-B and substance P-like reactivity are co-localized in enteric nerves of rat ileum. *Reg. Pept.* 1999; 80:67-74.

