



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

# **Alteracions motores i neurals en un model de colitis induïda per *Trichinella spiralis* en rata**

Memòria presentada per Mariona Aulí Casacuberta  
per optar al grau de Doctor  
*Programa de Doctorat en Neurociències*

Bellaterra, juny de 2006



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia  
Unitat de Fisiologia Animal



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia

Unitat de Fisiologia Animal (Veterinària)

ESTER FERNÁNDEZ GIMENO, Professora Titular de Fisiologia del Departament de Biologia Cel·lular, de Fisiologia i d'Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

FAIG CONSTAR

Que la memòria titulada "**Alteracions motores i neurals en un model de colitis induïda per *Trichinella spiralis* en rata**" presentada per Na **MARIONA AULÍ CASACUBERTA** per a optar al **Títol de Doctor** ha estat realitzada sota la meva direcció i, en considerar-la conclosa, autoritzo la seva presentació per ser jutjada pel Tribunal corresponent.

I per a que consti als efectes que s'escaigui signo la present a Bellaterra, a 25 de Maig de 2006

Signat: Dra. Ester Fernández Gimeno

## Agraïments

Moltes vegades he pensat en aquest moment que em pensava que mai arribaria. I ara em trobo escrivint aquest apartat, amb por de no deixar-me a ningú ja que sou moltes les persones que de manera directa o indirecta heu col·laborat en la meva tesi doctoral. Des d'aquí vull agrair la vostra ajuda.

A la directora d'aquesta tesi, Ester Fernández, per introduir-me al món de la recerca i donar-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi doctoral. Al Marcel pel suport i consells. A la Maite per la confiança i per ajudar-me tant en els moments bons com en els difícils.

Al Dr. Alberto Marco per l'ajuda en l'anàlisi histopatològic de les mostres. A l'Antonio per la cordialitat que mostra tant en les situacions previstes com en les imprevistes. I al Pepe, gràcies.

Aquesta tesi tampoc hauria estat possible sense la beca Predoctoral de Formació de Personal Investigador de la UAB, i l'ajut per estades de curta durada fora de Catalunya de la UAB que em va permetre realitzar part de la meva tesi a Canadà.

I want to thank Dr. Keith Sharkey for the stimulating suggestions and encouragement during my stay in Calgary. To Yasmin, Marlene, Marja, and Adam to make me feel comfortable even though the low temperatures we reached from october to december of 2003. To Pati to make me feel like home.

Al Dr. Pere Clavé per donar-me l'oportunitat de seguir investigant un cop acabada la meva beca predoctoral i a la Fundació de Gastroenterologia Dr. Francisco Vilardell i a l'Hospital de Mataró per fer-ho possible.

A en Ricard per la seva ajuda incondicional i amistat, a part de cafès, sopars, festes i d'altres. Que sàpigues que et trobo a faltar. A la Yoli per la seva forma de veure la vida i el seu somriure. A la Mònica per sempre està disposada a ajudar quan ho he necessitat, a l'Anna Alcàntara per molts moments compartits i molts més per compartir, i a l'Elena pel suport, consells i amabilitat constants. Al Jordi Aleu pels ànims i les discussions lingüístiques sobre esquesques i esquellerincs, entre d'altres. Tampoc em puc deixar a l'Oscar, el meu gairebé cosí, que per casualitat ens vam trobar pels laboratoris, ni al Dani per haver compartit part d'aquest camí.

Als futurs doctors que corren pel departament: a la Diana per aguantar estoicament les maratons musicals a la que es troba sotmesa quan treballa al 115 i pel suport, tot i el sulfhídric, a l'Estefania per estar sempre disposada a escoltar, a l'Esther Jorge per les lliçons magistrals de

cuina japonesa, les ganes de festa, la confiança i els consells. A l'Hernán, la Carol i el Joan per les bones estones passades. A l'Anna Domènech per la trajectòria compartida des de Dublin passant per veterinària i fins a fisio. Gràcies per ser-hi, compta amb mi. A la Lina i l'Alícia, gràcies! Alícia, la teva personalitat brilla.

A la Sara de farmaco per les agendes saturades en comú però tenir temps pel nostre dinaret de la setmana i explicar-nos la vida.

Als amics de sempre de Sabadell, la Montse, el Llore, l'Anna V., l'Anna S., l'Albert, l'Imma, en Narcís, la Raquel, el Ruben, la Soldi, la Mireia i en Rubèn per moltes converses monopolitzades amb la meva tesi doctoral i pel suport. I als veterinaris companys de promoció, la Maria, en Toni, la Montse, en Josep, la Irene, l'Encarna, en Jordi, la Núria B i la Núria L... entre d'altres, pels ànims constants, gràcies!

Als companys de feina i amics del laboratori 115 que durant aquest últim any m'han hagut d'aguantar en tots els sentits. A l'Oscar i la Pilar, gràcies. A l'Emma per ser-hi tant en els moments bons com en els difícils. I als futurs doctors del 115: l'Álvaro i la Bego. A l'Álvaro per l'ajuda tècnica en els últims moments, per preocupar-te per nosaltres i per ser com ets. I a la Bego pels gustos musicals compartits passant per Coldplay i Red Hot Chili Peppers, pels ànims, consells i suport incondicionals, i en definitiva per l'amistat.

També vull donar gràcies a en Jordi, per aguantar els meus mals de cap, per donar-me ànims en tot moment i per fer-me riure quan més ho he necessitat.

I per acabar, a la meva família i molt especialment als meus pares, en Pep i la Dolors, al meu germà, en Carles, i als meus avis, en Salvi i la Lola, que sempre em fan costat al llarg de la meva vida personal i professional, i em recolzen en els moments de dificultat.

A tots, gràcies.

Mariona Aulí Casacuberta  
Bellaterra, juny de 2006

“Come up to meet you, tell you I'm sorry  
You don't know how lovely you are  
I had to find you, tell you I need you  
Tell you I set you apart

Tell me your secrets and ask me your questions  
Oh let's go back to the start  
Running in circles, coming up tails  
Heads on a silence apart

Nobody said it was easy, it's such a shame for us to part  
Nobody said it was easy, no one ever said it would be this hard  
Oh take me back to the start

I was just guessing at numbers and figures  
Pulling your puzzles apart  
Questions of science, science and progress  
Do not speak as loud as my heart

Tell me you love me, come back and haunt me  
Oh and I rush to the start  
Running in circles, chasing our tails  
Coming back as we are

Nobody said it was easy, Oh it's such a shame for us to part  
Nobody said it was easy, no one ever said it would be so hard

I'm going back to the start”

*The Scientist*  
*A Rush of Blood to the Head, 2002*  
*Coldplay*

## Abreviacions

**ACh:** acetilcolina

**ATP:** adenosina 5-trifosfat

**AUC:** àrea sota la corba

**cAMP:** adenosina monofosfat cíclic

**cGMP:** guanosina monofosfat cíclic

**CD:** malaltia de Crohn

**CGRP:** pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina

**ChAT:** transferasa de l'acetilcolina

**DSS:** sulfat de dextrà sòdic

**GFAP:** proteïna acídica fibrilar glial

**HALF:** elevada amplitud i baixa freqüència

**IBD:** malaltia inflamatòria intestinal

**ICC:** cèl·lules intersticials de Cajal

**IFN:** interferó

**iNOS:** sintetasa de l'òxid nítric induïble

**IL:** interleucina

**IJP:** potencial post-unió de tipus inhibitori

**LAHF:** baixa amplitud i elevada freqüència

**L-NOARG:** N-nitro-L-arginina

**MHC:** antigen del complex major d'histocompatibilitat

**MPO:** oscil·lacions cícliques del potencial de membrana que provoquen potencials d'acció

**NANC:** no adrenèrgic no colinèrgic

**NKA:** neurocinina A

**nNOS:** sintetasa de l'òxid nítric neuronal

**NO:** òxid nítric

**PACAP:** pèptid activador de l'adenil ciclase pituïtària

**PGP:** protein gene product

**PI:** post infecció

**PM:** plexe mientèric

**PMN:** polimorfonuclear

**PSM:** plexe submucós

**RMP:** potencial de repòs de membrana

**sGC:** guanilat ciclasa soluble

**SP:** substància P

**SNC:** sistema nerviós central

**SNE:** sistema nerviós entèric

**TH:** hidroxilasa de la tirosina

**TNBS:** àcid trinitrobenzè sulfònic

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TTX:** tetrodotoxina

**UC:** colitis ulcerosa

**VIP:** pèptid intestinal vasoactiu

## Publicacions

Els estudis realitzats en aquesta tesi han estat publicats o pendents de publicar-se en els següents articles:

Aulí M., Fernández E. (2005). Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Digestive Diseases and Sciences* 50:1432-1443.

Aulí M., Fernández E (2006). Time course of neural & contractile disturbances in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Life Sciences. Sotmès*.

Aulí M., Nasser Y., Sharkey K.A., Fernández E. (2006). Neurochemical changes and infiltrating immune cells in the enteric nervous system in a rat model of ulcerative colitis. *En manuscrit*.

I publicats en forma d'abstract:

Aulí M., Fernández E (2003). Neural and non neural changes in motility in a rat model of ulcerative colitis. *Neurogastroenterology and motility* 15: 227-228.

Aulí M., Fernández E (2003). Characterization of changes in contractility in a rat model of ulcerative colitis. *Neurogastroenterology and motility* 15: 1184.

Aulí M, Sharkey K, Fernandez E (2004). Functional and structural changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Neurogastroenterology and motility* 16: 857.



# Índex

## Introducció

(I) Anatomia, fisiologia i motilitat del còlon.....	1
(II) Malalties inflamatòries intestinals humanes.....	10
(III) Models animals d'inflamació intestinal.....	18
Referències.....	27

<b>Objectius.....</b>	<b>37</b>
-----------------------	-----------

## **Capítol 1. Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis***

1.1. Abstract.....	39
1.2. Introduction.....	39
1.3. Material and Methods	
1.3.1. <i>Animal models</i> .....	41
1.3.2. <i>Induction of colitis</i> .....	41
1.3.3. <i>Tissue preparation</i> .....	41
1.3.4. <i>Recordings of spontaneous mechanical activity</i> .....	42
1.3.5. <i>Immunohistochemistry</i> .....	42
1.3.6. <i>Data analysis and statistics</i> .....	43
1.4. Results	
1.4.1. <i>Clinical observations</i> .....	43
1.4.2. <i>Macroscopic lesions</i> .....	46
1.4.3. <i>Histology</i> .....	46
1.4.4. <i>Tissue weight</i> .....	46
1.4.5. <i>Spontaneous smooth muscle contractions</i> .....	47
1.4.6. <i>Immunohistochemistry</i> .....	53
1.5. Discussion.....	55
1.6. References.....	58

**Capítol 2. Time course of neural & contractile disturbances in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis***

2.1. Abstract.....	63
2.2. Introduction.....	63
2.3. Material and Methods	
2.3.1. <i>Animal model</i> .....	65
2.3.2. <i>Induction of colitis</i> .....	65
2.3.3. <i>Tissue preparation</i> .....	65
2.3.4. <i>Recordings of spontaneous mechanical activity</i> .....	66
2.3.5. <i>Microelectrode studies</i> .....	67
2.3.6. <i>Solution and drugs</i> .....	68
2.3.7. <i>Data analysis and statistics</i> .....	68
2.4. Results	
2.4.1. <i>Effect of TTX on mechanical activity</i> .....	68
2.4.2. <i>Effect of inhibition of NO synthase on mechanical activity</i> .....	71
2.4.3. <i>Effect of apamin on mechanical activity</i> .....	71
2.4.4. <i>Contractile activity</i> .....	73
2.4.5. <i>Electrophysiological studies</i> .....	78
2.5. Discussion.....	82
2.6. References.....	85

**Capítol 3. Neurochemical changes and infiltrating immune cells in the enteric nervous system in a rat model of ulcerative colitis.**

3.1. Abstract.....	89
3.2. Introduction.....	90
3.3. Material and Methods	
3.3.1. <i>Animal model</i> .....	91
3.3.2. <i>Induction of colitis</i> .....	91
3.3.3. <i>Tissue preparation</i> .....	92
3.3.4. <i>Immunohistochemistry</i> .....	92
3.3.5. <i>Statistical analysis</i> .....	92

---

3.4. Results	
3.4.1. <i>Enteric innervation in inflammation</i> .....	94
3.4.2. <i>Neural calcium binding proteins</i> .....	97
3.4.3. <i>Inflammatory cellular infiltrate</i> .....	97
3.4.4. <i>Enteric glial cells</i> .....	100
3.5. Discussion.....	101
3.6. References.....	106
<b>Discussió general</b> .....	<b>111</b>
Referències.....	127
<b>Conclusions</b> .....	<b>135</b>

## Introducció (I) Anatomia, fisiologia i motilitat del còlon

### Funció i anatomia del còlon

El còlon participa en funcions importants de l'aparell digestiu com són l'absorció d'aigua i electròlits, la concentració de la matèria fecal i formació de femtes, el seu emmagatzament temporal abans de la defecació i finalment propulsa aquest material cap al recte per tal de permetre la defecació sota control voluntari.

El còlon humà es pot dividir funcionalment en còlon ascendent i transvers els quals participen activament en l'absorció d'aigua i electròlits, i el còlon descendent i sigma que estan sobretot implicats en l'emmagatzament de femtes i posterior defecació (figura 1).

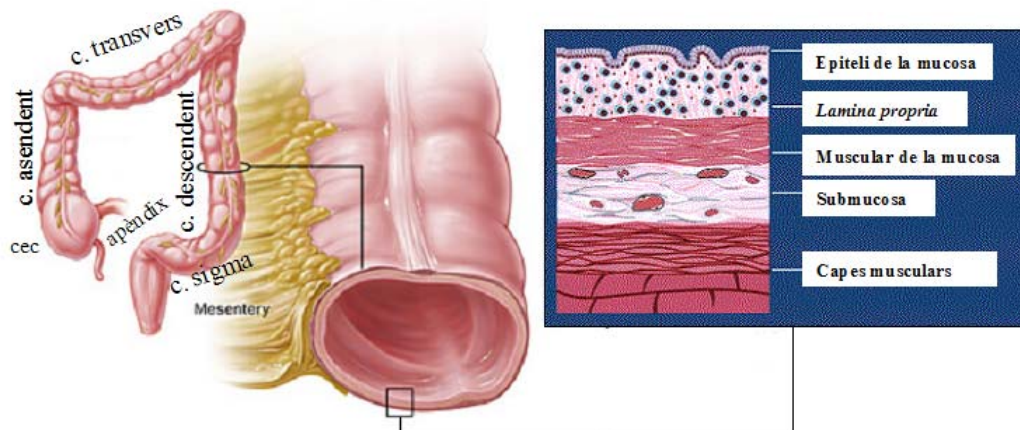


Figura 1. Anatomia del còlon humà. A la dreta, es pot observar la magnificació d'un tall transversal del còlon en què es mostren les capes que el constitueixen.

Per tal d'estudiar la organització i control de les contraccions colòniques, sovint s'utilitzen models animals que ens permeten una aproximació al funcionament del còlon humà. En la rata, l'intestí gros continua el procés de concentració de femtes mitjançant la reabsorció d'aigua i electròlits dels continguts intestinals. El cec tant en els rosegadors com en altres herbívors és més gros que en humans i permet als microorganismes digerir la cel·lulosa. El cec continua amb el còlon ascendent, transvers i descendent que desemboca al recte el qual es troba localitzat al canal pelvic.

La superfície externa del còlon està coberta per una capa de teixit connectiu que s'anomena serosa (veure figura 1). Immediatament per sota de la serosa hi ha una capa de múscul llis que discorre en el sentit longitudinal del tub digestiu (múscul longitudinal). Per sota d'aquesta capa, n'hi ha una altra de múscul llis que en aquest cas està orientada en el sentit circular del tub digestiu (múscul circular). Entre ambdues capes de múscul llis hi ha un plexe nerviós anomenat plexe mientèric o plexe d'Auerbach (PM). Per sota del múscul circular hi ha la submucosa i al costat més extern d'aquesta s'hi localitza un altre plexe nerviós que s'anomena plexe submucós o de Meissner (PSM). A la submucosa també hi trobem una altra capa de múscul llis, molt més prima que les capes musculars anteriors, que s'anomena muscular de la mucosa. I finalment, per sota la submucosa trobem la mucosa la qual està en contacte directe amb la llum intestinal.

Per dur a terme les seves funcions, el còlon realitza uns moviments motors que depenen de la sincronització de l'activitat contràctil de les dues capes musculars. El patró motor que presenta el còlon, és doncs la suma de l'activitat contràctil d'ambdues capes musculars, la qual està regulada principalment per l'anomenat acoblament excitació/contracció. A més a més, ambdós plexes nerviosos també participen en la regulació de l'activitat contràctil de les capes musculars, així com en l'activitat secretora de les glàndules i l'absorció des de l'epiteli.

### **Principals patrons de contracció**

*Cannon* va descriure al 1902 (Cannon, 1902) que el patró motor més característic del còlon ascendent i transvers del gat era l'antiperistalsi. Va utilitzar aquest terme per descriure un moviment en sentit oral que retorna el contingut luminal al cec o al mateix còlon proximal donant lloc així als moviments de barreja. La part més distal del còlon transvers i el còlon descendent, en canvi, mostraven moviments peristàltics que propulsaven el contingut cap al recte. Aquestes conclusions van ser reafirmades més tard per *Elliot i Barclay-Smith* els quals van estudiar tant el còlon del gat com el d'altres espècies animals (Elliott TR and Barclay-Smith E., 1904); però no va ser fins més tard que es va descriure un tercer patró d'activitat característic del còlon que es va anomenar *moviment en massa* i que consisteix en la contracció simultània del múscul llis d'una àmplia àrea provocant el desplaçament del contingut en sentit aboral (Hertz AF, 1907; Holzkecht G., 1909).

Actualment, es considera que els principals patrons motors del còlon són: les contraccions fàsiques espontànies, les contraccions gegants migratòries i el to. Les contraccions fàsiques espontànies es propaguen en distàncies curtes, permeten la barreja dels continguts colònics i l'absorció d'aigua i electròlits (Malcolm and Camilleri, 2000). Les contraccions gegants migratòries provoquen una forta oclusió de la llum colònica i es propaguen en distàncies llargues. Aquestes últimes contraccions constitueixen els anomenats *moviments en massa* que precedeixen l'expulsió de les femtes (Kruis et al., 1985). El to també regula la llum intestinal, una disminució en la mida de la llum intestinal millora l'eficàcia de les contraccions fàsiques en les funcions de barreja i propulsió (Gonzalez and Sarna, 2001). Aquests patrons motors estan regulats tant per mecanismes miogènics com neurogènics.

### **Control no neural de les contraccions colòniques**

El potencial de membrana de les cèl·lules musculars llises del tracte gastrointestinal presenta unes oscil·lacions cícliques. Aquestes oscil·lacions del potencial de membrana de les cèl·lules musculars llises són bàsiques per a explicar la contractilitat del múscul. A nivell de l'intestí prim les oscil·lacions del potencial de membrana s'anomenen ones lentes. Aquestes tenen una freqüència de 8 a 12 cicles/minut en funció del segment intestinal considerat (Jimenez et al., 1996), i presenten potencials d'acció quan el potencial de membrana assoleix un determinat llindar. L'acoblament excitació/contracció és el mecanisme pel qual el calci entra dins la cèl·lula muscular durant la fase de despolarització de les oscil·lacions elèctriques, sempre i quan es sobrepassi el llindar d'obertura dels canals de calci. L'entrada de calci es produeix principalment a través dels canals de calci de tipus L. L'augment del calci intracel·lular desencadena la formació d'un complex entre el calci i una proteïna reguladora, la calmodulina. Aquest complex activa la cinasa de cadenes lleugeres de miosina la qual al seu torn fosforila la miosina a expenses d'hidrolitzar una mol·lècula d'ATP (veure figura 2) . La hidròlisi d'una mol·lècula d'ATP provoca un canvi de conformació del cap de la miosina i el lliscament dels filaments d'actina sobre els de miosina i per tant la contracció; després, la concentració de calci citosòlic disminueix i el múscul es relaxa. Les ones lentes es defineixen també com a oscil·lacions del potencial de membrana que persisteixen en presència de blocadors de canals de calci de tipus L (Borderies et al., 1997; Cayabyab et al., 1996). A més a més, l'alliberament de calci des del reticle sarcoplasmàtic cap al citosol també modula la contractilitat de les cèl·lules musculars llises i de

fet, la mateixa entrada de calci extracel·lular dins la cèl·lula pot induir l'alliberament de calci des de les reserves intracel·lulars cap al citosol.

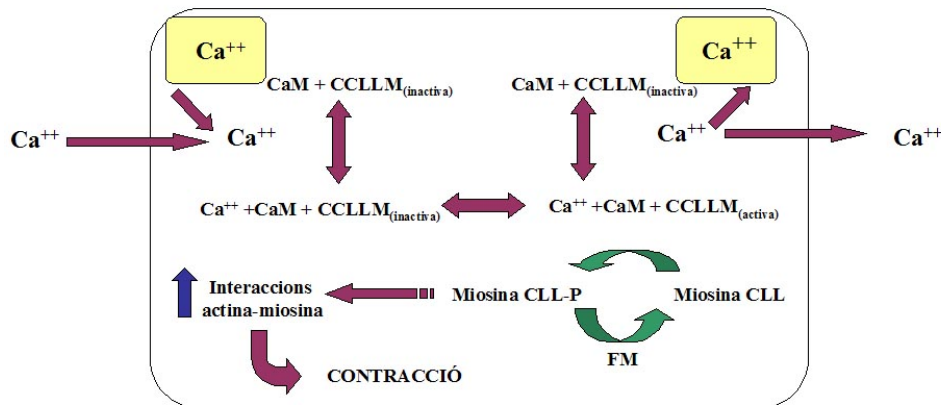


Figura 2. Mecanisme intracel·lular de contracció del múscul llis. CaM = calmodulina, CCLLM = cinasa de cadenes lleugeres de la miosina, FM = fosfatasa de la miosina

Es va creure durant molt temps que les ones lentes tenien un origen miogènic perquè els blocadors neurals tampoc no eren capaços de blocar aquestes oscil·lacions del potencial de membrana. Sembla ser però, que l'origen d'aquestes oscil·lacions cícliques ve determinat per la presència d'un tipus de cèl·lules no musculars i no neurals anomenades Cèl·lules Intersticials de Cajal (ICC). Les ICC van ser descrites per primer cop al 1893 per Santiago Ramón y Cajal (Cajal SR, 1893), però no va ser fins al 1982 que es va suggerir que aquestes cèl·lules podien ser les cèl·lules marcapassos que generen l'*input* oscil·lant que indueix les oscil·lacions característiques de les cèl·lules musculars (Thuneberg, 1982). La comunicació entre les cèl·lules marcapassos i les musculars es dona probablement a través d'unions obertes (*gap junctions*) que estan formades per proteïnes del grup de les connexines. Aquestes unions permeten l'acoblament elèctric entre les cèl·lules musculars conferint-los les propietats sincitials típiques de la musculatura llisa.

Si a l'intestí prim les ICC estan localitzades entre les capes circulars i longitudinals, properes al PM, en el còlon les ICC estan localitzades a dos nivells: a prop del PM i a prop del PSM (Alberti et al., 2005). En el còlon del gos, les ones lentes (5-6 cicles/min) depenen de la presència d'una xarxa d'ICC intacta al PSM (Liu et al., 1994; Smith et al., 1987b). A part de les ones lentes, també es van registrar al còlon de gos una sèrie de despolaritzacions cícliques del

potencial de membrana que provoquen potencials d'acció (*myenteric potential oscillations* (MPO); 16-20 cicles/min) i depenen de la presència d'ICC al PM (Smith et al., 1987a). Així doncs, al còlon, els dos marcapassos estan treballant simultàniament i l'activitat elèctrica final representa la combinació de les activitats d'ambdós marcapassos. En el còlon humà, les ones lentes també es generen a prop del PSM (3 cicles/min) i les MPO descrites prèviament en còlon caní, també han estat registrades a prop del PM (Rae et al., 1998).

En petits rosegadors, l'activitat marcapassos del còlon també inclou despolaritzacions cícliques i ones lentes. Al còlon de rata, s'han descrit dos patrons d'activitat elèctrica i mecànica clarament diferenciats (figura 3). Per un costat, s'han trobat unes contraccions de baixa amplitud i elevada freqüència (contraccions LAHF (*low amplitude high frequency*)) associades a les ones lentes i a les ICC del PSM. I per un altre costat, s'han trobat unes contraccions d'elevada amplitud i baixa freqüència (contraccions HALF (*high amplitude low frequency*)) que s'associen a les despolaritzacions cícliques del potencial de membrana i es creu que s'originen a partir de les ICC associades al PM.

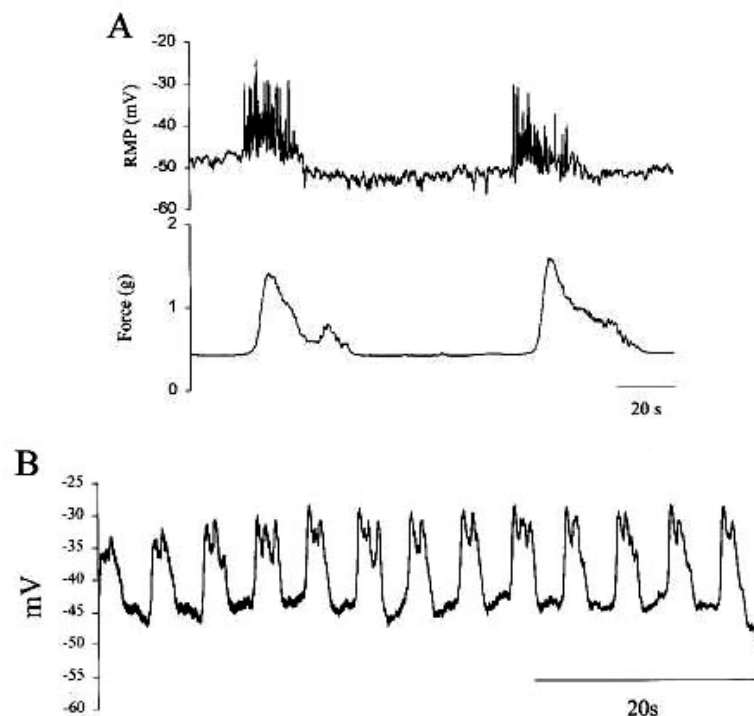


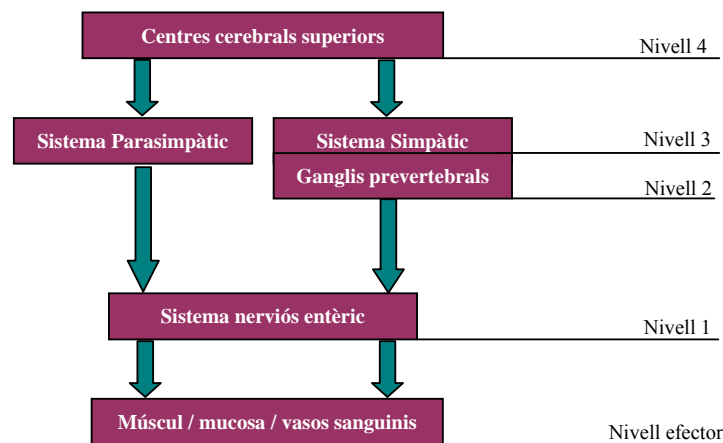
Figura 3. (A) Registre intracel·lular simultani de l'activitat elèctrica i mecànica (contraccions HALF) del múscul circular del còlon de rata sense submucosa. (B) Activitat d'ones lentes del múscul circular de rata amb la capa submucosa intacta. Adaptat de *Evidence supporting the presence of two pacemakers in the rat colon* (Pluja et al., 2001).



## Control neural de les contraccions colòniques

Les xarxes neurals que controlen la funció digestiva estan localitzades a nivell del cervell, de la medulla espinal, dels ganglis prevertebrals simpàtics i a nivell de la paret dels mateixos òrgans efectors (veure figura 4).

Al còlon, el sistema nerviós entèric està organitzat en dos plexes ganglionats. El PM se situa entre el múscul longitudinal i circular, i el PSM es localitza a la submucosa.



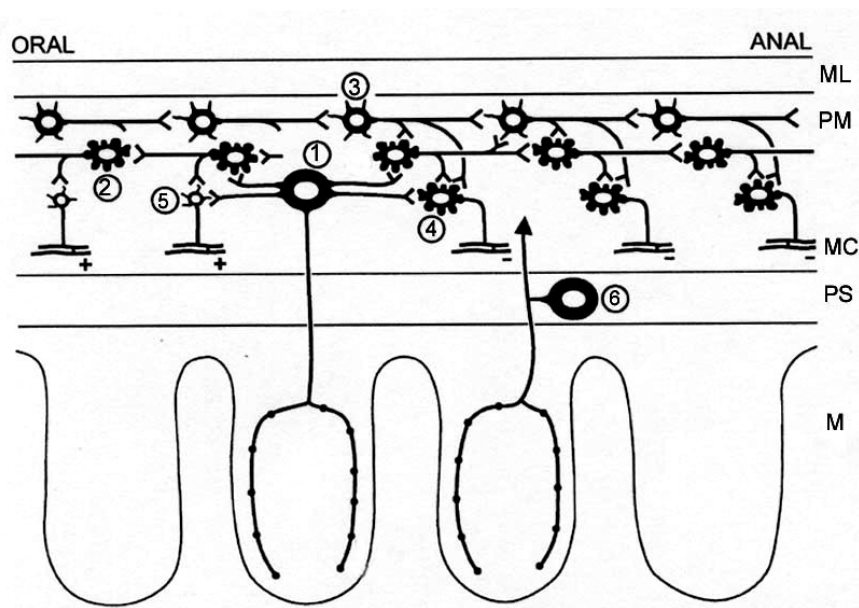
*Figura 4.* Diagrama representatiu del control neural de la funció gastrointestinal. El nivell 1 és el sistema nerviós entèric (ENS), el nivell 2 representa els ganglis prevertebrals simpàtics, el nivell 3 són els circuits parasimpàtics i simpàtics que connecten el sistema nerviós central (nivell 4) amb l'intestí. Adaptada de *Fundamentals of neurogastroenterology* (Wood et al., 1999).

El SNE està constituït per tres categories funcionals de neurones identificades com a neurones sensibles, interneurons i motoneurons (veure figura 5):

Les **neurones sensibles** tenen zones receptores especialitzades en detectar canvis de temperatura, canvis químics o estímuls mecànics. Les zones receptores d'aquestes neurones transformen els estímuls rebuts en potencials d'acció que es transmeten a través de fibres sensibles cap a altres punts del sistema nerviós. Estan constituïdes tant per neurones d'origen extrínsic (aferents vagals i espinals) com per neurones primàries intrínseques aferents (IPAN). Les neurones sensibles expressen, entre d'altres, receptors per la substància P (SP), el pèptid

relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) i el polipèptid intestinal vasoactiu (VIP) (Hansen, 2003).

Les **interneurons** estan connectades sinàpticament a les xarxes nervioses que processen la informació sensitiva i regulen també les motoneurons. Formen circuits integradors perquè organitzen les respostes reflexes segons els *inputs* sensitius. Les interneurons ascendents són majoritàriament colinèrgiques; en canvi, les interneurons descendents tenen un codi químic complex ja que s'hi han descrit diversos neurotransmissors entre els quals hi ha l'ACh, l'NO, el VIP, la serotonina i la somatostatina (Furness, 2000).



*Figura 5.* Representació del circuit neural entèric. 1) neurona primària intrínscica aferent (IPAN) amb el soma al PM; 2) interneurona ascendent; 3) interneurona descendent; 4) motoneurona muscular inhibidòria; 5) motoneurona muscular excitatòria; 6) IPAN amb el soma al PSM. ML: múscul longitudinal; PM: plexe mientèric; MC: múscul circular; PSM: plexe submucós; M: mucosa. Adaptada de *The enteric nervous system and regulation of intestinal motility* (Kunze and Furness, 1999).

Les **motoneurons** constitueixen la via final de transmissió dels senyals que controlen els sistemes efectors: la mucosa, els vasos sanguinis i la musculatura:

- Les **neurones secretomotores** i les **vasomotores** regulen les secrecions i el flux sanguini respectivament. Les neurones secretomotores colinèrgiques alliberen ACh que actua

directament sobre receptors muscarínics de l'epiteli. En canvi, les neurones secretomotores no colinèrgiques participen en respostes reflexes locals i utilitzen majoritàriament el VIP com a neurotransmissor (Furness, 2000).

- Les **motoneurons**, que innerven els músculs longitudinal i circular i la muscular de la mucosa de tot el tracte digestiu, poden ser tant excitatòries com inhibidores i l'alliberament de neurotransmissors provoca contracció o bé relaxació. Les neurones excitatòries tenen predominantment una transmissió colinèrgica muscarínica i taquicínèrgica (SP i neurocinina A).

Al l'intestí i al còlon, la neurotransmissió inhibidora és fonamental perquè l'activació de les motoneurons inhibidores permet la hiperpolarització i la relaxació musculars. Les motoneurons inhibidores descarreguen continuament, de manera que l'estat d'activitat d'aquestes neurones inhibidores determina el moment de la contracció. Aquest mecanisme és fonamental per la progressió del bolus. Així doncs, una vegada s'ha produït la distensió en un punt determinat, s'activen les vies neurals que conflueixen en una motoneurona excitatòria en sentit oral i en una motoneurona inhibidora en sentit aboral. Aquesta és la base del peristaltisme intestinal.

Mitjançant la utilització de microelèctrodes per a enregistrar el potencial de membrana i l'aplicació d'estímuls elèctrics es poden induir potencials d'acció en les neurones inhibidores i mesurar els canvis de potencial en la cèl·lula muscular. El resultat de l'estimulació de les motoneurons inhibidores és l'aparició en els miòcits del que s'anomena un potencial post-unió de tipus inhibitori (*inhibitory junction potential* (IJP)). L'estímul elèctric aplicat genera un potencial d'acció en la neurona inhibidora que produeix una entrada de calci en el terminal sinàptic. L'entrada de calci provoca l'alliberament d'un o diversos neurotransmissors inhibitoris que donaran lloc a la hiperpolarització i la relaxació de la cèl·lula muscular.

Diverses substàncies com l'ATP, l'NO, el VIP i el pèptid activador de l'adenil ciclasa pituitària (PACAP) entre d'altres, han estat considerades com a possibles neurotransmissors no adrenèrgics no colinèrgics en el tracte gastrointestinal (Burnstock et al., 1970; Mungan et al., 1992). Mentre que al còlon del gos, els IJPs es van descriure com a monofàsics i mediat per NO (Christinck et al., 1991), al colò humà i de ratolí, els IJPs presenten dues fases, una de ràpida i una altra de sostinguda, cosa que suggereix l'alliberament de més d'un neurotransmissor (Keef et al., 1993; Shuttleworth et al., 1997). En la rata els IJPs també tenen dues fases: una disminució

ràpida del potencial de membrana (component ràpid) seguida d'una hiperpolarització sostinguda (component lent) (veure figura 6). La primera fase de l'IJP és deguda majoritàriament a l'alliberament d'ATP que actúa sobre receptors purinèrgics acoblats a canals de potassi sensibles a apamina; en canvi, la segona fase és deguda a l'alliberament d'NO, l'acció del qual és independent de l'activació dels canals anteriors (Pluja et al., 1999).

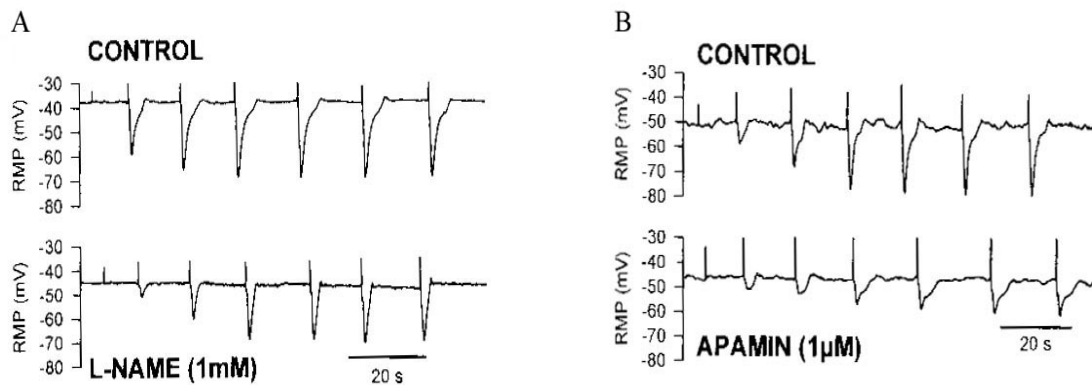


Figura 6. Registre intracel·lular que mostra IJPs induïts per estimulació elèctrica de camp (5, 10, 12, 15, 17, 20 i 25 V) de múscul circular de còlon de rata en condicions no adrenèrgiques no colinèrgiques. (A) Efecte de L-NAME sobre la durada dels IJPs i (B) efecte de l'apamina sobre l'amplitud dels dels IJPs. Adaptat de *Neural modulation of cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role o ATP and NO* (Pluja et al., 1999).

## Introducció (II) Malalties inflamatòries intestinals humanes

### Definició de les malalties inflamatòries intestinals

Sota la denominació de malaltia inflamatòria intestinal (inflammatory bowel disease (IBD)) s'hi troben diverses entitats patològiques que cursen amb inflamació del tub digestiu. Les malalties més representatives d'aquest grup són la colitis ulcerosa (ulcerative colitis (UC)) i la malaltia de Crohn (Crohn disease (CD)), ambdues d'etiologia desconeguda.

La UC és un procés inflamatori que afecta al còlon, i es caracteritza clínicament per la presència de diarrees hemorràgiques, moc en les femtes, dolor abdominal i pèrdua de pes. La inflamació colònica sol ser superficial (localitzada principalment a la mucosa) i sovint comença al recte des d'on s'exten cap a altres zones del còlon (Sands, 2004). A nivell microscòpic, s'observa edema i congestió de la mucosa, infiltrat de cèl·lules inflamatòries (limfòcits, cèl·lules plasmàtiques i granulòcits), abscessos i distorsió de l'arquitectura de les criptes, i úlceres (Seldenrijk et al., 1991). Si la inflamació està limitada al recte, aquest procés rep el nom de *proctitis*. Si la inflamació no s'exten més enllà del còlon descendent, parlem de *colitis esquerra*. Si la inflamació s'exten proximalment des del recte fins com a mínim la flexura hepàtica, aquest procés s'anomena *pancolitis*. I en últim lloc, parlem d'*ileitis inversa*, quan la inflamació del còlon s'exten fins a la part terminal de l'íleon.

A diferència de la UC, la CD pot afectar qualsevol part del tracte digestiu, tot i que freqüentment afecta la part final de l'íleon. Les persones que pateixen aquesta malaltia, presenten dolor abdominal, diarrea i pèrdua de pes. La inflamació sol ser focal o segmental, i transmural. Les úlceres es poden observar macroscòpicament, i a nivell microscòpic, sovint s'hi observen agregats limfoides, infiltrat inflamatori de tipus crònic i granulomes epitelioides (Sands, 2004). Es parla d'*ileitis terminal*, quan la part afectada és la última part de l'íleon. Si les lesions es localitzen a diferents segments de l'intestí, el procés s'anomena *enteritis segmental* o *regional*. A més a més, poden presentar ocasionalment obstrucció intestinal i fistules. I per últim, es parla de *colitis granulomatosa*, quan la CD afecta al còlon.

Cal dir, que alguns pacients que presenten inflamació colònica no poden ser classificats ni en UC ni en CD. En aquests casos, es parla de *colitis indeterminada* per categoritzar aquest procés (Wells et al., 1991). Ambdues malalties (UC i CD), a més a més, es caracteritzen per una

alternança entre períodes d'activitat, que s'anomenen brots, amb períodes de quiescència o inactivitat anomenats de remissió.

### **Epidemiologia de les malalties inflamatòries intestinals**

La freqüència de les malalties inflamatòries intestinals s'ha incrementat de forma constant en els últims 40-50 anys, però la incidència de la IBD és diferent segons les àrees geogràfiques que s'estudiïn. Hi ha una elevada incidència al nord oest d'Europa i nord d'Amèrica, mentre que és poc freqüent a l'Àsia i l'Àfrica. A les àrees on se'n troba més, la incidència és de: 2-15 casos cada 100000/any per la UC i 0.9-11.6 cada 100000/any per la CD. L'edat mitjana de presentació de la malaltia és de 30 anys per la UC i de 20 per la CD. A més a més, les dones tenen un 20-30 % més de risc que els homes de patir la CD. Pel que fa a la UC, sembla ser que els homes tenen més tendència a patir-la (Bing et al., 1998).

### **Etiologia de les malalties inflamatòries intestinals**

Malgrat que no es coneix l'etiologia de la IBD, sembla ser que es tracta d'un fenomen multifactorial. La patogènia de la malaltia ve donada per factors ambientals i immunològics sobre individus genèticament predisposats. Tot i això, cal destacar que ni els factors ambientals ni els factors genètics per ells mateixos són suficients per causar la malaltia, sinó que l'interacció entre ambdós és necessària per tal que la IBD es desenvolupi.

#### **a) Factors ambientals**

Alguns dels factors ambientals que poden afavorir l'aparició de la IBD són: el tabaquisme (en la CD (Harries et al., 1982)), l'ús de contraceptius orals, l'alimentació, la transfusió de sang i les infeccions perinatals (Bing et al., 1998; Fiocchi, 1998). Les bacteries poden induir canvis patològics i símptomes que recorden els de la UC i CD, però les infeccions bacterianes solen tenir un curs autolimitant i l'efectivitat dels tractaments amb antibiòtics permeten diferenciar-les de la IBD. Cal dir també, que actualment el possible paper dels agents microbians en la patogènia d'aquesta malaltia se centra en la flora intestinal normal (Sartor, 1997a). Eventualment aquesta flora indueix una resposta anormal en l'hoste que comporta un procés patològic caracteritzat per una inflamació crònica del tracte gastrointestinal. Alguns paràsits i virus també s'han proposat

com a possibles agents causals de la IBD, però no n'hi ha una evidència definitiva (Danese et al., 2004).

b) Factors immunològics

Anomalies en la immunitat de la mucosa intestinal també poden explicar la clínica i la histopatologia de la IBD. Hi ha diferents hipòtesis que justifiquen aquest fet: l'una proposa que la IBD representa una resposta immunitària anormal a estímuls normals en individus susceptibles (Mombaerts et al., 1993), i l'altre proposa que alguns patògens específics causen la IBD i que el sistema immunitari només està responent a aquests patògens.

També s'han descrit defectes en la barrera epitelial de la mucosa intestinal, com ara un augment de la permeabilitat de la mucosa en CD, que comporten el pas d'antígens i mol·lècules proinflamatòries les quals podrien iniciar les respostes immunològiques i inflamatòries (May et al., 1993; Sartor, 1997b).

Una altra anomalia, proposada també com a causa de la IBD, és la relacionada amb la regulació de les citocines (Sartor, 1997b). Un desequilibri entre citocines proinflamatòries i citocines antiinflamatòries, podria iniciar una resposta inflamatòria. El millor exemple és el desequilibri que hi ha entre la IL-1, una citocina proinflamatòria, i l'antagonista del receptor de la IL-1 (arIL-1), una citocina que es fixa al mateix receptor però que és incapaç de desencadenar inflamació. Tant en la CD com en la UC, ambdues citocines es troben augmentades a l'intestí, però la antiinflamatòria arIL-1 mai es produeix en quantitats suficients per a neutralitzar completament els nivells extremadament alts de IL-1; com a resultat d'aquest desequilibri es produeix la inflamació intestinal. Entre les citocines més estudiades també hi ha la IL-5, l'activitat de la qual està augmentada tant en la CD com en la UC, així com la IL-8 que només es troba incrementada en la CD (Fiocchi, 1996). Es considera també que a més a més de les citocines clàssiques hi ha molts altres mediadors implicats en la patogènia de la IBD com ara factors de creixement, quimiocines i eicosanoides. (Podolsky and Fiocchi, 1999).

c) Factors genètics

Els familiars de persones que pateixen la IBD tenen més risc de desenvolupar aquesta mateixa malaltia i a més a més, s'ha suggerit que la predisposició genètica a patir la CD és més alta que la de la UC (Satsangi et al., 1994; Tysk et al., 1988). Moltes investigacions s'estan

centrant en l'estudi dels gens del complex antigènic leucocitari humà (Human Leukocyte Antigen (HLA) complex), d'algunes citocines i d'altres immunomoduladors, com a possibles factors que determinen la susceptibilitat individual per patir la IBD. El gen NOD2 (codifica per una proteïna que s'expressa en monòcits i actúa com a receptor intracel·lular de components bacterians), que està situat al cromosoma 16, s'associa a una major susceptibilitat a la CD (Ogura et al., 2001).

### **Simptomatologia de les malalties inflamatòries intestinals**

Els símptomes més freqüents de la UC i la CD consisteixen en un increment en la freqüència de defecació i una disminució de la consistència de les femtes, així com presència de dolor abdominal. Molts paràmetres hemàtics (com ara el recompte leucocitari, l'hemoglobina i l'hematòcrit, el recompte plaquetari, la velocitat de sedimentació eritrocitària, etc...) es poden trobar lleugerament o molt alterats tant en la CD com la UC, així com en d'altres causes d'inflamació no relacionades amb la IBD (Sands, 2004). Les manifestacions mucocutànies d'aquestes malalties normalment també coincideixen, tot i que la presència d'aftes a la boca és més freqüent en la CD, així com també ho són la presència de masses abdominals especialment en el quadrant dret inferior (que representa inflamació ileocecal) o bé problemes perianals (fisures anals o fistules perianals). La febre s'observa més sovint en la CD que no pas en la UC; en aquesta última, la presència d'un brot de febre indicaria una inflamació severa. Per altre costat, la presència de tenesme i sang i moc a les femtes és molt més freqüent en UC que no pas en CD o bé d'algun tipus d'infecció colònica.

### **Alteracions de la motilitat**

La diarrea és un símptoma que molt freqüentment pateixen els pacients amb IBD, però la fisiopatologia d'aquest símptoma és poc coneguda. S'ha suggerit que la diarrea que presenten pacients amb UC pot ser deguda a una alteració en l'absorció colònica de sodi i clor (Hawker et al., 1980) o bé a una secreció excessiva de fluids i electròlits (Harris and Shields, 1970). Les alteracions en la consistència i volum de les femtes poden ser al mateix temps degudes a alteracions de l'activitat colònica motora. Kern *et al* (KERN, Jr. et al., 1951) va descriure la relació temporal entre l'alteració de la motilitat rectosigmoidal i la presència d'inflamació en pacients amb UC i va suggerir que les alteracions en la motilitat gastrointestinal no són una causa del la IBD, sinó una conseqüència. Les alteracions en l'activitat motora colònica també són poc



conegudes, i molts cops els resultats dels estudis de motilitat gastrointestinal són contradictoris. Mentre alguns estudis mostren que durant la colitis activa es produeix un augment de l'índex de motilitat del recte (Chaudhary and Truelove, 1961), d'altres mostren una motilitat rectal disminuïda (Connell, 1962). La força de les contraccions colòniques en resposta a diferents estímuls, acostuma a estar disminuïda en la majoria de pacients amb UC (Chaudhary and Truelove, 1961; Snape, Jr. et al., 1980; Snape, Jr. et al., 1991). Snape *et al* (Snape, Jr. et al., 1991) va descriure una disminució de la contracció en *off* en resposta a la estimulació elèctrica de camp en el còlon de pacients amb UC. Va suggerir que aquesta disminució podia ser secundària a una alteració en l'alliberació de neurotransmissors o bé a un defecte intrínsec en la contracció del múscul llis. La disminució de la contracció en el teixit inflammat en resposta a l'augment del potassi extracel·lular, li va permetre confirmar que la disminució en la contractilitat colònica podia ser deguda a un canvi en la cèl·lula muscular a nivell postreceptor.

Per altra banda, s'ha observat que les alteracions motores i de trànsit observades en la UC persisteixen en la fase de colitis quiescent (Rao et al., 1987). Aquest fet permet explicar per què els pacients amb colitis quiescent presenten símptomes d'IBD amb una elevada prevalença (Isgar et al., 1983).

La motilitat gastrointestinal està modulada per mecanismes de control miogènics, neurals -afereents i eferents-, endocrins i per les ICC. Així mateix, cadascun d'aquests mecanismes pot estar sotmès a modulació per part del sistema immunitari (Collins, 1996). Per altra banda, la inflamació d'una part del tracte gastrointestinal produeix alteracions de la funció motora a una altra part del tracte gastrointestinal no inflammat. Així, pacients amb UC poden presentar alteracions motores a l'estómac i a l'intestí prim (Manousos and Salem, 1965; Rao et al., 1987). Aquest fet suggereix que la inflamació pot induir canvis funcionals entèrics en regions no inflamades del tracte digestiu (Dvorak et al., 1979) o activar circuits neurals de fora l'intestí (Lindgren et al., 1991).

#### a) Alteració de la funció neural

L'alteració de la percepció sensorial intervé marcadament en la generació dels símptomes en la malaltia gastrointestinal. Per exemple, la sensibilitat a la distensió rectal està augmentada en la IBD (Rao et al., 1988). Aquest fet suggereix que les alteracions motores observades en la IBD podrien resultar de l'alteració de l'*input* neural aferent el qual s'integra als circuits neurals

intrínsecs i extrínsecs. L'alteració de la percepció sensorial podria estar provocada per un desequilibri del sistema nerviós autònom (Lindgren et al., 1991).

S'han observat tant alteracions estructurals com alteracions en el contingut de neurotransmissors en els plexes entèrics de pacients amb IBD (Belai et al., 1997; Dvorak et al., 1980; Neunlist et al., 2003). Majoritàriament, s'ha trobat una disminució del VIP, troballa que s'ha relacionat amb l'alteració de la funció neural inhib tòria en el múscul circular de pacients amb CD al còlon (Koch et al., 1987); la concentració de SP, en canvi, es troba majoritàriament augmentada en la UC, fet que podria explicar l'increment en la percepció sensorial observat en la fase activa d'aquesta malaltia (Koch et al., 1987; Rao et al., 1988). Altres estudis, mostren canvis en el nombre de ganglis, degeneració axonal i infiltració de cèl·lules inflamatòries als plexes nerviosos. A més a més, els canvis estructurals dels nervis entèrics durant la IBD no estan restringits a les zones d'inflamació activa, sinó que també són presents en zones no inflamades del tracte digestiu (Schneider et al., 2001).

Geboes *et al* van demostrar l'expressió del complex major d'histocompatibilitat II (major histocompatibility complex II (MHC II)) en les cèl·lules enterogliales (EGC) del SNE, fet que li va permetre suggerir que els canvis al SNE són immunomediats (Geboes et al., 1992). Les EGC constitueixen una població extensa, però poc estudiada a nivell del tracte gastrointestinal. La xarxa d'EGC s'encarrega de les funcions tròfiques i de protecció de les neurones entèriques i està implicada en la integració i la modulació de l'activitats neuronal. La immunoreactivitat a la GFAP (proteïna àcida fibril·lar glial), marcador de les EGC, es troba significativament alterada en la CD, mentre que la gliosi és més evident en la UC (Cornet et al., 2001). La disrupció de la xarxa de EGC podria provocar l'increment de la permeabilitat de la mucosa i la disfunció vascular que s'observa en la CD, la qual cosa afavoriria al mateix temps la inflamació de la mucosa (Bush et al., 1998; Cornet et al., 2001).

#### b) Alteració de la funció muscular

El múscul de l'intestí prim de pacients amb CD presenta un augment en la contractilitat (Vermillion et al., 1993), en canvi, el còlon de pacients amb UC presenta una activitat contràctil disminuïda (Snape, Jr. et al., 1991). La inflamació altera les propietats tròfiques del múscul llis durant la IBD (Geboes et al., 2001), afavorint específicament la formació d'estenosis. El múscul circular de pacients amb UC presenta una resposta contràctil al betanecol similar a la observada

en el teixit sa, mentre que la resposta contràctil a l'increment del potassi extracel·lular està disminuïda. Aquest fet suggereix que la disminució de la contractilitat muscular no es localitza a nivell de receptors muscarínics, sinó a nivell postreceptor (Snape, Jr. et al., 1991). Per altra banda, alguns estudis mostren que els canvis en la contractilitat observats durant la IBD són específics de receptors NK<sub>2</sub>, la qual cosa resultaria de l'alteració dels nivells de SP o altres taucininines que s'observa en aquestes malalties (Menzies et al., 2001).

#### c) Alteracions de les ICC

S'han trobat canvis ultraestructurals a les ICC de la submucosa del còlon de pacients amb UC. Les lesions observades consisteixen en acúmuls de lisosomes secundaris, agrupacions de gotes lipídiques, agrupacions anòmals de grànuls de glicogen, i presència de vacúols citoplasmàtics buits. Aquestes lesions suggereixen que aquestes cèl·lules durant la inflamació intestinal, pateixen alteracions metabòliques i cel·lulars que recorden a les observades en processos d'apoptosi (Rumessen, 1996). Tot i això, fins ara no hi ha dades que permetin valorar si l'apoptosi de les ICC és un fet generalitzat en la UC.

#### d) Alteracions de la funció endocrina

Donat que la IBD està associada a alteracions de la motilitat, secreció i sensibilitat intestinal es possible que alteracions al sistema endocrí contribueixin als símptomes que s'observen en aquestes malalties. Tot i això, hi ha pocs estudis que analitzin les alteracions endocrines relacionades amb la IBD. Alguns d'aquests, mostren que la fluctuació circadiana dels nivells plasmàtics de gastrina i somatostatina està lleugerament alterada en pacients amb UC (Payer et al., 1993). També s'ha descrit que hi ha una disminució del nombre de cèl·lules endocrines intestinals que contenen somatostatina, fet que suggereix la participació de la somatostatina en la patogènia de la IBD (Watanabe et al., 1992). La funció de la glàndula tiroïdes també es troba alterada en alguns pacients que pateixen IBD, fins i tot en absència de malaltia tiroïdal detectable clínicament; l'associació de les malalties inflamatòries intestinals amb la glàndula tiroïdes, així com la implicació d'altres òrgans, confirma que es tracta d'una malaltia sistèmica (Bianchi et al., 1995).

## Tractament de les malalties inflamatòries intestinals

Ni la CD ni la UC tenen un tractament curatiu i molts pacients pateixen múltiples brots durant el curs de la seva malaltia. Tot i això, actualment es possible suprimir de manera efectiva la inflamació intestinal amb tractament fàrmacològic encara que es difícil optimitzar-lo ja que no es coneix del tot la etiologia d'aquesta inflamació. Els fàrmacs que s'utilitzen per tractar aquestes malalties es poden agrupar en diverses categories com són: els corticosteroids, els aminosalicilats, els agents immunomoduladors, els antibiòtics, així com altres agents farmacològics que encara s'estan investigant (Carty and Rampton, 2003; Robinson, 1997). Cal tenir en compte però, que la majoria de tractaments tenen efectes secundaris, algunes vegades greus, i que tant metges com pacients han d'avaluar els beneficis i riscos potencials del tractament. En alguns casos la ressecció de la zona afectada és una alternativa vàlida, tot i que en la CD no es pot considerar curativa.

Tot i que els avenços immunològics, biotecnològics i farmacològics permeten desenvolupar noves teràpies més específiques (veure figura 7) encara no hi ha un tractament efectiu per la supressió de la IBD.

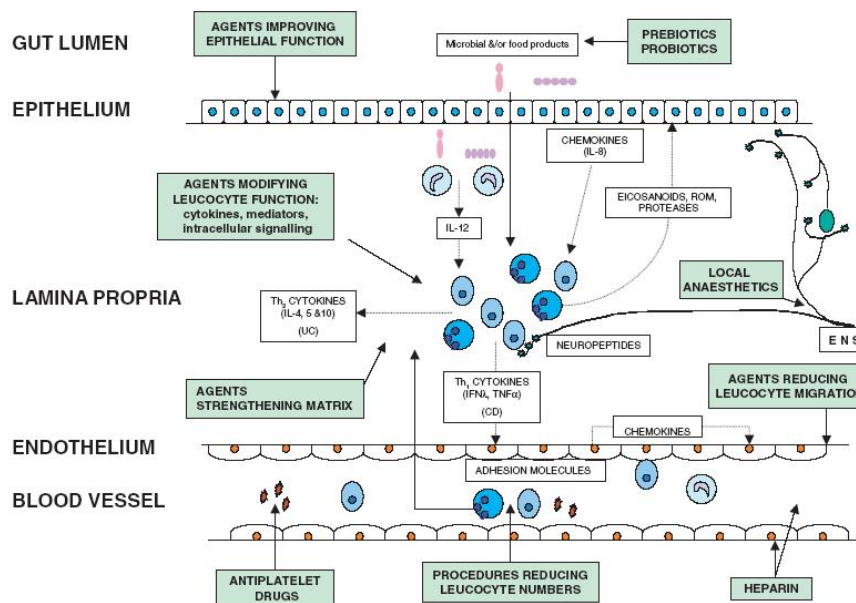


Figura 7. Fisiopatologia de la IBD i nous tractaments potencials per aquestes malalties intestinals. Abreviatures: IL = interleucina, IFN = interferó, TNF = factor de necrosi tumoral, ROM = metabòlits reactius derivats de l'oxigen, CD = Crohn's disease, UC = colitis ulcerosa, SNE = sistema nerviós entèric. Extreta de *Evaluation of new therapies for inflammatory bowel disease* (Carty and Rampton, 2003).

## **Introducció (III) Models animals d'inflamació intestinal**

Idòniament, un model animal de la malaltia inflamatòria intestinal hauria de compartir la mateixa etiopatogènia que la IBD humana, tenir unes manifestacions clíniques i patològiques similars, i un curs temporal comparable. A més a més, s'hauria de tractar d'un model econòmicament accessible, hauria de permetre la manipulació experimental (així com l'alimentació, l'estatus immunològic i exposició a agents infecciosos), els animals haurien de tenir una base genètica molt definida i poder ser tractats amb agents terapèutics que puguin tenir una aplicació humana (Strober, 1985).

Així doncs, definir un model animal ideal d'aquesta malaltia és complicat ja que encara no se'n coneixen en profunditat els aspectes etiològics i fisiopatològics, i la majoria de models que s'estan investigant no són models ideals específics d'IBD, sinó models d'inflamació gastrointestinal. Tanmateix, els models d'inflamació gastrointestinal fan possible el coneixement de la inflamació gastrointestinal en diferents condicions i permeten resoldre qüestions sobre la malaltia humana.

### **Tipus de models animals d'inflamació intestinal**

Els models animals d'inflamació intestinal es poden dividir en quatre grans categories (Hibi et al., 2002; Jurjus et al., 2004; Strober, 1985): models d'inflamació intestinal espontània, models de colitis induïdes en hostes sans, models de transferència adoptiva en hostes immunocompromesos i models obtinguts per manipulació genètica (veure taula 1):

#### **a) Models espontanis d'inflamació intestinal**

En aquesta categoria, hi ha models en els quals els animals desenvolupen la malaltia de forma natural sense la intervenció de factors exògens. Un representant n'és la colitis espontània en *ratolins C3H/HeJBir* que desenvolupen, entre la tercera i quarta setmana de vida, una colitis localitzada sobretot al còlon dret, i caracteritzada tant per úlceres com abscessos de les criptes a nivell histològic, així com per un augment de l'IFN $\gamma$  i la IL-2 a nivell immunològic (Cong et al., 1998). Per un altre costat, els *ratolins SAMPI/Yit* desenvolupen de forma espontània una ileitis crònica a les 30 setmanes de vida, que es caracteritza per una afectació de totes les capes i presència d'abscessos a les criptes (Matsumoto et al., 1998). Un altre model representant d'aquesta categoria és la colitis espontània del tití de cap blanc (*Saguinus oedipus*) (Madara et al.,

1985). El tití de cap blanc és un primat que desenvolupa de forma espontània una inflamació de la mucosa colònica que recorda molt a la colitis ulcerosa dels humans.

b) Models d'inflamació intestinal induïts en hostes sans

Aquesta categoria inclou tots aquells models en els quals s'indueix la inflamació intestinal experimentalment mitjançant l'exposició a substàncies tòxiques, agents farmacològics, agents productors de la malaltia o bé per la manipulació d'altres processos fisiològics normals.

Entre d'altres, es poden destacar els següents models: la *colitis induïda per àcid trinitrobenzè sulfònic* (TNBS), en el qual la inflamació aguda s'associa a l'increment en la permeabilitat de la mucosa i que resulta en una necrosi epitelial i en un increment en l'activitat mieloperoxidasa. Els animals desenvolupen granulomes i presenten infiltrat inflamatori en totes les capes del còlon. Els macròfags produeixen grans quantitats de IL-12, i els limfòcits grans quantitats de IFN $\gamma$  i IL-2 (Morris et al., 1989; Neurath et al., 1995). Les característiques d'aquest model fan que sigui considerat un bon model de malaltia de Crohn. La *colitis induïda per àcid acètic* es caracteritza per una necrosi epitelial, i edema a *lamina propria* i submucosa que pot afectar fins i tot a les capes musculars depenent de les concentracions i durada d'exposició a l'àcid acètic. És un model que comparteix semblances amb la fase aguda de la malaltia inflamatòria intestinal humana pel que fa a tipus de medidadors inflamatoris alliberats (Elson et al., 1995). La *colitis induïda per sulfat de dextrà sòdic* (DSS) en l'aigua de beguda de rates i ratolins provoca hematoquèzia, pèrdua de pes, escurçament de l'intestí, úlceres a la mucosa i infiltració neutrofílica (Okayasu et al., 1990). La *colitis induïda per oxazolona* es caracteritza sobretot per la presència d'úlceres al còlon distal. Les lesions histopatològiques que presenten els animals recorden molt més a la colitis ulcerosa que a la malaltia de Crohn (Boirivant et al., 1998). Un altre model representant d'aquesta categoria és la *colitis induïda per pèptidglicà-polisacàrid* (PG-PS) que consisteix en una injecció intramural de components de la paret cel·lular bacteriana, al còlon distal de rates genèticament susceptibles, i produeix una enterocolitis (Sartor et al., 1988). Alguns paràsits nemàtodes com ara la *Trichinella spiralis*, també han estat extensament utilitzats per induir inflamació de l'intestí prim (s'explica en profunditat més endavant en aquest mateix apartat).

<b>Models espontanis d'inflamació intestinal</b>	
Colitis espontània del tití de cap blanc ( <i>Saguinus oedipus</i> )	
Ratolins C3H/HeBir	
Ratolins SAMP/Yit	
<b>Models d'inflamació intestinal induïts en hostes sans</b>	
Colitis induïda per àcid trinitrobenzè sulfònic	
Colitis induïda per àcid acètic	
Colitis induïda per iodoacetamida	
Colitis induïda per immuno complexes/ formalina	
Colitis induïda per radiació	
Enterocolitis induïda per indometacina	
Colitis induïda per sulfat de dextrà sòdic	
Colitis induïda per oxazolona	
Colitis induïda per polímers de carragenats	
Colitis induïda per pèptidglicà-polisacàrid	
Enteritis induïda per <i>Trichinella spiralis</i>	
<b>Models per transferència adoptiva en hostes immunocompromesos</b>	
Colitis induïda per transferència de cèl·lules T CD4+/CD45RB	
Colitis induïda per transferència de la proteïna (hsp)60-específica de cèl·lules T CD8	
<b>Models obtinguts per manipulació genètica</b>	
<b>knockout</b>	
	Ratolins knockout d'IL-2
	Ratolins knockout d'IL-10
	Ratolins knockout de STAT3
	Ratolins mutants del receptor de cèl·lules T
	Ratolins knockout per TNF-3' UTR
<b>Transgènics</b>	
	Ratolins transgènics IL-7
	Ratolins transgènics STAT-4
	Rates transgèniques HLA B27

Taula 1. Models animals d'inflamació intestinal. Adaptada de *Animal Models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease* (Wirtz and Neurath, 2000).

c) Models de transferència adoptiva en hostes immunocompromesos

La inflamació intestinal també es pot induir en models per transferència adoptiva en els quals es transfereixen selectivament tipus cel·lulars específics en hostes immunocompromesos. La colitis induïda per *transferència de la proteïna hsp60-específica de limfòcits T CD 8<sup>+</sup>*, en ratolins TCR<sup>-/-</sup> o SCID, es caracteritza per una inflamació que, a diferència d'altres models, no depen de la presència de la flora bacteriana intestinal resident (Steinhoff et al., 1999). El model per *transferència de cèl·lules T CD45RB*, en receptors SCID, resulta en una colitis severa manifestada clínicament per diarrea sense hematoquèzia i pèrdua de pes dels animals (Morrissey et al., 1993).

d) Models obtinguts per manipulació genètica

En aquesta categoria s'inclouen tan ratolins *knockout* com transgènics. Entre els models Knockout se'n poden destacar els següents: Els ratolins *Knockout d'interleucina-2* que desenvolupen una colitis crònica caracteritzada per abscessos de les criptes, depleció de mucina, engruiximent de la paret colònica i presència d'úlceres. A part, tenen esplenomegàlia, limfadenopatia i anèmia hemolítica autoimmune (Sadlack et al., 1993). Els ratolins *Knockout d'interleucina-10* que pateixen una inflamació localitzada majoritàriament a duodè, jejú i còlon ascendent i les lesions es caracteritzen sobretot per engruiximent de la paret intestinal i degeneració de l'epiteli (Kuhn et al., 1993). I finalment, els *ratolins mutants del receptor de cèl·lules T (TCR)* que presenten inflamació localitzada al còlon amb hiperplàsia de l'epiteli; es considera un model d'UC per la semblança en la distribució de les lesions (Mombaerts et al., 1993).

Entre els models transgènics, se'n poden destacar: els ratolins *transgènics per la interleucina-7* que presenten una sobreexpressió d'aquesta citocina i desenvolupen colitis entre la primera i tercera setmana de vida. Pel tipus de lesions que presenten els animals, es considera un model d'UC (Watanabe et al., 1997). Les rates *transgèniques per HLA-B27* (una molècula implicada en les espondiloartropatia humana) desenvolupen una inflamació del tracte gastrointestinal que afecta sobretot a l'estómac, íleum i còlon. Aquest model s'ha utilitzat molt en l'estudi de l'efecte de les bacteries intestinals residents tant en la inflamació aguda com crònica del tracte gastrointestinal (Hammer et al., 1990).



Tot i els diferents mecanismes d'inducció d'inflamació intestinal, les cèl·lules, citocines i mediadors inflamatoris implicats en la fase inflamatòria no específica de la colitis semblen comuns a molts models (Elson et al., 1995). Les mateixes cèl·lules i mediadors també estan implicats en les lesions de la mucosa de pacients amb IBD i representen una via final comuna de la inflamació no específica sense tenir en compte com es va iniciar el procés. Per tot això, els models animals tant poden ser utilitzats per estudiar aquest component de la IBD com per provar noves teràpies a partir d'un millor coneixement dels mecanismes implicats en la malaltia.

### **La infecció per *Trichinella spiralis***

Les infeccions per nemàtodes són útils per a l'estudi de les alteracions de la fisiologia intestinal, que es produeixen com a conseqüència de la inflamació induïda pel paràsit així com per la resposta immunitària de l'hoste. El coneixement dels mecanismes que es troben darrere la immunomodulació de la funció muscular intestinal permet l'extrapolació a la gastroenterologia clínica, ja que les alteracions de motilitat intestinal humanes sovint es donen després d'infeccions entèriques o d'altres condicions inflamàtores del tracte gastrointestinal. Les infeccions per nemàtodes intestinals en rosegadors provoquen respostes que condueixen la majoria de vegades a l'expulsió dels mateixos paràsits, de manera que aquestes infeccions també són útils per analitzar fins a quin punt els processos fisiològics són capaços d'expulsar els agents nocius de l'intestí; per exemple, els canvis en la secreció d'aigua i electròlits, i les alteracions del trànsit gastrointestinal i de motilitat que s'observen durant la infecció primària es poden interpretar com a mecanismes d'evacuació del paràsit (Castro et al., 1976).

Un model extensament utilitzat per induir inflamació intestinal és la infecció per via oral amb larves de *Trichinella spiralis*. El nemàtode *T. spiralis* és un patògen de diferents espècies animals entre les quals també s'hi inclouen la rata i el ratolí que són hostes semi-permissius. La infecció a partir d'aquest nemàtode es produeix com a resultat de l'administració oral de larves que es troben encapsulades en el múscul estriat d'animals infectats. Les larves penetren preferentment a la mucosa i submucosa del jejú durant la fase intestinal de la infecció i causen una resposta inflamatòria que va acompanyada de canvis en la motilitat de l'intestí prim (Blennerhassett et al., 1992; Castro et al., 1976; Palmer et al., 1984; Tanovic et al., 2002). En la mucosa intestinal, les larves es desenvolupen fins a transformar-se en la forma adulta. Els adults copulen i la nova generació de larves migra cap als músculs estriats on s'encapsulen. Així

doncs, la fase muscular comença amb l'entrada de les larves als músculs estriats i segueix amb la seva posterior encapsulació (veure figura 8).

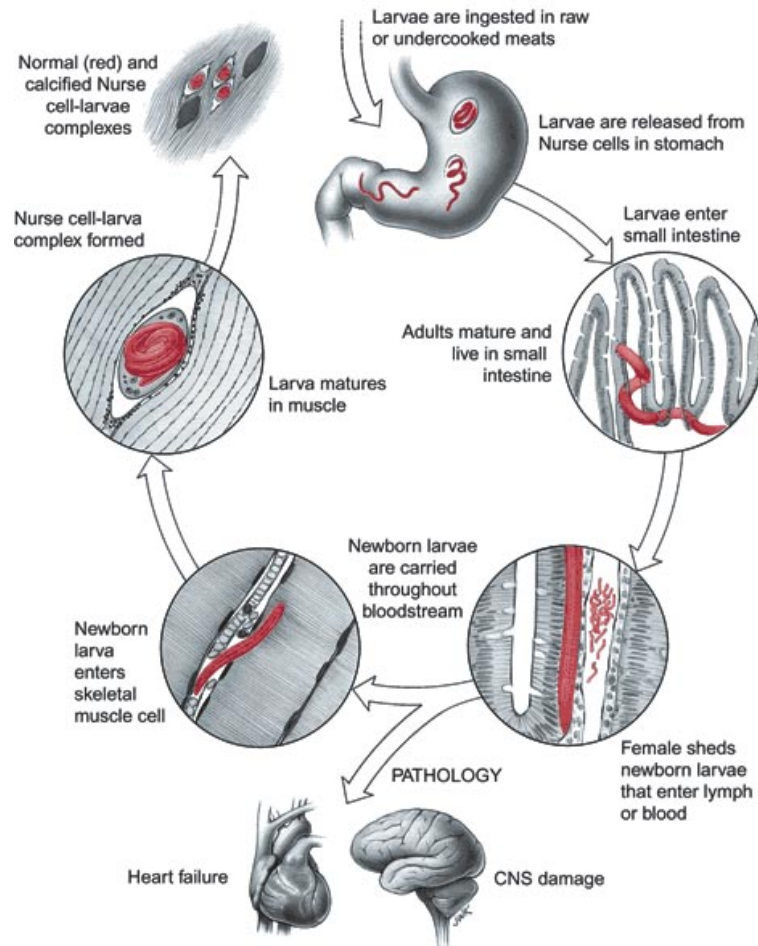


Figura 8. Cicle biològic del paràsit nemàtode *Trichinella spiralis*. Extreta de *Parasitic Diseases* (Despommier et al., 2000).

### **Alteracions intestinals en animals infectats per via oral amb larves de *Trichinella spiralis***

La fase entèrica de la infecció per *T. spiralis* produeix una reacció inflamatòria aguda de la mucosa de l'intestí prim que va acompanyada d'alteracions en la motilitat intestinal (Alizadeh et al., 1987; Castro et al., 1976; Palmer et al., 1984; Tanovic et al., 2002). Molts estudis *in vitro* mostren que l'alteració de la motilitat intestinal, observada durant aquesta infecció, podria resultar dels canvis que es produeixen a nivell de la cèl·lula muscular llisa, de la funció neural entèrica, així com, de les alteracions observades a nivell de les ICC:

#### a) Alteracions de la cèl·lula muscular

La màxima tensió generada pel carbacol i la 5-hidroxitriptamina *in vitro* es troba significativament augmentada en rates infectades per *T. spiralis* (Vermillion and Collins, 1988) i és independent dels canvis tròfics de la cèl·lula muscular llisa descrits en aquest model (Blennerhassett et al., 1992). Alguns estudis suggereixen que l'increment en la contractilitat del múscul llis pot ser degut en part a les alteracions que s'observen en l'expressió de la bomba de sodi del múscul longitudinal inflammat (Khan and Collins, 1993). Els canvis en la funció muscular podrien resultar de la producció per part del paràsit de substàncies, com ara l'acetilcolinesterasa, que actuaria directament sobre el teixit de l'animal infectat. Per altra banda, una segona hipòtesi seria que els canvis en la funció muscular resultessin de la resposta inflamatòria de l'hoste front al paràsit (Castro et al., 1976). El fet que les alteracions de la funció del múscul intestinal no requereixin la presència del paràsit a la llum de l'intestí i que aquestes alteracions puguin ser atenuades amb corticoesteroids (Marzio et al., 1990) donen suport a aquesta segona idea. A més a més, l'alteració de la funció muscular persisteix fins i tot després de l'expulsió del paràsit (Barbara et al., 1997). La persistència de la disfunció muscular que s'observa en aquest model pot ser rellevant per l'estudi de les alteracions de motilitat humanes, ja que són una seqüela freqüent de les infeccions entèriques.

#### b) Alteracions de la funció neural entèrica

La infecció per *T. spiralis* en la rata va acompanyada d'una disminució en l'alliberament de noradrenalina (Swain et al., 1991) i acetilcolina (Ach) (Collins et al., 1989) des del PM de l'intestí prim i d'un augment dels nivells de SP (Swain et al., 1992). A més a més, en aquest

model s'ha trobat un augment en l'expressió de citocines proinflamatòries com ara la IL-1 i la IL-6, així com del TNF- $\alpha$  al PM, fet que suggereix que aquestes citocines podrien contribuir en els canvis musculars i neurals observats (Khan and Collins, 1994).

### c) Alteracions de les ICC

La inflamació de la mucosa de l'intestí prim induïda per *T. spiralis* produeix canvis ultraestructurals importants a les ICC associades al PM. Tanmateix, s'ha demostrat que aquestes alteracions són prou importants per produir canvis funcionals remarcables (Der et al., 2000). Els estudis immunohistoquímics del receptor c-kit no evidencien les alteracions d'aquestes cèl·lules perquè durant el procés inflamatori no hi ha pèrdua d'ICC's i sembla ser que el receptor c-kit manté el seu nivell d'expressió sota aquestes condicions (Wang et al., 2002).

### **Colitis induïda per *Trichinella spiralis***

Així com la infecció per *T. spiralis* és un model extensament utilitzat per estudiar la inflamació de l'intestí prim, cal dir que molt pocs investigadors han utilitzat aquest paràsit per estudiar els canvis que es produeixen en la fisiologia del còlon durant aquesta infecció.

Grossi *et al* (Grossi et al., 1993) van desenvolupar un protocol per induir colitis amb aquest paràsit, que consisteix bàsicament en l'administració via intrarectal de les larves del mateix. En aquest estudi, van comparar la resposta contràctil del múscul longitudinal colònic d'aquest model amb la d'altres models, com ara l'exposició a TNBS i van observar una disminució de la contractilitat en tots els casos. Aquest fet els va fer suggerir que els canvis que es produeixen en condicions inflamatòries són independents de la manera mitjançant la qual s'indueix la colitis i que probablement estan mediat a nivell post receptor. Jacobson *et al* (Jacobson et al., 1995) també van utilitzar aquest model en un estudi on van descriure una disminució en l'alliberament de noradrenalina en resposta a diferents estímuls, tant en el model de colitis induïda per *T. spiralis* com en la colitis induïda per exposició a TNBS; a més a més, també van observar que la alteració de la funció simpàtica es donava tant en regions inflamades com en regions no inflamades del tracte gastrointestinal.

Els dos treballs esmentats en el paràgraf anterior, són els dos únics estudis en què s'utilitza i es descriu per primer cop el model de colitis induïda per *T. spiralis* per analitzar en

part la funció contràctil del múscul llis i la funció simpàtica durant la inflamació colònica induïda per aquest paràsit, i es compara amb d'altres models com ara la colitis per TNBS; model, que a diferència de la colitis induïda per *T. spiralis*, ha estat ben carecteritzat per altres investigadors i és considerat un bon model de malaltia de Crohn sobretot per la semblança en el tipus de lesions i troballes histopatològiques que presenten els animals (Hoshino et al., 1992; Morris et al., 1989; Morteau et al., 1993; Yamada et al., 1992).

## Referències

Alberti E, Mikkelsen HB, Larsen JO, Jimenez M (2005). Motility patterns and distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in the proximal, mid- and distal-colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 17:133-147.

Alizadeh H, Castro GA, Weems WA (1987). Intrinsic jejunal propulsion in the guinea pig during parasitism with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 93:784-790.

Barbara G, Vallance BA, Collins SM (1997). Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 113:1224-1232.

Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40:767-774.

Bianchi GP, Marchesini G, Gueli C, Zoli M (1995). Thyroid involvement in patients with active inflammatory bowel diseases. *Ital J Gastroenterol* 27:291-295.

Bing X, Crusius J, Meuwissen S, Peña A (1998). Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World Journal of Gastroenterology* 4 (5):446-458.

Blennerhasset MG, Vignjevic P, Vermillion DL, Collins SM (1992). Inflammation causes hyperplasia and hypertrophy in smooth muscle of rat small intestine. *Am J Physiol* 262:G1041-G1046.

Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W (1998). Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 188:1929-1939.

Borderies JR, Gonalons E, Angel F, Vergara P, Jimenez M (1997). Effect of different calcium channel blockers on inhibitory junction potentials and slow waves in porcine ileum. *Life Sci* 60:883-892.

Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40:668-688.

Bush TG, Savidge TC, Freeman TC, Cox HJ, Campbell EA, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1998). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell* 93:189-201.

Cajal SR (1893). Sur les ganglions et plexus nerveux de l'intestin. *C R Soc Biol* 45:217-223.

Cannon WB (1902). The movements of the intestines studied by means of the rontgen rays. *Am J Physiol* 6:251-277.

- Carty E, Rampton DS (2003). Evaluation of new therapies for inflammatory bowel disease. *British Journal of Clinical Pharmacology* 56:351-361.
- Castro GA, Badial-Aceves F, Smith JW, Dudrick SJ, Weisbrodt NW (1976). Altered small bowel propulsion associated with parasitism. *Gastroenterology* 71:620-625.
- Cayabyab FS, deBruin H, Jimenez M, Daniel EE (1996). Ca<sup>2+</sup> role in myogenic and neurogenic activities of canine ileum circular muscle. *Am J Physiol* 271:G1053-G1066.
- Chaudhary NA, Truelove SC (1961). Human colonic motility: a comparative study of normal subjects, patients with ulcerative colitis, and patients with the irritable colon syndrome. III. Effects of emotions. *Gastroenterology* 40:27-36.
- Christinck F, Jury J, Cayabyab F, Daniel EE (1991). Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1448-1458.
- Collins SM (1996). The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111:1683-1699.
- Collins SM, Blennerhassett PA, Blennerhassett MG, Vermillion DL (1989). Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 257:G898-G903.
- Cong Y, Brandwein SL, McCabe RP, Lazenby A, Birkenmeier EH, Sundberg JP, Elson CO (1998). CD4<sup>+</sup> T cells reactive to enteric bacterial antigens in spontaneously colitic C3H/HeJBir mice: increased T helper cell type 1 response and ability to transfer disease. *J Exp Med* 187:855-864.
- Connell AM (1962). The motility of the pelvic colon. II. Paradoxical motility in diarrhoea and constipation. *Gut* 3:342-348.
- Cornet A, Savidge TC, Cabarocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13306-13311.
- Danese S, Sans M, Fiocchi C (2004). Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 3:394-400.
- Der T, Bercik P, Donnelly G, Jackson T, Berezin I, Collins SM, Huizinga JD (2000). Interstitial cells of cajal and inflammation-induced motor dysfunction in the mouse small intestine. *Gastroenterology* 119:1590-1599.
- Despommier, Gwadz, Hotez, Knirsch (2000) *Parasitic Diseases*. Apple Trees Productions L.L.C. NY.
- Dvorak AM, Connell AB, Dickersin GR (1979). Crohn's disease: a scanning electron microscopic study. *Hum Pathol* 10:165-177.

Dvorak AM, Osage JE, Monahan RA, Dickersin GR (1980). Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system. *Hum Pathol* 11:620-634.

Elliott TR, Barclay-Smith E. (1904). Antiperistalsis and other muscular activities of the colon. *J Physiol (Lond)* 31:272-304.

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

Fiocchi C (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.

Fiocchi C (1996) *Cytokines in Inflammatory Bowel Disease*. Austin: R.G. Landes Company.

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

Geboes K, El Zine MY, Dalle I, El Haddad S, Rutgeerts P, Van Eyken P (2001). Tenascin and strictures in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical study. *Int J Surg Pathol* 9:281-286.

Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, Mebis J, Penninckx F, Vantrappen G, Desmet VJ (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103:439-447.

Gonzalez A, Sarna SK (2001). Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G546-G554.

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

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

Hansen MB (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and Classification. *Pharmacology and Toxicology* 92:105-113.

Harries AD, Baird A, Rhodes J (1982). Non-smoking: a feature of ulcerative colitis. *Br Med J (Clin Res Ed)* 284:706.

Harris J, Shields R (1970). Absorption and secretion of water and electrolytes by the intact human colon in diffuse untreated proctocolitis. *Gut* 11:27-33.

Hawker PC, McKay JS, Turnberg LA (1980). Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 79:508-511.



- Hertz AF (1907). The passage of food along the human alimentary canal. *Guy's Hosp Rep* 61:389-427.
- Hibi T, Ogata H, Sakuraba A (2002). Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 37:409-417.
- Holzknacht G. (1909). Die normale Peristaltik des Colon. *Munch Med Wochenschr* 56:2401-2403.
- Hoshino H, Sugiyama S, Ohara A, Goto H, Tsukamoto Y, Ozawa T (1992). Mechanism and prevention of chronic colonic inflammation with trinitrobenzene sulfonic acid in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19:717-722.
- Isgar B, Harman M, Kaye MD, Whorwell PJ (1983). Symptoms of irritable bowel syndrome in ulcerative colitis in remission. *Gut* 24:190-192.
- Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.
- Jimenez M, Cayabyab FS, Vergara P, Daniel EE (1996). Heterogeneity in electrical activity of the canine ileal circular muscle: interaction of two pacemakers. *Neurogastroenterol Motil* 8:339-349.
- Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM (2004). Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 50:81-92.
- Keef KD, Du C, Ward SM, McGregor B, Sanders KM (1993). Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. *Gastroenterology* 105:1009-1016.
- KERN F, Jr., ALMY TP, ABBOT FK, BOGDONOFF MD (1951). The motility of the distal colon in nonspecific ulcerative colitis. *Gastroenterology* 19:492-503.
- Khan I, Collins SM (1993). Altered expression of sodium pump isoforms in the inflamed intestine of *Trichinella spiralis*-infected rats. *Am J Physiol* 264:G1160-G1168.
- Khan I, Collins SM (1994). Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 107:691-700.
- Koch TR, Carney JA, Go VL (1987). Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 32:369-376.
- Kruis W, Azpiroz F, Phillips SF (1985). Contractile patterns and transit of fluid in canine terminal ileum. *Am J Physiol* 249:G264-G270.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.

Kunze WA, Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61:117-142.

Lindgren S, Lilja B, Rosen I, Sundkvist G (1991). Disturbed autonomic nerve function in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 26:361-366.

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

Madara JL, Podolsky DK, King NW, Sehgal PK, Moore R, Winter HS (1985). Characterization of spontaneous colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) and its response to sulfasalazine. *Gastroenterology* 88:13-19.

Malcolm A, Camilleri M (2000). Coloanal motor coordination in association with high-amplitude colonic contractions after pharmacological stimulation. *Am J Gastroenterol* 95:715-719.

Manousos ON, Salem SN (1965). Abnormal motility of the small intestine in ulcerative colitis. *Gastroenterologia* 104:249-257.

Marzio L, Blennerhassett P, Chiverton S, Vermillion DL, Langer J, Collins SM (1990). Altered smooth muscle function in worm-free gut regions of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 259:G306-G313.

Matsumoto S, Okabe Y, Setoyama H, Takayama K, Ohtsuka J, Funahashi H, Imaoka A, Okada Y, Umesaki Y (1998). Inflammatory bowel disease-like enteritis and caecitis in a senescence accelerated mouse P1/Yit strain. *Gut* 43:71-78.

May GR, Sutherland LR, Meddings JB (1993). Is small intestinal permeability really increased in relatives of patients with Crohn's disease? *Gastroenterology* 104:1627-1632.

Menzies JR, McKee R, Corbett AD (2001). Differential alterations in tachykinin NK2 receptors in isolated colonic circular smooth muscle in inflammatory bowel disease and idiopathic chronic constipation. *Regul Pept* 99:151-156.

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

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

Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD (1993). CD4<sup>+</sup> T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4<sup>+</sup> T cells. *J Exp Med* 178:237-244.

- Morteau O, More J, Pons L, Bueno L (1993). Platelet-activating factor and interleukin 1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 104:47-56.
- Mungan Z, Arimura A, Ertan A, Rossowski WJ, Coy DH (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. *Scand J Gastroenterol* 27:375-380.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52:84-90.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W (1995). Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182:1281-1290.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH (2001). A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411:603-606.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98:694-702.
- Palmer JM, Weisbrodt NW, Castro GA (1984). *Trichinella spiralis*: intestinal myoelectric activity during enteric infection in the rat. *Exp Parasitol* 57:132-141.
- Payer J, Huorka M, Duris I, Mikulecky M, Kratochvil'ova H, Ondrejka P (1993). Circadian rhythmicity and cross correlation of plasma gastrin, cortisol and somatostatin levels in ulcerative colitis patients and healthy subjects. *Hepatogastroenterology* 40:272-275.
- Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G255-G266.
- Pluja L, Fernandez E, Jimenez M (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 126:883-892.
- Podolsky DK, Fiocchi C (1999). Cytokines, chemokines, growth factors, eicosanoids and other bioactive molecules in IBD. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 191-207.
- Rae MG, Fleming N, McGregor DB, Sanders KM, Keef KD (1998). Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol* 510 ( Pt 1):309-320.
- Rao SS, Read NW, Brown C, Bruce C, Holdsworth CD (1987). Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 93:934-940.

- Rao SS, Read NW, Stobart JA, Haynes WG, Benjamin S, Holdsworth CD (1988). Anorectal contractility under basal conditions and during rectal infusion of saline in ulcerative colitis. *Gut* 29:769-777.
- Robinson M (1997). Optimizing therapy for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 92:12S-17S.
- Rumessen JJ (1996). Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 111:1447-1455.
- Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I (1993). Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75:253-261.
- Sands BE (2004). From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 126:1518-1532.
- Sartor RB (1997a). Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? *Inflammatory Bowel Disease* 3:230-235.
- Sartor RB (1997b). Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92:5S-11S.
- Sartor RB, Bond TM, Schwab JH (1988). Systemic uptake and intestinal inflammatory effects of luminal bacterial cell wall polymers in rats with acute colonic injury. *Infect Immun* 56:2101-2108.
- Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI (1994). Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* 35:696-700.
- Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M (2001). Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* 13:255-264.
- Seldenrijk CA, Morson BC, Meuwissen SG, Schipper NW, Lindeman J, Meijer CJ (1991). Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 32:1514-1520.
- Shuttleworth CW, Conlon SB, Sanders KM (1997). Regulation of citrulline recycling in nitric oxide-dependent neurotransmission in the murine proximal colon. *Br J Pharmacol* 120:707-713.
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM (1987a). Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J Physiol* 252:C290-C299.
- Smith TK, Reed JB, Sanders KM (1987b). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J Physiol* 252:C215-C224.
- Snape WJ, Jr., Matarazzo SA, Cohen S (1980). Abnormal gastrocolonic response in patients with ulcerative colitis. *Gut* 21:392-396.

- Snape WJ, Jr., Williams R, Hyman PE (1991). Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol* 261:G987-G991.
- Steinhoff U, Brinkmann V, Klemm U, Aichele P, Seiler P, Brandt U, Bland PW, Prinz I, Zugel U, Kaufmann SH (1999). Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. *Immunity* 11:349-358.
- Strober W (1985). Animal models of inflammatory bowel disease--an overview. *Dig Dis Sci* 30:3S-10S.
- Swain MG, Agro A, Blennerhassett P, Stanisz A, Collins SM (1992). Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 102:1913-1919.
- Swain MG, Blennerhassett PA, Collins SM (1991). Impaired sympathetic nerve function in the inflamed rat intestine. *Gastroenterology* 100:675-682.
- Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E (2002). Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from *Trichinella spiralis* infected rats. *Life Sci* 71:3121-3136.
- Thuneberg L (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 71:1-130.
- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B (1988). Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 29:990-996.
- Vermillion DL, Collins SM (1988). Increased responsiveness of jejunal longitudinal muscle in *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 254:G124-G129.
- Vermillion DL, Huizinga JD, Riddell RH, Collins SM (1993). Altered small intestinal smooth muscle function in Crohn's disease. *Gastroenterology* 104:1692-1699.
- Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD, Huizina JD (2002). Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol* 160:1529-1540.
- Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, Ogata H, Kanai T, Ueno Y, Tsuchiya M, Ishii H, Aiso S, Habu S, Hibi T (1997). The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse thymus is interleukin-7. *J Clin Immunol* 17:282-292.
- Watanabe T, Kubota Y, Sawada T, Muto T (1992). Distribution and quantification of somatostatin in inflammatory disease. *Dis Colon Rectum* 35:488-494.
- Wells AD, McMillan I, Price AB, Ritchie JK, Nicholls RJ (1991). Natural history of indeterminate colitis. *Br J Surg* 78:179-181.

Wirtz S, Neurath MF (2000). Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 15:144-160.

Wood JD, Alpers DH, Andrews PL (1999). Fundamentals of neurogastroenterology. *Gut* 45 Suppl 2:II6-II16.

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

## Objectius

La malaltia inflamatòria intestinal és una patologia humana d'incidència creixent en països desenvolupats. Sota la denominació de malaltia inflamatòria intestinal s'inclouen una sèrie de patologies d'etiologia mal definida en les que trobem una marcada inflamació de la mucosa i en ocasions de les capes subjacents del tracte digestiu que es produeix com a conseqüència d'una resposta immune sobredimensionada i que va acompanyada d'importantes alteracions de la motilitat gastrointestinal.

Un dels models experimentals més utilitzats per a provocar enteritis és l'administració oral de larves de *T. spiralis* i aquest model ha proporcionat molta informació relativa als canvis motors que tenen lloc durant la inflamació. Per contra, tant les característiques clíniques com el curs temporal dels canvis funcionals associats a la colitis induïda per l'administració intrarectal de *T. spiralis* en rata han estat fins ara molt pobrament descrits. Així doncs, l'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar fins a quin punt la colitis induïda per *T. spiralis* en la rata comparteix similituds amb la colitis ulcerosa i pot ser útil com a model d'aquesta malaltia humana.

Concretament, els objectius d'aquest estudi han estat:

- (1) Monitoritzar el curs de la inflamació, caracteritzar els símptomes clínics i trets anatomopatològics que presenten les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis*.
- (2) Estudiar el patró motor que presenta el múscul circular del còlon, així com analitzar alguns aspectes de l'acoblament excitació-contracció en aquestes condicions inflamatòries.
- (3) Estudiar les alteracions dels principals neurotransmissors excitatoris i inhibitoris implicats en la regulació de la motilitat del còlon de rates infectades amb aquest paràsit.

Per tal de dur a terme aquests objectius les tècniques que s'han utilitzat han estat el bany d'òrgans per a l'estudi de l'activitat mecànica i els microelèctrodes intracel·lulars per a l'estudi de l'activitat elèctrica. A més a més, s'han utilitzat tècniques immunohistoquímiques i d'immunofluorescència per al marcatge de neurotransmissors i enzims relacionats amb la seva síntesi, així com per identificar alguns tipus cel·lulars.

## Capítol 1

### Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*

#### 1.1. Abstract

We intended to characterize the effect of inflammation on spontaneous colonic motility pattern and the role of iNOS in its disruption in colitis. Colitis was induced by an intra-colonic enema of *T. spiralis* larvae. Animals were studied 2-30 days post-infection (PI). Standard H&E and iNOS staining were performed on colonic sections. Altered stool consistency was found from day 1 to 21 PI; leukocytosis peaked on days 6-21 PI. Edema and cell infiltration were found in mucosa and submucosa (day 2-14 PI). Contractility displayed a disorganized pattern with decreased high amplitude low frequency (HALF) contractions. A progressive fading of spontaneous activity was observed and was partly restored in strips devoid of submucosa. iNOS immunoreactivity increased in epithelial and infiltrating cells (days 2-14 PI). In this model of colonic inflammation, the decrease in spontaneous contractility, which might be caused by NO generated from mucosal and submucosal iNOS, bears some traits with changes observed in ulcerative colitis and might thus be useful to study the dismotility observed in this human disease.

#### 1.2. Introduction

Ulcerative colitis (UC) is a chronic disease characterized by altered bowel habits where diarrhea is a major symptom. Previous reports have indicated that colonic contractility in patients with UC (Rao and Read, 1990; Reddy et al., 1991; Snape, Jr. et al., 1991) as well as in animal models of colitis is decreased during inflammation (Cohen et al., 1986; Grossi et al., 1993; Lu et al., 1997; Myers et al., 1997). The mechanisms underlying these disturbances are poorly understood and may involve changes in the enteric nervous system, the smooth muscle layers or the interstitial cells of Cajal networks as well as in the crosstalk among them and mediators released from the mucosa.

Animal models of intestinal inflammation have provided the opportunity to investigate the impact of inflammatory processes on several aspects of gut function since studies of human disease have experimental limitations. Infection by the nematode parasite *Trichinella spiralis* in



rodents has been used extensively to study the impact of inflammation on the small intestine and it has been demonstrated that during the intestinal phase of *T. spiralis* infection, mucosal inflammation is accompanied by a suppression of neurotransmitter -acetylcholine and norepinephrine- release by enteric nerves (Collins et al., 1989; Hurst and Collins, 1994). Some putative mediators of functional alterations in enteric nerves have also been identified. For instance, administration of exogenous IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  to control tissue mimics the impairment of neurotransmitter release from the myenteric plexus, and a synergistic effect of IL-6 and IL-1 $\beta$  has been described (Hurst and Collins, 1994; Main et al., 1993; Ruhl et al., 1994). Furthermore, increased mRNA expression for these cytokines has been shown in the myenteric plexus of these infected animals (Khan and Collins, 1994).

Various animal models have been used to evaluate the impact of inflammation on colonic physiology (Elson et al., 1995), and altered muscular and neural function has been described (Grossi et al., 1993; Jacobson et al., 1995; Lu et al., 1997; Mizuta et al., 2000). Besides, it has been suggested that the decrease in colonic contractility is independent of the manner in which colitis is induced (Grossi et al., 1993). There are only a few reports describing the effects of *T. spiralis* induced colitis (Grossi et al., 1993; Jacobson et al., 1995). Decreased contractile responses to carbachol, substance P and KCl have been found (Grossi et al., 1993) together with decreased release of noradrenaline from longitudinal muscle myenteric plexus in response to KCl or electrical field stimulation (Jacobson et al., 1995). The *T. spiralis*-induced colitis model may be useful since, it shares some features that are characteristic of UC, whereas other models like trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis share more similarities with human Crohn's disease (Morris et al., 1989).

Thus, we intended to study to what extent *T. spiralis*-induced colitis shares similarities with UC and may thus be useful as a model of such human disease. For this purpose we have monitored the time course of inflammation as well as the clinical signs, iNOS expression and changes in spontaneous motility.

### **1.3. Material and methods**

#### **1.3.1. Animal model**

Male Sprague-Dawley rats (325-350g) were purchased from Charles River (Lyon, France) and were housed in a room with constant temperature (23°C) and light-dark cycles (12:12h). Standard rodent food and tap water were provided *ad libitum*.

#### **1.3.2. Induction of colitis**

Colitis was induced by intra-colonic instillation of 5000 *Trichinella spiralis* larvae suspended in 1 mL saline (0.9%). The larvae were obtained according to the method described by Castro and Fairbairn (Castro and Fairbairn, 1969). Each rat was lightly anesthetized with halothane, and a polyethylene canula (2 mm diameter) was inserted into the lumen of the colon 8 cm to the anus. Next, a flush volume of 1- mL saline (0.9%) was instilled and fecal matter was removed by manual palpation. Finally, each rat received 1-mL of a suspension of *T. spiralis* larvae. Control animals were treated identically except that, instead of *T. spiralis* larvae, they received 1-mL normal saline. Colon was excised 2, 6, 14 and 30 days post enema.

The body weight (g), food intake (g) and stool wet weight (g) were measured daily from the intra-colonic enema until sacrifice. Stool appearance was graded using the following scoring index: 0 for normal pellets; 1 for soft stools; 2 for pasty and semi formed stools with some mucus; 3 for watery stools with presence of mucus and 4 for macroscopically bloody stools. Leukocyte counts were made in blood samples collected by puncture of the safenous vein on days 2, 6, 14, 21 and 30 days post enema. The study was approved by the Ethical Committee of the Universtitat Autònoma de Barcelona.

#### **1.3.3. Tissue preparation**

After an overnight (18h) fasting with *ad libitum* access to water the rats were killed by decapitation and bled. The colon was then removed and placed in Krebs solution (in mM: glucose 10.10; NaCl 125.48; NaHCO<sub>3</sub> 21.9; KCl 4.61; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.14; CaCl<sub>2</sub> 2.50 and MgSO<sub>4</sub> 1.16), bubbled with a mixture of 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>. Samples of control and inflamed colons were excised and immediately immersed in 4% formaldehyd in phosphate-buffered saline, embedded in paraffin, sectioned, and stained with haematoxylin and eosin (H&E) for subsequent blind histological examination.

#### **1.3.4. Recordings of spontaneous mechanical activity**

After macroscopic examination of the colon to score the degree of inflammation, a piece of mid colon was pinned (mucosal side up) in a sylgard bottomed dissecting dish filled with carbogenated Krebs solution. Circular muscle strips with intact mucosal layer and muscle strips in which the mucosal and submucosal layers had been removed were cut (3mm x 10 mm) for each rat and placed in individual 10-mL organ bath cups containing warm (37°C) carbogenated Krebs solution. The upper end was attached to an isometric force transducer (Harvard UF-1, Apparatus Inc., Holliston, Massachusetts, USA) connected to an amplifier and then to a computer. Data were digitized (25 Hz) and simultaneously displayed and collected using Datawin 2 software (Panlab-Barcelona) coupled to an ISC-16 A/D card installed in a computer. A tension of 1 g was applied and the tissue was allowed to equilibrate for 1h. After this period the strips displayed spontaneous phasic activity which was recorded. The amplitude (mg), area under curve (AUC; g x s) and frequency of contractions (contractions/min) were measured in time intervals of 10 minutes. The intervals analyzed were 0-10 min (interval *a*) and 20-30 min (interval *b*) of spontaneous activity from the start of the recording.

#### **1.3.5. Immunohistochemistry**

Samples of control and inflamed colons were excised and immediately immersed in phosphate-buffered 4% formaldehyde. Slides were deparaffinized, washed in tap water and then micro waved in 10 mM citrate buffer (pH 6.0) for 15 min for antigen unmasking. Endogenous peroxidase quenching was performed by incubation in 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution for 30 min. Slides were then incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution of 20% goat serum. After standard blocking of endogenous avidin/biotin binding sites (avidin/biotin blocking kit; Vector laboratories), slides were incubated with a rabbit anti iNOS polyclonal antibody (1/100; Lab-Vision) at 4° C overnight. The ABC kit (Vector laboratories) was used with biotinylated goat anti rabbit IgG (1/200; Sta. Cruz) and was developed with a 3-3'-diaminobenzidine solution according to the manufacturer's instructions; haematoxylin was used as a counterstain.

### 1.3.6. Data analysis and statistics

Data are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean. Student's t-test for paired data was used to compare differences between full thickness strips and strips devoid of submucosal layer. T-test for unpaired data was used to compare differences between groups of animals. Differences in body weight, food intake, or stool weight between sham and colitic rats were compared by two-way ANOVA for non repeated measures. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## 1.4. Results

### 1.4.1. Clinical observations

Intra-rectal administration of 5000 *T. spiralis* larvae caused overt changes in the experimental animals. Infected rats ( $n = 8$ ) lost body weight from day 2 post infection (PI) to day 4 (day 4:  $353.4 \pm 7.13$  vs  $398.29 \pm 7.4$  g;  $P < 0.0001$ ). After the fourth day PI, rats started to recover gradually until day 11. Next, body weight decreased significantly again until the fourteenth day PI (day 14:  $364 \pm 8.3$  vs  $429 \pm 12.34$  g;  $P < 0.0001$ ). From day 14 PI, rats progressively gained weight until day 30 PI, but the values attained were always below those corresponding to sham rats ( $n = 8$ ) (day 30:  $417 \pm 6.79$  vs  $472.75 \pm 19.58$  g;  $P < 0.0001$ ) (Figure 1).

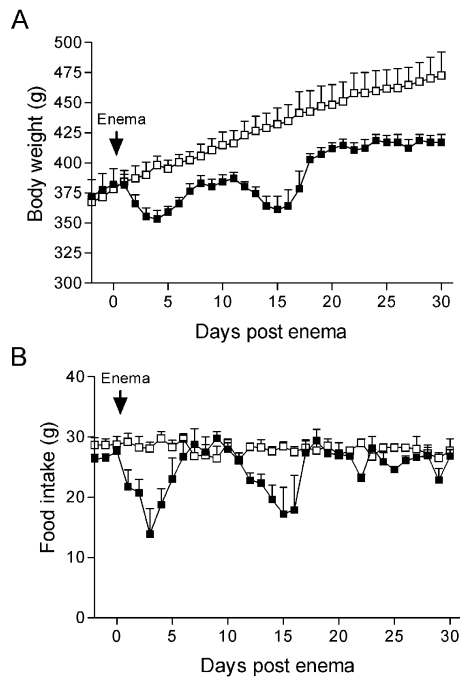


Figure 1. Body weight (A) and food intake (B) monitoring. (white) Sham vs (black) Infected.

Food intake decreased significantly in infected animals, from day 1 to 3 PI (day 3:  $13.88 \pm 4.21$  vs  $28.11 \pm 0.77$  g/day;  $P < 0.0001$ ). Food intake was back to normal values from day 4 to 10 PI, and decreased again from day 11 to 15 PI (day 15:  $17.22 \pm 4.41$  vs  $28.44 \pm 0.77$  g/day;  $P < 0.0001$ ). Thereafter, food intake was fully normalized (Figure 1).

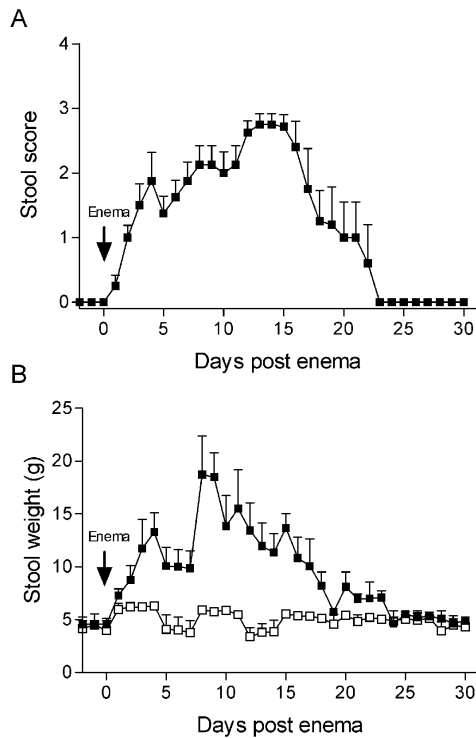


Figure 2. (A) Time course of the stool score. Scoring index: 0 for normal pellets; 1 for soft stools; 2 for pasty and semi formed stools with some mucus; 3 for watery stools with presence of mucus and 4 for macroscopically bloody stools. Sham animals are not represented in this panel as the score was always 0. (B) Stool weight monitoring. Sham (white) vs infected (black).

Stool consistency was altered from day 2 to 20 in infected animals (Stool scores: day 2 PI:  $1 \pm 0.18$ ; day 6 PI:  $1.62 \pm 0.25$ ; day 14 PI:  $2.75 \pm 0.16$ ; day 20 PI:  $1 \pm 0.54$ ;) while sham animals always presented normal pellets (stool score of 0;  $P < 0.0001$ ) after intra-colonic injection of 0.9% saline. Stool wet weight was significantly increased in infected animals from day 1 to 20 PI compared to sham rats (day 9:  $18.5 \pm 2.3$  vs  $5.75 \pm 0.28$  g/day;  $P < 0.0001$ ). The stool weight and consistency returned to normal from day 21 (Figure 2).

Blood leukocyte counts (Figure 3) started to increase from day 2 PI and were significantly increased on days 6 PI ( $18040 \pm 1436$  vs  $11830 \pm 751$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.01$ ), 14 PI ( $19080 \pm 1578$  vs  $11320 \pm 503$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.01$ ) and 21 PI ( $15690 \pm 1368$  vs  $11060 \pm 215$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ) compared to sham animals. Leukocyte counts on day 30 PI did not differ from controls. Neutrophilia and eosinophilia were the main features of the observed leukocytosis. Neutrophils were significantly increased on days 2 ( $4100 \pm 952$  vs  $1011 \pm 143$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ), 6 ( $5209 \pm 1153$  vs  $1149 \pm 113$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.01$ ) and 14 PI ( $4687 \pm 884$  vs  $1336 \pm 127$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ). Eosinophils were significantly increased on days 6 ( $358 \pm 81$  vs  $58 \pm 34$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ) and 14 PI ( $216 \pm 47$  vs  $81 \pm 29$  cells/ $\mu\text{L}$ ;  $P < 0.05$ ).

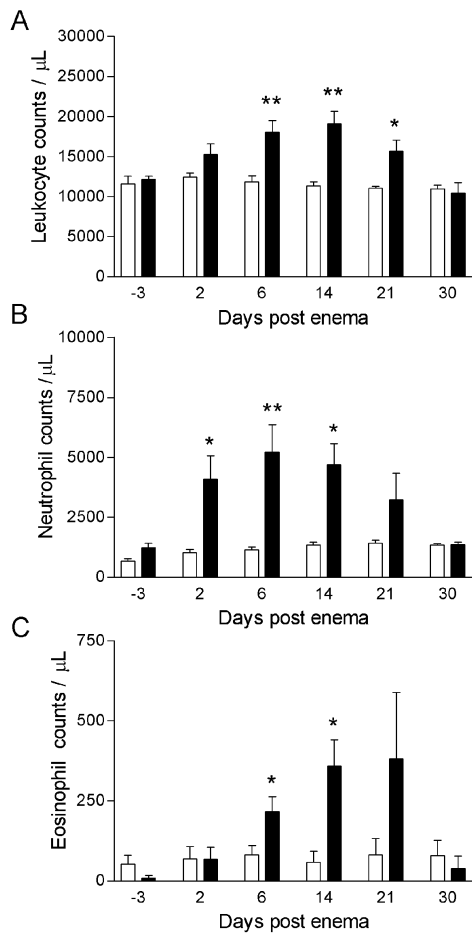


Figure 3. Bar diagrams showing total leukocyte counts/ $\mu\text{L}$  (A), neutrophil counts/ $\mu\text{L}$  (B) and eosinophil counts/ $\mu\text{L}$  (C). Sham rats (white) vs infected (black). \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

### **1.4.2. Macroscopic lesions**

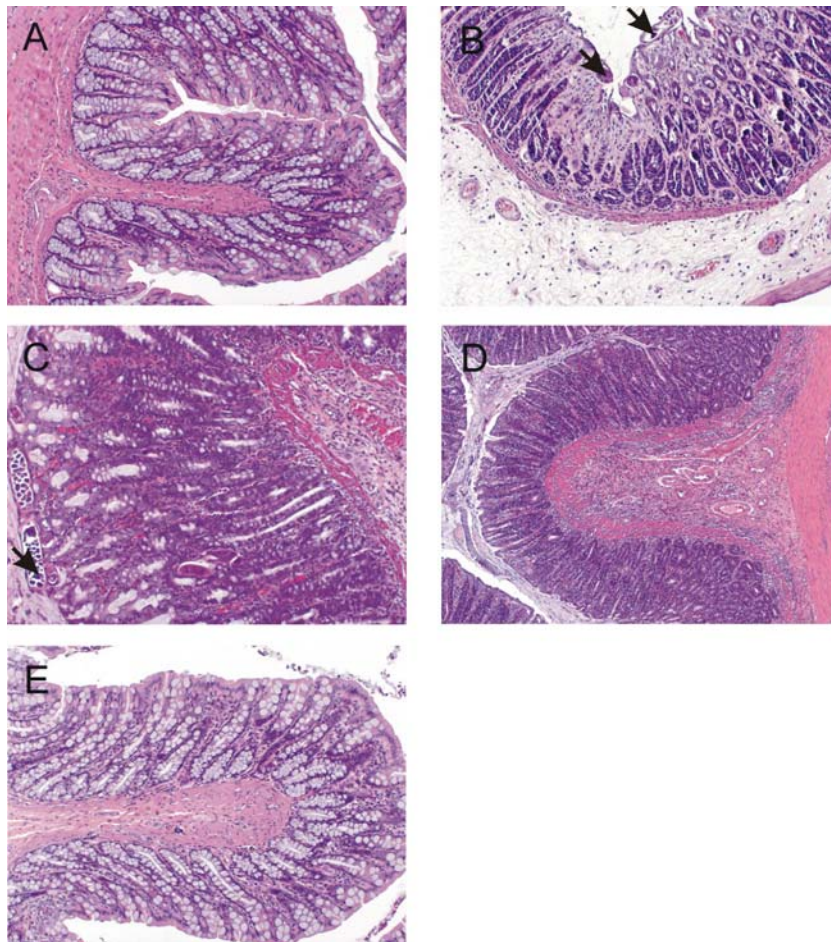
Colon from infected rats showed mild macroscopic inflammation on days 2, 6 and 14 PI, with petechiae, hipervascularity, increased mucus production and no major ulcers. Colon obtained 30 days PI still presented slight focal petechiae. Colon was apparently enlarged on all days PI. No macroscopic lesions were observed in sham animals.

### **1.4.3. Histology**

Severe inflammatory lesions were observed in infected colonic tissue from day 2 to 14 PI. At day 2 PI the main findings were: epithelial atrophy and sloughing, mucosal edema and hyperplasia, presence of numerous *T. spiralis* larvae, submucosal edema and an acute inflammatory infiltrate. Macrophages and polymorphonuclear cells (PMNs) were predominant in the *lamina propria*, extending as far as the submucosal layer. Tissue corresponding to 6 days PI presented signs of inflammation that consisted of epithelial sloughing, presence of larvae and microulcerations and severe submucosal edema with an important inflammatory infiltrate characterized by the presence of neutrophils, macrophages, lymphoplasmocytic cells and eosinophils. At day 14 PI, signs of mucosal regeneration and a few *T. spiralis* larvae were observed. The inflammatory infiltrate was still increased in the mucosal and submucosal layers. Animals corresponding to 30 days PI presented encysted *T. spiralis* larvae in the diaphragm but no obvious inflammatory lesions were observed in the colon. Sham rats never showed inflammatory lesions (See figure 4).

### **1.4.4. Tissue weight**

Full thickness strips of colon taken on day 2 PI presented a decreased wet weight compared to controls ( $30.64 \pm 5.78$  vs  $66.86 \pm 5.78$  mg;  $P < 0.001$ ;  $n = 7$ ). In contrast, on day 14 PI the weight was significantly increased ( $96 \pm 0.9$  vs  $66.86 \pm 5.78$  mg;  $P < 0.05$ ) compared to controls.



*Figure 4.* H&E staining of colonic tissue of (A) healthy rat; *T. spiralis* infected rat, 2 days PI (B), note the distortion of the mucosal architecture, the presence of *T. spiralis* larvae in the mucosa and the submucosal edema. Colitic tissue (6 days PI), note the increased number of inflammatory cells (C). Colon 14 days PI. Note that inflammation is still evident (D). Colon 30 days PI. No evident inflammatory signs are found. Magnifications: x 100 (A) (B) (C) (E); x 40 (D). Arrows indicate *T. spiralis* nematode.

#### 1.4.5. Spontaneous smooth muscle contractions

##### Sham animals

Full thickness circular strips from control animals ( $n = 8$ ) showed spontaneous cyclic mechanical activity with two types of phasic contractions: high amplitude low frequency (HALF) contractions and superimposed low amplitude and high frequency (LAHF) contractions. This pattern was consistent (area under curve, amplitude and frequency) in both time intervals analyzed – interval *a* (first 10 min) vs interval *b* (20-30 min) from the start of the recording. Values of AUC, amplitude and frequency of HALF contractions (interval *b*) were  $152.2 \pm 26.2$  g x s,  $1591 \pm 409$  mg and  $1.2 \pm 0.2$  contractions/min (See figure 5). The AUC, amplitude and frequency of LAHF contractions (interval *b*) were  $33.67 \pm 3.91$  g x s,  $78.12 \pm 7.86$  mg and  $9.04 \pm$



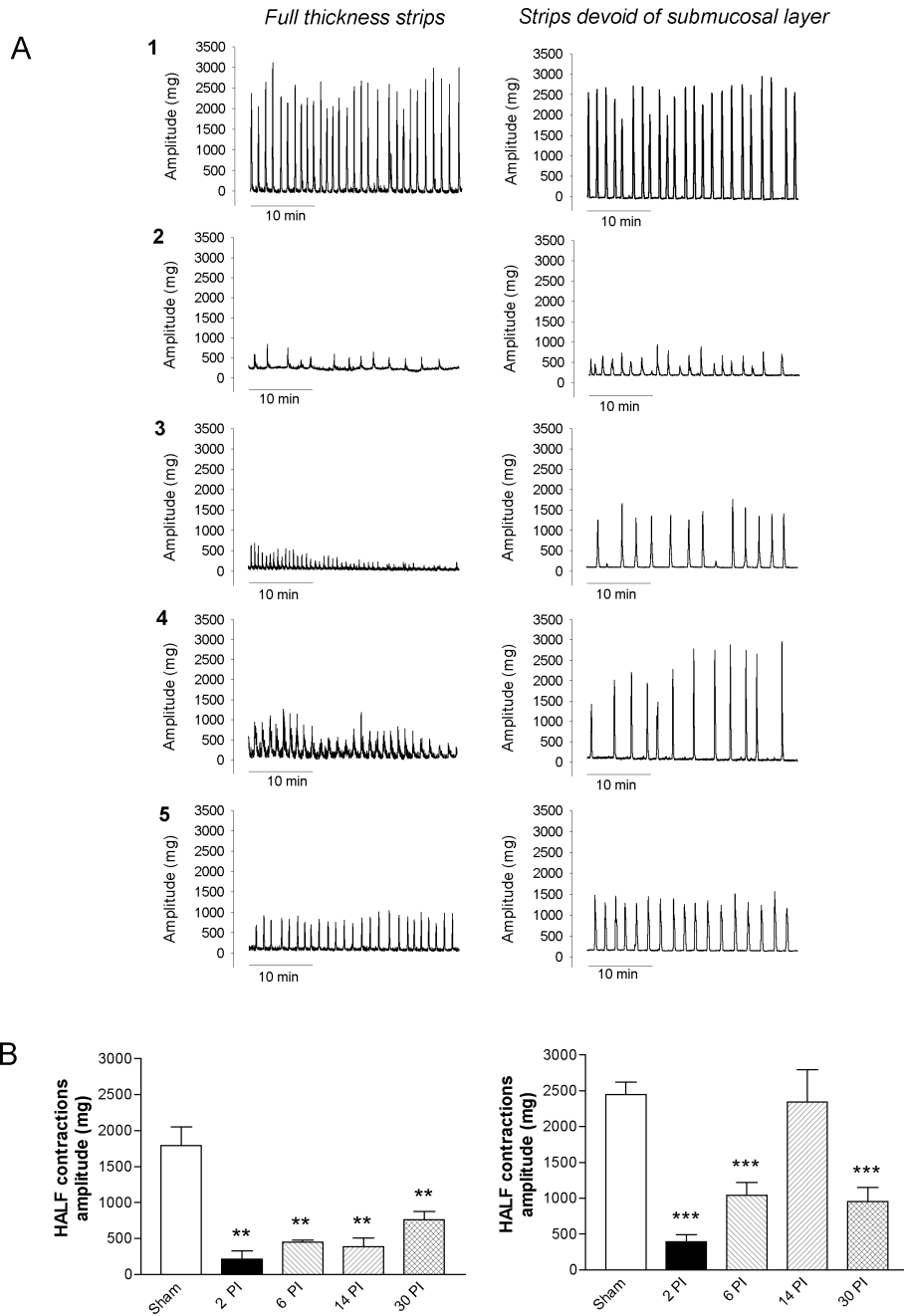
0.5 contractions/min (Figure 7). No significant differences were found in HALF or LAHF contractions between both intervals analyzed. When the mucosal and submucosal layers were removed, the AUC and amplitude values remained unchanged in strips from sham rats whereas the frequency was significantly decreased compared to full thickness strips ( $0.72 \pm 0.1$  contractions/min;  $P < 0.01$ ). Besides, LAHF contractions were absent in strips devoid of submucosa.

### **Infected animals**

The motor pattern displayed by strips taken from infected animals was disorganized and had lost the distinctive traits of HALF and LAHF contractions and a progressive fading of spontaneous activity.

### ***Day 2 PI***

Intact strips from infected rats on day 2 PI presented a decreased contractility compared to sham rats. Two out of 6 animals showed a pronounced decrease of spontaneous contractility and did not display any contractions (HALF or LAHF) in both intervals analyzed. No significant changes were observed when the submucosal layer was removed in these animals. Four out of 6 rats (Figure 5) presented (interval *b*) significant lower AUC and amplitude of HALF contractions ( $11.5 \pm 4.7$  g x s,  $P < 0.05$ ;  $215.1 \pm 114.2$  mg,  $P < 0.01$ ;  $0.37 \pm 0.18$  contractions/min, n.s.) and LAHF contractions ( $13.31 \pm 3.47$  g x s,  $P < 0.05$ ;  $31.45 \pm 6.21$  mg,  $P < 0.01$ ;  $8.47 \pm 3.11$  contractions/min, n.s.) (Figure 7) compared to sham rats. No LAHF contractions were recorded when the submucosal layer was removed.



*Figure 5.* (A) Recordings showing the spontaneous mechanical activity (HALF contractions) of colonic circular muscle in full thickness strips (left panel) and strips devoid of the submucosal layer (right panel) of sham rats (A.1) and colon from day 2 PI (A.2), day 6 PI (A.3), day 14 PI (A.4) and day 30 PI (A.5). (B) Bar diagrams representing HALF contraction amplitude (interval *b*) of full thickness strips (left panel) and strips devoid of mucosal and submucosal layers (right panel). \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$

**Day 6 PI**

Full thickness circular strips corresponding to infected animals on day 6 PI ( $n = 6$ ) presented significant lower AUC and amplitude of HALF contractions (interval *b*;  $10.3 \pm 3$  g x s,  $P < 0.01$ ;  $167.1 \pm 36.3$  mg,  $P < 0.05$ ;  $0.67 \pm 0.21$  contractions/min, n.s.) compared to controls (Figure 5). LAHF contractions had increased amplitude ( $123.7 \pm 14.42$  g x s;  $P < 0.01$ ) and decreased frequency ( $5.7 \pm 0.89$  contractions/min;  $P < 0.05$ ) compared to sham rats; No significant differences were observed between AUC values ( $28.42 \pm 4.99$  g x s; n.s.) (Figure 7). In addition to this findings, a progressive fading of HALF contractions throughout time was found in this tissue, so that, interval *b* had a significantly decreased amplitude compared to interval *a* ( $37.74 \pm 15.27$  g x s, n.s.;  $521.8 \pm 146.7$  mg,  $P < 0.05$ ;  $1.11 \pm 0.21$  contractions/min, n.s.). Strips devoid of submucosal layer displayed a consistent pattern in both intervals analyzed and AUC and amplitude of HALF contractions (interval *b*) were increased compared to full thickness strips ( $46.8 \pm 20.63$  g x s, n.s.;  $1042 \pm 179.3$  mg,  $P < 0.01$ ) (See figure 6). The frequency was significantly decreased compared to intact strips ( $0.39 \pm 0.04$  contractions/min,  $P < 0.05$ ). However, this increased contractility observed in strips from infected animals devoid of submucosa, was still below normal values of AUC, amplitude and frequency compared to sham rats ( $P < 0.05$ ). LAHF contractions were always absent in strips devoid of submucosal layer.

**14 days PI**

Circular muscle with the submucosal and mucosal layers kept intact ( $n = 6$ ) showed decreased HALF contractions (interval *b*;  $24.48 \pm 16.58$  g x s, n.s.;  $389.9 \pm 116.4$  mg,  $P < 0.01$ ;  $0.62 \pm 0.14$  contractions/min, n.s.) (Figure 5). No significant differences were observed vs control animals in LAHF contraction values ( $31.37 \pm 4.32$  g x s, n.s.;  $81.25 \pm 12.39$  mg, n.s.;  $8.39 \pm 1.13$  contractions/min, n.s.) (Figure 7). AUC and amplitude of HALF contractions displayed by strips devoid of mucosal and submucosal layers remarkably increased ( $106.2 \pm 11.64$  g x s,  $P < 0.05$ ;  $2341 \pm 454$  mg,  $P < 0.05$ ) compared to full thickness strips, reaching values similar to those observed in sham animals (Figure 6); In such strips, HALF contraction frequency was decreased ( $0.28 \pm 0.03$  contractions/min,  $P < 0.05$ ). No LAHF contractions were observed in strips devoid of the submucosal and mucosal layers.

**30 days PI**

On day 30 PI (n = 6), intact circular strips displayed an organized motility pattern similar to sham rats, so that, the progressive fading of the spontaneous activity was not observed at this time point and no significant differences were observed between both intervals analyzed. The AUC and amplitude of HALF contractions (interval *b*), were decreased compared to sham rats ( $43.70 \pm 7.59$  g x s, n.s.;  $759 \pm 119.9$  mg,  $P < 0.01$ ;  $0.62 \pm 0.08$  contractions/min, n.s.) (Figure 5). LAHF contractions had similar amplitude ( $80.67 \pm 15.47$  mg, n.s.) and frequency ( $9.79 \pm 1.16$  contractions/min, n.s.) values compared to sham animals while AUC was decreased ( $20.03 \pm 4.3$  g x s,  $P < 0.05$ ) (Figure 6). No LAHF contractions were observed when the mucosal and submucosal layers were removed and no significant changes in HALF contractions AUC, amplitude and frequency were found compared to full thickness strips. HALF contractions in strips devoid of submucosa still presented significantly lower amplitude compared to controls ( $755.2 \pm 218.8$  mg,  $P < 0.001$ ). LAHF contractions were not recorded in strips devoid of the submucosal layer.

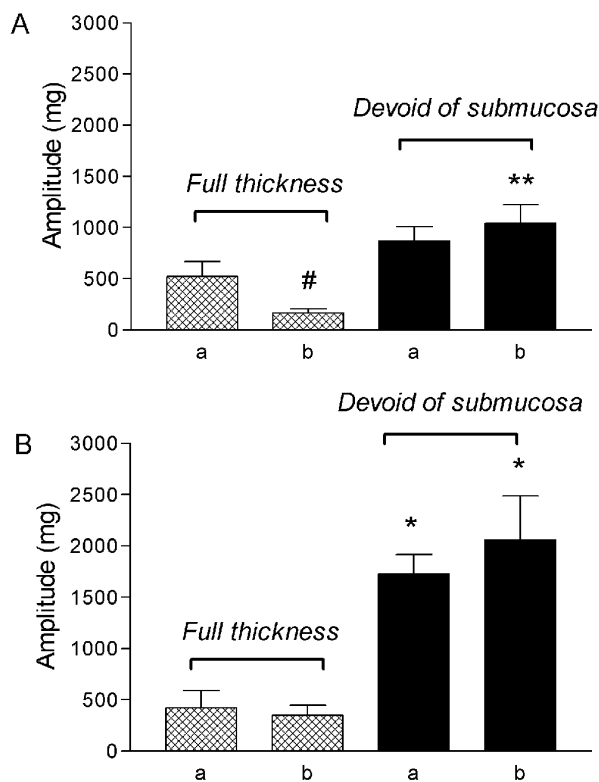


Figure 6. Bar diagrams showing the effect of submucosal layer removal on the spontaneous HALF contractions from 6 days PI (A) and 14 days PI rats (B); *a* represents the first 10 minutes interval from the start of the recording and *b* represents the 20-30 minutes interval from the beginning of the recording; \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$  represent differences between full thickness strips and strips devoid of submucosa (comparing the same time interval) and #  $P < 0.05$  represents differences between both time intervals analysed in the same strip.

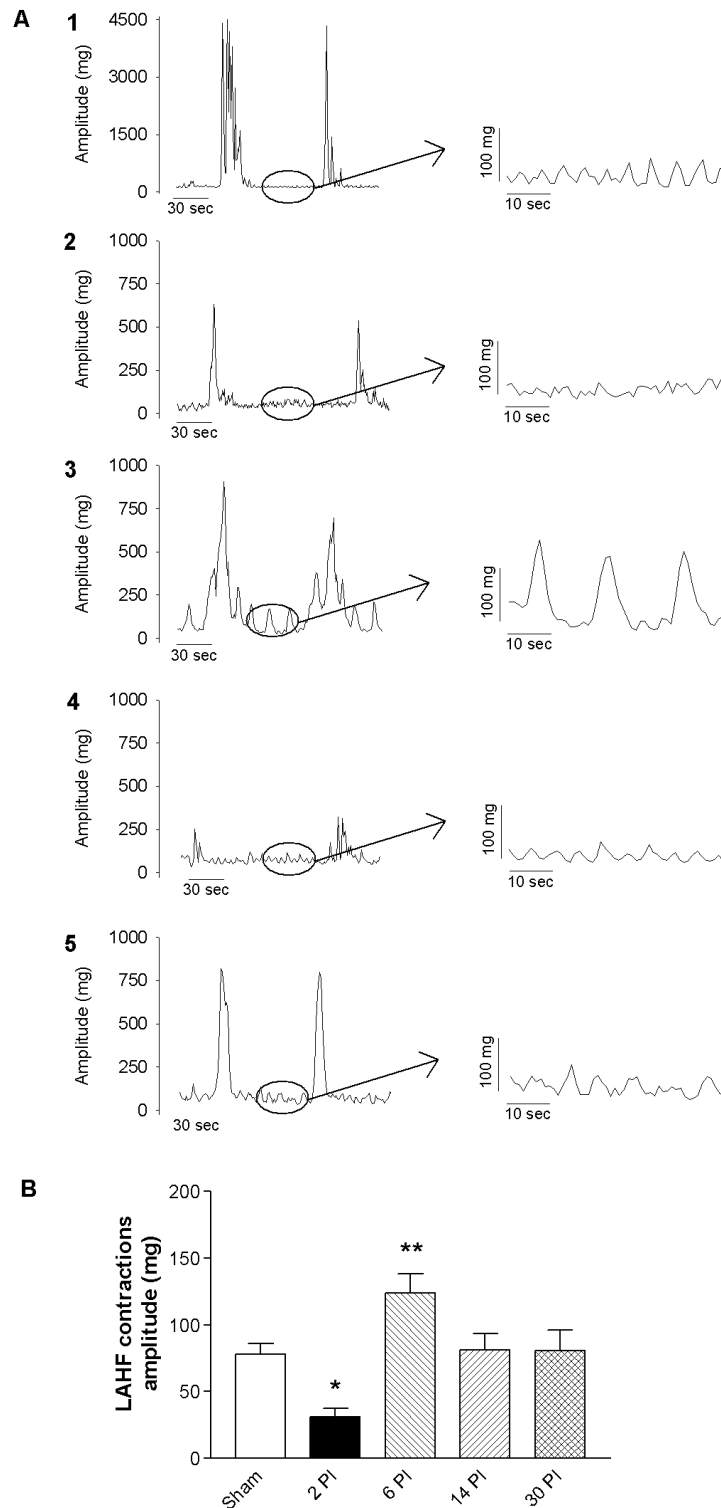
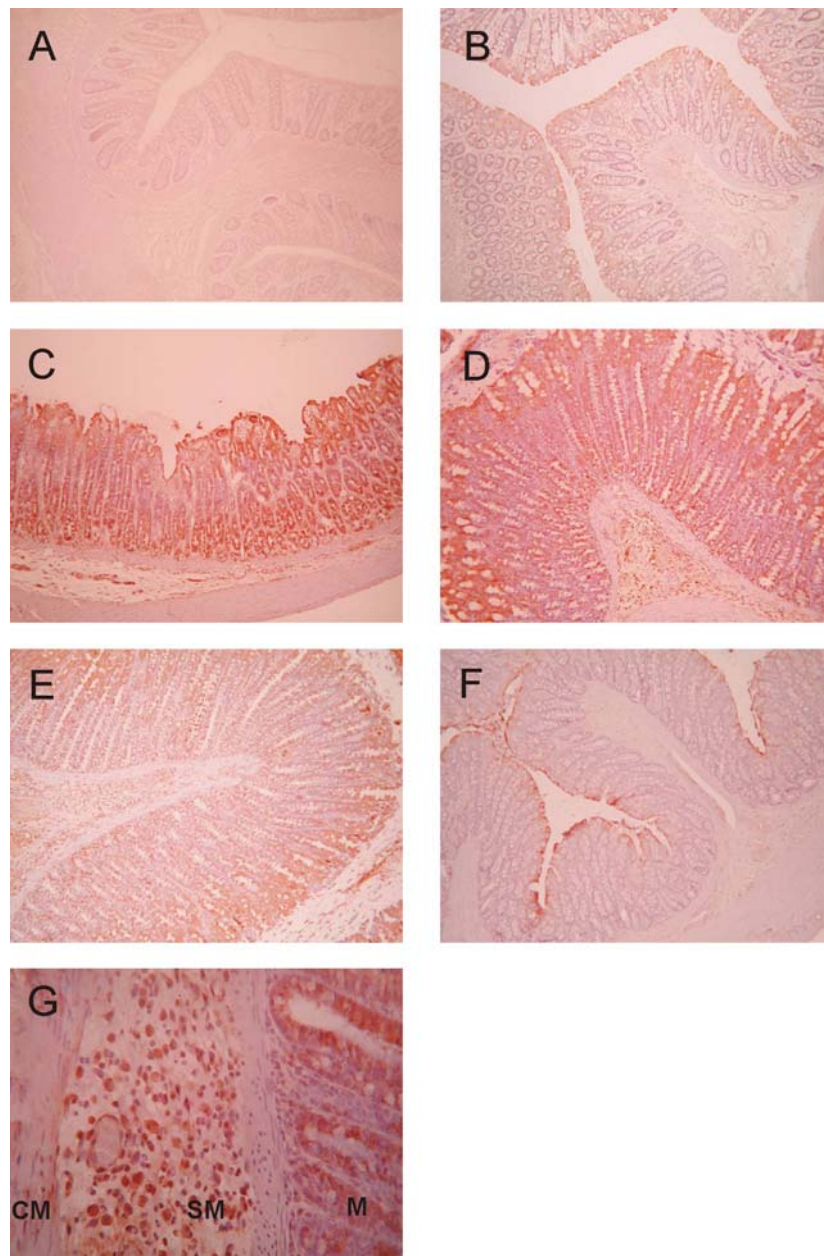


Figure 7. (A) Mechanical recording showing spontaneous colonic LAHF contractions from full thickness strips of non infected animals (A.1) and infected rats on days 2 PI (A.2), 6 PI (A.3), 14 PI (A.4) and 30 PI (A.5). Arrows indicate magnified LAHF contractions in the right panel (B) Bar diagram representing LAHF contraction amplitude (interval *b*) of full thickness strips. LAHF contractions always disappeared when the submucosal layer was removed. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

#### **1.4.6. Immunohistochemistry**

In healthy rat colon, there was a weak iNOS immunoreactivity localized in epithelial cells and in scarce cells in the mucosal *lamina propria* and submucosa. Some myenteric ganglia presented light diffuse staining as well. Figure 8 illustrates iNOS immunoreactivity in normal (Fig. 8B) and inflamed colon on days 2 (Fig. 8C), 6 (fig. 8D), 14 (Fig. 8E) and 30 PI (Fig. 8F). Two days after *T. spiralis* infection, inflammation was accompanied by a dramatic increase in iNOS immunoreactivity in mucosal epithelial cells and in infiltrating inflammatory macrophages and neutrophils in the submucosa. Six days after the induction of colitis, the number of iNOS immunoreactive cells was increased in the submucosa compared to that observed 2 days after the induction of colitis. A reduction of iNOS immunoreactive epithelial cells was observed in the colon examined 14 days after the induction of colitis compared to 2 and 6 days PI. However, iNOS immunoreactivity in the infiltrating cells was still present in the submucosa of the inflamed tissue. Colon taken 30 days PI showed similar iNOS immunoreactivity than colon from sham rats.



*Figure 8.* Immunoreactivity to iNOS in the rat colon. (A) Negative control (section without primary antibody). (B) Occasional weak iNOS immunoreactivity was observed in epithelial cells and in scarce cells in the mucosal *lamina propria* and submucosa in sham rats. (C) Two days after the induction of colitis, a dramatic increase of iNOS immunoreactivity was found in the epithelium as well as in the *lamina propria*. (D) 6 days PI, the number of iNOS immunoreactive cells was increased in the submucosa. (E) Tissue from 14 days PI presented a reduction of iNOS immunoreactive epithelial cells; iNOS immunoreactivity in the infiltrating cells remained in the submucosa. (F) Colon taken on day 30 PI showed similar iNOS immunoreactivity to sham rats. (G) Higher magnification of some iNOS immunoreactive cells in the submucosa of 6 days PI rats (CM: circular muscle; SM: submucosal layer; M: mucosal layer). Magnifications: x100 (A-F); x 400 (G).

### 1.5. Discussion

In the present study, we used intra-rectal administration of *Trichinella spiralis* larvae to induce colonic inflammation and assessed the changes 2, 6, 14 and 30 days PI. Oral *T. spiralis* infection is commonly used as a model to investigate changes related to small intestinal inflammation. In contrast, few reports study the inflammatory response of colonic tissue in front to this nematode (Grossi et al., 1993; Jacobson et al., 1995). *T. spiralis*-induced colitis in rats has some clinical and pathological features reminiscent of those seen in human ulcerative colitis (UC) as infected animals undergo episodes of weight loss, decreased stool consistency with increased stool weight; inflammatory infiltrate mainly restricted in the mucosal and submucosal layers, decreased colonic motility and increased iNOS expression in the epithelium and the infiltrating cells (Reddy et al., 1991; Sands, 2004; Seldenrijk et al., 1991; Snape, Jr. et al., 1991). The changes found in other extensively used animal models like trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis appear to bear similarities to Crohn's disease rather than to ulcerative colitis as shown by the histopathological features -i.e. ulcers affect not only the mucosa and submucosa but also the muscular layers- (Morris et al., 1989).

Infected rats presented two episodes of food intake and body weight decrease occurring between 1st-4th and 11-15th days PI. Infected animals began to regain body weight from day 15 PI but they never attained the values exhibited by sham rats. These findings seem to correspond to the life cycle of the nematode. The first episode could represent the entry of the parasite into the mucosal layer; the second one could be due to the migration of the larvae from the mucosa to the circulatory system and striated muscle. The fact that only a few parasites were found in the mucosa on day 14 PI whereas a large number were found in the striated muscle from day 30 PI seems to support this idea. Reduced food intake rather than diarrhea appears to be the primary cause for body weight loss in small intestinal inflammation induced by oral administration of *T. spiralis* larvae (Castro et al., 1979) and it has been suggested that it is directly linked to intestinal inflammation (Faro et al., 2000).

Blood leukocyte counts were increased on days 6, 14 and 21 PI and neutrophilia and eosinophilia were the main features of the observed leukocytosis. This finding together with the decreased food intake shows that experimental colitis induced by *T. spiralis* is associated with a compromised immune status.



Colitic rats presented soft and semi formed stools and increased stool weight compared to controls from day 2 to 20 PI. Studies in patients with UC are in agreement with these findings, as stool weight was increased during the active phase of colitis. This could be related to exudation from the inflamed epithelium, increased secretion of mucus and reduced fluid and electrolyte absorption, since no apparent acceleration in whole-gut transit was observed (Rao and Read, 1990; Snape, Jr. et al., 1991).

Inflammatory cell infiltration was mainly restricted to mucosal and submucosal layers and epithelial sloughing and microulcerations were found throughout the colon. Colonic tissue from 14 days PI showed a chronic inflammatory infiltrate (mostly macrophages) compared to tissue from 2 and 6 days PI where the neutrophilic infiltrate was predominant. The microscopic pattern observed in this model shares similar features to UC regarding inflammatory reaction (cell type involved) and mucosal structure (shallow ulcers) (Seldenrijk et al., 1991). No abnormal findings were observed in tissue from 30 days PI rats.

Wet weight of full thickness colonic strips was decreased on day 2 PI compared to strips obtained from sham rats. This could probably be due to the disruption of the mucosa observed on the first days post infection. In contrast, strips taken on 14 days PI rats presented an increased wet weight compared to controls, probably due to the submucosal edema and exudation from epithelium, with no obvious changes in the thickness of muscle layers.

The present studies were restricted to the rat mid colon. Regional differences in aspects such as nitrergic innervation have been found in the rat colon (Takahashi and Owyang, 1998). We observed that spontaneous colonic phasic high amplitude low frequency (HALF) contractions from full thickness strips of infected animals are decreased (AUC and amplitude) from day 2 to 30 PI compared to controls. Furthermore, this weaker activity faded progressively on days 6 and 14 PI. Inflammation had no significant effect on the frequency of spontaneous *in vitro* phasic HALF contractions. Low amplitude high frequency (LAHF) contractions were altered on day 2 and 6 PI. The changes found consisted of a decreased AUC and amplitude on day 2 PI and increased amplitude and decreased frequency on day 6 PI. Studies in patients with UC (Rao and Read, 1990; Reddy et al., 1991; Snape, Jr. et al., 1991) as well as in other animal models of colitis (Grossi et al., 1993; Lu et al., 1997; Myers et al., 1997) have described decreased colonic contractility.

Two electrical and mechanical activity patterns have been previously recorded in the rat mid colon: HALF contractions associated to high amplitude membrane potential oscillations (MPOs) and LAHF contractions associated to low amplitude oscillations (slow waves) (Pluja et al., 2001). Two major populations of interstitial cells of Cajal (ICC) have been shown in the rat colon: one associated with the Auerbach's plexus (ICC-AP) and one with the submuscular plexus (ICC-SMP). Whereas ICC-AP have been suggested to regulate HALF contractions and MPOs, ICC-SMP may participate in LAHF contraction generation and slow wave regulation. Our findings show alterations in both, HALF and LAHF contractions. It cannot be ruled out that inflammation might induce changes in ICC function resulting in a modified pacemaker activity. In fact, ultrastructural alterations of SMP-ICC have been described in the colon of patients with UC (Rumessen, 1996) as well as in a canine colitis induced by ethanol and acetic acid (Lu et al., 1997) and in the small intestine of *T. spiralis* infected mice ((Wang et al., 2002).

When the mucosal and submucosal layers were removed, HALF contractions significantly increased and displayed a consistent pattern compared to full thickness strips of 6 and 14 days infected animals. However, contractility was still lower than that observed in control rats. These results may suggest that mucosal and submucosal layers play a chief role in the development of smooth muscle dysfunction and that permanent structural changes in smooth muscle layers are only partly responsible for the observed changes in motility (Liu et al., 2001; Xie et al., 1992). LAHF contractions were never recorded in strips devoid of submucosal layer as SMP-ICC had been removed with the dissection.

We observed weak iNOS immunoreactivity in epithelial and some infiltrating cells in healthy colon. This finding may result from the continuous mucosal exposure to an abundance of bacteria and has also been described by other investigators (McCafferty et al., 1999; Miampamba and Sharkey, 1999; Roberts et al., 2001). Colonic inflammation induced by *T. spiralis* infection is accompanied by a dramatic increase in iNOS immunoreactivity in the epithelium and inflammatory cells from 2, 6 and 14 days PI rats. The morphology of infiltrating cells suggests that they are most probably macrophages and neutrophils, which together with the epithelial cells would be the major source of nitric oxide (NO) generation in this model. NO might thus participate in the decreased contractility observed. An increased iNOS expression has been found in colon from patients with active ulcerative colitis (Kimura et al., 1998; Singer et al., 1996) as well as in animal models of colitis (McCafferty et al., 1999; Miampamba and

Sharkey, 1999). In contrast to most reports, Bian *et al* (Bian et al., 2001) showed a down-regulation of iNOS in the small intestine of *T. spiralis* infected mice (3 - 20 days PI). These differences could be due to differing responses to *T. spiralis* infection between small intestine and colon or to interspecies differences.

Our findings show that contractility on day 30 PI is still decreased eventhough nematodes were completely absent from the mucosa. At this stage, iNOS immunoreactivity was similar to sham rats, suggesting that it is the systemic inflammatory response, rather than the local irritation provoked by the parasite, the main cause of the impaired smooth muscle contractility. Supporting this, it has been shown that motility disturbances observed in rats infected by oral *T. spiralis* larvae do not require the presence of the parasite in the intestinal lumen and are mediated by the host's inflammatory reaction (Marzio et al., 1990) and that changes in motility persist even in non-inflamed areas (Tanovic et al., 2002).

Colonic mucosal inflammation induced by *T. spiralis* causes a marked decrease in the spontaneous contractility of the underlying circular smooth muscle. NO generated by iNOS in the colonic mucosa and submucosa might be one of the major, though not the only cause of the observed motor dysfunction. In summary, our study shows that *T. spiralis*-induced colitis in rats may be a useful model to study UC in view of the presence of some common features with this disease.

## 1.6. References

- Bian K, Harari Y, Zhong M, Lai M, Castro G, Weisbrodt N, Murad F (2001). Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase (NOS-2) during parasite-induced gut inflammation: a path to identify a selective NOS-2 inhibitor. *Mol Pharmacol* 59:939-947.
- Castro GA, Copeland EM, Dudrick SJ, Ramaswamy K (1979). Enteral and parenteral feeding to evaluate malabsorption in intestinal parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 28:500-507.
- Castro GA, Fairbairn D (1969). Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol* 55:51-58.
- Cohen JD, Kao HW, Tan ST, Lechago J, Snape WJ, Jr. (1986). Effect of acute experimental colitis on rabbit colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 251:G538-G545.
- Collins SM, Blennerhassett PA, Blennerhassett MG, Vermillion DL (1989). Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 257:G898-G903.

- Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109:1344-1367.
- Faro CJ, Reidelberger RD, Palmer JM (2000). Suppression of food intake is linked to enteric inflammation in nematode-infected rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R118-R124.
- Grossi L, McHugh K, Collins SM (1993). On the specificity of altered muscle function in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 104:1049-1056.
- Hurst SM, Collins SM (1994). Mechanism underlying tumor necrosis factor-alpha suppression of norepinephrine release from rat myenteric plexus. *Am J Physiol* 266:G1123-G1129.
- Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.
- Khan I, Collins SM (1994). Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 107:691-700.
- Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H (1998). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42:180-187.
- Liu X, Rusch NJ, Striessnig J, Sarna SK (2001). Down-regulation of L-type calcium channels in inflamed circular smooth muscle cells of the canine colon. *Gastroenterology* 120:480-489.
- Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK (1997). Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 273:G1233-G1245.
- Main C, Blennerhassett P, Collins SM (1993). Human recombinant interleukin 1 beta suppresses acetylcholine release from rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 104:1648-1654.
- Marzio L, Blennerhassett P, Chiverton S, Vermillion DL, Langer J, Collins SM (1990). Altered smooth muscle function in worm-free gut regions of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 259:G306-G313.
- McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P (1999). Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 45:864-873.
- Miampamba M, Sharkey KA (1999). Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11:193-206.
- Mizuta Y, Isomoto H, Takahashi T (2000). Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 118:714-723.

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

Myers BS, Martin JS, Dempsey DT, Parkman HP, Thomas RM, Ryan JP (1997). Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats. *Am J Physiol* 273:G928-G936.

Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G255-G266.

Rao SS, Read NW (1990). Gastrointestinal motility in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 172:22-28.

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

Roberts PJ, Riley GP, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ (2001). The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol* 54:293-297.

Ruhl A, Hurst S, Collins SM (1994). Synergism between interleukins 1 beta and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 107:993-1001.

Rumessen JJ (1996). Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 111:1447-1455.

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

Seldenrijk CA, Morson BC, Meuwissen SG, Schipper NW, Lindeman J, Meijer CJ (1991). Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 32:1514-1520.

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

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

Takahashi T, Owyang C (1998). Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in rats. *Gastroenterology* 115:1504-1512.

Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E (2002). Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from *Trichinella spiralis* infected rats. *Life Sci* 71:3121-3136.

Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD, Huizina JD (2002). Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol* 160:1529-1540.

Xie YN, Gerthoffer WT, Reddy SN, Cominelli F, Eysselein VE, Snape WJ, Jr. (1992). An abnormal rate of actin myosin cross-bridge cycling in colonic smooth muscle associated with experimental colitis. *Am J Physiol* 262:G921-G926.

## Capítol 2

### **Time course of neural & contractile disturbances in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis***

#### **2.1. Abstract**

Colitis induced by *Trichinella spiralis* in rat induces alterations in the spontaneous motor pattern displayed by circular colonic muscle (Auli and Fernandez, 2005). We examined the temporal relationship between the severity of inflammation and the altered contractility of the underlying circular muscle as well as the role of NANC inhibitory pathways in the disruption of the motility pattern. Colitis was induced by intrarectal administration of *T. spiralis* larvae. Responses to acetylcholine (ACh) and increased extracellular potassium as well as the effect of tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu$ M), L-nitro-N-arginine (L-NOARG, 1 mM) and apamin (1  $\mu$ M) were determined *in vitro* in the organ bath with circular muscle strips from sham and infected rats at days 2-30 postinfection (PI). Microelectrode recordings were performed to study the putative changes in electrical activity of colonic smooth muscle cells. Responses to ACh and KCl were decreased at all days PI compared to sham. Intracellular calcium depletion had a greater inhibitory effect in inflamed tissue (6-14 PI). The effect of TTX, L-NOARG and apamin on the spontaneous contractions was found to be altered in all infected rats, i.e. their effects were transient and milder. Inflamed tissue showed lower resting membrane potential and a decreased duration of inhibitory junction potentials induced by electrical stimulation. These data suggest that the decreased contractility of colonic circular smooth muscle induced by the intrarectal *T. spiralis* infection results from the impairment of the excitation-contraction coupling, from a persistent hyperpolarization of smooth muscle cells and from impaired NANC inhibitory neurotransmission.

#### **2.2. Introduction**

Patients with ulcerative colitis (UC) suffer severe motility disorders such as decreased colonic motility and abnormal colonic transit pattern (Rao et al., 1987; Reddy et al., 1991). The characteristic symptoms of these patients are diarrhoea and abdominal pain (Sands, 2004), which may result from altered function of smooth muscle, enteric nerves or both.

In vitro studies using colonic muscle strips obtained from patients with ulcerative colitis and from animal models of colitis support the idea that colitis is accompanied by a decrease in the contractility of smooth muscle from the inflamed area (Auli and Fernandez, 2005; Bossone et al., 2001; Cohen et al., 1986; Depoortere et al., 1999; Grossi et al., 1993; Mourelle et al., 1996; Myers et al., 1997; Rao and Read, 1990; Reddy et al., 1991). Decreased responses to excitatory agonists, together with calcium influx impairment and down regulation of L-type calcium channels have been reported and related to the suppression of contractility in the inflamed state (Grossi et al., 1993; Myers et al., 1997). Moreover, alterations in neural function and altered neurotransmitter release have also been described in different experimental models (Collins et al., 1989; Eysselein et al., 1991; Jacobson et al., 1995; Miampamba and Sharkey, 1998; Mizuta et al., 2000; Sanovic et al., 1999) and in colon from patients with UC (Tomita et al., 1998; Tomita and Tanjoh, 1998).

*Trichinella spiralis* infection has been extensively used to induce inflammation of duodenum and jejunum in rodents (Collins et al., 1989; Der et al., 2000; Galeazzi et al., 2000; Khan and Collins, 1993) and hypertrophy of the muscle layers and hypermotility have been constant features of these studies (Tanovic et al., 2002). Nevertheless, there is lack of data indicating the effect of this parasite in the colonic physiology (Grossi et al., 1993). In a recent study, we have characterized the model of colitis induced by intra rectal administration of *T. spiralis* in rat (Auli and Fernandez, 2005). The main findings that we observed in these animals and reminiscent of those seen in UC were: (1) presence of diarrhoea, (2) decreased spontaneous motility, (3) inflammatory lesions mainly restricted to the mucosa and submucosa and (4) increased iNOS immunoreactivity in the epithelium and inflammatory infiltrate within the *lamina propria* and submucosa. Therefore, we have used this model to investigate the effect of colitis on the neuromuscular function and NANC inhibitory neurotransmission in the rat colon. In fact, our group had previously characterized the inhibitory neurotransmission of the rat colon and shown that the electrically-induced inhibitory junction potential is mainly purinergic and nitrergic (Pluja et al., 1999).



Specifically, the aims of this study were to (1) determine in vitro the time-course of mucosal inflammation induced by *T. spiralis* and its correlation with the altered contractility (2) the effect of colitis on extracellular and intracellular calcium handling in the ACh-induced contraction of circular muscle and (3) the effect of colonic inflammation on the NANC inhibitory neurotransmission.

### **2.3. Material and methods**

#### **2.3.1. Animal model**

Male Sprague-Dawley rats (325-350g) were purchased from Charles River (Lyon, France) and were housed in a room with constant temperature (23°C) and light-dark cycles (12:12h). Standard rodent food and tap water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the local Ethical Committee.

#### **2.3.2. Induction of colitis**

Colitis was induced by intra-colonic instillation of 5000 *Trichinella spiralis* larvae suspended in 1 mL saline. The larvae were obtained according to the method described by Castro and Fairbairn . Each rat was lightly anesthetized with halothane, and a polyethylene cannula (2 mm diameter) was inserted into the lumen of the colon 8 cm to the anus. Next, a flush volume of 1- mL saline (0.9%) was instilled and fecal matter was removed by manual palpation. Finally, each rat received 1-mL of a suspension of *T. spiralis* larvae. Control animals were treated identically except that, instead of *T. spirals* larvae, they received 1-mL normal saline. Animals were studied 2, 6, 14 and 30 days PI.

#### **2.3.3. Tissue preparation**

After an overnight (18h) fasting with *ad libitum* access to water the rats were killed by decapitation and bled. The colon was then removed and placed in Krebs solution of the following composition (in mM): glucose 10.10; NaCl 115.48; NaHCO<sub>3</sub> 21.9; KCl 4.61; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.14; CaCl<sub>2</sub> 2.50 and MgSO<sub>4</sub> 1.16, bubbled with a mixture of 5% CO<sub>2</sub>-95%O<sub>2</sub> (pH 7.4). Both studies of inhibitory neurotransmission (organ bath and microelectrode) were carried out under nonadrenergic noncholinergic conditions (atropine, propranolol and phentolamine, 1 μM). Organ bath studies were performed in full thickness strips except for excitation-contraction coupling

studies and for membrane potential recording which were performed with tissue devoid of mucosal and submucosal layers.

#### **2.3.4. Recordings of spontaneous mechanical activity**

A piece of mid colon was pinned flat (mucosal side up) in a sylgard bottomed dissecting dish filled with carbogenated Krebs solution. Circular muscle strips were cut (3 mm x 10 mm) for each rat and placed in individual 10 mL organ bath containing warm (37°C) carbogenated Krebs solution. The upper end was attached to an isometric force transducer (Harvard UF-1, Apparatus Inc., Holliston, Massachusetts, USA) connected to an amplifier and then to a computer. Data were digitized (25 Hz) and simultaneously displayed and collected using Datawin 2 software (Panlab-Barcelona) coupled to an ISC-16 A/D card installed in a computer. A tension of 1 g was applied and the tissue was allowed to equilibrate for 1 h. After this period the strips displayed spontaneous phasic contractions that were recorded.

In order to avoid confusion respect nomenclature to define the type of contractions observed, we have used terms that we had previously used to describe motility of the rat colon (Auli and Fernandez, 2005; Pluja et al., 2001): full-thickness strips from rat mid colon display low-frequency electrical rhythm which provokes muscular action potentials and high-amplitude contractions (High Amplitude Low Frequency (HALF) contractions). HALF contractions are superimposed with slow waves corresponding to the low-amplitude mechanical activity (Low Amplitude High Frequency (LAHF) contractions). It is worth to note that in the present study we have only analysed HALF contractions. The amplitude (g), area under curve (AUC; g · s) and frequency of contractions (contractions/min) were measured in time intervals of 10 min. The interval analysed was the 20-30 min interval of spontaneous activity from the recording start and the same time interval after drug addition (tetrodotoxin (TTX, 1 µM), N-nitro-L-arginine (L-NOARG, 1mM) or apamin (1 µM)).

Contractility. For the dose-response experiments, muscle strips from control and infected animals were stimulated with ACh (0.01 µM to 100 µM) and KCl (5-40 mM).

Zero extracellular calcium experiments. In separate experiments, muscle strips from control and infected rats (6 days PI) were stimulated with 100 µM ACh in normal calcium-containing buffer and in buffer devoid of calcium and containing 1 mM ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'- tetraacetic acid (EGTA) (calcium-free buffer). Tissues were

stimulated 30 s after exposure to calcium-free buffer solution. The magnitude of the contractile response in calcium-free buffer was expressed as the percent decrease of the control response recorded immediately before exposure to the calcium-free buffer.

Nifedipine experiments. Manipulation of extracellular calcium influx into the colonic smooth muscle was also carried out by incubating the tissues for 5 min in normal buffer solution containing the L-type calcium channel blocker nifedipine (1  $\mu$ M) before ACh (100  $\mu$ M) stimulation. The contractile response in the presence of nifedipine was expressed as the percent decrease of the control response recorded immediately before exposure to the calcium channel blocker.

Intracellular calcium depletion experiments. Depletion of intracellular calcium stores was performed using a previously described protocol (Myers et al., 1997). Briefly, muscle strips were contracted for 20 min by adding 40 mM KCl to normal calcium buffer solution followed by the addition of 40 mM KCl calcium-free buffer solution. Muscle strips were stimulated repeatedly with 100  $\mu$ M ACh until no contractions were evident. This was followed by immediate exposure of the muscle strips to normal buffer solution containing ACh 100  $\mu$ M. The contractile response achieved after stimulation of the calcium-depleted muscle was expressed as the percent of the contraction obtained in presence of normal calcium buffer.

### **2.3.5. Microelectrode recordings**

Muscle strips were placed (circular muscle side up) in a Sylgard-coated chamber and continuously perfused with carbogenated Krebs solution at 37°C. Preparations were pinned for intracellular recordings and allowed to equilibrate for 1 h before experiments started. Circular muscle cells were impaled with glass microelectrodes ( $R= 40\text{-}60\text{ M}\Omega$ ) filled with 3 M KCl. The membrane potential was measured using a standard electrometer (Duo 773 WPI, FL, USA). Data were displayed on a digital storage oscilloscope 4026 (Racal-Dana Ltd., England) and simultaneously digitized (100 Hz) and collected using EGAA software coupled to an ISC-16 A/D card (RC Electronics, CA, USA) installed in a computer.

Electrical field stimulation (EFS) was applied using two AgCl plates placed perpendicular to the longitudinal axis of the preparation and 1.5 cm apart. Train stimulation had the following parameters: total duration 100 ms, frequency 20 Hz, pulse duration 0.3 ms and increasing

amplitude strengths (5, 10, 12, 17, 20 and 25 V). The amplitude and duration of inhibitory junction potentials (IJP) were measured under control conditions and after infusion of each drug.

### **2.3.6. Solution and drugs**

The following drugs were used: nifedipine, N-nitro-L-arginine (L-NOARG), phentolamine, ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N, N, N', N'- tetraacetic acid (EGTA) and acetylcholine chloride (ACh) (Sigma Chemicals, St. Louis, USA); tetrodotoxin (TTX), atropine sulphate, propranolol, apamin (Research Biochemicals International, Natick, USA). Stock solutions were made by dissolving drugs in distilled water except for nifedipine which was dissolved in ethanol. The final concentration of ethanol in the organ bath did not exceed 0.1 %.

### **2.3.7. Data analysis and statistics**

Data are expressed as mean  $\pm$  s.e. mean. Paired Student's t-test was used to compare mechanical activity in the absence and in the presence of drugs in the time intervals analysed. Student's t-test for unpaired data was used to compare the differences between groups of animals. Differences between amplitude or duration of the IJPs before and after drug infusion were compared by two-way ANOVA for repeated measures; IJP's differences between groups or differences between dose-response curves in the organ bath were compared by two way ANOVA for non repeated measures. A *P* value  $<0.05$  was considered statistically significant.

## **2.4. Results**

### **Organ bath studies**

#### **2.4.1. Inhibitory neurotransmission-effect of TTX on mechanical activity**

In sham animals, tetrodotoxin (TTX 1 $\mu$ M) significantly ( $P<0.001$ ;  $n = 6$ ) increased the AUC ( $71.49 \pm 20.82$  vs.  $301.3 \pm 45.74$  g  $\cdot$  s), the amplitude ( $1.87 \pm 0.47$  vs.  $7.57 \pm 1.70$  g) and the frequency of contractions ( $0.52 \pm 0.05$  vs.  $0.88 \pm 0.06$  contractions /min). This increased motility persisted until the drug was washed out (see first panel in figure 1).

On day 2 PI ( $n = 6$ ), tissue from 50 % of the infected animals was refractory to TTX. In 3 animals, TTX increased the AUC ( $16.78 \pm 5.98$  vs.  $57.69 \pm 10.56$  g  $\cdot$  s;  $P<0.05$ ) and the amplitude ( $0.23 \pm 0.07$  vs.  $1.51 \pm 0.47$  g; ns). However, the frequency remained unchanged ( $0.64 \pm 0.22$  vs.  $0.61 \pm 0.17$  contractions/min; ns).

On day 6 PI (n = 4), TTX transiently increased spontaneous motility although activity progressively faded throughout time. Consequently, no significant differences were found in the time interval analysed upon TTX addition: AUC ( $46.27 \pm 9.28$  vs.  $46.66 \pm 7.45$  g·s), amplitude ( $0.83 \pm 0.24$  vs.  $0.74 \pm 0.18$  g) and frequency ( $0.65 \pm 0.05$  vs.  $0.59 \pm 0.09$  contractions/min) of contractions.

Opposite to controls, TTX addition induced no significant changes on the spontaneous motility of infected animals on day 14 PI (n = 6): AUC ( $33.41 \pm 13.31$  vs.  $35.67 \pm 11.63$  g · s), amplitude ( $0.77 \pm 0.17$  vs.  $1.08 \pm 0.28$  g) and frequency ( $0.52 \pm 0.11$  vs.  $0.55 \pm 0.09$  contractions/min) of contractions.

On day 30 PI (n = 4), the response to TTX seemed to recover: the AUC ( $15.93 \pm 5.11$  vs.  $85.05 \pm 16.88$  g · s;  $P < 0.05$ ), amplitude ( $0.68 \pm 0.22$  vs.  $1.43 \pm 0.38$  g;  $P < 0.05$ ) and frequency ( $0.33 \pm 0.06$  vs.  $0.79 \pm 0.1$  contractions/min;  $P < 0.01$ ) of contractions significantly increased after TTX addition.

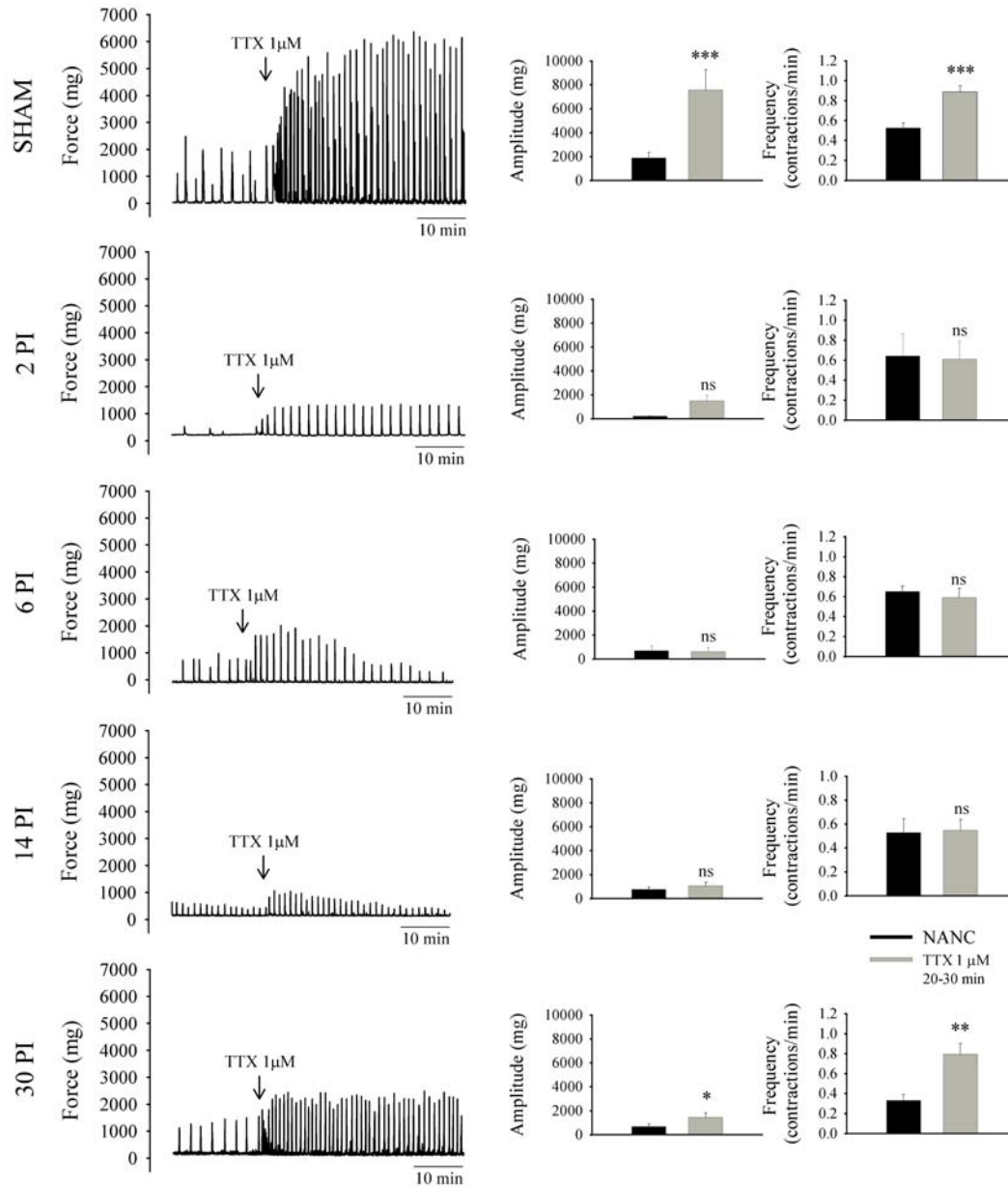


Figure 1. Representative mechanical recordings and bar diagrams showing the effects of TTX (1 μM) on the spontaneous contractions in sham rats and infected animals (day 2, 6, 14 and 30 PI). Note that the intervals analysed were: 20-30 min of spontaneous contractions and 20-30 min after drug addition. \* P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

### 2.4.2. Inhibitory neurotransmission-effect of inhibition of NO synthase

L-NOARG (1 mM) caused significant increases of AUC ( $95.36 \pm 16.94$  vs.  $577.4 \pm 163.3$  g · s;  $P < 0.05$ ), amplitude ( $2.82 \pm 0.39$  vs.  $7.05 \pm 1.53$  g;  $P < 0.05$ ) and frequency ( $0.61 \pm 0.07$  vs.  $1.01 \pm 0.1$ ;  $P < 0.05$ ) of contractions in sham animals ( $n = 7$ ) (figure 2, upper panel).

On day 2 PI, tissue taken from 2 out of 6 rats was totally refractory to L-NOARG addition. In contrast, tissue from 4 out of 6 animals responded to this drug though the increase in activity observed was not significantly different from the activity observed in the preceding control interval : AUC ( $14.69 \pm 6.44$  vs.  $59.51 \pm 28.21$  g · s; ns), amplitude ( $0.23 \pm 0.12$  vs.  $0.81 \pm 0.3$  g; ns) and frequency ( $0.32 \pm 0.26$  vs.  $0.69 \pm 0.17$  contractions/min; ns) of contractions.

On day 6 PI ( $n = 5$ ), L-NOARG (1 mM) did not increase the AUC ( $22.11 \pm 8.65$  vs.  $52.27 \pm 21.96$  g · s; ns) and amplitude ( $0.98 \pm 0.43$  vs.  $1.65 \pm 0.64$  g; ns) of contractions. In contrast, the frequency of contractions significantly increased ( $0.57 \pm 0.07$  vs.  $0.77 \pm 0.07$  contractions/min;  $P < 0.01$ ) after the addition of the drug.

L-NOARG significantly increased the AUC ( $45.04 \pm 16.68$  vs.  $106.8 \pm 27.5$  g · s;  $P < 0.01$ ), the amplitude ( $1.03 \pm 0.27$  vs.  $2.03 \pm 0.55$  g;  $P < 0.05$ ) and the frequency ( $0.45 \pm 0.09$  vs.  $0.81 \pm 0.08$  contractions/min;  $P < 0.05$ ) of contractions in strips taken from animals on day 14 PI ( $n = 7$ ).

On day 30 PI, L-NOARG induced a significant increase of contractions: AUC ( $27.05 \pm 8.91$  vs.  $98.79 \pm 15.71$  g · s;  $P < 0.05$ ), amplitude ( $0.81 \pm 0.47$  vs.  $1.74 \pm 0.66$  g;  $P < 0.05$ ) and frequency ( $0.28 \pm 0.09$  vs.  $1.11 \pm 0.13$  contractions/min;  $P < 0.05$ ).

### 2.4.3. Inhibitory neurotransmission-effect of apamin on mechanical activity

Apamin addition (1  $\mu$ M) to control tissue ( $n = 5$ ) increased the AUC ( $78.79 \pm 13.6$  vs.  $172.30 \pm 15.34$  g · s;  $P < 0.05$ ), the amplitude ( $1.95 \pm 0.50$  vs.  $4.05 \pm 0.89$  g;  $P < 0.05$ ) and the frequency ( $0.4 \pm 0.06$  vs.  $0.72 \pm 0.06$  contractions/min;  $P < 0.05$ ) of contractions (see figure 3).

In contrast to sham animals, apamin did not significantly increase neither the AUC ( $17.23 \pm 6.96$  vs.  $48.62 \pm 11.30$  g x s; ns) nor the amplitude ( $0.50 \pm 0.09$  vs.  $1.02 \pm 0.35$  g; ns) and the frequency ( $0.39 \pm 0.15$  vs.  $0.46 \pm 0.02$  contractions/min; ns) of contractions in strips of day 2 PI ( $n = 4$ ).

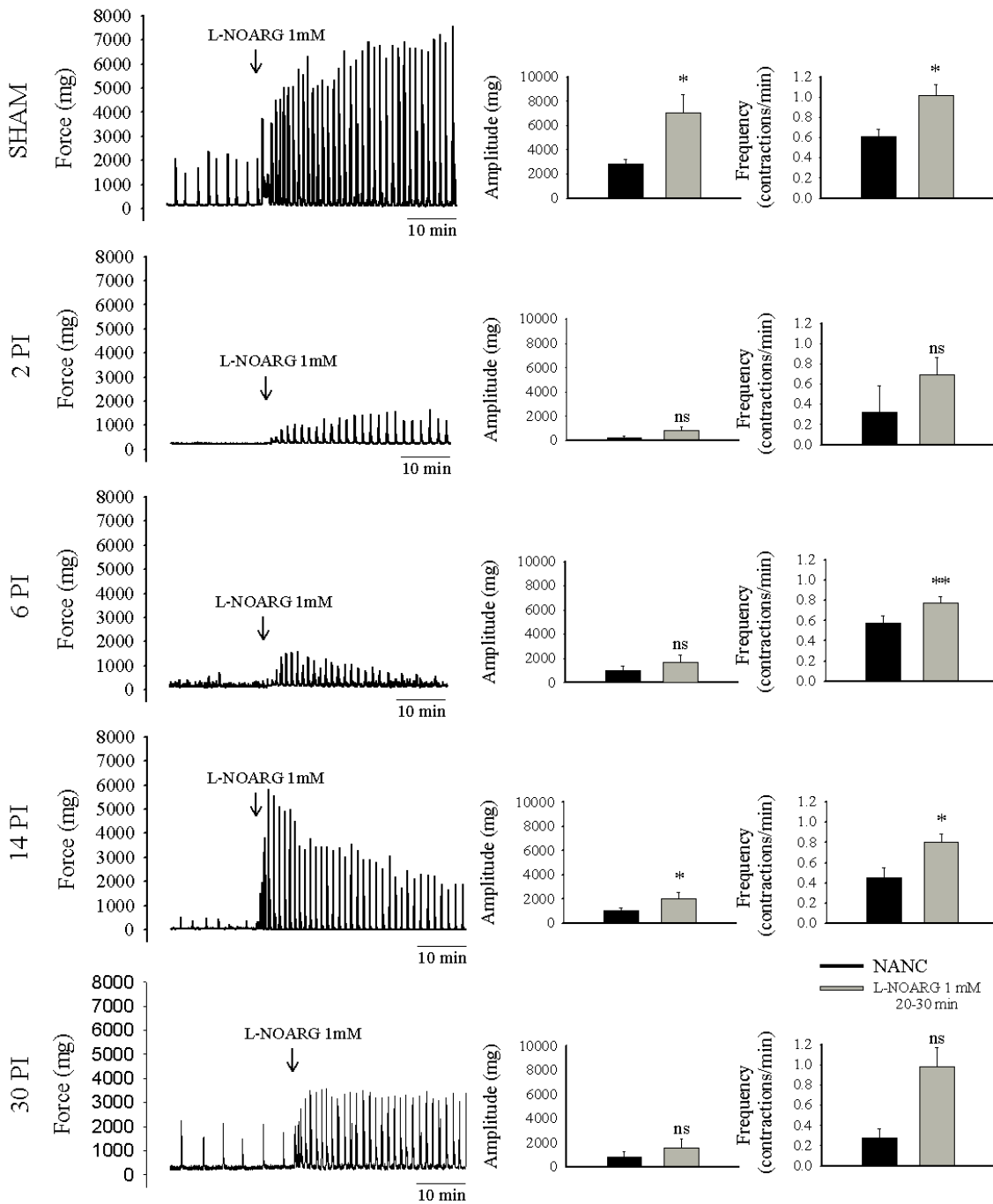


Figure 2. Representative mechanical recordings and bar diagrams showing the effects of L-NOARG (1 mM) on the spontaneous mechanical activity under NANC conditions in sham rats and infected animals (day 2, 6, 14 and 30 PI). Note that the intervals analysed were: 20-30 min of spontaneous activity and 20-30 min after drug addition. \* P<0.05, \*\*P<0.01



On day 6 PI (n = 5), apamin did not significantly increase neither the AUC ( $62.7 \pm 14.8$  vs.  $30.15 \pm 11.57$  g x s; ns) nor the amplitude ( $1.31 \pm 0.28$  vs.  $0.87 \pm 0.10$  mg; ns) and the frequency ( $0.73 \pm 0.07$  vs.  $0.68 \pm 0.11$  contractions/min; ns) of contractions.

On day 14 PI (n = 8), the tissue displayed only a mild increase of spontaneous motility in response to apamin addition: AUC ( $19.58 \pm 9.05$  vs.  $30.22 \pm 7.01$  g x s; ns), amplitude ( $0.74 \pm 0.13$  vs.  $1.12 \pm 0.30$  g; ns) and frequency ( $0.54 \pm 0.09$  vs.  $0.67 \pm 0.1$  contractions/min;  $P < 0.05$ ).

On day 30 PI (n = 4), the response to apamin was partly restored, though the spontaneous activity both before and after apamin addition was still dramatically decreased: AUC ( $53.97 \pm 15.55$  vs.  $84.69 \pm 13.5$  g x s;  $P < 0.05$ ), amplitude ( $0.74 \pm 0.28$  vs.  $1.23 \pm 0.04$  g; ns) and frequency ( $0.46 \pm 0.11$  vs.  $0.68 \pm 0.08$  contractions/min;  $P < 0.05$ ).

#### **2.4.4. Contractile activity**

Figure 4 shows the ACh dose-response curves obtained from sham and infected rats 2, 6, 14 and 30 days PI. In all groups, stimulation with ACh caused sharp contractions and a dose-dependent increase in force with the maximal response \*\* being achieved at 100  $\mu$ M. Ach. The contractile response to ACh 10  $\mu$ M was significantly decreased at days 2 PI ( $0.41 \pm 0.19$  g;  $P < 0.001$ ), 6 PI ( $3.78 \pm 0.29$  g;  $P < 0.001$ ), 14 PI ( $1.35 \pm 0.56$  g;  $P < 0.01$ ), and 30 PI ( $2.8 \pm 0.92$  g;  $P < 0.05$ ) compared to sham rats ( $6.3 \pm 0.7$  g).

Figure 5 shows the KCl dose-response curves obtained from sham and infected rats 2, 6, 14 and 30 days PI. In all experimental groups, the increase in extracellular potassium caused sustained contractions with the maximal contractile response developing when KCl concentration was \*\* 30 mM KCl. The contractile response to 30 mM KCl was significantly decreased at days 2 PI ( $1.09 \pm 0.50$  g;  $P < 0.001$ ), 6 PI ( $2.23 \pm 0.45$  g;  $P < 0.01$ ), 14 PI ( $1.51 \pm 0.41$  g;  $P < 0.05$ ) and 30 PI ( $1.41 \pm 0.42$  g;  $P < 0.001$ ) compared to controls ( $5.20 \pm 0.74$  g).

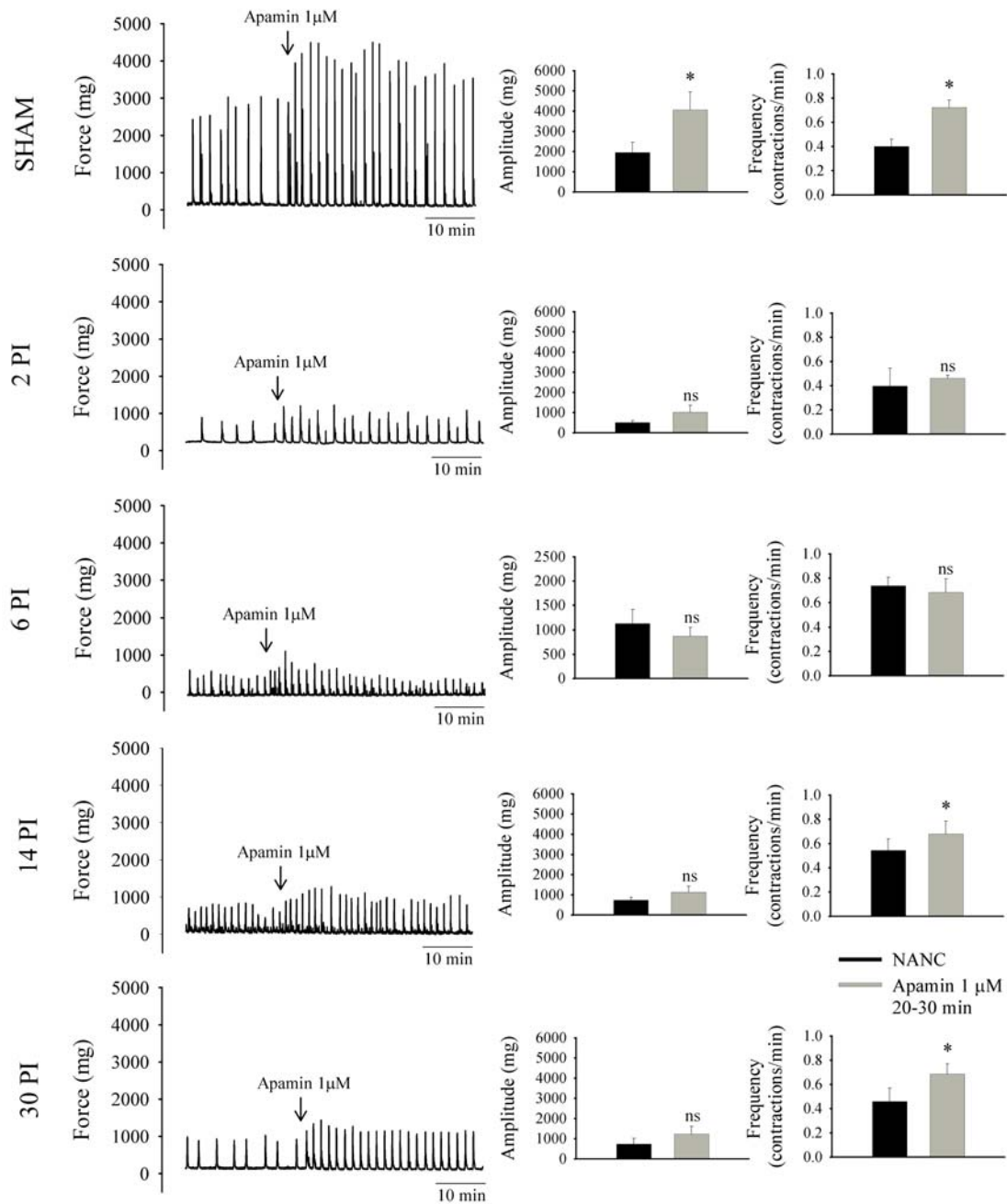


Figure 3. Mechanical recordings from the circular muscle layer and bar diagrams showing the response to apamin (1 μM) on the spontaneous mechanical activity in sham rats and infected animals (days 2, 6, 14 and 30 PI). Note that the intervals analysed were: 20-30 min of spontaneous activity and 20-30 min after drug addition. \* P<0.05

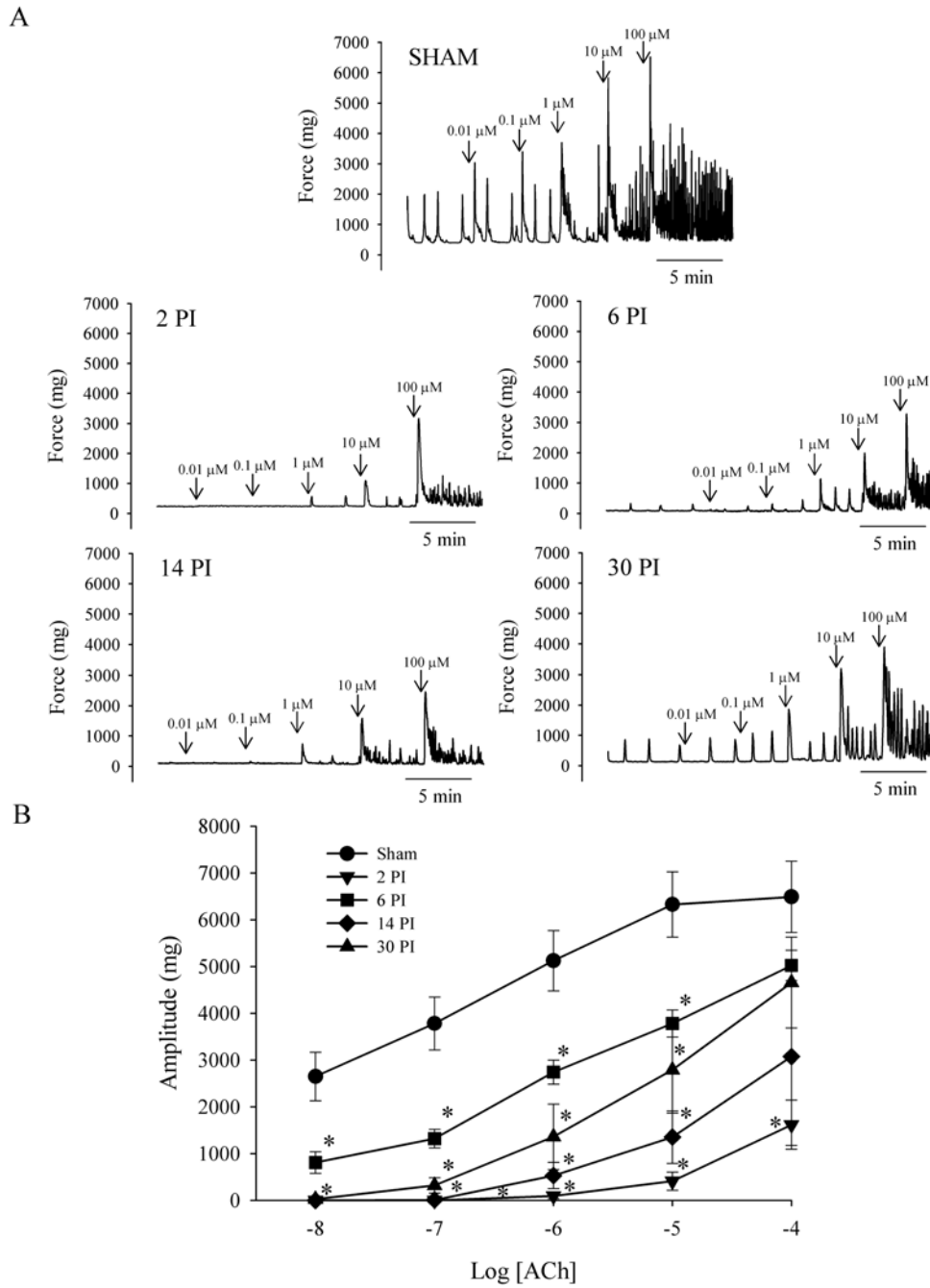


Figure 4. (A) Mechanical recordings showing ACh dose response of circular smooth muscle from the mid colon of sham and infected rats. (B) ACh dose response curves of each experimental animal group. \*  $P < 0.05$

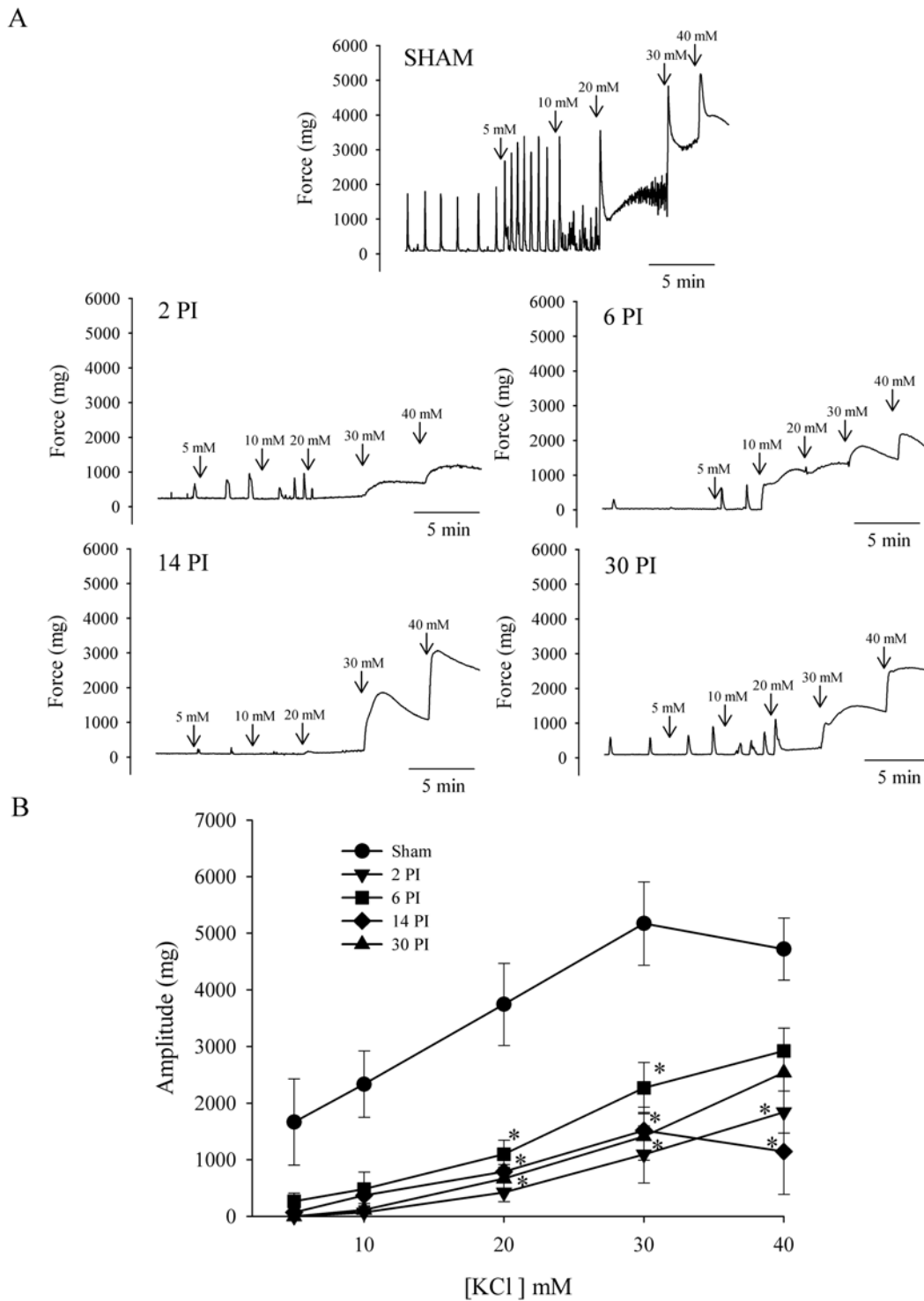


Figure 5. (A) Mechanical recordings showing KCl dose response of circular smooth muscle from the mid colon of sham and infected rats. (B) KCl dose response curves of each experimental animal group. \* P<0.05

*Contractile activity in calcium-free conditions*

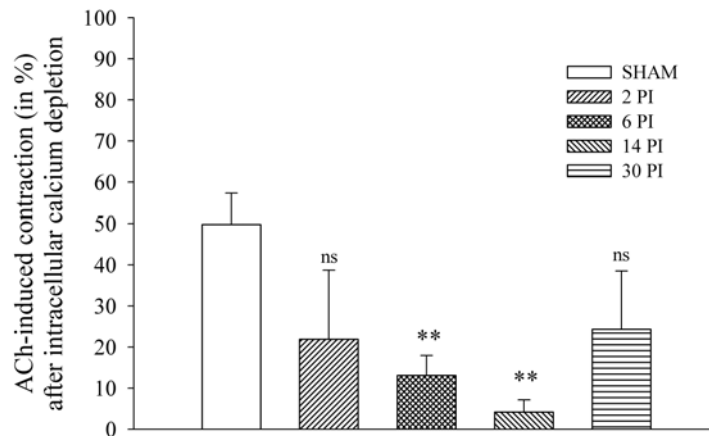
The contractile response to 100  $\mu$ M ACh in calcium-free buffer was significantly lower than that obtained in normal buffer. The decrease in this response was similar for both infected (6 days PI) and healthy tissue (infected  $98.34 \pm 0.71$  %,  $n = 6$  vs. sham  $94.02 \pm 3.33$  %,  $n = 6$ ; ns)

*Response to nifedipine 1  $\mu$ M*

Nifedipine (1  $\mu$ M) decreased ACh-induced contractions (100  $\mu$ M) of colonic smooth muscle to a similar extent in both sham and infected rats (sham  $97.06 \pm 0.94$  %,  $n = 6$  vs. infected  $99.49 \pm 0.25$  %; ns).

*Calcium depletion experiments*

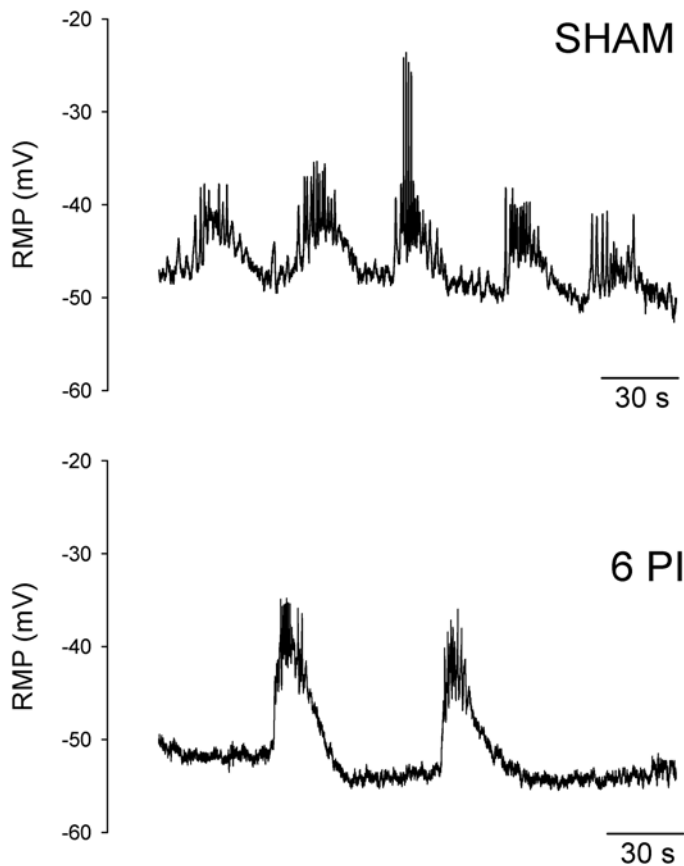
Depletion of intracellular calcium stores significantly decreased the contractile response to ACh (100  $\mu$ M) in both control and infected rats. However, the ACh-induced contraction after calcium depletion was significantly decreased ( $P < 0.01$ ) on day 6 and 14 PI ( $13.07 \pm 4.88$ % and  $4.19 \pm 2.95$ %;  $n = 4$ ) compared to sham ( $52.64 \pm 8.61$ %;  $n = 6$ ). See figure 6.



*Figure 6.* Effect of intracellular calcium depletion on 100  $\mu$ M ACh-induced contraction of circular smooth muscle from mid colon of sham and infected rats. Results are expressed as percent ACh response obtained immediately before intracellular calcium depletion. \*\*  $P < 0.01$

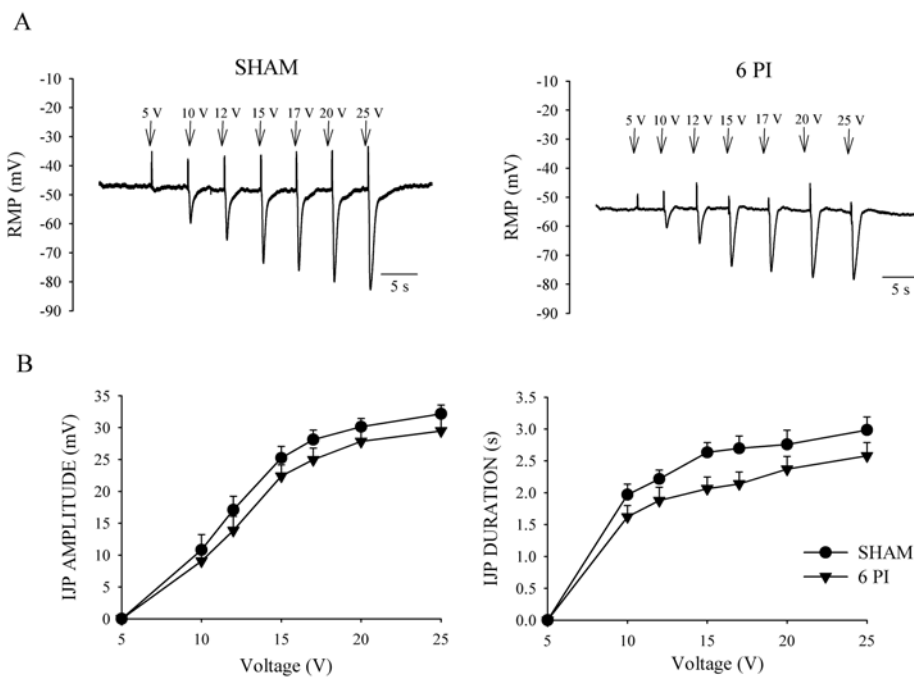
### 2.4.5. Electrophysiological studies

Circular muscle strips devoid of submucosa developed spontaneous electrical activity that consisted of cyclic depolarizations (sham  $14.76 \pm 2.27$  mV;  $25.4 \pm 0.54$  s vs. infected (6 PI)  $16.05 \pm 0.65$  mV;  $16.07 \pm 1.87$  s; n = 4) which triggered several action potentials. No significant differences in the amplitude and duration of myenteric potential oscillations (MPOs) were found between control and infected animals (see figure 7). In the presence of nifedipine ( $1\mu\text{M}$ ), myenteric potential oscillations and spontaneous contractions were abolished and the resting membrane potential (RMP) remained unaltered in all experimental groups. Thus, intracellular recordings were systematically performed in the presence of nifedipine since the absence of mechanical activity increased the duration of impalements. In strips taken on day 6 PI (n = 16), the RMP was lower than that observed in sham animals (n = 8) ( $-56.5 \pm 2.42$  vs.  $-45.88 \pm 2.04$  mV;  $P < 0.01$ ).



*Figure 7.* Intracellular recordings showing the spontaneous cyclic depolarizations of the circular muscle of sham vs. infected (6 PI) colonic preparations. Note that slow waves were not recorded between the cyclic depolarizations since the submucosa had been previously stripped away.

In both sham and infected rats, electrical field stimulation evoked a transient hyperpolarization designated as “inhibitory junction potential” (IJP) which consisted typically of two phases: a fast hyperpolarization followed by a slow one. These phases were characterized by the amplitude and the duration of the transient hyperpolarization respectively. Both parameters increased when increasing voltages were applied. The maximal response in sham animals ( $30.78 \pm 0.89$  mV in amplitude and  $2.87 \pm 0.19$  s in duration) was reached for stimuli of 25 V. On day 6 PI, the maximal response was reached at the same voltage ( $28.93 \pm 1.78$  mV and  $2.55 \pm 0.16$  s in duration). Though there was no differences in the maximal amplitude and duration of the IJP in infected *vs.* sham tissue, the overall process was modified as shown by the curve stimulation voltage *vs.* IJP duration ( $P < 0.001$ ; Two-way ANOVA, unpaired data; figure 8).



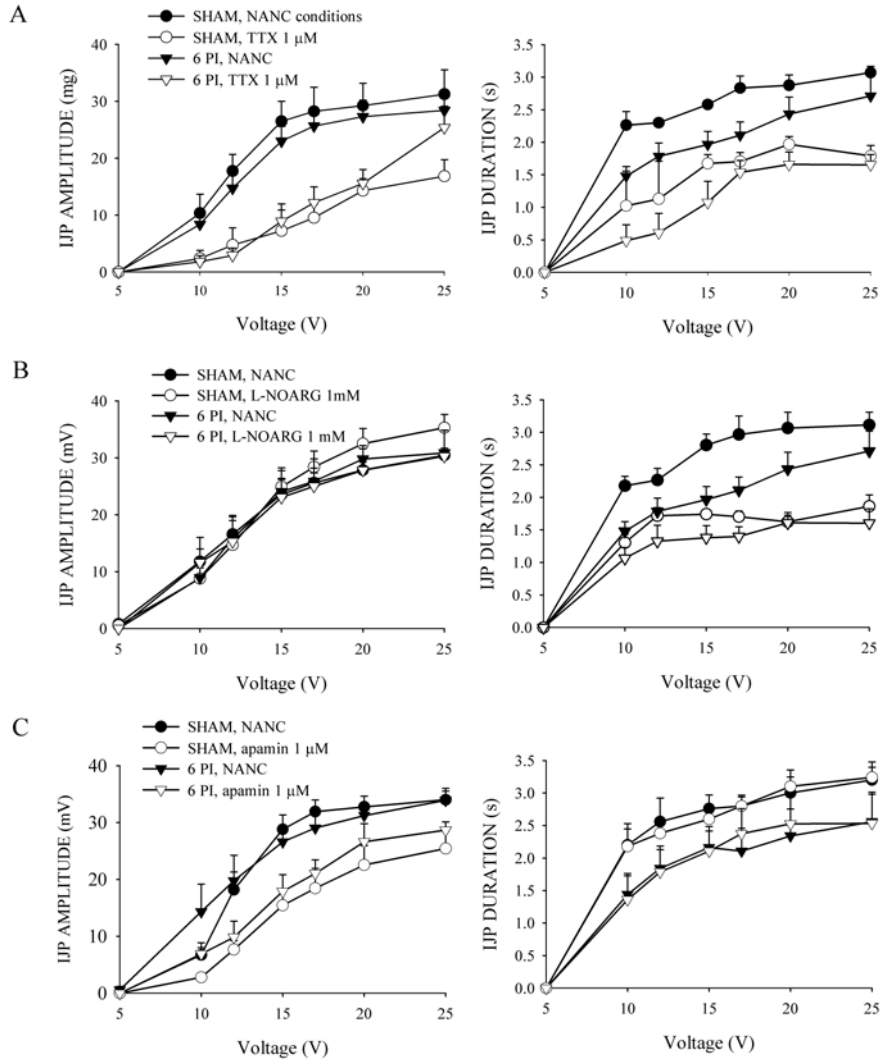
*Figure 8.* (A) Intracellular recordings showing IJPs elicited by EFS increasing the voltage of stimulation (5, 10, 12, 17, 20 and 25 V) under NANC conditions and in presence of nifedipine (1  $\mu$ M) in sham animals and infected rats (6 PI). (B) Amplitude (ns) and duration (Two-way ANOVA,;  $P < 0.001$ ) of the IJPs.

TTX (1 $\mu$ M) decreased the amplitude ( $n = 5$ ;  $P < 0.001$ ) and duration ( $P < 0.001$ ) of the IJPs in sham rats. In inflamed tissue, the amplitude was slightly decreased ( $n = 4$ ; ns) whereas the duration was shorter ( $P < 0.0001$ , see figure 9A). Despite the inhibitory effect of TTX on EFS induced hyperpolarizations, IJPs duration in infected tissue remained shorter than that observed in control strips ( $P < 0.05$ ).

L-NOARG (1 mM) decreased significantly the IJPs duration in both groups of animals (sham  $n = 4$ ,  $P < 0.0001$ ; infected  $n = 5$ ,  $P < 0.0001$ ) whereas IJPs amplitude was not affected in any group (figure 9B). However, duration was still shorter in inflamed tissue compared to control ( $P < 0.05$ ).

In the presence of apamin (1  $\mu$ M), the IJPs amplitude was diminished in all groups (sham  $n = 4$ ,  $P < 0.0001$ ; infected  $n = 4$ ,  $P < 0.0001$ ) with no change in IJPs duration in any group (figure 9C). Inflamed tissue was found to be less sensitive to apamin than tissue from sham rats ( $P < 0.05$ ).





*Figure 9.* Drug sensitivity of EFS induced IJPs in NANC conditions in presence of nifedipine (1  $\mu$ M). (A) Effect of TTX (1  $\mu$ M), (B) L-NOARG (1mM) and (C) apamin (1  $\mu$ M) on the amplitude (left) and duration (right) of the IJPs. Sham vs. infected rats (6 PI).

## 2.5. Discussion

The purpose of our study was to determine the time-course of the dysmotility caused by inflammation and how the inflammation affects the calcium-handling properties of the smooth muscle, specifically the involvement of intracellular calcium stores, and the inhibitory neurotransmission. We used intra-rectal administration of *T. spiralis* larvae to induce colonic inflammation and assessed the changes in neuromuscular function and NANC inhibitory neurotransmission at days 2, 6, 14 and 30 post infection (PI). We have recently reported that infected animals undergo episodes of weight loss, decreased stool consistency with increased stool weight; epithelial sloughing and microulcerations together with inflammatory infiltrate largely restricted to the mucosal and submucosal layers. This model is also characterized by a decrease in colonic motility associated with increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the epithelium, as well as in infiltrating cells within the lamina propria and submucosa (Auli and Fernandez, 2005).

In this study, we intended to determine whether the previously described alteration in the motility pattern (Auli and Fernandez, 2005) could involve as well changes in the NANC inhibitory neurotransmission. The increase in AUC, amplitude and frequency of spontaneous contractions caused by the presence of L-NOARG or TTX in control tissue was attenuated in inflamed strips. The lack of effect of TTX or L-NOARG on spontaneous contractility has been found throughout acute colonic inflammation and loss of neural NO release has been previously reported (Bossone et al., 2001). Our data suggest that the decrease in contractility observed during *T. spiralis*-induced colitis would not be due to an increase in neural NO release. On the contrary, nitrenergic transmission seems to be rather impaired since we have observed reduced IJPs duration. In fact, we previously found that infected animals at day 6 and 14 PI exhibit decreased nNOS immunoreactive cells per ganglia in the myenteric plexus (Auli et al., 2004). Impaired nitric oxide synthase activity has also been reported by other investigators and has been linked to the reduced relaxation of smooth muscle in rat DSS-induced colitis (Mizuta et al., 2000). Similarly, in TNBS-induced colitis, off contractions following an electrical stimulus were not significantly enhanced by L-NOARG, indicating a reduction in nitrenergic regulation (Zhao et al., 2001).

It is worth to note that organ bath studies reported here were performed in full-thickness strips since we previously described that the removal of the mucosal and submucosal layers from

the colon of infected rats (6-14 PI) resulted in an increased amplitude of contractions and a more consistent motility pattern. We related these changes to the marked increase of iNOS immunoreactivity that we found predominantly in the colonic mucosa and submucosa of these animals. However, the fact that L-NOARG did not significantly enhance the spontaneous motility in strips from infected rats (2-6 PI), and that microelectrode studies were performed in strips without mucosa and submucosa might suggest that NO from these layers is not the only factor accounting for the decreased colonic motility and increased hyperpolarization observed.

Regarding apamin, a selective blocker of the small conductance calcium-activated potassium channels, it enhanced the AUC, amplitude and frequency of colonic contractions in control tissue, whereas during inflammation the sensitivity of spontaneous contractions to apamin is lost from day 6 to 14 PI. This finding is similar to that our group previously reported in *T. spiralis* infected jejunum and ileum (Tanovic et al., 2002), and suggests that functional changes in calcium activated potassium channels contribute to some extent to the impaired relaxation found or alternatively that the release of inhibitory transmitters which exert their effects through such channels is impaired. The fact that ATP acts through activation of apamin-sensitive potassium channels in the rat colon (Pluja et al., 1999) together with the decreased sensitivity to apamin that we have observed in inflamed tissue may suggest an impairment of the purinergic neurotransmission in this model. Altered purinergic neurotransmission has been reported before during inflammation since the purinergic control of cholinergic nerve activity was found significantly impaired during chronic intestinal inflammation in mice (De Man et al., 2003).

The suppression of contractility observed in inflamed tissue could be associated with the hyperpolarization of the resting membrane potential (RMP) recorded at day 6 PI. In controls, the RMP in circular muscle cells was  $-45.9 \pm 2.04$  mV whereas inflamed muscle cells RMP was  $-56.5 \pm 2.42$  mV. The precise mechanisms underlying generation of the RMP are not completely understood. However, some studies suggest that alterations in the expression of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump (Khan and Collins, 1993) or damages to the interstitial cells of Cajal (Lu et al., 1997) may contribute to the changes in the RMP.

Since IJPs have been shown to be unaltered in the presence of nifedipine, the characterization of inhibitory junction potentials at different times post infection was always made in presence of nifedipine in order to increase the duration of impalements.. It has been reported that IJPs in rat colon are biphasic, with: a fast apamin-sensitive hyperpolarization, which

appears to be mediated by ATP and a L-NOARG-sensitive slow hyperpolarization mediated by the endogenous nitrergic transmitter (Pluja et al., 1999). IJPs duration was significantly reduced in inflamed tissue (6 days PI). Lu *et al* (Lu et al., 1997) also observed a decrease in the duration of IJPs in response to EFS in canine acetic acid-induced colitis, and suggested that it might result from a reduction in the neuronal release of NO. The reduction in IJPs duration suggests that the inhibition in contractility observed in this model is unlikely to be due to an excessive nitrergic inhibitory input from NANC neurons. NO synthesized by iNOS rather than neuronal NO appears to be one of the causes which might contribute to the suppression of spontaneous motility that we observed in this model since iNOS immunoreactivity strongly increased on days 6 and 14 PI (Auli and Fernandez, 2005). As reported previously (Pluja et al., 1999), TTX decreased the amplitude and duration in all experimental groups. However, in the presence of TTX, IJPs duration still remained lower in inflamed tissue compared to control. Similar results were found when L-NOARG was added. L-NOARG diminished IJPs duration in all experimental groups, but its effects were slightly lower in inflamed tissue. Apamin decreased the amplitude in all animals but IJPs amplitude from inflamed tissue was less sensitive to apamin than control. This finding confirms the lost of sensitivity to apamin observed as well in organ bath studies and suggests alterations in calcium activated potassium channels during the inflammatory state.

The decreased contractile response to ACh and KCl observed in tissues from infected rats (2-30 PI) is in agreement with other studies which have used other models of colitis (Grossi et al., 1993; Liu et al., 2001; Myers et al., 1997; Shi and Sarna, 2000). The main changes that may account for such finding include alterations in the properties of G proteins (Rudolph et al., 1995), changes in the expression or regulation of the contractile proteins (Xie et al., 1992) and/or changes in the contribution of extracellular and intracellular calcium to the contractile event (Liu et al., 2001; Myers et al., 1997; Shi and Sarna, 2000).

Incubation of tissues in calcium-free buffer had similar inhibitory effects on the response to ACh in control and inflamed tissue. Since it is generally accepted that a contraction that develops in the absence of extracellular calcium reflects the utilization of intracellular calcium stores (Lategan and Brading, 1988; Myers et al., 1997; Paul et al., 1994), our data may suggest that in colitis the contribution of intracellular calcium to the contraction remains intact. To further test the contribution of intracellular calcium stores to the contractile event in colonic smooth muscle, we stimulated tissues from control and infected rats with ACh after using a previously

described protocol for intracellular calcium depletion (Myers et al., 1997). Depletion of intracellular calcium stores significantly decreased the contractile response to ACh in both control and infected rats; however, depletion of intracellular calcium had more pronounced effects on the contractile response displayed by inflamed tissue, particularly at days 6 and 14 PI. The contraction that develops after depletion of intracellular calcium indicates the contribution of extracellular calcium influx to the contractile event (Renzetti et al., 1990). Thus the finding of significantly decreased contractions in intracellular calcium-depleted tissue suggests that extracellular calcium utilization might be impaired at this stage of the inflammatory process. In fact, it has been reported that the expression level of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels is down-regulated in circular smooth muscle cell membranes of inflamed canine colon (Liu et al., 2001), which may result in a reduced  $\text{Ca}^{2+}$  influx and contribute to the abnormalities in motility observed during intestinal inflammation.

The decreased utilization of extracellular calcium is not the only factor accounting for the decreased contractility of inflamed colon. In our study, inflammation also impaired the contractile response to KCl. KCl initiates smooth muscle contraction via membrane depolarization and activation of calcium influx through voltage-sensitive channels on the plasmalemma. Thus, steps in the excitation-contraction coupling might also be impaired. Xie *et al* (Xie et al., 1992) have suggested that alterations in actin-myosin interaction beyond the initial step of myosin light-chain phosphorylation might be responsible for the decreased contractile response of colonic smooth muscle obtained from rabbits undergoing experimental colitis.

In summary, our study shows that the decrease in contractility of colonic circular smooth muscle induced by the intra rectal enema of *T. spiralis* larvae might result from a persistent hyperpolarization of smooth muscle cells and an impairment of the excitation-contraction coupling. Moreover, NANC inhibitory neurotransmission appears to be impaired.

## 2.6. References

- Auli M, Fernandez E (2005). Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Digestive Diseases and Sciences* 50:1432-1443.
- Auli M, Sharkey KA, Fernandez E (2004). Functional and structural changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. p. 857.

Bossone C, Hosseini JM, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T (2001). Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G949-G957.

Cohen JD, Kao HW, Tan ST, Lechago J, Snape WJ, Jr. (1986). Effect of acute experimental colitis on rabbit colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 251:G538-G545.

Collins SM, Blennerhassett PA, Blennerhassett MG, Vermillion DL (1989). Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 257:G898-G903.

De Man JG, Seerden TC, De Winter BY, Van Marck EA, Herman AG, Pelckmans PA (2003). Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 139:172-184.

Depoortere I, Van Assche G, Thijs T, Geboes K, Peeters TL (1999). Differential changes in ACh-, motilin-, substance P-, and K(+)-induced contractility in rabbit colitis. *Am J Physiol* 277:G61-G68.

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

Eysselein VE, Reinshagen M, Cominelli F, Sternini C, Davis W, Patel A, Nast CC, Bernstein D, Anderson K, Khan H, . (1991). Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. *Gastroenterology* 101:1211-1219.

Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM (2000). Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G259-G265.

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

Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.

Khan I, Collins SM (1993). Altered expression of sodium pump isoforms in the inflamed intestine of *Trichinella spiralis*-infected rats. *Am J Physiol* 264:G1160-G1168.

Lategan TW, Brading AF (1988). Contractile effects of manganese on taenia of guinea pig cecum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 254:G489-G494.

Liu X, Rusch NJ, Striessnig J, Sarna SK (2001). Down-regulation of L-type calcium channels in inflamed circular smooth muscle cells of the canine colon. *Gastroenterology* 120:480-489.

Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK (1997). Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 273:G1233-G1245.

Miampamba M, Sharkey KA (1998). Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 10:315-329.

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

Mourelle M, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Malagelada JR (1996). Toxic dilatation of colon in a rat model of colitis is linked to an inducible form of nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 270:G425-G430.

Myers BS, Martin JS, Dempsey DT, Parkman HP, Thomas RM, Ryan JP (1997). Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats. *Am J Physiol* 273:G928-G936.

Paul DA, Ierardi JA, Parkman HP, Ryan JP (1994). Developmental changes in gastric fundus smooth muscle contractility and involvement of extracellular calcium in fetal and adult guinea pigs. *Pediatr Res* 36:642-646.

Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G255-G266.

Pluja L, Fernandez E, Jimenez M (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 126:883-892.

Rao SS, Read NW (1990). Gastrointestinal motility in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 172:22-28.

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

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

Renzetti LM, Wang MB, Ryan JP (1990). Contribution of intracellular calcium to gallbladder smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 259:G1-G5.

Rudolph U, Finegold MJ, Rich SS, Harriman GR, Srinivasan Y, Brabet P, Bradley A, Birnbaumer L (1995). Gi2 alpha protein deficiency: a model of inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 15:101S-105S.

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

Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-1057.

Shi XZ, Sarna SK (2000). Impairment of Ca<sup>2+</sup> mobilization in circular muscle cells of the inflamed colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G234-G242.

Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E (2002). Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from *Trichinella spiralis* infected rats. *Life Sci* 71:3121-3136.

Tomita R, Munakata K, Tanjoh K (1998). Role of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 33:48-52.

Tomita R, Tanjoh K (1998). Role of nitric oxide in the colon of patients with ulcerative colitis. *World J Surg* 22:88-91.

Xie YN, Gerthoffer WT, Reddy SN, Cominelli F, Eysselein VE, Snape WJ, Jr. (1992). An abnormal rate of actin myosin cross-bridge cycling in colonic smooth muscle associated with experimental colitis. *Am J Physiol* 262:G921-G926.

Zhao A, Bossone C, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T (2001). Colitis-induced alterations in adrenergic control of circular smooth muscle in vitro in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 299:768-774.



## Capítol 3

### Neurochemical changes and infiltrating immune cells in the enteric nervous system in a rat model of ulcerative colitis

#### 3.1. Abstract

Intrarectal administration of *Trichinella spiralis* larvae in rats causes colonic inflammation with functional changes similar to those observed in ulcerative colitis. However, enteric neurochemical changes and inflammatory cells involved in this model are unknown.

Our aim was to characterize the neurochemical changes that occur during *T. spiralis* colitis and to study the presence of infiltrating MHC class II positive cells within the submucosal (SMP) and myenteric plexus (MP). *T. spiralis* infected rats were studied at 6 and 14 days post infection (PI). Whole mounts preparations of the SMP and MP were used for immunofluorescence studies.

No neuronal loss was evidenced as measured by protein gene product 9.5 positive cells per ganglia. However, a decreased number of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) positive cells per myenteric ganglia and decreased intensity of calcitonin-gene related peptide (CGRP) immunoreactivity in the MP were found in both 6 and 14 day PI animals. No changes in substance P-, vasoactive intestinal peptide-, tyrosine hydroxylase-, choline acetyl transferase or calbindin immunoreactivity were observed. A dramatic increase in ED1 immunopositive macrophages was found in both the MP and SMP of infected tissues, whereas the number of ED2 immunoreactive macrophages increased only in the SMP.

In summary, the most prominent changes found in this model were a decrease in CGRP and nNOS immunoreactivity in the MP with no change in the number of neurones per ganglia. Antigen presenting cells, most likely ED1 macrophages found within the MP, might play a pivotal role in the neurochemical changes observed.

### 3.2. Introduction

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two main forms of idiopathic inflammatory bowel disease (IBD). They can be distinguished by their clinical manifestations, sites of inflammation and immunologic profiles (Fiocchi, 1998; Sands, 2004). Both forms of IBD are also associated with marked abnormalities in intestinal motility. In UC, these impairments include abnormal transit together with decreased contractility of colonic smooth muscle (Reddy et al., 1991; Snape, Jr. et al., 1991).

Extensive alterations in the enteric nervous system (ENS) have been observed during IBD, including changes in morphology, neurotransmitter contents and function of enteric neurons (Belai et al., 1997; Dvorak et al., 1980; Dvorak et al., 1993; Geboes and Collins, 1998; Miampamba and Sharkey, 1998; Neunlist et al., 2003). Because the ENS plays an important role in the regulation and control of motility, it seems reasonable to propose that alterations in the ENS underlie some of the functional abnormalities observed in IBD. Inflammatory cytokines and infiltrating immune cells appear to be responsible for many of the changes to the ENS in inflammation (Khan and Collins, 1994; Ruhl et al., 1994). In particular, in nematode infection models, infiltrated cells expressing high levels of MHC class II are responsible for reduced acetylcholine release and altered contractility (Collins et al., 1992; Collins et al., 1989; Galeazzi et al., 2000).

Although there have been numerous studies of the ENS in inflammation, few studies have examined the structural and functional changes to the ENS in animal models of UC, where inflammation is restricted to the mucosa and submucosa. We have recently characterized a model of colitis induced by the administration of *Trichinella spiralis* larvae into the colon (Aulí M. and Fernández E., 2005). This model was based on previous reports which showed marked reductions in contractility and reduced acetylcholine release from the longitudinal muscle after intracolonic *T. spiralis* infection (Grossi et al., 1993; Jacobson et al., 1995). The model has many similarities to the features of UC. Infected animals undergo episodes of weight loss, decreased stool consistency with increased stool weight; epithelial sloughing and microulcerations together with inflammatory infiltrate largely restricted to the mucosal and submucosal layers (Aulí M. and Fernández E., 2005). In this model a reduction in colonic motility is also observed in association with increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the epithelium and in infiltrating cells within the lamina propria and

submucosa (Aulí M. and Fernández E., 2005). However, how the ENS of the colon is affected in this model has not been examined. Neither is it clear whether macrophage infiltration into the region of the nerve plexuses is a feature of the inflammatory response.

The aim of the present study was to investigate the effects of inflammation on the neurochemical composition of the colonic submucosal and myenteric plexuses in the *T. spiralis*-induced colitis model in the rat. Specifically, we studied the distribution and organization of the major excitatory and inhibitory neurochemical markers, as well as markers of intrinsic and extrinsic primary afferent and extrinsic sympathetic nerves. The presence and composition of the inflammatory cellular infiltrate expressing major histocompatibility (MHC) class II antigens and the monocyte/macrophage markers ED1 and ED2 were also studied. Finally, we evaluated the expression of the enteric glial marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) within the plexuses, as enteric glia are thought to play a role in inflammatory pathologies in the gut (Cabarrocas et al., 2003).

### **3.3 Material and methods**

#### **3.3.1 Animal model**

Male Sprague-Dawley rats (325-350g) were purchased from Charles River (Lyon, France) and were housed at a constant temperature (23°C) and light-dark cycles (12:12h). Standard rodent food and tap water were provided *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the local Animal Ethics Committee.

#### **3.3.2. Induction of colitis**

Colitis was induced by intra-colonic instillation of 5000 *Trichinella spiralis* larvae suspended in 1 mL saline (0.9%). The larvae were obtained according to the method of Castro and Fairbairn (Castro and Fairbairn, 1969). Each rat was lightly anesthetized with halothane, and a polyethylene cannula (2 mm diameter) was inserted into the lumen of the colon 8 cm from the anus. Next, a flush volume of 1 mL saline (0.9%) was instilled and fecal matter was removed. Finally, each rat received 1 mL of a suspension of *T. spiralis* larvae. Control animals were treated identically except that, instead of *T. spiralis* larvae, they received 1 mL normal saline.

### 3.3.3. Tissue preparation

After an overnight (18-hr) fast with *ad libitum* access to water, the rats were killed by decapitation and bled. Segments of mid colon were removed from animals 6 and 14 days after administration of saline or *T. spiralis* larvae (n= 3 per group at each time point. Colonic segments were opened longitudinally along the mesenteric border, washed in phosphate-buffered saline (PBS) and pinned with the mucosal surface up, on a Sylgard-covered Petri dish in PBS containing 1 $\mu$ M nifedipine. Samples were fixed overnight in Zamboni's fixative (pH 7.4) at 4°C, rinsed (3 x 10 min) in PBS, transferred to PBS with 0.01% sodium azide and stored at 4°C.

After fixation, all tissue was unpinned and whole mount preparations of the myenteric plexus-longitudinal muscle (MP) and the submucosal plexus (SMP) were prepared under a dissecting microscope(Costa et al., 1980).

### 3.3.4. Immunohistochemistry

Tissues were incubated separately for 24h at 4°C with the primary antibodies listed in Table 1. All antibodies were diluted in PBS containing 0.1% triton X-100 (PBS-T) and 0.1% bovine serum albumin. After incubation, tissues were rinsed (3 x 10 min) with PBS-T and incubated for 1 h at room temperature with the species-appropriate secondary antibody conjugated to CY3 or FITC (1:50-1:100; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). Samples were given a final wash (3x10 min) with PBS-T, mounted in bicarbonate-buffered glycerol (pH 8.6) and examined using either a Zeiss fluorescence microscope, or an Olympus fluoview FV300 confocal microscope. All photographs were taken with a digital camera and adjusted in Adobe Photoshop or Corel draw for brightness and contrast. Photomicrographs were taken at the same exposure to facilitate direct comparison.

### 3.3.5. Statistical analysis

The proportion of immunoreactive neurons was analyzed by counting neurons in a minimum of 12 ganglia randomly selected from each preparation and the mean number of positive neurons per ganglia was calculated. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Student's t-test for unpaired data was used to assess the significance of the differences between experimental groups. P values <0.05 were considered statistically significant.

*Table 1.* Primary antibodies

Primary antibody	Developed in	Dilution	Source
anti-human PGP 9.5	rabbit	1:100	Ultraclone Ltd. (31A3, Rossisters Farmhouse Wellow, UK)
anti-nNOS	mouse	1:500	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
anti-macrophage iNOS	rabbit	1:500	Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA)
anti-VIP	rabbit	1:1000	Generous gift of Dr. Walsh (Los Angeles, CA)
anti-SP	rabbit	1:500	Incstar Corporation (Stillwater, MN, USA)
anti-ChAT (P3YEB)	rabbit	1:2000	Generous gift of M. Schemann (Freising, Germany)
anti-CGRP	rabbit	1:1000	Cambridge CA 08-220
anti-TH	rabbit	1:500	Chemicon International Inc. (Tencula, CA, USA)
anti-calretinin	rabbit	1:2000	Generous gift of J. Rodgers (Cambridge University, UK)
anti-calbindin	mouse	1:1000	Swant (Bellinzona, Switzerland)
anti-rat OX-6	mouse	1:500	Serotec Ltd. (MCA46G, Kidlington, Oxford, UK)
anti-rat ED1	mouse	1:1000	Chemicon International Inc. (MAB1425)
anti-rat ED2	mouse	1:500	Serotec Ltd.

*Table 1.* Primary antibodies (*PGP 9.5* protein gene product 9.5, *nNOS* neural nitric oxide synthase, *iNOS* inducible nitric oxide synthase, *VIP* vasoactive intestinal peptide, *SP* substance P, *ChAT* choline acetyltransferase, *CGRP* calcitonin gene related peptide, *TH* tyrosine hydroxylase, calbindin, calretinin, major histocompatibility (MHC) class II antigens *OX-6*, monocyte/macrophage *ED1*, macrophage *ED2*)

### 3.4. Results

In a previous study we showed that *T. spiralis*-induced colitis in rats has some features reminiscent of those seen in human UC. Inflammatory infiltrate and histopathological lesions mainly restricted to the mucosal and submucosal layers are found in the colon of infected animals (Aulí M. and Fernández E., 2005). The functional consequences of such inflammation are a marked decrease in the spontaneous contractility of the underlying circular smooth muscle which might be linked to the increased iNOS expression we observed in the colonic mucosa and submucosa of these animals.

### 3.4.1. Enteric innervation in inflammation

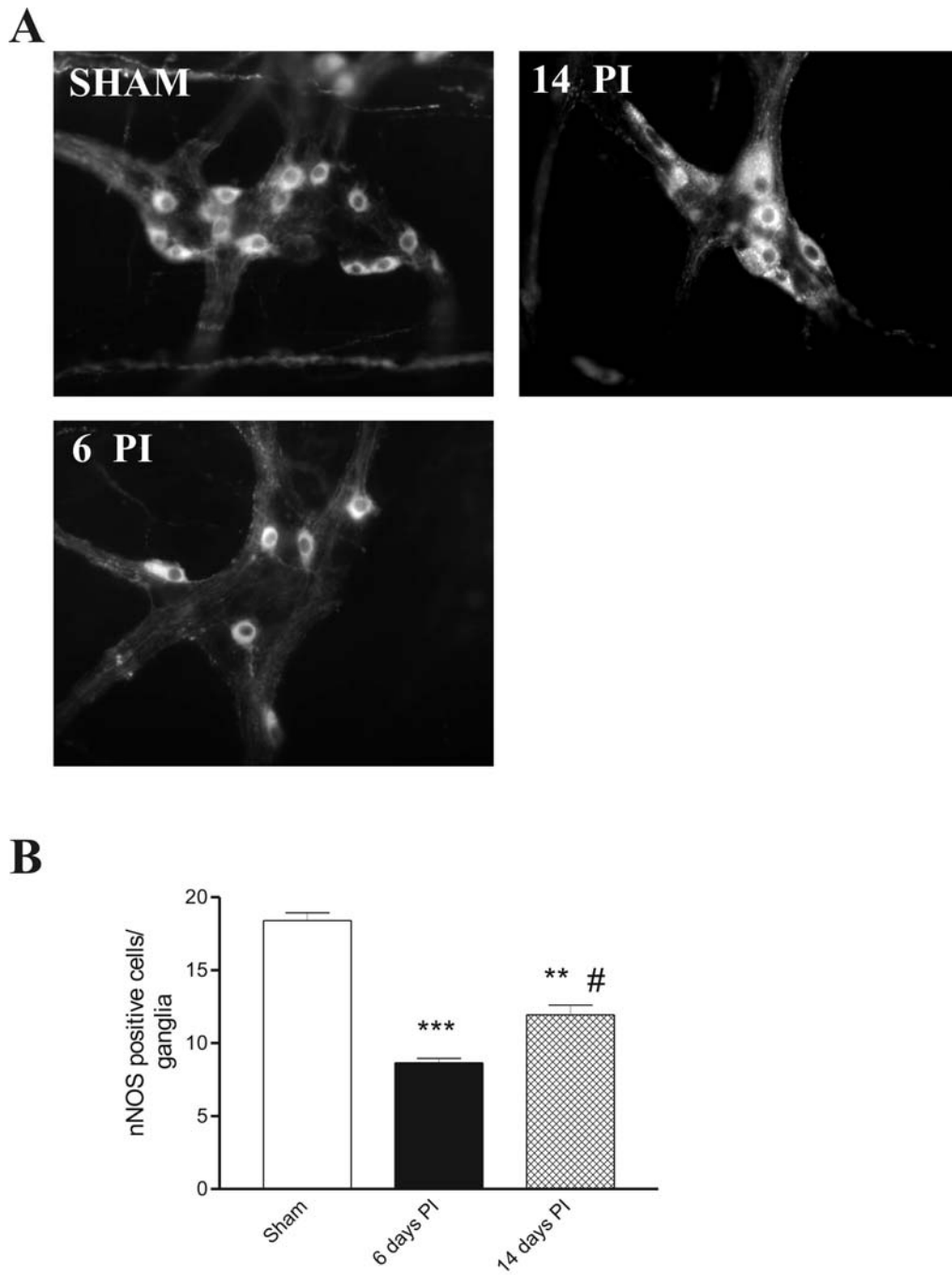
#### 3.4.1.a) Excitatory neurotransmitters

The pattern of distribution and intensity of the immunoreactivity for neurochemical markers of excitatory neurons was evaluated. In general, there were few changes observed. Substance P immunoreactivity was present in nerve fibers distributed in the SMP and MP in both control and infected animals. In control tissues, dense networks of substance P immunoreactive fibers were prominent in the MP. In the SMP, ganglia were densely innervated, as were the submucosal blood vessels, whose innervation is largely from extrinsic primary afferent nerves (data not shown). The distribution and density of substance P immunoreactivity in the inflamed colon was comparable to that observed in the normal colon. Similarly, choline acetyl transferase-(ChAT) immunoreactivity was localized to cell bodies in the MP and SMP preparations of all experimental groups. *T. spiralis* induced inflammation caused no observable changes in ChAT immunoreactivity and distribution (data not shown).

#### 3.4.1.b) Inhibitory neurotransmitters

##### *Neuronal nitric oxide synthase (nNOS)*

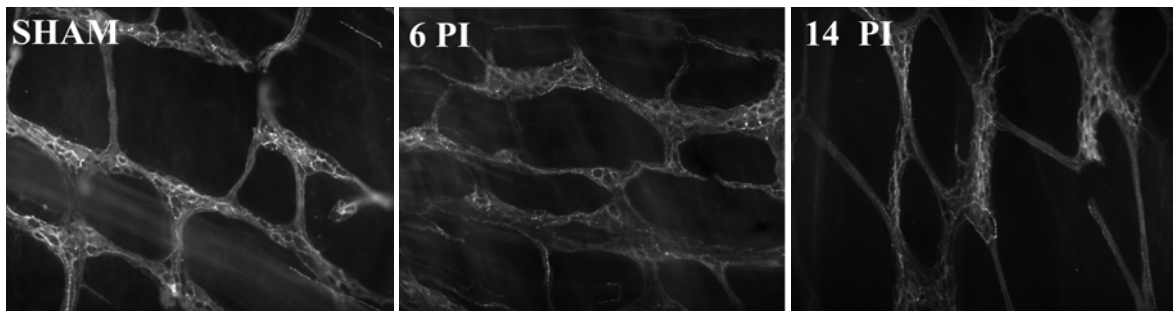
Immunoreactive nerve cell bodies and fibers containing neuronal nitric oxide synthase (nNOS) were seen in the SMP and MP preparations of control and inflamed animals. Inflammation significantly altered the expression of nNOS in the MP. The number of nNOS immunoreactive cells per ganglia was reduced in tissues taken from days 6 and 14 post-infection (PI) when compared to sham treated rats (control  $18.4 \pm 0.5$  vs. 6 days PI  $8.7 \pm 0.3$  and 14 days PI  $12.0 \pm 0.7$  cells/ganglia;  $P < 0.01$ ; Fig. 1). Staining with the pan neuronal marker PGP 9.5 demonstrated that the number of PGP 9.5 immunoreactive cells in the MP remained unchanged at these stages of inflammation (control  $32.3 \pm 1.6$  vs. 6 days PI  $24.1 \pm 5.2$  and 14 days PI  $24.8 \pm 2.5$  cell number/ganglia; ns). No differences in nNOS immunoreactivity were observed in SMP preparations (control  $2.19 \pm 0.17$  vs 6 days PI  $2.85 \pm 0.74$  and 14 days PI  $2.06 \pm 0.43$  cell number/ganglia; ns). Vasoactive intestinal peptide (VIP) immunoreactivity was distributed in neuronal cell bodies and fibers in the SMP and in numerous fibers in the MP. No differences between the control and inflamed colon were observed (data not shown).



*Figure 1.* (A) Immunoreactivity to nNOS in the myenteric plexus from sham, 6 days PI and 14 days PI rats. Magnification x400. (B) Bar diagrams showing the decrease in nNOS positive somas/ganglia in the infected tissue.\*\*\*  $P < 0.0001$  and \*\*  $P < 0.01$  when comparing sham vs. infected groups (6 and 14 days PI, respectively). #  $P < 0.05$  between both colitic groups.

*Calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity*

CGRP is present in both extrinsic primary afferent nerves and a population of enteric neurons in the rat colon (Ekblad et al., 1988; Grider, 1994). CGRP immunoreactivity was present in nerve fibers distributed in the SMP and MP in both control and infected animals. In control tissues, CGRP-containing fibers were abundant in the MP and were found in moderate density in the SMP in association with the vasculature. In the inflamed colon, CGRP distribution was comparable to that observed for the normal colon; however, we observed a substantial decrease in both the density and intensity of CGRP immunoreactivity in the MP from infected animals at 6 and 14 days PI (Fig. 2). Surprisingly, no differences were observed regarding CGRP immunoreactivity in the SMP.



*Figure 2.* Immunofluorescence micrographs of CGRP in the myenteric plexus. Note there is a decrease in the density and the immunoreactivity of CGRP fibres in both infected groups (6 and 14 days PI) when compared to the sham group. The decrease was more evident in 6 day PI tissue. Magnification x200.

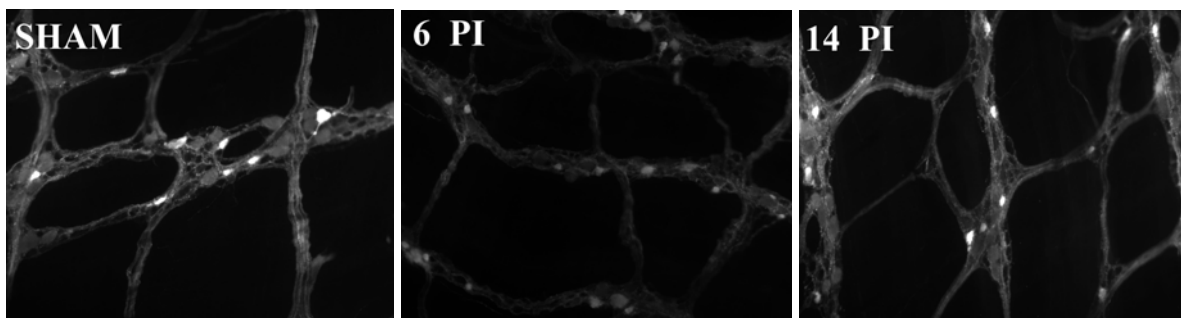
*Extrinsic sympathetic nerves*

Tyrosine hydroxylase (TH) is a marker of extrinsic sympathetic nerves (Furness and Costa, 1974). TH immunoreactivity was observed within both enteric plexuses. A high density of TH immunoreactive varicosities was observed in ganglia and in perivascular nerves surrounding blood vessels in the SMP. TH immunoreactive fibers were present throughout the MP. No changes in TH immunofluorescence were noted between control and inflamed tissues (data not shown).



### 3.4.2. Neural calcium binding proteins

Calbindin and calretinin were distributed in neuronal cell bodies in the SMP and MP of all animals. In the MP, the density of calretinin-positive cell bodies was higher than that of calbindin, as previously described (Xiang and Burnstock, 2004). No differences in the distribution of calretinin (data not shown) were observed in tissues taken from 6 and 14 day PI animals when compared to sham animals. Calbindin-IR was weaker (intensity) in the tissue of 6 days PI animals compared to sham rats (Fig. 3).



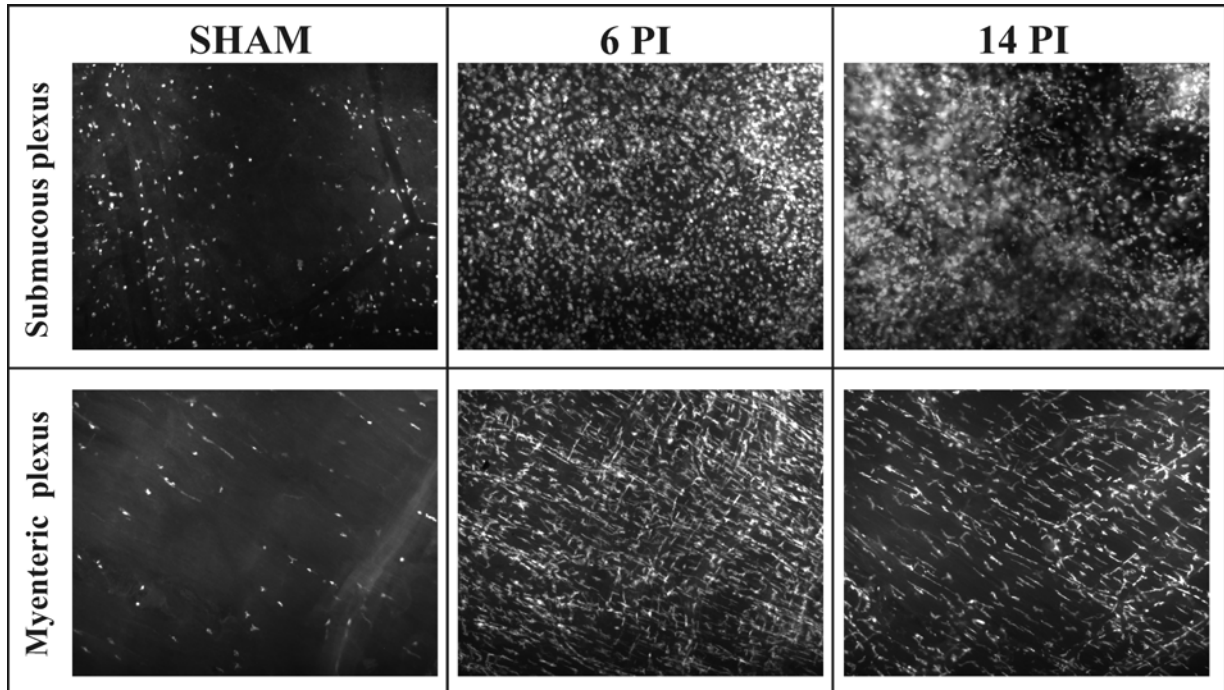
*Figure 3.* Calbindin immunostaining in the myenteric plexus. Scattered labeled somas were found in the ganglia in all experimental groups. In the 6 days PI rats, there is a marked decrease in the intensity of calbindin immunostaining of the soma.

### 3.4.3. Inflammatory cellular infiltrate

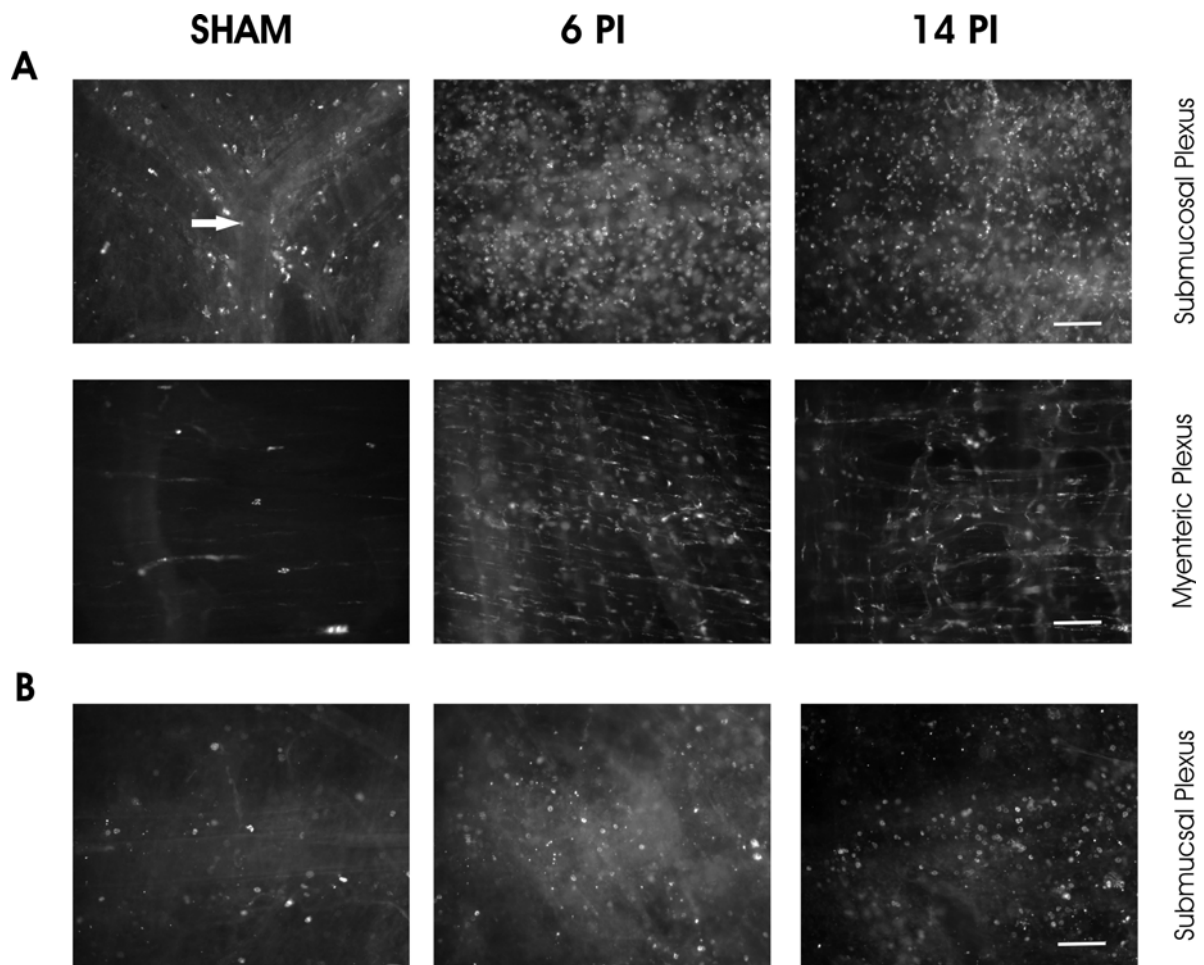
Immunoreactivity to OX-6, which recognizes major histocompatibility complex class II antigen, was observed in scarce infiltrating cells in both SMP and MP preparations of control animals. In contrast, OX-6 immunoreactive cells were dramatically increased in the SMP and MP of all infected animals (both days PI; Fig. 4).

The density of ED1 immunoreactive cells (macrophages) was increased in the SMP and MP in both groups of infected animals when compared to sham rats. In SMP preparations of control animals, the infiltrating cells were mainly concentrated in and around blood vessels; on the other hand, the infiltrating cells were present in a fairly uniform density throughout the SMP preparation in the inflamed tissues (Fig. 5). No differences in ED1 positive cells were observed between tissues 6 and 14 days after inflammation. The number of ED2 positive infiltrating macrophages was markedly increased in SMP preparations in both groups of infected animals. In

contrast to ED1 immunoreactivity, few ED2 positive cells were observed in the MP of both sham and infected rats (Fig. 5).



*Figure 4.* Ox-6 (MHC class II antigen) immunoreactivity in the submucosal and myenteric plexus from all experimental groups. Scarce Ox-6 positive immunoreactive cells are present in both plexuses of sham rats; in contrast, infected animals have a markedly increased number of Ox-6 infiltrating cells within both the submucosal and myenteric plexuses. Magnification x100.

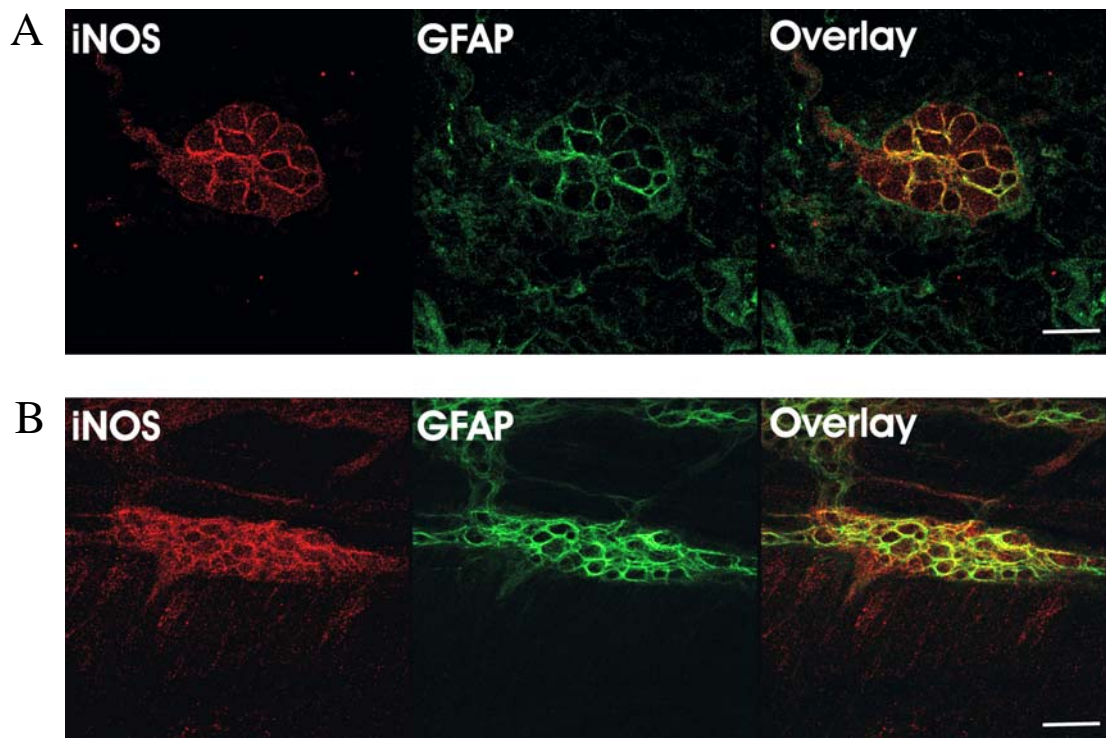


*Figure 5.* ED1 and ED2 immunoreactivity are increased in both groups of infected animals when compared to controls. (A) ED1 immunoreactivity in the submucosal and myenteric plexuses from all experimental groups. Scarce ED1 positive cells are present in the sham animals. In the submucosal plexus, infiltrating cells are concentrated around blood vessels (indicated with arrow). However, infected animals display a marked increase in the number of ED1 positive cells in both plexuses; in the submucosal plexuses, infiltrating cells are now distributed throughout the tissue and are not just concentrated around blood vessels. Pictures from each region were taken at the same exposure time to facilitate direct comparison. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . (B).ED2 immunoreactivity in the submucosal plexus from all experimental groups. Few ED2 positive cells are present in the sham animals but an increase in ED2 infiltrating cells is apparent in the infected animals. Pictures were taken at the same exposure time to facilitate direct comparison. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.4. Enteric glial cells

Enteric glia are specifically labeled with the intermediate filament protein glial fibrillary acidic protein (Jessen and Mirsky, 1980). GFAP immunoreactivity was observed in both the SMP and MP. Enteric glia were star shaped cells with numerous processes extending within the ganglia, surrounding neurons in all experimental groups. No differences in the intensity or density of distribution or the morphology of enteric glia were observed between the infected and control animals.

The inducible isoform of NOS was found in the submucosal and myenteric plexus of both sham and colitic rats. The pattern and distribution of iNOS immunoreactivity in both plexuses colocalized with the GFAP immunoreactivity in the ganglia (see figure 6). No differences in iNOS ganglionic immunoreactivity were found in sham vs. infected animals.



*Figure 6.* GFAP and iNOS immunoreactivity is colocalized. Panel A shows iNOS and GFAP staining in the submucous plexus of a colitic rat (6PI). The image in panel B reveals iNOS and GFAP staining in the myenteric plexus. Scale bar 50  $\mu$ m.

### 3.5. Discussion

We have investigated the effects of inflammation on the neurochemical coding of the colon in a *T. spiralis*-induced model of ulcerative colitis in rats. Our major findings were that mucosal inflammation reduced the expression of nNOS and CGRP in the MP, which was associated with an increase in infiltrating mononuclear cells expressing MHC II. Unexpectedly, we did not observe any changes in the expression of substance P or CGRP in the SMP or ChAT or VIP in the MP or SMP, even though expression of these transmitters are altered in other models of intestinal inflammation and in IBD (Belai et al., 1997; Bishop et al., 1980; Eysselein et al., 1991; Kimura et al., 1994; Kishimoto et al., 1992; Miampamba and Sharkey, 1998; Neunlist et al., 2003).

We studied animals at 6 and 14 days PI, as we previously found two distinct episodes of reduced food intake and body weight at these time points in parallel with decreased spontaneous colonic motility and increased iNOS immunoreactivity in the mucosa and submucosa. This study intended to analyse whether these changes in motility could be attributed to changes in the distribution of the major excitatory or inhibitory transmitters in the ENS. Previous studies in models of experimental colitis have reported changes in the expression of ChAT (Palmer and Koch, 1995), substance P (Miampamba and Sharkey, 1998), VIP (Kishimoto et al., 1992) and nNOS (Balemba et al., 2002; Mizuta et al., 2000). Moreover, there have been reports of neuronal loss that range from 20% to 50% in models of transmural colitis in various species (Boyer et al., 2005; Sanovic et al., 1999). In this study, using the cytoplasmic neuronal marker PGP 9.5, we did not observe significant changes in the number of myenteric neurons after the induction of colitis. The average number of neurons per ganglia that we observed in control conditions is similar to previous reports (Lin et al., 2005).

We studied the distribution and density of ChAT using immunohistochemistry, as previous studies of *T. spiralis* infection have indicated that cholinergic neurotransmission is impaired in this model (Collins et al., 1989; Davis et al., 1998; Galeazzi et al., 2000; Palmer and Greenwood-Van Meerveld, 2001; Palmer and Koch, 1995; Van Assche and Collins, 1996). In a rat model of *T. spiralis* jejunitis, ChAT activity was rapidly increased during infection and remained elevated until 6 days PI (Davis et al., 1998). However, in a guinea pig model of *T. spiralis* jejunitis, ChAT activity was unchanged in the early stages following infection (up to 10 days PI (Palmer and Koch, 1995)). We did not measure enzyme activity in our study, but rather

its expression and distribution and found no obvious changes. The proportion of ChAT positive neurons was unchanged in biopsies from patients with UC when compared to control tissue (Neunlist et al., 2003). Since immunohistochemistry is not readily quantifiable, we may have underestimated changes to this marker.

We observed no changes in substance P immunoreactivity in infected tissues. This was unexpected, as numerous studies have demonstrated altered substance P levels during intestinal inflammation (Holzer, 1998). In rats with TNBS-induced colitis, there is an initial decrease in the density of substance P positive fibers in the MP and mucosa, accompanied by an increase in substance P synthesis, suggesting an enhanced release of this peptide during the initial stage of colitis (Holzer, 1998; Miampamba and Sharkey, 1998; Sharkey and Kroese, 2001; Traub et al., 1999). *T. spiralis* ileitis (De Giorgio et al., 2001) and jejunitis (Palmer and Greenwood, 1993; Swain et al., 1992), as well as *Clostridium difficile* toxin A enteritis (McVey and Vigna, 2001), are also associated with an increase in substance P release and a reduction in substance P content in the small intestine. In contrast, studies performed in specimens taken from UC patients have mostly reported an increase in substance P immunoreactivity in the mucosa and *lamina propria* (Koch et al., 1987; Mazumdar and Das, 1992; Neunlist et al., 2003). This discrepancy might be due to distinct regional responses in the gut in this model of colitis.

We did not observe any changes in VIP immunoreactivity when we compared sham and inflamed tissue. Studies in animal models of chemically induced intestinal inflammation have mostly observed an increase in VIP fiber density and content in enteric nerves as well as in the circular muscle layer of inflamed animals (Kishimoto et al., 1992; Miampamba and Sharkey, 1998). In contrast, a reduction of VIP content has been reported in a ferret model of *T. spiralis* jejunitis (Palmer and Greenwood, 1993). There is conflicting data from studies of IBD patients, where both decreased (Surrenti et al., 1993) and increased VIP immunoreactivity (Ekblad and Bauer, 2004; Tomita et al., 2000) have been observed.

The number of nNOS immunoreactive cells/ganglia was significantly reduced in the colonic MP of *T. spiralis*-infected rats (at both time points) when compared to controls. This finding might explain the decrease in the duration of the inhibitory junction potential of the infected animals that we previously observed in this model (Aulí M et al., 2004). Decreased nNOS expression has also been reported by Mizuta *et al* (Mizuta et al., 2000) and has been linked to the impaired non-adrenergic non-cholinergic relaxation observed in dextran sodium

sulphate- (DSS) -treated rats. A slight decrease in nNOS immunoreactivity was also observed 1 day after the induction of TNBS colitis in rats; however, no changes in nNOS immunoreactivity were observed from day 2 to 14 after treatment in this model (Miampamba and Sharkey, 1999). Neural NOS levels are unchanged in mouse models of TNBS and DSS colitis (Beck et al., 2004; Vallance et al., 2004) or are increased in the MP and SMP from the colon of pigs infected with the parasite *Schistosoma japonicum* (Balemba et al., 2002) . Alterations of nNOS expression might be mediated through a cytokine-dependent process, as interferon gamma, for example, has been shown to suppress nNOS gene expression (Bandyopadhyay et al., 1997).

CGRP immunoreactivity was decreased in the MP of inflamed tissue on days 6 and 14 PI. In the MP of the rat colon, CGRP-immunoreactive fibers are mainly of intrinsic origin (Su et al., 1987), while in the rat colonic SMP, CGRP-immunoreactive fibers are mainly located surrounding blood vessels and are of extrinsic origin. The decrease in both the intensity and density of CGRP in the MP suggests that there might be an increase in CGRP release during the inflammatory response. An increase in CGRP release occurs during acute experimental colitis in the rabbit (Eysselein et al., 1991), while a decrease in CGRP immunoreactivity has been also found in a rat model of TNBS-induced colitis (Miampamba and Sharkey, 1998) as well as in IBD patients (Kimura et al., 1994). The decrease in CGRP observed under inflammatory conditions might alter the peristaltic reflex since it has been reported that the addition of the sensory neurotoxin, capsaicin, in a colonic preparation causes a depletion of CGRP which causes a decrease of the peristaltic responses to muscle stretch and mucosal stimulation (Grider, 1994). We also examined calbindin-IR in sham and inflamed tissues. We observed a decreased intensity in calbindin-IR in the MP at 6 days PI. Since calbindin is a marker for intrinsic primary afferent neurons (Song et al., 1994; Furness et al., 1998) this finding may suggest that this model of inflammation might affect sensory function in the colon.

Noradrenergic nerves in the intestine are known to modulate the motility of non-sphincteric parts of the gut within the myenteric ganglia through inhibition of transmitter release from intrinsic cholinergic excitatory neurones (Hirst and McKirdy, 1974; Nishi and North, 1973). Studies in patients with Crohn's disease have reported increased TH immunoreactivity in the MP of the ileum which might thus contribute to the abnormal intestinal motor activity in these patients. However, in the present study, we did not find any differences in TH immunoreactivity in sham vs. inflamed animals.

No changes in the immunoreactivity of the calcium binding proteins calbindin and calretinin were observed in infected animals. Since calbindin is a marker for intrinsic primary afferent neurons (Furness et al., 1998; Song et al., 1994) this finding suggests that these neurons might not to be affected in this model of colitis.

The number of MHC II (OX-6 positive) infiltrating inflammatory cells was dramatically increased in the SMP and MP in infected rats (6-14 days PI). MHC-II-expressing macrophages have been previously described in the muscularis externa in *T. spiralis*-infected mice, suggesting a putative role of these cells in the development of the neural changes observed in this model (Galeazzi et al., 2000; Vallance et al., 1999). Geboes *et al.* (Geboes et al., 1992) demonstrated *de novo* expression of MHC II in enteric glia in IBD, an observation we could not replicate in this rat model of ulcerative colitis. Nevertheless, our data suggest that some of the alterations in the enteric nervous system may be immunologically mediated through antigen presentation and activation of infiltrating immune cells.

We have also explored the immunoreactivity of two specific macrophage markers (ED1 and ED2). ED1 is present in both rat monocytes and macrophages, while ED2 is present in a subpopulation of differentiated resident tissue macrophages (Dijkstra et al., 1985; Kummer et al., 2005). Previous studies in a rat model of *T. spiralis* jejunitis have demonstrated that functional enteric neural changes are macrophage dependent (Galeazzi et al., 2000). We found that ED1 positive macrophages/monocytes were markedly increased in the SMP and MP of 6 and 14 days PI rats; similarly, Galeazzi *et al.* also observed an increase in macrophage infiltration into the muscle layers and MP which peaked at 6 days following infection in a rat model of *T. spiralis* jejunitis (Galeazzi et al., 2000). In addition, we found that ED2 positive resident macrophages were only increased in the SMP of infected animals. Galeazzi *et al.* also suggested that infiltrating macrophages, rather than the resident population, are involved in the development of enteric neural changes in this model (Galeazzi et al., 2000). Although MHC II-ED1/ED2 double labeling was not performed in this study, the population number and cell morphology observed in ED1/ED2 immunostaining seems to correlate well with that observed with MHC II. Indeed, in *T. spiralis* induced jejunitis it has been shown that macrophages are the most abundant MHC II cell type infiltrating the jejunum (Vallance et al., 1999). This finding suggests that ED1 macrophages expressing MHC II might mediate the neural changes observed within the MP in *T.*



*spiralis* induced colitis in rat as well as the altered spontaneous motility described in this model in a previous report .

In addition, in this study we intended to explore iNOS immunoreactivity within enteric ganglia. We found iNOS immunoreactivity in both plexuses from control animals. This finding is consistent with the so called “physiological” inflammatory status of the colon, due to the continuous exposure to an abundance of bacteria (McCafferty et al., 1999; Roberts et al., 2001). No differences were found when comparing iNOS immunoreactivity in the enteric ganglia between control and infected rats. We also explored GFAP immunoreactivity in both plexuses. No changes in GFAP immunoreactivity were found when we compared healthy and infected animals. Interestingly, the majority of iNOS immunoreactivity in both the MP and the SMP colocalized with the enteric glial cell marker GFAP in all experimental animals. Indirect evidence that enteric glia participate in NO synthesis has been previously reported as L-arginine immunoreactivity is present in enteric glia (Nagahama et al., 2001). Furthermore, Green *et al* (Green et al., 2004) reported an increase in iNOS expression in enteric glia in the MP from dextran sodium sulfate-treated mice. Despite the fact that iNOS and GFAP immunoreactivity were unchanged throughout the inflammatory process induced by *T. spiralis* in the colon, the involvement of enteric glia in the pathogenesis of colitis cannot be ruled out since it has been shown that these cells may be active participants in neuro-immune communication events in the enteric nervous system (Cornet et al., 2001; Ruhl et al., 2001).

In summary, we conclude that mucosal inflammation induced by *T. spiralis* in the colon induces neural changes within the MP. Specifically, there is a decrease in CGRP and nNOS immunoreactivity. These changes may be responsible for alterations in gut motility during inflammation. Macrophages (ED1) expressing MHC class II are found extensively in both enteric plexuses and might thus play a pivotal role in the neural changes observed.

### 3.6. References

Aulí M, Sharkey K, Fernandez E (2004). Functional and structural changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Neurogastroenterology and motility* 16: 857. (*Abstract*).

Aulí M., Fernández E. (2005). Characterization of functional and morphological changes in a rat model of colitis induced by *Trichinella spiralis*. *Digestive Diseases and Sciences* 50:1432-1443.

Balemba OB, Mortensen K, Semuguruka WD, Hay-Schmidt A, Johansen MV, Dantzer V (2002). Neuronal nitric oxide synthase activity is increased during granulomatous inflammation in the colon and caecum of pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Auton Neurosci* 99:1-12.

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

Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK (2004). Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G137-G147.

Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40:767-774.

Bishop AE, Polak JM, Bryant MG, Bloom SR, Hamilton S (1980). Abnormalities of vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves in Crohn's disease. *Gastroenterology* 79:853-860.

Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K (2005). Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosci* 117:41-53.

Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93.

Castro GA, Fairbairn D (1969). Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol* 55:51-58.

Collins SM, Blennerhassett P, Vermillion DL, Davis K, Langer J, Ernst PB (1992). Impaired acetylcholine release in the inflamed rat intestine is T cell independent. *Am J Physiol* 263:G198-G201.

Collins SM, Blennerhassett PA, Blennerhassett MG, Vermillion DL (1989). Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 257:G898-G903.

Cornet A, Savidge TC, Cabarrocas J, Deng WL, Colombel JF, Lassmann H, Desreumaux P, Liblau RS (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13306-13311.

Costa M, Buffa R, Furness JB, Solcia E (1980). Immunohistochemical localization of polypeptides in peripheral autonomic nerves using whole mount preparations. *Histochemistry* 65:157-165.

Davis KA, Masella J, Blennerhassett MG (1998). Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Exp Neurol* 152:251-258.

De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P, Wang L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Collins SM, Tougas G (2001). Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 49:822-827.

Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599.

Dvorak AM, Onderdonk AB, McLeod RS, Monahan-Earley RA, Cullen J, Antonioli DA, Blair JE, Morgan ES, Cisneros RL, Estrella P (1993). Axonal necrosis of enteric autonomic nerves in continent ileal pouches. Possible implications for pathogenesis of Crohn's disease. *Ann Surg* 217:260-271.

Dvorak AM, Osage JE, Monahan RA, Dickersin GR (1980). Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. III. Target tissues. Proliferation of and injury to smooth muscle and the autonomic nervous system. *Hum Pathol* 11:620-634.

Ekblad E, Bauer AJ (2004). Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:123-128.

Ekblad E, Ekman R, Hakanson R, Sundler F (1988). Projections of peptide-containing neurons in rat colon. *Neuroscience* 27:655-674.

Eysselein VE, Reinshagen M, Cominelli F, Sternini C, Davis W, Patel A, Nast CC, Bernstein D, Anderson K, Khan H, . (1991). Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. *Gastroenterology* 101:1211-1219.

Fiocchi C (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115:182-205.

Furness JB, Costa M (1974). The adrenergic innervation of the gastrointestinal tract. *Ergeb Physiol* 69:2-51.

Furness JB, Kunze WA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54:1-18.

Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM (2000). Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G259-G265.

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

Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, Mebis J, Penninckx F, Vantrappen G, Desmet VJ (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103:439-447.

Green CL, Ho W, Sharkey KA, McKay DM (2004). Dextran sodium sulfate-induced colitis reveals nicotinic modulation of ion transport via iNOS-derived NO. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G706-G714.

Grider JR (1994). CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am J Physiol* 266:G1139-G1145.

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

Hirst GD, McKirdy HC (1974). A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. *J Physiol* 238:129-143.

Holzer P (1998). Implications of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in inflammatory bowel disease. *Digestion* 59:269-283.

Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.

Jessen KR, Mirsky R (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature* 286:736-737.

Khan I, Collins SM (1994). Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. *Gastroenterology* 107:691-700.

Kimura M, Masuda T, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H (1994). Changes in neuropeptide-containing nerves in human colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Pathol Int* 44:624-634.

Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, Haruma K, Tamaru T, Kajiyama G, Miyoshi A (1992). Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis. *Dig Dis Sci* 37:1729-1737.

Koch TR, Carney JA, Go VL (1987). Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 32:369-376.

Kummer W, Stommel C, Grau V (2005). MHC class II antigen-expressing cells in cardiac ganglia of the rat. *Cell Tissue Res* 319:37-48.

Lin A, Lourenssen S, Stanzel RD, Blennerhassett MG (2005). Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Exp Neurol* 191:337-343.

Mazumdar S, Das KM (1992). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 87:176-181.

McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P (1999). Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 45:864-873.

McVey DC, Vigna SR (2001). The capsaicin VR1 receptor mediates substance P release in toxin A-induced enteritis in rats. *Peptides* 22:1439-1446.

- Miampamba M, Sharkey KA (1998). Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 10:315-329.
- Miampamba M, Sharkey KA (1999). Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11:193-206.
- Mizuta Y, Isomoto H, Takahashi T (2000). Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 118:714-723.
- Nagahama M, Semba R, Tsuzuki M, Aoki E (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10:336-340.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52:84-90.
- Nishi S, North RA (1973). Presynaptic action of noradrenaline in the myenteric plexus. *J Physiol* 231:29P-30P.
- Palmer JM, Greenwood B (1993). Regional content of enteric substance P and vasoactive intestinal peptide during intestinal inflammation in the parasitized ferret. *Neuropeptides* 25:95-103.
- Palmer JM, Greenwood-Van Meerveld B (2001). Integrative neuroimmunomodulation of gastrointestinal function during enteric parasitism. *J Parasitol* 87:483-504.
- Palmer JM, Koch TR (1995). Altered neuropeptide content and cholinergic enzymatic activity in the inflamed guinea pig jejunum during parasitism. *Neuropeptides* 28:287-297.
- Reddy SN, Bazzocchi G, Chan S, Akashi K, Villanueva-Meyer J, Yanni G, Mena I, Snape WJ, Jr. (1991). Colonic motility and transit in health and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 101:1289-1297.
- Roberts PJ, Riley GP, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ (2001). The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol* 54:293-297.
- Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1163-G1171.
- Ruhl A, Hurst S, Collins SM (1994). Synergism between interleukins 1 beta and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 107:993-1001.
- Sands BE (2004). From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 126:1518-1532.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-1057.

Sharkey KA, Kroese AB (2001). Consequences of intestinal inflammation on the enteric nervous system: neuronal activation induced by inflammatory mediators. *Anat Rec* 262:79-90.

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

Song ZM, Brookes SJ, Costa M (1994). All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* 180:219-222.

Su HC, Bishop AE, Power RF, Hamada Y, Polak JM (1987). Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRP- and NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. *J Neurosci* 7:2674-2687.

Surrenti C, Renzi D, Garcea MR, Surrenti E, Salvadori G (1993). Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis. *J Physiol Paris* 87:307-311.

Swain MG, Agro A, Blennerhassett P, Stanisz A, Collins SM (1992). Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 102:1913-1919.

Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M (2000). Peptidergic nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 47:400-404.

Traub RJ, Hutchcroft K, Gebhart GF (1999). The peptide content of colonic afferents decreases following colonic inflammation. *Peptides* 20:267-273.

Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, Mashimo H, Collins SM (2004). Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G865-G874.

Vallance BA, Galeazzi F, Collins SM, Snider DP (1999). CD4 T cells and major histocompatibility complex class II expression influence worm expulsion and increased intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Infect Immun* 67:6090-6097.

Van Assche G, Collins SM (1996). Leukemia inhibitory factor mediates cytokine-induced suppression of myenteric neurotransmitter release from rat intestine. *Gastroenterology* 111:674-681.

Xiang Z, Burnstock G (2004). Development of nerves expressing P2X3 receptors in the myenteric plexus of rat stomach. *Histochem Cell Biol* 122:111-119.

## Discussió general

La infecció oral amb larves de *T. spiralis* és un model molt utilitzat per tal d'estudiar els canvis que es produeixen durant la inflamació de l'intestí prim; tanmateix, la inducció de colitis amb aquest paràsit ha estat molt poc caracteritzada (Grossi et al., 1993; Jacobson et al., 1995). Per tal d'aconseguir que les larves penetrin a la mucosa colònica és imprescindible que s'administrin via intrarectal ja que administrat per via oral, el paràsit no arriba més enllà de l'íleon (Dick and Silver, 1980). A més a més, per dur a terme aquest tipus d'administració és necessària l'anestèsia de l'animal -en aquest estudi hem utilitzat anestèsia inhalatòria per halotà- i hem comprovat que ni l'anestèsia ni l'ènema administrat produeixen alteracions de cap dels paràmetres estudiats (rates *sham*).

Aquest treball analitza fins a quin punt la colitis induïda per *T. spiralis* en la rata presenta semblances amb la UC i pot ser útil com a model de malalties inflamatòries intestinals humanes.

### **Simptomatologia de les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis***

Les rates infectades presenten 2 períodes de disminució d'ingesta i pes. El primer es dona entre els dies 1 i 4 post infecció (PI) i el segon entre els dies 11 i 15 PI; a partir del dia 15 les rates es recuperen sense arribar als valors observats en les rates *sham*. Aquests períodes recorden el cicle biològic del paràsit: el primer podria representar l'entrada del paràsit a la mucosa del còlon i el segon podria ser degut a la migració de les larves des de la mucosa fins al múscul estriat. El fet que només trobéssim alguns paràsits a la capa submucosa en rates de dia 14 PI mentre que en vam observar molts d'enquistats a músculs estriats a dia 30 PI, fa pensar que el cicle del nemàtode es tanca, independentment de l'administració oral o intrarectal del paràsit. Sembla ser que en l'administració oral de larves de *T. spiralis* (Castro et al., 1979; Faro et al., 2000), la disminució d'ingesta i no la diarrea és la causa principal de la pèrdua de pes que es produeix durant la inflamació.

Les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis* també presenten leucocitosi amb neutrofilia i eosinofilia evidenciables del dia 6 al 21 PI; aquests símptomes suggereixen que aquestes rates pateixen a part de la colitis, una marcada resposta del seu sistema immunitari. A més a més, presenten femtes toves amb *mucus* i increment del pes de les femtes des del dia 2 al

20 PI. Estudis realitzats en pacients amb UC també mostren un increment del pes de les femtes durant la fase activa de la colitis i ho relacionen amb l'exudat de l'epiteli inflammat, amb l'augment que es produeix en la secreció de *mucus* i la reducció en l'absorció de fluids i electròlits que es dona durant aquest procés (Rao and Read, 1990; Snape, Jr. et al., 1991).

### **Troballes macro i microscòpiques de les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis***

El còlon de les rates infectades presenta una inflamació macroscòpica moderada caracteritzada per la presència de petèquies, congestió, producció de mucus incrementada i absència d'úlceres macroscòpiques des del dia 2 al 14 PI. El còlon de rates a dia 30 PI té una aparença gairebé normal. Per altre costat, els animals *sham* mai van presentar cap tipus de lesió.

Les lesions microscòpiques observades en els animals infectats són les següents: a dia 2 PI es troba atrofia epitelial, edema i hiperplàsia de la mucosa, edema de la submucosa, presència de nombroses larves de *T. spiralis* i infiltrat inflamatori de tipus agut a nivell de mucosa i submucosa; a dia 6 PI, es troben microúlceres i larves a la mucosa, i un edema submucós sever acompanyat d'un augment del nombre de cèl·lules inflamatòries; a dia 14 PI, s'observa regeneració de la mucosa i la presència d'algunes larves del nemàtode, i a dia 30 PI no es troba cap tipus de lesió inflamatòria.

### *Tipus cel·lular inflamatori implicat*

L'infiltrat inflamatori observat del dia 2 al 6 PI es caracteritza per la presència de neutròfils, macròfags, cèl·lules limfopasmocitàries i eosinòfils entre els quals l'infiltrat neutrofilic és el més abundant. A dia 14 PI, el nombre de cèl·lules inflamatòries encara es troba incrementat però, el tipus cel·lular més abundant durant aquesta fase són els macròfags. El patró microscòpic observat en aquest model presenta semblances amb la UC sobretot pel que fa al tipus cel·lular implicat i a l'estructura de la mucosa (Seldenrijk et al., 1991).

El nombre de cèl·lules immunoreactives a l'OX-6, que reconeix l'MHC II, es troba molt incrementat tant al PSM com al PM de les rates infectades (dia 6 i 14 PI). Estudis anteriors (Galeazzi et al., 2000; Vallance et al., 1999), mostren que els macròfags que expressen el MHC II de la muscular externa de ratolins infectats per *T. spiralis* estan implicats en el desenvolupament dels canvis neurals observats en aquest model. Per altre costat, Geboes *et al.* (Geboes et al., 1992) van demostrar per primer cop l'expressió del MHC II a la glia entèrica de



pacients amb IBD, troballa que nosaltres no hem observat en aquest estudi. Tot i això, els nostres resultats suggereixen que les alteracions que trobem en aquest model estan immunològicament mediatades a través de la presentació d'antigen i l'activació de les cèl·lules immunitàries que infiltrin els plexes entèrics.

A més a més, també hem estudiat la immunoreactivitat a dos marcadors específics de macròfags: l'ED1 que s'expressa tant en monòcits com en macròfags de rata, i l'ED2 que s'expressa en una subpoblació diferenciada de macròfags residents a l'íntestí (Dijkstra et al., 1985; Kummer et al., 2005). Estudis anteriors van demostrar que els canvis observats en la funció neural entèrica depenien de la presència de macròfags en un model de jejunitis per *T. spiralis* en rata (Galeazzi et al., 2000). El nombre de cèl·lules immunoreactives a ED1 es troba molt incrementat en ambdós plexes entèrics de les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis* a dia 6 i 14 PI; de manera similar, també ha estat descrit un increment del nombre de macròfags a les capes musculars intestinals, sobretot a dia 6 PI, en el model de jejunitis-induïda per *T. spiralis* (Galeazzi et al., 2000). En canvi, en el nostre estudi només trobem augmentat el nombre de cèl·lules immunoreactives a ED2 al PSM dels animals infectats, resultats que també concorden amb els trobats en el model de jejunitis per *T. spiralis* anteriorment esmentat (Galeazzi et al., 2000), i que suggereixen que els macròfags infiltrants més que no pas la població de macròfags residents, són els que estan implicats en el desenvolupament de canvis neurals entèrics en aquest model. Cal dir, que encara que no hem realitzat doble marcatge MHC II vs. ED1/ED2, el nombre i morfologia de les cèl·lules marcades positivament amb ED1 i ED2, sembla que es correlacionen bé amb el nombre i morfologia de cèl·lules positives a MHC II. De fet, els macròfags són el tipus cel·lular que més expressa MHC II en el jejú inflammat per *T. spiralis* (Vallance et al., 1999). Aquest resultat fa pensar que els macròfags ED1 positius que expressen l'MHC II podrien estar relacionats amb els canvis neurals i alteracions en la motilitat colònica que s'observen en aquest model de colitis.

#### *Expressió de la òxid nítric sintetasa induïble (iNOS)*

La inflamació colònica induïda per *T. spiralis* va acompanyada d'un increment significatiu en l'expressió de la iNOS en l'epiteli i l'infiltrat inflamatori present a la mucosa i la submucosa de les rates infectades (2-14 PI). Cal dir que estudis realitzats tant en pacients amb UC activa (Singer et al., 1996; Kimura et al., 1998; Kolios et al., 1998; Guihot et al., 2000)

com en d'altres models d'inflamació intestinal (McCafferty et al., 1999; Miampamba and Sharkey, 1999) també han descrit un augment de la iNOS durant el procés inflamatori. Concretament, Kimura *et al* (Kimura et al., 1998) van observar, de manera similar al nostre estudi, un augment en la immunoreactivitat a la iNOS tant a *lamina propria* com a l'epiteli de la mucosa de pacients amb UC activa. En el nostre estudi, a més a més, la morfologia de l'infiltrat inflamatori -que expressa iNOS- presenta la morfologia de leucòcits fagòcits, sobretot macròfags i alguns neutròfils. De fet, aquests tipus cel·lulars se solen acumular a la *lamina propria* de la mucosa inflamada i es consideren una font important de radicals lliures (Grisham et al., 1999). Tepperman *et al* (Tepperman et al., 1993) van descriure que algunes endotoxines i citocines poden induir un increment en l'activitat de la iNOS en cultius de cèl·lules epitelials.

L'increment en l'expressió de la iNOS, que s'observa en la mucosa de pacients amb UC i en les rates infectades via intrarectal amb larves de *T. spiralis*, contribueix a l'increment de l'activitat d'aquest enzim i dóna lloc a la formació de quantitats molt grans d'NO. L'increment en la síntesi d'NO és un factor determinant per l'agreujament de la inflamació contribuint al desenvolupament de dany tissular, i pot ser considerat un factor rellevant en la disminució de motilitat i contractilitat que observem en aquest model. En contrast amb els nostres resultats, l'estudi realitzat per Bian *et al.* (Bian et al., 2001) descriu una disminució en l'expressió de la iNOS a l'intestí prim de ratolins infectats per via oral amb *T. spiralis* (del dia 3 al 30 PI). Cal dir que la disminució en l'expressió de la iNOS és un fet del tot insòlit en condicions d'inflamació intestinal i tal com s'ha esmentat anteriorment, la majoria de treballs solen descriure un increment en la seva expressió (Singer et al., 1996; Kolios et al., 1998; Guihot et al., 2000; McCafferty et al., 1999; Miampamba and Sharkey, 1999; Kimura et al., 1998). Tot i això, aquesta discrepància amb els nostres resultats podria ser deguda a l'estudi de diferents regions intestinals o bé a diferències entre les espècies animals estudiades.

Per un altre costat, en el nostre estudi també observem una lleugera immunoreactivitat a la iNOS en algunes cèl·lules epitelials i inflamatòries de rates *sham*. Aquest fet ha estat descrit per altres investigadors i s'associa a la contínua exposició de la mucosa intestinal a diversos microorganismes (McCafferty et al., 1999; Miampamba and Sharkey, 1999; Roberts et al., 2001) i en definitiva a un estat de "inflamació controlada" característic de l'intestí.

**Motilitat espontània colònica en les rates infectades per *T. spiralis****Contraccions colòniques : contraccions HALF i LAHF*

El còlon de rata es caracteritza per la presència de dos patrons elèctrics associats a dos patrons d'activitat mecànica. Per un costat, les contraccions HALF (d'elevada amplitud però baixa freqüència) que estan associades a MPOs i per altre costat, les contraccions LAHF (de baixa amplitud però elevada freqüència) que s'associen a oscil·lacions del potencial de membrana de baixa amplitud (ones lentes) (Pluja et al., 2001). La xarxa d'ICCs del PM regula els MPOs i les contraccions HALF; en canvi, la xarxa d'ICCs del PSM participa en la regulació de les ones lentes i en la generació de les contraccions LAHF.

En aquest estudi, trobem que les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis* presenten canvis importants en ambdós patrons motors. Les tires de múscul circular colònic presenten unes contraccions HALF disminuïdes des del dia 2 fins al 30 PI. A més a més, quan s'enregistra l'activitat espontània de tires de rates infectades (sobretot a dia 6 i dia 14 PI) la motilitat desapareix en un interval de temps curt. Pel que fa a les contraccions LAHF, trobem una amplitud augmentada a dia 2 PI i disminuïda a dia 6 PI. Cal dir que estudis realitzats en pacients amb colitis ulcerosa (Rao and Read, 1990; Snape, Jr. et al., 1991; Reddy et al., 1991), així com en altres models animals de colitis (Grossi et al., 1993; Myers et al., 1997; Lu et al., 1997), també descriuen en general una disminució de la contractilitat colònica, però no analitzen els canvis de patró d'activitat mecànica. A més a més, el fet que durant la colitis induïda per *T. spiralis* trobem canvis tant en les contraccions HALF com en les LAHF suggereix que la inflamació podria induir canvis sostinguts en les ICC i com a conseqüència una activitat marcapassos alterada. De fet, canvis ultraestructurals en aquest tipus cel·lular han estat prèviament descrits al còlon de pacients amb UC (Rumessen, 1996), així com en la inflamació intestinal induïda amb etanol i àcid acètic en gossos (Lu et al., 1997) i en ratolins infectats per via oral amb *T. spiralis* (Wang et al., 2002).

*Participació de les capes mucosa i submucosa en alteracions motores observades*

En aquest estudi, hem trobat lesions histopatològiques marcades i un augment important de la immunoreactivitat a la iNOS a la capa mucosa i submucosa durant la infecció intrarectal per *T. spiralis*. Per aquests motius, també hem analitzat la participació d'aquestes capes en el desenvolupament de la dismotilitat observada. Trobem que les tires circulars de còlon d'animals

infectats, en les quals hem disseccionat prèviament tant la capa mucosa com la submucosa, presenten una activitat contràctil espontània superior a la observada en tires que conserven totes les capes. Tot i això, la motilitat espontània segueix sent inferior a la observada en animals *sham*. Aquest fet es pot relacionar amb l'increment en l'expressió de la iNOS que trobem sobretot en aquestes dues capes. L'augment d'NO és doncs un factor determinant en la disminució de contractilitat observada en aquest model d'inflamació colònica. A més a més, l'activitat fàsica espontània es manté sense canvis durant més temps que en les tires que tenen les capes mucosa i submucosa resseccionades. De fet, quan s'enregistra l'activitat de tires amb mucosa i submucosa obtingudes d'animals infectats, l'activitat rítmica espontània no es conserva ni tan sols durant el temps de durada de l'experiment. Aquesta troballa, que és més marcada a dia 6 i 14 PI, indica que la inflamació localitzada justament en aquestes dues capes és determinant per al desenvolupament de la disfunció del múscul llis i suggereix que els canvis estructurals permanents de la cèl·lula muscular llisa serien només en part responsables dels canvis de motilitat observats (Xie et al., 1992; Liu et al., 2001). Així mateix, s'ha descrit que la mucosa i submucosa colònica de pacients amb UC activa produeix mediadors inflamatoris -IL-1 $\beta$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i NO- que difonen a les capes musculars i contribueixen a la dismotilitat colònica observada en aquesta malaltia (Cao et al., 2005). És possible que en una primera etapa de la malaltia, els mediadors inflamatoris produïts a la mucosa afectin la funció muscular, però també cal tenir en compte que les mateixes cèl·lules musculars llises i les pròpies cèl·lules epitelials també són font d'aquests mediadors inflamatoris (Salinthonne et al., 2004) i poden contribuir al manteniment de la inflamació en aquests pacients.

El fet que la motilitat a dia 30 PI encara es troba disminuïda -tot i l'absència del paràsit a la mucosa colònica i malgrat que la immunoreactivitat a la iNOS és similar a la observada en animals control- fa pensar que la resposta inflamatòria sistèmica i no la irritació local provocada pel paràsit és un factor determinant de la dismotilitat colònica induïda per *T. spiralis*. De la mateixa manera, s'ha observat que les alteracions motores que es donen en rates infectades via oral amb aquest paràsit, tampoc requereixen la presència del mateix a la llum intestinal (Marzio et al., 1990) i que els canvis en la motilitat persisteixen fins i tot en zones no inflamades (Tanovic et al., 2002). Ambdós fets suggereixen que les alteracions motores observades estarien mediades també per la resposta inflamatòria de l'hoste. Per altre costat, el retorn de l'expressió de la iNOS als nivells basals que observem a dia 30 PI en aquest estudi, juntament amb la

hipomotilitat colònica residual que presenten aquests animals, suggereix la presència de canvis permanents a nivell de múscul llis i de SNE.

### **Contractilitat colònica en les rates infectades per *T. spiralis***

La motilitat del múscul llis circular del còlon depèn per un costat, de l'alliberament de calci des dels magatzems intracel·lulars i per un altre costat, depèn de l'entrada de calci a través de canals de calci dependents de voltatge (Sato et al., 1994). En resposta a diferents estímuls, s'activen aquestes vies de mobilització de calci que determinen un augment del nivell de calci intracel·lular i la consegüent contracció del múscul llis (Sato et al., 1994; Shi and Sarna, 2000). L'agonista excitatori que hem utilitzat en aquest treball ha estat l'ACh ja que és un dels principals neurotransmissors implicats en les contraccions espontànies del còlon a nivell de la unió neuroefectora (Kunze and Furness, 1999). Hem trobat que el còlon de rates infectades per *T. spiralis* presenta una resposta contràctil disminuïda front a l'ACh. Aquest fet ha estat descrit també en d'altres models de colitis (Grossi et al., 1993; Liu et al., 2001; Myers et al., 1997; Shi and Sarna, 2000) i s'ha associat a possibles alteracions en les propietats de les proteïnes G acoblades als receptors muscarínics (Shi and Sarna, 2004), canvis en l'expressió o regulació de proteïnes contràctils (Xie et al., 1992) i/o canvis en la contribució del calci extracel·lular i intracel·lular (Liu et al., 2001; Shi and Sarna, 2000).

### *Contribució del calci intracel·lular a la contracció*

En principi, una contracció que es desenvolupa en absència de calci extracel·lular, reflecteix la utilització dels magatzems intracel·lulars d'aquest ió (Lategan and Brading, 1988; Myers et al., 1997; Paul et al., 1994). Les nostres dades indiquen que la contribució del calci intracel·lular a la contracció es manté intacta en aquest model, ja que la incubació del còlon en un medi lliure de calci afecta per igual a l'activitat espontània dels animals *sham* i els animals infectats. En el nostre estudi, la incubació del còlon amb nifedipina, un blocador dels canals de calci de tipus L, produeix un efecte inhibitori sobre les contraccions rítmiques espontànies similar en rates *sham* i en rates infectades amb el paràsit. A més a més, la contracció induïda per ACh, en presència d'aquest blocador, també es troba reduïda en tots els animals. Aquestes troballes suggereixen que les contraccions fàsiques espontànies així com la contracció en resposta a l'acetilcolina depenen de la presència de calci extracel·lular i de l'entrada de calci dins la cèl·lula

a través de canals de calci de tipus L tant en rates *sham* com en rates infectades per *T. spiralis*. En el múscul circular colònic de pacients amb UC, la contracció en resposta l'addició de NKA es troba disminuïda (Cao et al., 2004). La NKA activa receptors  $NK_2$  i produeix la contracció provocant l'alliberament de calci dels magatzems intracel·lulars (Cao et al., 2000), de manera que sembla ser que la utilització del calci intracel·lular es troba alterada en la malaltia humana, troballa que no hem pogut observar en aquest model.

#### *Contribució del calci extracel·lular a la contracció*

La depleció dels magatzems de calci intracel·lular disminueix la contracció induïda per ACh en tots els animals; tot i això, l'efecte inhibitori és més marcat en el còlon d'animals infectats (sobretot a dies 6 i 14 PI). Aquesta troballa suggereix que la utilització del calci extracel·lular pot estar alterada durant la inflamació colònica induïda per *T. spiralis* ja que la resposta a l'acetilcolina obtinguda després de la depleció del calci intracel·lular determina el nivell d'utilització del calci extracel·lular (Myers et al., 1997; Renzetti et al., 1990). Un dels factors determinants en la contribució del calci extracel·lular a la contracció són els canals de calci tipus L. De fet, s'ha trobat que el seu nivell d'expressió es troba disminuït en les cèl·lules musculars llises de còlon inflammat caní (Liu et al., 2001) i com a conseqüència es produeix una reducció en l'entrada de calci a la cèl·lula, que s'associa a la supressió de motilitat observada durant la inflamació.

El clorur potàssic provoca la contracció del múscul llis via despolarització i activació d'entrada de calci a la cèl·lula a través de canals sensibles a voltatge de la membrana plasmàtica. En aquest estudi, trobem que la resposta contràctil al clorur potàssic també està disminuïda durant la infecció per *T. spiralis*. Aquest fet pot suggerir que alguns passos de l'acoblament excitació-contracció es trobin alterats en aquest model. Les alteracions en l'acoblament excitació-contracció han estat descrites també per altres investigadors. Per exemple, la inflamació disminueix l'expressió d'algunes proteïnes G (proteïna  $G\alpha_{q/11}$ ) acoblades a receptors muscarínics en un model d'ileitis per àcid acètic en gos (Shi and Sarna, 2004). En canvi, la densitat dels receptors muscarínics i l'afinitat de l'ACh per aquests receptors no es van trobar alterats en aquest model. La disminució en l'expressió de proteïnes G, acoblades a receptors muscarínics, podria participar en la supressió de la contractilitat que s'observa durant la inflamació, ja que de fet, les proteïnes G constitueixen el primer pas de l'anomenat acoblament excitació-contracció

que condueix a la fosforilació/defosforilació de les proteïnes contràctils. Per altre costat, Xie *et al.* (Xie et al., 1992) van suggerir que la disminució en la resposta contràctil observada durant una colitis per formalina en conills pot ser deguda a alteracions en la interacció actina-miosina. Així doncs, defectes del sistema contràctil a diferents nivells com ara la regulació, síntesi i degradació de les pròpies proteïnes contràctils també es poden trobar alterats durant el procés inflamatori.

#### *Potencial de membrana de les cèl·lules musculars de còlon inflammat*

El potencial de repòs de membrana del múscul llis intestinal ve determinat majoritàriament per la diferent distribució d'ions, concretament sodi i potassi, a través de la membrana i per la permeabilitat selectiva de la membrana a aquests ions. El gradient de potassi a través de la membrana és determinant per la gènesi d'aquest potencial. Per contra, la bomba sodi-potassi participa més aviat poc en el la gènesi del potencial, tot i que contribueix en el manteniment de concentracions intracel·lulars elevades de potassi i baixes de sodi en comparació amb les seves respectives concentracions en el líquid extracel·lular. El múscul llis colònic de rata presenta un potencial de repòs de membrana que oscil·la al voltant dels  $-50$  mV (Pluja et al., 1999). En aquest treball, hem trobat que el potencial de membrana del còlon de rates infectades per *T. spiralis* es troba més hiperpolaritzat que el de les rates *sham*. Malgrat que el paper de la bomba sodi-potassi no és rellevant en la gènesi del potencial de membrana cal esmentar que alguns estudis suggereixen que canvis en la seva expressió, que han estat observats durant la infecció intestinal per *T. spiralis* en rata, podrien contribuir a alteracions del potencial de membrana de la cèl·lula muscular llisa intestinal (Khan and Collins, 1993).

La hiperpolarització induïda per estímul elèctric del múscul circular colònic de rata es deu tant a l'alliberament d'NO com d'ATP des dels terminals nerviosos NANC (Pluja et al., 1999). L'addició exògena d'aquests dos neurotransmissors hiperpolaritza la cèl·lula muscular i disminueix l'activitat rítmica espontània. L'NO és un gas molt difussible i que travessa fàcilment la membrana de la cèl·lula muscular llisa i activa la guanilat ciclasa soluble (sGC). Aquest enzim està format per una subunitat  $\alpha$  i una subunitat  $\beta$ , i el seu acoblament és limitant perquè l'activació pels seus lligands produeixi cGMP (Lucas et al., 2000). La producció de cGMP i la posterior fosforilació de proteïnes tradueixen el senyal de l'NO per donar lloc a la relaxació del múscul llis (Lincoln and Cornwell, 1991). A més a més, l'NO pot actuar incrementant la

conductància al potassi i induir també d'aquesta manera la hiperpolarització de la membrana (Thornbury et al., 1991). Les rates infectades per via intrarectal amb *T. spiralis* mostren un augment important en l'expressió de la iNOS en les capes més superficials colòniques, que resulta en un augment en la síntesi d'NO. El fet que els estudis electrofisiològics van ser realitzats en tires colòniques en les quals s'havia eliminat la capa mucosa i la submucosa, fa suggerir que les cèl·lules infiltrants al PM podrien participar activament en l'increment dels nivells d'NO. Aquest augment d'NO podria contribuir a la marcada disminució del potencial de repòs de la cèl·lula muscular llisa colònica que s'observa durant la inflamació. En darrer lloc, l'increment en la hiperpolarització cel·lular podria explicar la desorganització i disminució en l'activitat rítmica espontània i la reducció en la contractilitat del múscul llis de les rates amb colitis.

### **Alteracions del sistema nerviós entèric durant la inflamació colònica induïda per *T. spiralis***

El marcador pan neuronal utilitzat en aquest treball ha estat la PGP 9.5. La PGP 9.5 és una proteïna citoplasmàtica que pertany a la família de les hidroxilases C terminal de la ubiquitina. Les proteïnes d'aquesta família intervenen en molts processos cel·lulars com ara en la reparació d'ADN, la embriogènesi, la regulació de la transcripció i l'apoptosi. Concretament, la PGP 9.5 es troba en cossos neuronals i axons del SNC i SNP, així com en el tracte gastrointestinal. Cal dir també, que el nombre de neurones per gangli que hem observat en el teixit control d'aquest estudi és similar a l'observat en d'altres publicacions (Lin et al., 2005).

En aquest estudi, no hem observat canvis significatius en el nombre de neurones mientèriques després de la inducció de la inflamació, tot i que molts estudis descriuen pèrdues neuronals del 20% al 50% en models de colitis (Sanovic et al., 1999; Boyer et al., 2005). La raó d'aquesta discrepància podria raure en el fet que els estudis esmentats anteriorment han estat realitzats en models de colitis transmural, en els quals les lesions són molt més profundes que les trobades en la inflamació colònica induïda per *T. spiralis*.

### *Neurotransmissió excitatòria*

Estudis anteriors d'infeccions per *T. spiralis* suggerien que la neurotransmissió colinèrgica està alterada en aquest model (Collins et al., 1989; Galeazzi et al., 2000; Palmer and Koch, 1995; Van Assche and Collins, 1996; Davis et al., 1998). Per exemple, en la jejunitis per *T. spiralis* en rata, la ChAT augmenta durant la infecció i es manté elevada fins el dia 6 PI



(Davis et al., 1998). Per contra, en un model de jejunitis per *T. spiralis* en conill d'indies (Palmer and Koch, 1995), l'activitat de la ChAT es manté intacta durant les primeres etapes de la infecció (fins el dia 10 PI). És important tenir en compte que en aquest estudi no hem mesurat l'activitat enzimàtica de la ChAT, però sí la seva expressió i distribució, i no hem pogut evidenciar canvis significatius. En concordança amb la nostra observació, la proporció de neurones ChAT-positives es manté inalterada en pacients amb UC (Neunlist et al., 2003).

Tampoc no hem observat canvis pel que fa a la immunoreactivitat a la SP entre animals sans i infectats. Aquesta troballa era inesperada perquè molts estudis han trobat nivells alterats de SP durant la inflamació. Durant la jejunitis (Palmer and Greenwood, 1993; Swain et al., 1992) i ileitis (De Giorgio et al., 2001) induïdes per *T. spiralis* s'han trobat increments en l'alliberació de SP i reducció del seu contingut a nivell de l'intestí prim. En canvi, els estudis realitzats en teixits obtinguts de pacients amb UC solen descriure en general un augment en la SP de la mucosa i la *lamina propria* (Koch et al., 1987; Mazumdar and Das, 1992; Neunlist et al., 2003). Aquestes discrepàncies amb els nostres resultats poden ser degudes a diferents respostes a la inflamació segons el segment intestinal estudiat durant la infecció per *T. spiralis*.

#### *Neurotransmissió inhibidora*

En aquest estudi, observem que la TTX i L-NOARG produeixen un augment de l'àrea sota la corba (AUC, g x min), de l'amplitud i de la freqüència de les contraccions fàsiques espontànies del còlon de rates sanes. Aquest fet suggereix que l'activitat fàsica espontània està sotmesa a un control inhibitori tònic des de fibres nervioses NANC inhibitories, i ha estat prèviament descrit per altres investigadors (Pluja et al., 1999). En canvi, en la inflamació colònica per *T. spiralis* cap dels paràmetres esmentats abans augmenta significativament després de l'addició de TTX o L-NOARG, fet que suggereix una pèrdua com a mínim del control neural nitrèrgic en aquest model. Cal dir que en alguns casos vam observar un lleuger augment de l'activitat rítmica espontània després de l'addició d'aquests dos blocadors en el grup d'animals amb colitis, però mai va ser significatiu i l'efecte tenia una durada curta comparat amb els animals *sham*. El fet que aquest petit increment sigui, a més a més, molt transitori en els animals amb colitis podria ser explicat per l'augment en la síntesi de NO –per part de la iNOS i no de la nNOS- que es produeix en aquest model. De forma similar, Bossone *et al* (Bossone et al., 2001) també van descriure una reducció en l'efecte d'aquests dos blocadors en un model de colitis per

TNBS en rata i també el van associar a una disminució en l'alliberament d'NO d'origen neural (Bossone et al., 2001); a més a més, en la colitis per TNBS, les contraccions en *off* induïdes per estímul elèctric no augmenten significativament després de l'addició de L-NOARG, fet que suggereix altra vegada la pèrdua del control tònic inhibitori nitrèrgic prèviament descrit (Zhao et al., 2001).

L'apamina és un blocador de canals de potassi de baixa conductància activats per calci. L'addició d'apamina al bany d'òrgans provoca un augment de l'amplitud i la freqüència de les contraccions colòniques en teixit control. No obstant, l'apamina no fa augmentar cap dels paràmetres esmentats anteriorment quan analitzem teixit inflammat (sobretot a dia 6 i 14 PI). Aquesta disminució en la sensibilitat a l'apamina també ha estat descrita en la jejunitis induïda per *T. spiralis* (Tanovic et al., 2002) tant a nivell de jejú com en l'ili no inflammat i fa suggerir que els canvis en aquests canals poden alterar l'efecte dels neurotransmissors que actuen sobre els mateixos. Els efectes inhibitoris de l'ATP depenen en gran mesura de l'activació dels canals sensibles a apamina i s'ha proposat l'ATP com a co-transmissor inhibitori juntament amb l'òxid nítric en el còlon de rata (Pluja et al., 1999). Així doncs, la disminució en la sensibilitat a l'apamina observada durant l'estat inflamatori pot indicar una alteració de la neurotransmissió purinèrgica. L'alteració de la neurotransmissió purinèrgica també ha estat descrita anteriorment per altres investigadors com ara De Man *et al.* (De Man et al., 2003) que associen la inflamació intestinal crònica en ratolí amb canvis en el control purinèrgic de l'activitat neural colinèrgica.

La caracterització dels IJPs ha estat realitzada sempre en presència de nifedipina - blocador de canals de calci de tipus L- per tal d'estabilitzar el potencial de membrana, fer desaparèixer la motilitat rítmica espontània i permetre d'aquesta manera, augmentar la durada del registre de l'activitat elèctrica. Segons ha estat descrit prèviament, els IJPs del còlon de rata són bifàsics (Pluja et al., 1999), consten d'una hiperpolarització ràpida- que sembla ser mediada per ATP- i d'una hiperpolarització lenta mediada per un component nitrèrgic. La durada dels IJPs es troba significativament reduïda al teixit inflammat (6 PI). Aquesta troballa també ha estat observada per Lu *et al.* (Lu et al., 1997) en un model de colitis per àcid acètic en gos, fet que els va fer suggerir una reducció en l'alliberament neuronal d'NO. Per tant, la disminució observada en la durada dels IJPs fa pensar que la disminució en contractilitat que trobem en aquest model de colitis no és deguda a un augment en l'alliberament d'NO des de les neurones NANC. Probablement l'NO produït per la iNOS i no per la nNOS, sigui una de les causes que

contribueixen a la supressió de motilitat observada. Fins i tot en presència de TTX, que disminueix tant amplitud com durada dels IJPs, la durada d'aquests segueix mantenint-se inferior en el teixit inflammat comparada amb la del control. L'addició de L-NOARG disminueix la durada dels IJPs en tots els grups experimentals, però el seu efecte es troba reduït en el teixit inflammat. L'apamina disminueix l'amplitud dels IJPs en tots els animals però l'amplitud dels IJPs del teixit inflammat es veu menys afectada per aquest fàrmac en relació al que observem en teixit control. Així doncs, la falta de sensibilitat a l'L-NOARG i l'apamina observada al bany d'òrgans en rates infectades per *T. spiralis* és una troballa que també s'observa al analitzar la morfologia dels IJPs en teixit inflammat, i suggereix un deteriorament de la neurotransmissió inhibitoria en aquest model.

El nombre de neurones positives a la nNOS per gangli es troba significativament reduït al PM de rates infectades per *T. spiralis* (tant a dia 6 com 14 PI). Aquesta troballa pot explicar la disminució en la duració de l'IJP que presenten els animals infectats a dia 6 PI. Mizuta *et al.* (Mizuta *et al.*, 2000) també descriuen una disminució en l'expressió de nNOS en el model de colitis induïda amb DSS en rates i l'associen a l'alteració que observen en la relaxació no adrenèrgica no colinèrgica del colon distal d'aquests animals. Els canvis en l'expressió de la nNOS estan mediat, probablement, a través d'un procés dependent de citocines ja que per exemple, s'ha demostrat que l'IFN- $\gamma$  pot suprimir l'expressió del gen de la nNOS (Bandyopadhyay *et al.*, 1997). Els nivells de nNOS no s'alteren en models de colitis per TNBS en ratolins (Beck *et al.*, 2004; Vallance *et al.*, 2004) o fins i tot, es poden trobar incrementats en el còlon de porcs infectats amb el paràsit *Schistosoma japonicum* (Balemba *et al.*, 2002).

En el nostre estudi no hem observat canvis en la immunoreactivitat al VIP durant la inflamació. Gran part dels estudis realitzats en models animals d'inflamació intestinal descriuen majoritàriament un augment en la densitat de les fibres VIP-positives (Kishimoto *et al.*, 1992; Miampamba and Sharkey, 1998). Pel que fa a treballs realitzats amb teixit obtingut de pacients amb IBD, els resultats són discrepants perquè s'han descrit tant disminucions (Surrenti *et al.*, 1993) com increments (Tomita *et al.*, 2000; Ekblad and Bauer, 2004) en la seva immunoreactivitat.

### *Pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina*

El CGRP és un neuropèptid determinant en molts processos fisiològics i funcions reguladores del sistema nerviós entèric de moltes espècies de vertebrats. Concretament, participa en la regulació del múscul gastrointestinal i la motilitat (Palmer et al., 1984; Grider, 1994), apleix funcions sensibles (Rasmussen et al., 2001), intervé en la regulació de la microcirculació intestinal (Kawasaki, 2002), de la secreció (Tache, 1992) així com també de l'absorció d'alguns aminoàcids (Barada et al., 2000).

La capsaicina és una neurotoxina que activa fibres nervioses sensibles a través d'un canal iònic que es coneix com a receptor vaniloide (Caterina et al., 1997). Després de la seva activació, la capsaicina desensibilitza les neurones sensibles (Szallasi, 1996). S'ha demostrat que el 80 % de fibres sensibles a la capsaicina del SNE contenen CGRP i s'ha suggerit, que el CGRP té un paper determinant en el mecanisme d'hipersensibilitat colònica en la rata (Plourde et al., 1997). En aquesta espècie, les fibres immunoreactives a CGRP del PM són fibres d'origen majoritàriament intrínsec (Su et al., 1987). En canvi, les fibres immunoreactives a CGRP del PSM tenen un origen extrínsec i es troben envoltant vasos sanguinis. En el nostre model, la immunoreactivitat al CGRP es troba disminuïda en el PM a dia 6 i 14 PI. La disminució tant en intensitat com en densitat de les fibres CGRP-immunoreactives al PM suggereix un increment en la seva alliberació durant la resposta inflamatòria. L'increment en l'alliberació de CGRP ha estat descrit en d'altres models d'inflamació intestinal (Eysselein et al., 1991), tot i que la disminució d'aquest pèptid també ha estat observada en la colitis induïda amb TNBS (Miampamba and Sharkey, 1998) i en pacients amb IBD (Kimura et al., 1994). També ha estat descrit que l'addició de capsaicina a una preparació colònica, provoca una depleció de CGRP que acaba ocasionant una disminució de la resposta peristàltica a la distensió i a l'estimulació de la mucosa (Grider, 1994). Així doncs la disminució en les fibres immunoreactives al CGRP que observem en les rates infectades per *T. spiralis*, podria contribuir a les alteracions colòniques motores observades durant la inflamació.

### *Proteïnes neurals lligadores de calci*

L'alliberament de neurotransmissors des del terminal sinàptic és un procés complex que requereix la presència de proteïnes neuronals lligadores de calci que responguin a l'augment del nivell de calci intracel·lular. La calbindina pertany a aquest grup de proteïnes. El significat de la

seva expressió en les neurones entèriques colòniques no ha estat estudiat en profunditat, però hi ha dades que indiquen que podrien expressar-se en neurones sensibles aferents (Mann et al., 1999; Song et al., 1994). En aquest treball, hem analitzat la immunoreactivitat a aquesta proteïna i hem trobat que es troba disminuïda al PM a dia 6 PI; aquest fet, juntament amb la disminució de la immunoreactivitat al CGRP, fa suggerir que la funció de les neurones sensibles podria trobar-se alterada durant la inflamació colònica induïda per *T. spiralis*. Aquesta troballa també s'ha observat en d'altres models, com ara la colitis per TNBS en rata (Lin et al., 2005), on s'ha descrit que el nombre de neurones que co-expressen receptors del Factor de Creixement Neural (NGF) i calbindina disminueix, i que aquest fet podria induir canvis a diferents nivells de la fisiologia intestinal.

#### *Innervació extrínscica simpàtica*

La TH és un enzim que introdueix un segon grup hidroxil a l'anell aromàtic de la tirosina i constitueix el primer pas en la síntesi de catecolamines. La dopamina és una molècula precursora de norepinefrina i característica de la innervació simpàtica, però s'han trobat neurones intrínseques dopaminèrgiques en el sistema nerviós entèric d'algunes espècies (Li et al., 2004). La innervació noradrenèrgica a l'intestí modula la motilitat de les zones no esfintèriques a través de receptors  $\alpha_2$  que inhibeixen l'alliberament de neurotransmissors de neurones colinèrgiques excitatòries intrínseques (Nishi and North, 1973; Hirst and McKirdy, 1974). Estudis realitzats en pacients de Crohn han descrit un augment en la immunoreactivitat a la TH (Belai et al., 1997), i per altre costat, estudis realitzats en models d'inflamació intestinal com la colitis per TNBS o la mateixa colitis per *T. spiralis* en rata, descriuen una disminució en l'alliberament de noradrenalina en resposta al KCl o a l'estimulació elèctrica de camp (Jacobson et al., 1995). El fet que en el nostre estudi no hàgim observat diferències en la immunoreactivitat a la TH entre animals infectats i *sham*, no descarta completament que la innervació simpàtica pugui trobar-se alterada en aquest model.

#### **Cèl·lules glials entèriques**

Les cèl·lules glials entèriques són un tipus cel·lular que presenta semblances tant morfològiques com funcionals amb els astròcits del SNC. Així mateix, també se'ls atribueixen funcions tròfiques i protectores de les neurones entèriques i sembla ser que a més a més, estan

implicades en la integració i modulació de l'activitat neuronal (Cabarrocas et al., 2003). Per altre costat, es considera que aquestes cèl·lules constitueixen un component actiu del sistema nerviós entèric durant la inflamació intestinal ja que poden actuar com a cèl·lules presentadores d'antigen (Geboes et al., 1992), i interaccionen amb el sistema immunitari expressant citocines i receptors de citocines (Ruhl et al., 2001). Tot i això, en aquest estudi no hem observat expressió del MHC II a la glia entèrica durant la inflamació induïda per *T. spiralis*.

En aquest treball, també hem analitzat la immunoreactivitat a la GFAP que és una proteïna associada als filaments intermedis de les cèl·lules glials, però no hem observat diferències suggestives d'una reactivitat glial en les diferents situacions experimentals. Tot i això, hem trobat immunoreactivitat a la iNOS en ganglis entèrics d'ambdós plexes nerviosos tant d'animals *sham* com rates infectades per *T. spiralis* i hem observat que colocalitza amb la GFAP. De fet, ja existia una evidència indirecte de la participació de la glia entèrica en la síntesi d'NO perquè estudis anteriors havien descrit immunoreactivitat a la L-arginina en cèl·lules glials entèriques (Nagahama et al., 2001). Aquesta troballa s'associa a l'estatus d'inflamació controlada propi del còlon, degut a la contínua exposició a microorganismes (McCafferty et al., 1999; Roberts et al., 2001). Tot i que en d'altres models d'inflamació intestinal, com ara la colitis per DSS en ratolins, s'ha observat un increment de la immunoreactivitat a la iNOS en la glia del PM, nosaltres no hem trobat diferències entre animals *sham* i infectats; no obstant, la implicació de la glia entèrica en la patogènia de la colitis induïda per *T. spiralis* no s'hauria de descartar i mereixeria un estudi més detallat.

---

## Referències

- Balembe OB, Mortensen K, Semuguruka WD, Hay-Schmidt A, Johansen MV, Dantzer V (2002). Neuronal nitric oxide synthase activity is increased during granulomatous inflammation in the colon and caecum of pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Auton Neurosci* 99:1-12.
- Bandyopadhyay A, Chakder S, Rattan S (1997). Regulation of inducible and neuronal nitric oxide synthase gene expression by interferon-gamma and VIP. *Am J Physiol* 272:C1790-C1797.
- Barada KA, Saade NE, Atweh SF, Khoury CI, Nassar CF (2000). Calcitonin gene-related peptide regulates amino acid absorption across rat jejunum. *Regul Pept* 90:39-45.
- Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK (2004). Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G137-G147.
- Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 40:767-774.
- Bian K, Harari Y, Zhong M, Lai M, Castro G, Weisbrodt N, Murad F (2001). Down-regulation of inducible nitric-oxide synthase (NOS-2) during parasite-induced gut inflammation: a path to identify a selective NOS-2 inhibitor. *Mol Pharmacol* 59:939-947.
- Bossone C, Hosseini JM, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T (2001). Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G949-G957.
- Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K (2005). Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Auton Neurosci* 117:41-53.
- Cabarrocas J, Savidge TC, Liblau RS (2003). Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* 41:81-93.
- Cao W, Fiocchi C, Pricolo VE (2005). Production of IL-1beta, hydrogen peroxide, and nitric oxide by colonic mucosa decreases sigmoid smooth muscle contractility in ulcerative colitis. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1408-C1416.
- Cao W, Pricolo VE, Zhang L, Behar J, Biancani P, Kirber MT (2000). Gq-linked NK(2) receptors mediate neurally induced contraction of human sigmoid circular smooth muscle. *Gastroenterology* 119:51-61.
- Cao W, Vrees MD, Potenti FM, Harnett KM, Fiocchi C, Pricolo VE (2004). Interleukin 1beta-induced production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contributes to reduced sigmoid colonic circular smooth muscle contractility in ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 311:60-70.

Castro GA, Copeland EM, Dudrick SJ, Ramaswamy K (1979). Enteral and parenteral feeding to evaluate malabsorption in intestinal parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 28:500-507.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.

Collins SM, Blennerhassett PA, Blennerhassett MG, Vermillion DL (1989). Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 257:G898-G903.

Davis KA, Masella J, Blennerhassett MG (1998). Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine. *Exp Neurol* 152:251-258.

De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P, Wang L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Collins SM, Tougas G (2001). Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 49:822-827.

De Man JG, Seerden TC, De Winter BY, Van Marck EA, Herman AG, Pelckmans PA (2003). Alteration of the purinergic modulation of enteric neurotransmission in the mouse ileum during chronic intestinal inflammation. *Br J Pharmacol* 139:172-184.

Dick TA, Silver BB (1980). Intestinal distribution of *Trichinella spiralis* in rats. *Journal of Parasitology* 66:472-477.

Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54:589-599.

Ekblad E, Bauer AJ (2004). Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 16 Suppl 1:123-128.

Eysselein VE, Reinshagen M, Cominelli F, Sternini C, Davis W, Patel A, Nast CC, Bernstein D, Anderson K, Khan H, . (1991). Calcitonin gene-related peptide and substance P decrease in the rabbit colon during colitis. A time study. *Gastroenterology* 101:1211-1219.

Faro CJ, Reidelberger RD, Palmer JM (2000). Suppression of food intake is linked to enteric inflammation in nematode-infected rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278:R118-R124.

Galeazzi F, Haapala EM, van Rooijen N, Vallance BA, Collins SM (2000). Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G259-G265.

Geboes K, Rutgeerts P, Ectors N, Mebis J, Penninckx F, Vantrappen G, Desmet VJ (1992). Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 103:439-447.



Grider JR (1994). CGRP as a transmitter in the sensory pathway mediating peristaltic reflex. *Am J Physiol* 266:G1139-G1145.

Grisham MB, Jour'dheuil D, Wink DA (1999). Nitric oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol* 276:G315-G321.

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

Guihot G, Guimbaud R, Bertrand V, Narcy-Lambare B, Couturier D, Duee PH, Chaussade S, Blachier F (2000). Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. *Amino Acids* 18:229-237.

Hirst GD, McKirdy HC (1974). A nervous mechanism for descending inhibition in guinea-pig small intestine. *J Physiol* 238:129-143.

Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109:718-722.

Kawasaki H (2002). Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves. *Jpn J Pharmacol* 88:39-43.

Khan I, Collins SM (1993). Altered expression of sodium pump isoforms in the inflamed intestine of *Trichinella spiralis*-infected rats. *Am J Physiol* 264:G1160-G1168.

Kimura H, Hokari R, Miura S, Shigematsu T, Hirokawa M, Akiba Y, Kurose I, Higuchi H, Fujimori H, Tsuzuki Y, Serizawa H, Ishii H (1998). Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 42:180-187.

Kimura M, Masuda T, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H (1994). Changes in neuropeptide-containing nerves in human colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Pathol Int* 44:624-634.

Kishimoto S, Kobayashi H, Shimizu S, Haruma K, Tamaru T, Kajiyama G, Miyoshi A (1992). Changes of colonic vasoactive intestinal peptide and cholinergic activity in rats with chemical colitis. *Dig Dis Sci* 37:1729-1737.

Koch TR, Carney JA, Go VL (1987). Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis Sci* 32:369-376.

Kolios G, Rooney N, Murphy CT, Robertson DA, Westwick J (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 43:56-63.

Kummer W, Stommel C, Grau V (2005). MHC class II antigen-expressing cells in cardiac ganglia of the rat. *Cell Tissue Res* 319:37-48.

Kunze WA, Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61:117-142.

Lategan TW, Brading AF (1988). Contractile effects of manganese on taenia of guinea pig cecum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 254:G489-G494.

Li ZS, Pham TD, Tamir H, Chen JJ, Gershon MD (2004). Enteric dopaminergic neurons: definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *J Neurosci* 24:1330-1339.

Lin A, Lourenssen S, Stanzel RD, Blennerhassett MG (2005). Selective loss of NGF-sensitive neurons following experimental colitis. *Exp Neurol* 191:337-343.

Lincoln TM, Cornwell TL (1991). Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. *Blood Vessels* 28:129-137.

Liu X, Rusch NJ, Striessnig J, Sarna SK (2001). Down-regulation of L-type calcium channels in inflamed circular smooth muscle cells of the canine colon. *Gastroenterology* 120:480-489.

Lu G, Qian X, Berezin I, Telford GL, Huizinga JD, Sarna SK (1997). Inflammation modulates in vitro colonic myoelectric and contractile activity and interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 273:G1233-G1245.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 52:375-414.

Mann PT, Furness JB, Southwell BR (1999). Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons in the rat ileum. *Cell Tissue Res* 297:241-248.

Marzio L, Blennerhassett P, Chiverton S, Vermillion DL, Langer J, Collins SM (1990). Altered smooth muscle function in worm-free gut regions of *Trichinella*-infected rats. *Am J Physiol* 259:G306-G313.

Mazumdar S, Das KM (1992). Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 87:176-181.

McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P (1999). Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 45:864-873.

Miampamba M, Sharkey KA (1998). Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 10:315-329.

Miampamba M, Sharkey KA (1999). Temporal distribution of neuronal and inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 11:193-206.

- Mizuta Y, Isomoto H, Takahashi T (2000). Impaired nitrergic innervation in rat colitis induced by dextran sulfate sodium. *Gastroenterology* 118:714-723.
- Myers BS, Martin JS, Dempsey DT, Parkman HP, Thomas RM, Ryan JP (1997). Acute experimental colitis decreases colonic circular smooth muscle contractility in rats. *Am J Physiol* 273:G928-G936.
- Nagahama M, Semba R, Tsuzuki M, Aoki E (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* 10:336-340.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52:84-90.
- Nishi S, North RA (1973). Presynaptic action of noradrenaline in the myenteric plexus. *J Physiol* 231:29P-30P.
- Palmer JM, Greenwood B (1993). Regional content of enteric substance P and vasoactive intestinal peptide during intestinal inflammation in the parasitized ferret. *Neuropeptides* 25:95-103.
- Palmer JM, Koch TR (1995). Altered neuropeptide content and cholinergic enzymatic activity in the inflamed guinea pig jejunum during parasitism. *Neuropeptides* 28:287-297.
- Palmer JM, Weisbrodt NW, Castro GA (1984). *Trichinella spiralis*: intestinal myoelectric activity during enteric infection in the rat. *Exp Parasitol* 57:132-141.
- Paul DA, Ierardi JA, Parkman HP, Ryan JP (1994). Developmental changes in gastric fundus smooth muscle contractility and involvement of extracellular calcium in fetal and adult guinea pigs. *Pediatr Res* 36:642-646.
- Plourde V, St-Pierre S, Quirion R (1997). Calcitonin gene-related peptide in viscerosensitive response to colorectal distension in rats. *Am J Physiol* 273:G191-G196.
- Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G255-G266.
- Pluja L, Fernandez E, Jimenez M (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 126:883-892.
- Rao SS, Read NW (1990). Gastrointestinal motility in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 172:22-28.
- Rasmussen TN, Schmidt P, Poulsen SS, Holst JJ (2001). Localisation and neural control of the release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from the isolated perfused porcine ileum. *Regul Pept* 98:137-143.

- Reddy SN, Bazzocchi G, Chan S, Akashi K, Villanueva-Meyer J, Yanni G, Mena I, Snape WJ, Jr. (1991). Colonic motility and transit in health and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 101:1289-1297.
- Renzetti LM, Wang MB, Ryan JP (1990). Contribution of intracellular calcium to gallbladder smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 259:G1-G5.
- Roberts PJ, Riley GP, Morgan K, Miller R, Hunter JO, Middleton SJ (2001). The physiological expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human colon. *J Clin Pathol* 54:293-297.
- Ruhl A, Franzke S, Collins SM, Stremmel W (2001). Interleukin-6 expression and regulation in rat enteric glial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1163-G1171.
- Rumessen JJ (1996). Ultrastructure of interstitial cells of Cajal at the colonic submuscular border in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 111:1447-1455.
- Salinthon S, Singer CA, Gerthoffer WT (2004). Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G627-G637.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* 155:1051-1057.
- Sato K, Sanders KM, Gerthoffer WT, Publicover NG (1994). Sources of calcium utilized in cholinergic responses in canine colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 267:C1666-C1673.
- Seldenrijk CA, Morson BC, Meuwissen SG, Schipper NW, Lindeman J, Meijer CJ (1991). Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 32:1514-1520.
- Shi XZ, Sarna SK (2004). G protein-mediated dysfunction of excitation-contraction coupling in ileal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286:G899-G905.
- Shi XZ, Sarna SK (2000). Impairment of Ca<sup>2+</sup> mobilization in circular muscle cells of the inflamed colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278:G234-G242.
- Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111:871-885.
- Snape WJ, Jr., Williams R, Hyman PE (1991). Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol* 261:G987-G991.
- Song ZM, Brookes SJ, Costa M (1994). All calbindin-immunoreactive myenteric neurons project to the mucosa of the guinea-pig small intestine. *Neurosci Lett* 180:219-222.
- Su HC, Bishop AE, Power RF, Hamada Y, Polak JM (1987). Dual intrinsic and extrinsic origins of CGRP- and NPY-immunoreactive nerves of rat gut and pancreas. *J Neurosci* 7:2674-2687.

- Surrenti C, Renzi D, Garcea MR, Surrenti E, Salvadori G (1993). Colonic vasoactive intestinal polypeptide in ulcerative colitis. *J Physiol Paris* 87:307-311.
- Swain MG, Agro A, Blennerhassett P, Stanisz A, Collins SM (1992). Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 102:1913-1919.
- Szallasi A (1996). Vanilloid-sensitive neurons: a fundamental subdivision of the peripheral nervous system. *J Peripher Nerv Syst* 1:6-18.
- Tache Y (1992). Inhibition of gastric acid secretion and ulcers by calcitonin [correction of calciton] gene-related peptide. *Ann N Y Acad Sci* 657:240-247.
- Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E (2002). Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from *Trichinella spiralis* infected rats. *Life Sci* 71:3121-3136.
- Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJ (1993). Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 265:G214-G218.
- Thornbury KD, Ward SM, Dalziel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM (1991). Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 261:G553-G557.
- Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, Fukuzawa M (2000). Peptidergic nerves in the colon of patients with ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 47:400-404.
- Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, Mashimo H, Collins SM (2004). Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G865-G874.
- Vallance BA, Galeazzi F, Collins SM, Snider DP (1999). CD4 T cells and major histocompatibility complex class II expression influence worm expulsion and increased intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Infect Immun* 67:6090-6097.
- Van Assche G, Collins SM (1996). Leukemia inhibitory factor mediates cytokine-induced suppression of myenteric neurotransmitter release from rat intestine. *Gastroenterology* 111:674-681.
- Wang XY, Berezin I, Mikkelsen HB, Der T, Bercik P, Collins SM, Huizinga JD, Huizinga JD (2002). Pathology of interstitial cells of Cajal in relation to inflammation revealed by ultrastructure but not immunohistochemistry. *Am J Pathol* 160:1529-1540.
- Xie YN, Gerthoffer WT, Reddy SN, Cominelli F, Eysselein VE, Snape WJ, Jr. (1992). An abnormal rate of actin myosin cross-bridge cycling in colonic smooth muscle associated with experimental colitis. *Am J Physiol* 262:G921-G926.

Zhao A, Bossone C, Pineiro-Carrero V, Shea-Donohue T (2001). Colitis-induced alterations in adrenergic control of circular smooth muscle in vitro in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 299:768-774.

## Conclusions

- 1) Les rates infectades per via intrarectal amb larves de *T. spiralis* presenten dos períodes de disminució d'ingesta i pes (dies 1 i 4 PI /11 i 15 PI), i femtes toves amb *mucus* del dia 2 al 20 PI. A més a més, presenten leucocitosi amb neutrofilia i eosinofília des del dia 6 al 21 PI. Aquests símptomes fan pensar que a part de la colitis, les rates mostren una resposta sistèmica front al paràsit.
- 2) El fet que a dia 30 PI trobem larves enquistades a músculs estriats, com ara el diafragma, permet afirmar que tot i la utilització d'una via no natural d'infecció com és la via intrarectal per a la *T. spiralis*, el cicle biològic del paràsit es tanca.
- 3) El còlon de rates infectades per *T. spiralis* presenta una inflamació macroscòpica moderada. Les lesions histopatològiques més característiques són atrofia epitelial amb presència de microúlceres i edema de la mucosa i la submucosa. El nombre de PMNs neutròfils i macròfags es troba augmentat tant a la mucosa com a la submucosa colòniques. Tant pel tipus de lesions observades, com per la circumscripció d'aquestes a les capes més superficials del còlon i pels tipus cel·lulars implicats, aquest model presenta notables similituds a la UC.
- 4) El nombre de cèl·lules immunoreactives a l'OX-6, que reconeix l'MHC II es troba molt incrementat tant al PM com al PSM de les rates infectades. El nombre de macròfags infiltrants (ED1 positius) es troba augmentat en ambdós plexes intrínsecs mentre que el nombre de macròfags residents (ED2 positius) només es troba incrementat al PSM. Els macròfags infiltrants que es troben íntimament relacionats amb el PM i expressen l'MHC II, podrien estar implicats en la gènesi de les alteracions neurals i motores observades en aquest model.
- 5) L'expressió de la iNOS es troba augmentada a l'epiteli inflammat i a l'infiltrat inflamatori (sobretot macròfags i neutròfils) de la mucosa i la submucosa colòniques. L'increment en

l'expressió de la iNOS, dona lloc a un augment en la síntesi de NO. La producció de quantitats augmentades de NO podria ocasionar alguns dels canvis observats, com ara la hiperpolarització del múscul circular colònic i la dismotilitat que trobem en les rates infectades per *T. spiralis*. L'augment en l'expressió de la iNOS, així com l'augment del nivell d'NO a la mucosa i la submucosa colòniques són trets que també es descriuen en la fase activa de la UC.

- 6) Les contraccions rítmiques espontànies d'elevada amplitud però baixa freqüència (HALF) es troben disminuïdes des del dia 2 al 30 PI. A més a més, l'eliminació de les capes mucosa i submucosa comporta un increment significatiu de la motilitat fàscica i un manteniment del patró per un interval de temps més perllongat. La mucosa i la submucosa colòniques participen doncs activament en la supressió progressiva de la motilitat colònica espontània observada al llarg de l'experiment, possiblement per l'alliberament de mediadors inflamatoris.
- 7) La disminució de la resposta contràctil a l'ACh després de la depleció dels magatzems de calci intracel·lular és més marcada en animals infectats per *T. spiralis* que no pas en rates *sham*. Aquest fet suggereix que la utilització de calci extracel·lular està alterada durant la inflamació colònica. La resposta a un agent despolaritzant com el clorur potàssic també està reduïda en el còlon d'animals colítics, fet que suggereix que la disminució de la motilitat i la contractilitat poden deure's en part a alteracions a nivell post-receptor.
- 8) No hi ha una pèrdua significativa de neurones per gangli a cap dels plexes intrínsecs del còlon durant la colitis induïda per *T. spiralis*. La immunoreactivitat a la ChAT i TH tampoc es troben alterades. En canvi, la immunoreactivitat a la calbindina i al CGRP disminueix transitòriament a dia 6 PI, fet que pot estar relacionat amb alteracions en l'alliberament de neurotransmissors i alteracions en els reflexes intrínsecs.
- 9) La immunoreactivitat a la GFAP no es troba alterada durant la colitis induïda per *T. spiralis*. La GFAP colocalitza amb la iNOS en ambdós plexes intrínsecs colònics de tots els animals estudiats. Aquest fet suggereix que les cèl·lules gials entèriques poden tenir



un paper actiu en la regulació del SNE i pot reflectir la reactivitat d'aquest tipus cel·lular a la presència de microorganismes a la llum colònica.

10) La reducció de l'efecte de la TTX sobre la motilitat espontània, i el fet que tant l'L-NOARG com l'apamina ocasionin canvis més lleugers en el patró de motilitat suggereix una alteració neural a nivell de plexes intrínsecs durant la colitis malgrat que en aquest model no hi hagi pèrdues neuronals demostrables.

11) La disminució de la durada dels IJPs i la menor sensibilitat d'aquests a la presència d'L-NOARG juntament a la reducció del nombre de neurones immunoreactives a nNOS per gangli indiquen que durant la colitis hi ha una merma important de la neurotransmissió nitrèrgica. La menor sensibilitat dels IJPs a l'apamina suggereix també una reducció del component inhibitori com l'ATP que utilitza com a efectors els canals de potassi de baixa conductància activats per calci.

Finalment, la persistència de les alteracions motores més enllà del propi brot inflamatori suggereix que en la malaltia inflamatòria intestinal humana i en la UC en particular, els fenòmens de dismotilitat poden tenir una dimensió molt més greu de la esperada. El model de colitis induïda per *T. spiralis* es perfila com una eina d'utilitat per a l'estudi dels mecanismes subjacents a la dismotilitat i l'avaluació d'agents terapèutics específicament dirigits a paliar aquestes alteracions.