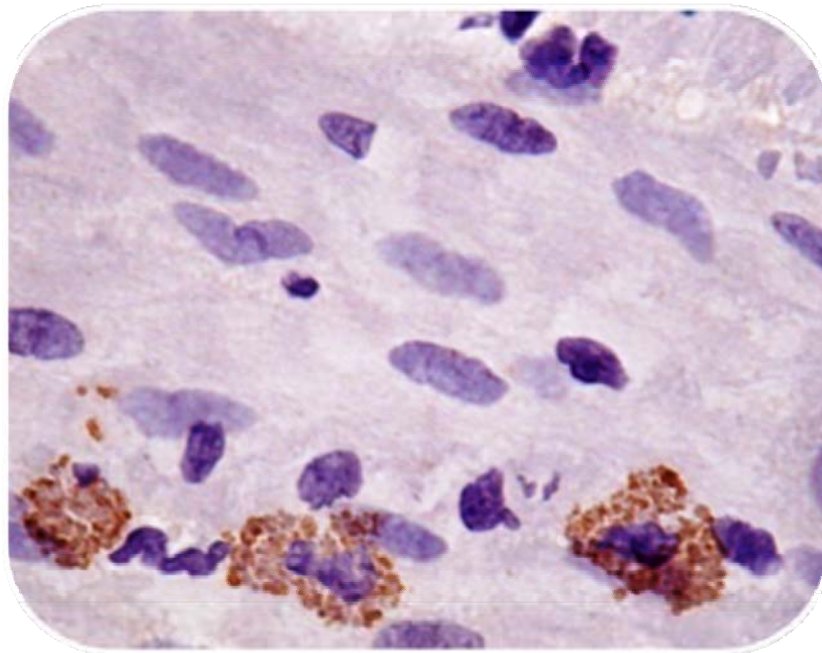


**Función Barrera Epitelial en un Modelo de  
Disfunción Intestinal Inducido por Parasitosis  
con *Trichinella spiralis* en la Rata**



**Joan Antoni Fernández Blanco**

**2012**





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**Función Barrera Epitelial en un Modelo de  
Disfunción Intestinal Inducido por Parasitosis  
con *Trichinella spiralis* en la Rata**

**Memoria presentada por Joan Antoni Fernández Blanco para optar al  
grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado en Inmunología**

Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología

Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis doctoral dirigida por los doctores:

Patrocínio Vergara Esteras

Vicente Martínez Perea

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 27 de setiembre de 2012



La **Dra. Patrocinio Vergara Esteras**, Catedrática de Fisiología del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona y el **Dr. Vicente Martínez Perea**, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona

HACEN COSTAR:

Que la memoria titulada “**Función Barrera Epitelial en un Modelo de Disfunción Intestinal Inducido por Parasitosis con *Trichinella spiralis* en la Rata**” presentada por JOAN ANTONI FERNÁNDEZ BLANCO para optar al grado de Doctor se ha realizado bajo su dirección y, al considerarla concluida, autorizan su presentación para ser evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) a 28 de setiembre de 2012

**Dra. Patrocinio Vergara Esteras**

**Dr. Vicente Martínez Perea**



La imagen que aparece en portada es una microfotografía de obtención propia realizada en microscopía óptica de campo claro. En ella se pueden observar diversas células que expresan la triptasa rMCP-6, correspondientes a mastocitos de tejido conectivo, infiltrando la capa muscular longitudinal del yeyuno de una rata Sprague Dawley OFA transcurridos 30 días tras su parasitosis por *Trichinella spiralis*.





## AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, en el camino recorrido desde mi iniciación en la investigación hasta el día de hoy, ha habido muchos momentos difíciles. Sin embargo, llegada la hora de hacer balance, me doy cuenta de que habría sido mucho más complicado sobrellevarlos si no fuese por toda la gente que me ha acompañado en esta aventura y a la que tengo tanto que agradecer.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores. A la Dra. Patri Vergara, por descubrirme el mundo de la investigación y el del animal de laboratorio. Al Dr. Vicente Martínez, por propiciar el punto de inflexión más importante en el avance de mi tesis doctoral, debido a su experiencia y capacidad resolutive.

También me gustaría hacer mención de la ayuda brindada por los demás investigadores senior de la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria: la Dra. Ester Fernández, la Dra. Maite Martín y el Dr. Marcel Jiménez.

A su vez, tengo mucho que agradecer a todos los becarios y residentes con los que he tenido la fortuna de tropezar. A Estefanía, por encajar mi cínico “alegría a la feina” siempre con una sonrisa. A Esther, por los buenos momentos vivimos y por promover incansablemente cenas y salidas. A Lina, por hacerme ver la importancia de tener compañeros generosos y dispuestos a enseñar. A en Ferran, per animar-me, fer-me riure i ensenyar-me la subtil diferència entre criticar i l’art d’observar i comentar. A la Mònica, per fer-me veure la importància de ser pràctic i per descobrir-me Igualada. A Sergio, por aportar ese toque de *glamour* necesario en todo departamento. A Javier Estévez por ser un gran compañero y un más que digno sucesor en el arte de las cámaras de Ussing. A Jakub, por aportar buenas dosis de optimismo y calma al grupo. A en Joan Burgueño, per la seva ajuda, l’excésiva sinceritat i demostrar-me que es pot ser bona persona tot i ser “periquito”. A Carol, por inundar con su aire canario el laboratorio. A en Víctor, pel seu humor delirant. A Diana, por sacar tiempo de donde no lo tenía para echarme una mano. A Bego y a Álvaro, por los momentos vividos en el VO-115. A Gloria, por los misterios de la *T. spiralis* transmitidos y por tantas cenas de máster organizadas. A Javier Benito, por los cafés de máquina y conocimientos compartidos y por sus contagiosas e ilimitadas ansias de aprender. A Paco, por tener

claro que es más importante ser buena persona que buen investigador y por descubrirme el Jägermeister. A Sandra, por los repetidos intentos de completar mis trabajos con el FISH y por “obligarme” a vivir largas noches en Get Back. A Elena Tapia, por su espíritu luchador, su punto de vista crítico y compartir el mundo Mercadona. A la Marina, la Míriam, Elena Eyre, Carlos Bielsa y Carlos Grau por su contribución al grupo como becarias y/o residentes.

Gracias a los técnicos y administrativos de la Unidad de Fisiología. A Emma, por su ayuda, especialmente con las IHQs y el baño de órganos, por hacer de DJ e interesarse por lo que hacía en todo momento. A Antonio, por su ayuda con los animales, los pedidos y el curso de categoría C. A David, por tener siempre la puerta abierta para cualquier gestión, su amabilidad y su educación.

También quiero darle las gracias al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. En el breve periodo que compartimos, me hicieron sentir plenamente integrado desde el primer día. Merecen una mención especial Isabel y el Dr. Fermín Sánchez de Medina. Su ayuda fue fundamental a la hora de concluir con la odisea en que se había convertido la puesta a punto de las cámaras de Ussing. Además, este último contribuyó en el que fue mi primer manuscrito científico como primer autor.

A su vez, me gustaría agradecerle al grupo de la Dra. Terez Shea-Donohue y el Dr. Aiping Zhao del *Mucosal Biology Research Center* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Maryland que me brindaran la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio. Gracias a ellos, pude introducirme en los apasionantes campos de la captura por microdissección láser, de la PCR y de los cultivos celulares. A su vez, debo agradecerles el excelente trato personal que me brindaron en todo momento.

Del mismo modo, quiero darles las gracias a todos los miembros del Servei d'Estabulari de la UAB, desde Jordi Cantó hasta cada uno de los técnicos. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por mantener la colonia de ratones parasitados sin la cual esta tesis no habría sido posible. En este sentido, también quisiera rendirles un sentido homenaje a todos los animales y “paràsits mil·lenaris” que participaron en los estudios llevados a cabo a lo largo de estos años.

A los miembros del CReSA, debo agradecerles su ayuda en el aprendizaje de la fluorimetría y las lecturas de absorbancia. Gracias al Departamento de Anatomía de la Facultad de Veterinaria y al Instituto de Neurociencias de la UAB por haber hecho posibles las fotografías de campo claro que aparecen en este manuscrito.

También me gustaría agradecerles a los miembros del tribunal de esta tesis que aceptasen la invitación y el esfuerzo realizado al respecto.

No me puedo olvidar de los amigos de toda la vida con los que he compartido tantas experiencias. Especialmente quiero darles las gracias a Álex y a Checho. Porque ya sea en la Madre Rusia, en Cádiz o a la vuelta de la esquina siempre es un placer pasar un rato a su lado. Porque gracias a las pequeñas locuras vividas junto a ellos me he mantenido más cuerdo.

La familia, no cabe duda, merece una mención especial. A Abel quiero agradecerle que me obligase a ser fuerte y tener un espíritu de superación constante. A Héctor le debo dar las gracias por su gran corazón, su sentido del humor y permitirme estar a su lado presenciando el gran salto personal que ha dado durante estos últimos años. A mis padres, en primer lugar, les debo dar las gracias por estar siempre a mi lado y enseñarme lo que significa el amor incondicional. Ellos han sido y siguen siendo mi referente más claro, un ejemplo a seguir tanto en el ámbito personal como en el laboral. Mi cultura del esfuerzo y del trabajo bien hecho se la debo a ellos. También quiero acordarme de los demás miembros de mi familia y especialmente los que no están a nuestro lado en el día de hoy, como son mis abuelos. Tampoco está ya entre nosotros Platón. Él fue sin duda uno de los motivos que me alentó a estudiar veterinaria, permitiéndome posteriormente realizar los estudios de doctorado.

Per últim voldria donar-li les gràcies a l'Elisabet. Perquè sent com és, autèntica i espontània, m'ha dibuixat un somriure a la cara dia rere dia durant tots aquests anys. Per la seva generositat, fent-me costat en els moments més durs, sense importar la distància. Per creure en mi i en nosaltres per sobre de totes les adversitats. En definitiva, li vull donar infinites gràcies per estimar-me i deixar-se estimar.



“From contemplation one may become wise, but knowledge comes only from study”

Alfred Edward Newton (1864-1940), escritor norteamericano.



# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN .....	3
SUMMARY .....	4
INTRODUCCIÓN .....	5
Estructura y Funciones Intestinales .....	5
Anatomía e Histología del Intestino Delgado.....	5
Función Barrera Intestinal.....	7
Motilidad Intestinal .....	13
El Sistema Inmune Intestinal.....	17
Enfermedades Inflamatorias y Funcionales del Tracto Gastrointestinal .....	18
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD).....	18
Enfermedades Funcionales Gastrointestinales: Síndrome del Intestino Irritable (IBS).....	18
Modelos Animales de IBD y de IBS.....	22
Las Mastocitos (Mcs).....	29
Mecanismos de Activación de los Mastocitos .....	29
Proteinasas Mastocitarias: Clasificación de los Mastocitos e Implicaciones Funcionales..	30
Métodos de Estudio de las Funciones Mastocitarias.....	32
Los Mastocitos en la IBD y el IBS.....	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
CAPÍTULO 1 .....	41
PERSISTENT EPITHELIAL BARRIER ALTERATIONS IN A RAT MODEL OF POSTINFECTIOUS GUT DYSFUNCTION .....	41
CAPÍTULO 2 .....	71
PAR-2-MEDIATED CONTROL OF BARRIER FUNCTION AND MOTILITY DIFFERS BETWEEN EARLY AND LATE PHASES OF POSTINFECTIOUS GUT DYSFUNCTION IN THE RAT.....	71
CAPÍTULO 3 .....	101

DYNAMICS OF MAST CELL SERINE PROTEINASES AND TIGHT JUNCTIONS-RELATED PROTEINS IN A RAT MODEL OF GUT DYSFUNCTION INDUCED BY TRICHINELLA SPIRALIS INFECTION .....	101
DISCUSIÓN GENERAL.....	127
CONCLUSIONES .....	137
REFERENCIAS.....	139
PUBLICACIONES Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS .....	1533



## ABREVIATURAS

**5-HT:** 5-hidroxitriptamina, *5-hydroxytryptamine*; serotonina, *serotonin*

**ACh:** Acetilcolina

**AJ:** Unión adherente, *adherens junction*

**AUC:** Área bajo la curva, *area under the curve*

**CCh:** Carbacol, *carbachol*

**CD:** Enfermedad de Crohn, *Crohn's disease*

**cDNA:** DNA complementario, *complementary DNA*

**Cq:** Ciclo de cuantificación, *quantification cycle*

**CRH:** Hormona liberadora de corticotropina, *corticotropin-releasing hormone*

**CTMC:** Mastocito de tejido conectivo, *connective tissue mast cell*

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico, *deoxyribonucleic acid*

**DNBS:** Ácido dinitrobenzenosulfónico, *dinitrobenzene sulfonic acid*

**EBF:** Función barrera epitelial, *epithelial barrier function*

**EGTA:** Ácido etilenglicol bis tetraacético, *ethylene glycol tetraacetic acid*

**ENS:** Sistema nervioso entérico, *enteric nervous system*

**FcεRI:** Receptor de alta afinidad para la IgE

**FD:** FITC conjugado con dextrano, *FITC-labeled dextran*

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína, *fluorescein isothiocyanate*

**G:** Conductancia, *conductance*

**IBD:** Enfermedad inflamatoria intestinal, *inflammatory bowel disease*

**IBS:** Síndrome del intestino irritable, *irritable bowel syndrome*

**IFN-γ:** Interferón γ, *interferon γ*

**Ig:** Inmunoglobulina, *immunoglobulin*

**IL:** Interleuquina, *interleukin*

**Isc:** Corriente de cortocircuito, *short-circuit current*

**JAM:** Moléculas de adhesión de la unión, *junctional adhesion molecules*

**MC:** Mastocito, *mast cell*

**MC-CPA:** carboxipeptidasa A mastocitaria

**MLCK:** Quinasa de la cadena ligera de la miosina, *myosin light chain kinase*

**MMC:** Mastocito de mucosa, *mucosal mast cell*

**mMCP:** Proteínasa mastocitaria de ratón, *mouse mast cell proteinase*

**PAR:** Receptor activado por proteínasas, *proteinase-activated receptor*

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa, *polymerase chain reaction*

**PD:** Diferencia de potencial, *potential difference*

**PI-IBS:** IBS post-infeccioso, *postinfectious IBS*

**rMCP:** Proteínasa mastocitaria de rata, *rat mast cell proteinase*

**RNA:** Ácido ribonucleico, *ribonucleic acid*

**RT-qPCR:** PCR cuantitativa tras transcripción inversa, *reverse transcription-quantitative PCR*

**SP:** Sustancia P, *substance P*

**TJ:** Unión estrecha, *tight junction*

**TNBS:** Ácido trinitrobencenosulfónico, *trinitrobenzene sulfonic acid*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , *tumor necrosis factor  $\alpha$*

**TTX:** Tetrodotoxina, *tetrodotoxin*

**UC:** Colitis ulcerosa, *ulcerative colitis*

**VCU:** Unidad vellosidad-cripta, *villus-crypt unit*

**ZO:** *Zonula occludens*

## RESUMEN

La función barrera intestinal constituye la primera línea de defensa del tracto digestivo. Ésta se ve condicionada por el transporte hidroelectrolítico, la permeabilidad y la motilidad intestinales. Alteraciones de estas funciones favorecen la estimulación continua, por antígenos y microorganismos lumbinales, del sistema inmune local llevando a estados inflamatorios más o menos crónicos. Estos cambios parecen caracterizar diversas patologías inflamatorias y funcionales gastrointestinales, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome de intestino irritable. Los mastocitos (MCs), a través de un proceso de activación y liberación de mediadores neuroinmunes, participan como células efectoras en la respuesta inmune asociada a estas enfermedades. Este trabajo profundiza en las implicaciones de los MCs en las disfunciones intestinales, haciendo un especial énfasis en la función barrera. Para ello, se empleó un modelo de parasitosis por *Trichinella spiralis* en ratas. Tras la infección, se observó la evolución temporal (días 2 a 30 post-infección) en las poblaciones de MCs de mucosa y de tejido conectivo en el yeyuno. Las variaciones en los infiltrados mastocitarios se acompañaron de una sobreexpresión en las proteinasas mastocitarias. Las proteinasas, actuando como enzimas sobre sustratos específicos, incluyendo la activación de receptores activados por proteinasas (PARs), regulan las funciones secretomotoras y sensoriales gastrointestinales. Acompañando estos cambios, se han caracterizado remodelaciones neuroepiteliales post-infecciosas que resultan en una alteración de la función barrera, en concreto: una alteración de la secreción hidroelectrolítica basal, de la respuesta a secretagogos y en el incremento de la permeabilidad intestinal. Estas disfunciones de la barrera tienen como base cambios temporales específicos en la expresión de proteínas de las uniones estrechas intercelulares. A su vez, la parasitosis produjo un aumento de la actividad motora espontánea intestinal, en parte mediada por los MCs, ya que se revierte parcialmente en animales tratados con el estabilizador mastocitario ketotifeno. Por otro lado, las respuestas secretoras intestinales a la degranulación mastocitaria y a la activación de PAR-2 se vieron reducidas en la fase post-infecciosa (día 30 post-infección). Si bien, ello sugeriría una desensibilización epitelial a los mediadores mastocitarios, la estabilización de los MCs con ketotifeno no tuvo efectos sobre las respuestas secretoras basales o mediadas por PAR-2 ni sobre los incrementos post-infecciosos en la permeabilidad. En resumen, hemos definido los cambios en las poblaciones mastocitarias y la función barrera intestinal, así como su relación con la expresión de proteínas de uniones intercelulares y con la expresión de PAR-2 y sus efectos secretorios en un modelo de disfunción intestinal post-infecciosa. Aunque estos datos apoyan una implicación de los MCs en los cambios morfo-funcionales asociados a la infección cuestionan una participación directa de los mismos en la función barrera intestinal. Mecanismos de regulación similares pueden operar en enfermedades inflamatorias y funcionales gastrointestinales.

## SUMMARY

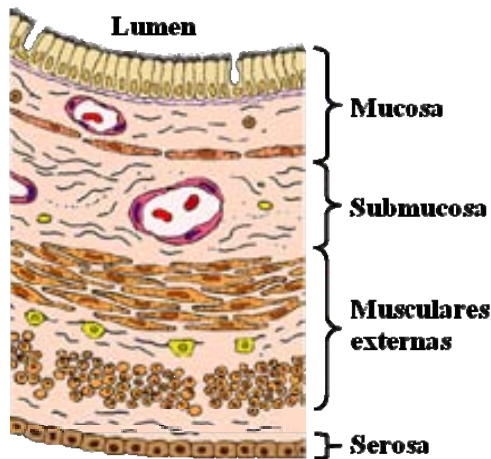
Epithelial barrier function is considered part of the defensive mechanisms of the gastrointestinal tract. Barrier function results from an interplay of at least three components: hydroelectrolytic transport, permeability and intestinal motility. Alterations of these functions favor a state of luminal antigens- and microorganisms-dependent stimulation of the local immune system, leading to an inflammatory-like stage. These changes are common to several gastrointestinal pathologies, including inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. Mast cells (MCs), through a process of activation and release of endogenous neuroimmune mediators, act as effector cells in the neuroimmune responses associated to these alterations. This work aims the characterization of MCs' implications in gastrointestinal dysfunctions, with emphasis in barrier function. For this, we used a model of *Trichinella spiralis* infection in rats. After the infection, time-related (days 2 to 30 postinfection) changes in mucosal and connective tissue MCs were assessed in the jejunum. Changes in MCs infiltrates occurred together with an up-regulation of proteinases gene expression. MC-derived proteinases, through the enzymatic cleavage of specific substrates, including proteinase-activated receptors (PARs), regulate gastrointestinal secretomotor and sensory functions. In addition, we characterized postinfectious neuroepithelial remodelations, leading to functional changes in barrier function. In particular, alterations in basal electrolytic secretion, secretory responses to secretagogues and an increase in epithelial permeability were observed. These barrier dysfunctions are associated to time-related changes in the expression of tight junctions-related proteins. In parallel, an increase in spontaneous intestinal motor activity was also observed. Treatment with the MC stabilizer ketotifen partially prevented these motor alterations, thus suggesting that MCs are implicated, at least partially, in these responses. In addition, secretory responses to MCs degranulation and PAR-2 activation were reduced during the postinfectious phase (day 30 postinfection). This might suggest a desensitization of the epithelium to MC mediators. However, treatment with the MC stabilizer ketotifen was without effect, thus suggesting the contribution of additional, MCs-independent mechanisms. In summary, this work characterizes changes in MCs populations and epithelial barrier function in a model of postinfectious gut dysfunction in rats. Furthermore, the relationship with the expression of tight junction-related proteins and PAR-2 and its secretory effects was characterized. Overall, results obtained support an implication of MCs in the morphological and functional alterations associated to the infection. However, they also question a direct role of MCs in the control of epithelial barrier function. Similar mechanisms might operate in inflammatory and functional gastrointestinal disorders.

## INTRODUCCIÓN

### *Estructura y Funciones Intestinales*

#### **Anatomía e Histología del Intestino Delgado**

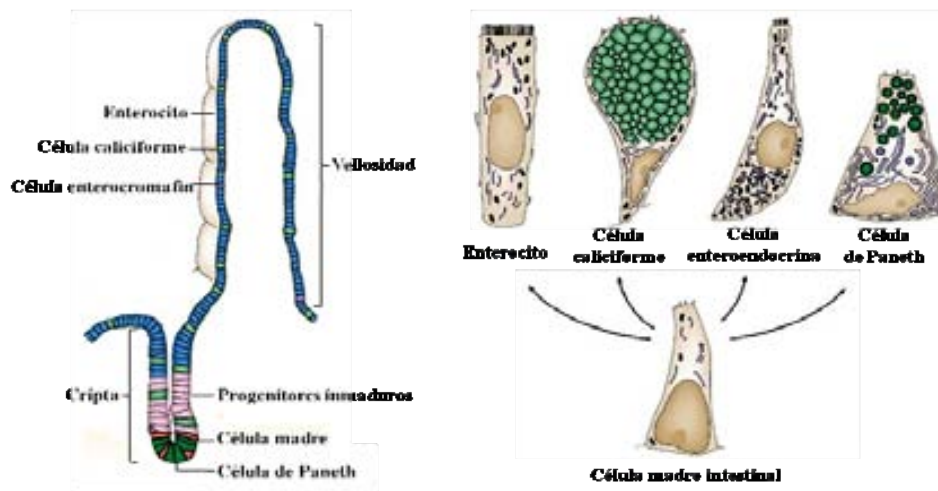
El intestino delgado constituye el segmento de mayor longitud del tracto gastrointestinal, extendiéndose desde el píloro hasta la válvula ileocecólica. Éste se divide, de oral a aboral, en duodeno, yeyuno e íleon. Histológicamente, la pared del intestino delgado está constituida por la mucosa, la submucosa, las musculares externas y la serosa (Barrett 2006, Gartner and Hiatt 2002) (Fig. 1).



**Figura 1. Organización histológica del intestino delgado.** Adaptada de Madara and Anderson, 2003.

La mucosa presenta un conjunto de evaginaciones e invaginaciones denominadas respectivamente vellosidades y criptas, que dan lugar a las unidades vellosidad-cripta (*villus-crypt units, VCUs*). La existencia de VCUs permite incrementar la superficie de contacto entre el medio externo y el organismo, favoreciendo funciones gastrointestinales fundamentales, como son los procesos de digestión y absorción. Formando parte de la mucosa y en contacto directo con la luz intestinal, encontramos el epitelio intestinal. Éste consiste en una monocapa de diferentes tipos celulares especializados que derivan de células madre intestinales localizadas a nivel de las criptas (Figs. 1 y 2). Las células epiteliales más abundantes son los enterocitos, cuyas funciones principales son la absorción de nutrientes y agua, la secreción

hidroelectrolítica y la función barrera. Situadas entre los enterocitos se encuentran células caliciformes, responsables de la producción y la secreción de moco, que contribuye a la lubricación y la protección de la mucosa intestinal. Localizadas a nivel de las criptas, las células de Paneth llevan a cabo funciones defensivas, mediante la secreción de péptidos y enzimas antimicrobianas y participan en la regulación de la composición iónica luminal, la inflamación intestinal y la digestión. Por último, dispersas entre todas estas células, se pueden encontrar células enteroendocrinas, que producen y secretan diferentes hormonas y neuropéptidos, como por ejemplo la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) y la sustancia P (SP). Subyacente a las células epiteliales, se dispone la lámina propia, formada por tejido conectivo y donde encontramos vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas y células del sistema inmune. Dando soporte físico a la mucosa y separándola de la submucosa se halla la muscular de la mucosa, formada por células de músculo liso (Barrett 2006, Gartner and Hiatt 2002).



**Figura 2. Unidad cripta-vellosidad y tipos celulares epiteliales en el intestino delgado.**  
Adaptada de (Crosnier et al. 2006).

En la submucosa encontramos tejido conectivo y un plexo nervioso conocido como plexo submucoso, o de Meissner, perteneciente al sistema nervioso entérico (*enteric nervous system*, ENS). Dicho plexo recibe y envía información desde y hacia la mucosa, incluyendo las células epiteliales, siendo su función principal regular el

transporte hidroelectrolítico y el flujo sanguíneo (Barrett 2006, Gartner and Hiatt 2002).

Las musculares externas están formadas por musculatura lisa y se distribuyen en dos capas, la circular y la longitudinal. La capa circular está situada más próxima a la mucosa y su contracción reduce el diámetro de la luz intestinal. Por su parte, la contracción de las fibras musculares longitudinales induce el acortamiento y el aumento del diámetro del intestino. Entre ambas capas musculares se dispone otro plexo nervioso, el plexo mientérico o de Auerbach, que, junto con el submucoso, forma parte del ENS. La actividad de las capas de músculo liso está en gran parte bajo el control del plexo mientérico (Barrett 2006, Gartner and Hiatt 2002).

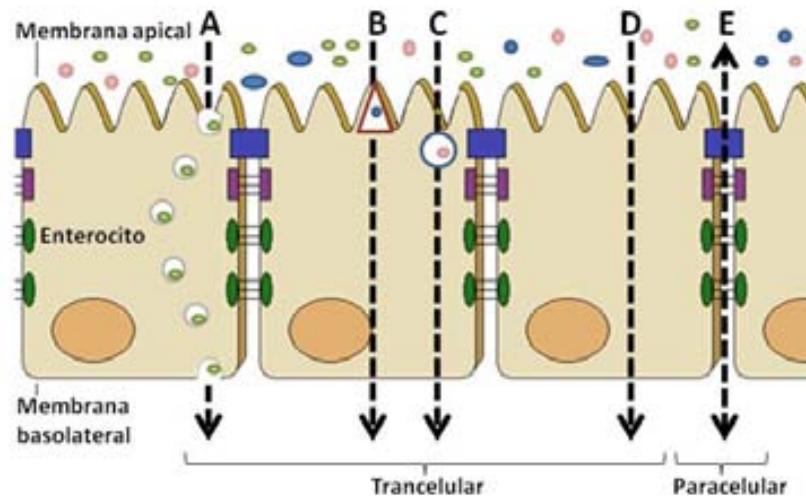
Finalmente, la serosa consiste en una membrana formada por un epitelio simple plano (mesotelio) y tejido conectivo (Barrett 2006, Gartner and Hiatt 2002).

### **Función Barrera Intestinal**

El intestino tiene el difícil cometido de llevar a cabo la absorción de agua y nutrientes a su vez que ejerce una función barrera, restringiendo la entrada de elementos potencialmente nocivos desde la luz intestinal hacia el resto del organismo. La primera línea de defensa la encontramos en la misma luz, donde microorganismos y antígenos son degradados por acción de las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares. A su vez, la microbiota comensal contribuye a reducir la colonización por parte de agentes patógenos produciendo sustancias antimicrobianas, modificando el pH y compitiendo por los nutrientes. Recubriendo el epitelio intestinal, se encuentra una capa de agua, glicocáliz y moco que contiene moléculas con capacidad defensiva, tales como las defensinas e inmunoglobulinas (Igs) de tipo A, producidas a nivel epitelial. Por otra parte, las células epiteliales participan en la función barrera modulando la secreción de fluidos hacia la luz intestinal y mediante las uniones intercelulares que se establecen entre ellas (Camilleri et al. 2012, Keita and Soderholm 2010). Sin embargo, a pesar de esta compleja barrera y de su diversidad de mecanismos, no existe una exclusión completa del paso de moléculas desde la luz hacia el tejido subyacente. Por el contrario, existe un movimiento bidireccional, selectivo y constante de partículas entre ambos compartimentos, sujeto a la regulación de la permeabilidad y del transporte hidroelectrolítico intestinales.

### La Permeabilidad y el Transporte Hidroelectrolítico Intestinales

La permeabilidad intestinal viene definida por el flujo de moléculas a través de las células epiteliales (ruta transcelular) y por los espacios comprendidos entre las mismas (ruta paracelular) (Fig. 3).



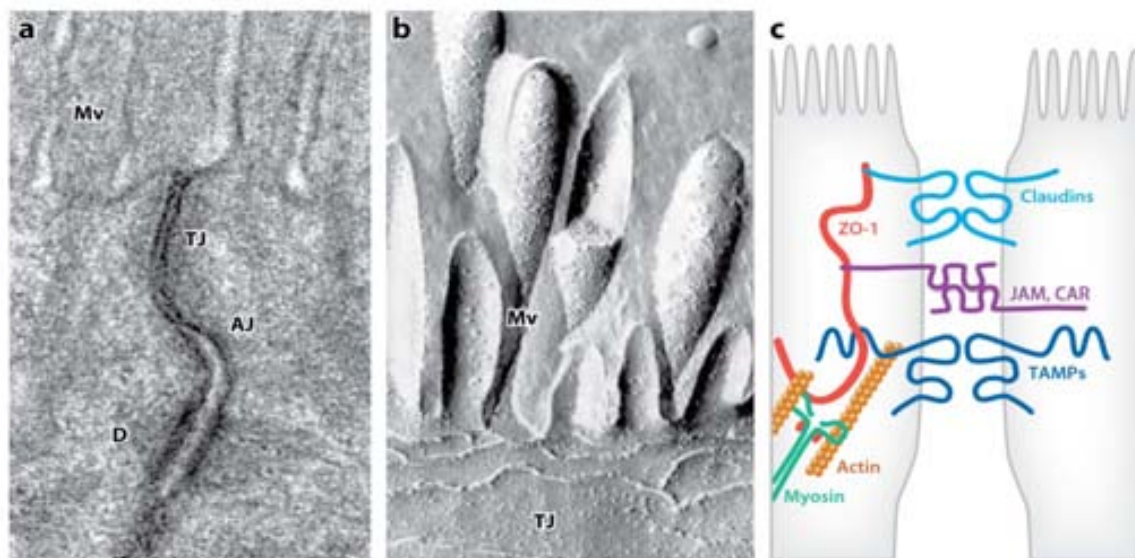
**Figura 3. Rutas de transporte transepitelial.** A) Endocitosis seguida de transcitosis y exocitosis; B) Transporte activo mediado por transportadores situados en la membrana apical seguido de difusión pasiva a través de la membrana basolateral; C) Ruta transcelular a través de acuaporinas; D) Difusión pasiva transcelular; E) Ruta paracelular. Basada en Keita and Soderholm 2010.

Existen diferentes mecanismos que median el paso de moléculas por la ruta transcelular y el uso de unos u otros viene determinado por las características fisicoquímicas de las mismas. Los compuestos lipofílicos así como los compuestos hidrofílicos de pequeño tamaño podrán difundir pasivamente a través de la bicapa lipídica de la membrana de los enterocitos. Al mismo tiempo, los compuestos hidrofílicos de pequeño tamaño pueden hacer uso de acuaporinas para atravesar las membranas celulares. Por otra parte, la permeabilidad epitelial viene condicionada por el transporte activo transcelular mediado por transportadores y diferentes mecanismos de endocitosis, transcitosis y exocitosis. Los mecanismos de endocitosis pueden implicar el uso de receptores (endocitosis mediada por clatrina y fagocitosis) o no ser selectivos (macropinocitosis y endocitosis mediada por caveolas). Estos procesos de transporte activo serán fundamentales en la captación de nutrientes, electrolitos y antígenos tanto



bacterianos como de la dieta (Fig. 3) (Camilleri et al. 2012, Keita and Soderholm 2010, Madara 1990).

Por su parte, la ruta paracelular permite el 85% del total del flujo pasivo transepitelial de moléculas. Esta vía posibilita el paso de elementos hidrofílicos de mayor tamaño que la transcelular. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, es impermeable a moléculas de dimensiones tales como las de las proteínas, constituyendo una barrera efectiva para el paso de antígenos luminales. Esto es posible gracias a la presencia de uniones intercelulares entre las membranas laterales de las células epiteliales adyacentes. Estas uniones se asocian a la expresión de distintas familias de proteínas que se organizan para dar lugar a uniones estrechas (*tight junctions*, TJs), uniones adherentes y desmosomas (Fig. 4) (Keita and Soderholm 2010, Castro and Fairbairn 1969).



**Figura 4. Uniones intercelulares en el epitelio intestinal.** a) Microfotografía tomada mediante microscopía electrónica de transmisión donde se observan la unión estrecha (*tight junction*, TJ), por debajo de las microvellosidades (Mv), la unión adherente (*adherens junction*, AJ) y los desmosomas (D) que se encuentran entre los enterocitos adyacentes. b) Micrografía de microscopía electrónica de criofractura de un cultivo de células epiteliales intestinales mostrando las TJs. c) Esquema de las uniones intercelulares en que se muestran las interacciones entre las proteínas integrales de las TJs [claudinas, las moléculas de adhesión de la unión (*junctional adhesion molecules*, JAM) y proteínas marvel asociadas a TJ (*TJ-associated marvel proteins*, TAMPs)], las macromoléculas de la placa citoplasmática [zonula occludens (ZO)-1] y el citoesqueleto de actina y miosina. Extraída de Shen et al. 2011.

En particular, el estudio de la estructura y el control de las TJs ha suscitado un gran interés a lo largo de los últimos años. A día de hoy, han sido identificados diversos grupos de macromoléculas conformando las TJs: claudinas, moléculas de adhesión de la unión (*junctional adhesion molecules*, JAM) y proteínas marvel asociadas a la TJ como la ocludina y la tricelulina. Al mismo tiempo, se ha observado como estas proteínas se encuentran asociadas a macromoléculas de la placa citoplasmática o del complejo de oclusión [*zonula occludens* (ZO)-1, ZO-2, ZO-3, AF-6/afadina, cingulina, antígeno 7H6] y a estructuras del citoesqueleto de los enterocitos (microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos) (Fig. 4) (Shen et al. 2011, Assimakopoulos et al.2011). Por otro lado, dichos estudios han permitido discernir que las uniones intercelulares no son estáticas sino que están sujetas a una regulación constante tanto por estímulos intracelulares como extracelulares. Dichos estímulos son capaces de regular la permeabilidad paracelular modificando la expresión de los componentes de las TJs o su interacción con el citoesqueleto intracelular. Uno de los factores capaces de modular el funcionamiento de las uniones intercelulares es la quinasa de la cadena ligera de la miosina (*myosin light chain kinase*, MLCK). La activación de dicha quinasa comporta la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II, provocando la contracción del citoesqueleto, y propicia la redistribución de la ocludina y la ZO-1, contribuyendo todo ello a incrementar la permeabilidad paracelular (Shen et al. 2011, Wang et al. 2006).

Al mismo tiempo, las uniones intercelulares juegan un papel fundamental en la modulación del transporte hidroelectrolítico intestinal. Ello se debe a que bloquean la circulación de proteínas y lípidos entre las membranas basolateral y apical de los enterocitos. De este modo es posible la polarización de las células, es decir, la distribución asimétrica de vías de transporte iónico activo (bombas) y pasivo (canales y transportadores) en su superficie. A su vez, las TJs restringen selectivamente el flujo de moléculas de pequeño tamaño, eminentemente iones, por la vía paracelular. Por lo tanto, en ausencia de dichas uniones no sería posible regular el movimiento iónico transepitelial que controla el transporte hídrico (Barrett 2006, Barrett 2008).

El control de la cantidad de fluidos luminales es crítico para la correcta función intestinal, siendo fundamental en los procesos digestivos y el tránsito gastrointestinal. Ello explica que su regulación sea altamente compleja, pudiéndose producir de manera

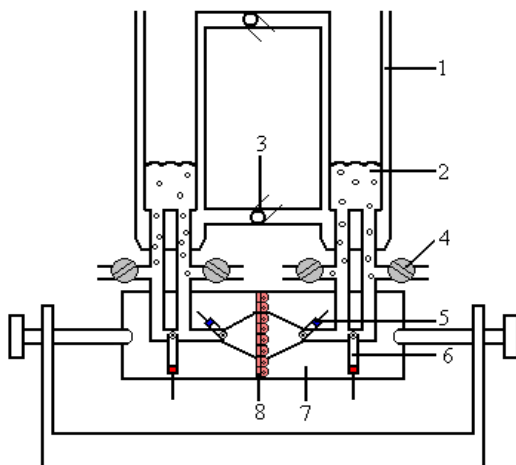
simultánea secreción y absorción de fluidos en cualquier segmento del tracto intestinal. En términos generales, la absorción de fluidos se debe fundamentalmente a la absorción de  $\text{Na}^+$ , mientras que la secreción de agua es dirigida principalmente por el transporte de  $\text{Cl}^-$ . El organismo regula el transporte de estos electrolitos mediante mediadores neuroendocrinos e inmunológicos. Éstos, al unirse a sus receptores, localizados en la membrana o intracelularmente, generan cambios en los niveles de mensajeros intracelulares, como son el  $\text{Ca}^{2+}$  y los nucleótidos cíclicos (adenosina monofosfato cíclico y guanosin monofosfato cíclico). En última instancia, esto supone la activación o desactivación de los diferentes transportadores iónicos. Especialmente relevante resulta la regulación de la actividad del regulador transmembrana de la fibrosis quística en el borde apical de los enterocitos, ya que es el principal responsable del movimiento de  $\text{Cl}^-$  hacia la luz intestinal (Barrett 2006, Barrett 2008, Martinez-Augustin et al. 2009, Kunzelmann and Mall 2002).

#### *Estudio Funcional de la Barrera Epitelial y del Transporte Hidroelectrolítico*

Existen numerosas técnicas experimentales que permiten el estudio de la permeabilidad y/o el transporte hidroelectrolítico intestinales. Las técnicas *in vivo* permiten integrar todos los componentes orgánicos que modulan dichos procesos, como son la irrigación, la motilidad, la inervación extrínseca o el control endocrino. Por ejemplo, la técnica del asa intestinal aislada permite estudiar los procesos de secreción, absorción y permeabilidad *in situ* en animales de experimentación. (Riegler and Matthews 2001) Otra posibilidad a la hora de estudiar la permeabilidad intestinal *in vivo* es administrar moléculas marcadoras por vía oral y determinar su incorporación al medio interno orgánico midiendo sus niveles séricos y/o de excreción en orina (Camilleri et al. 2012, Napolitano, Koruda et al. 1996). Las técnicas *in vitro* más empleadas incluyen el *patch clamp*, el estudio de transporte en vesículas de membrana, el saco intestinal evertido y las cámaras de Ussing (Riegler and Matthews 2001, Le Ferrec et al. 2001).

Las cámaras de Ussing (Fig. 5), desarrolladas por Ussing y Zehran en 1951, son un método de gran utilidad para el estudio de la función barrera epitelial. Su popularidad radica en que permiten evaluar tanto la permeabilidad epitelial como el transporte transepitelial de electrolitos, nutrientes o fármacos de un modo rápido y sencillo. Para

ello, se procede, en primer lugar, a montar una muestra tisular o una monocapa de células en las cámaras. Los bordes apical y basolateral están en contacto con un medio nutritivo tamponado, oxigenado y a una temperatura y pH controlados. El sistema consta de dos parejas de electrodos que se emplean respectivamente para medir el voltaje y aplicar corrientes eléctricas. Haciendo uso de un equipo de fijación de corriente y voltaje, es factible regular el voltaje transepitelial entre las regiones apical y basolateral, conocido como diferencia de potencial (*potential difference*, PD). Generalmente, la PD se fija en cero, para lo cual se debe aplicar una corriente, conocida como corriente de cortocircuito (*short circuit current*, I<sub>sc</sub>). De este modo, en condiciones estándar, se anulan los gradientes eléctricos, químicos, hidrostáticos y osmóticos entre ambos lados del tejido. En la práctica, esto equivale a eliminar el flujo pasivo de iones, con lo cual la I<sub>sc</sub> es equivalente al transporte activo iónico electrogénico (Riegler and Matthews 2001, Clarke 2009).



**Figura 5. Representación esquemática de una cámara de Ussing.** 1) Copa de vidrio en forma de U (reservorio); 2. Medio nutritivo de incubación; 3. Sistema de circulación de agua para el control de la temperatura del sistema; 4. Sistema de regulación de gases; 5. Electrodo de voltaje; 6. Electrodo de corriente; 7. Hemicámara para el montaje de las muestras; 8. Muestra tisular/monocapa de células.

La I<sub>sc</sub> se puede estudiar tanto en condiciones basales como tras la adición de fármacos en el borde apical y/o basolateral o tras la aplicación de estímulos eléctricos. Más aún, las bases iónicas de los cambios producidos en la I<sub>sc</sub> se pueden establecer mediante experimentos de sustitución iónica en los tampones y mediante la inhibición farmacológica de transportadores iónicos. En el caso de trabajar con muestras tisulares, es posible estudiar la participación de los diferentes sistemas de regulación potencialmente presentes en el tejido. Por ejemplo, el control nervioso se puede poner de manifiesto mediante el bloqueo de la transmisión nerviosa con tetrodotoxina (TTX).

Sin embargo, la  $I_{sc}$  tiene la limitación de no reflejar el transporte electrolítico electroneutro, ya que éste no genera una PD. A fin de estudiar el transporte iónico electroneutro, que también contribuye a modular el movimiento de agua en el intestino, es necesario emplear radioisótopos como el  $^{22}\text{Na}$  y el  $^{36}\text{Cl}$  (Riegler and Matthews 2001, Clarke 2009).

Por otro lado, tal y como se mencionó anteriormente, las cámaras de Ussing permiten llevar a cabo estudios de permeabilidad. Dichos estudios se basan en la medida del flujo de iones y moléculas marcadas. El paso neto de iones viene definido por la resistencia transepitelial o, su inversa, la conductancia (G). Ésta se calcula mediante la ley de Ohm tras medir el incremento en  $I_{sc}$  inducido al aplicar un voltaje conocido ( $G = \Delta I_{sc} / \Delta V$ ) y está correlacionada positivamente con la permeabilidad iónica. En el caso del intestino, la G transepitelial viene determinada casi en su totalidad por la ruta paracelular y, por lo tanto, es indicativa del estado de las uniones intercelulares. (Riegler and Matthews 2001) Sin embargo, la permeabilidad iónica y macromolecular pueden ser independientes, por lo que los estudios de transporte de macromoléculas a nivel intestinal aportan información complementaria y relevante a la hora de investigar la función barrera. (Dye et al. 2001) Se usan a tal efecto moléculas de diferentes tamaños marcadas radioactivamente, como el  $^3\text{H}$ -manitol, unidas a fluorocromos, como son los dextranos conjugados con fluoresceína, o detectables mediante técnicas enzimáticas, como es el caso de la peroxidasa de rábano (Jorge et al. 2010, Porras et al. 2006, Roka et al. 2007). En los experimentos realizados con segmentos intestinales, se recomienda disecar las capas musculares externas previamente al montaje del tejido. Ello permite una evaluación más precisa del flujo de moléculas hacia la lámina propia y la submucosa y facilita la difusión de fármacos añadidos en el lado serosal.

### **Motilidad Intestinal**

La motilidad intestinal resulta de los movimientos coordinados de contracción y relajación de las capas de músculo liso que forman parte de la pared intestinal (Fig. 1). La actividad motora del intestino es determinante en el movimiento del contenido intestinal, la digestión de los alimentos, la asimilación de nutrientes y la eliminación de los residuos no digeridos (Barrett 2006). La coordinación de la motilidad depende de varios factores,

que incluyen, al menos: las propiedades intrínsecas de la musculatura lisa intestinal; la actividad de las células intersticiales de Cajal; la actividad del ENS; estímulos nerviosos extrínsecos; hormonas y mediadores producidos por células del sistema inmune (Granger et al. 1985).

La base de la actividad motora es la presencia en las células de la musculatura lisa intestinal de oscilaciones cíclicas espontáneas de su potencial de membrana de reposo, las denominadas ondas lentas (Makhlouf 1994). Las ondas lentas determinan la aparición de potenciales de acción, que a su vez inducen la contracción muscular. Por otra parte, la frecuencia y la propagación de las ondas lentas, y por lo tanto la ritmicidad de la motilidad intestinal, depende de la actividad de células con actividad de tipo marcapasos, las células intersticiales de Cajal (Takaki 2003).

La activación de programas específicos en los microcircuitos que configuran el ENS da lugar a los diferentes patrones de motilidad del intestino delgado: patrones interdigestivos, patrones postprandiales o digestivos, las Contracciones Gigantes y las fases de quiescencia o íleo fisiológico (Grundy et al. 2006).

En las fases interdigestivas o de ayuno el intestino delgado presenta un patrón motor cíclico recurrente denominado Complejo Motor Migratorio. Cada complejo puede dividirse en tres fases (I, II y III), en función de la actividad eléctrica y motora que presenta el músculo liso. En particular, la fase III, o frente de actividad, es la que muestra una actividad motora más intensa, presentando contracciones de mayor amplitud y duración que migran en sentido aboral, dando como resultado una actividad netamente propulsora. Se ha sugerido que la función de este patrón motor es limpiar la luz del intestino delgado de los restos indigestibles de alimento así como regular la microbiota comensal. En este sentido, varios estudios apuntan a que alteraciones en dicho patrón contribuirían a un sobrecrecimiento bacteriano intestinal, un fenómeno que parece estar implicado en la fisiopatología de diferentes patologías intestinales, como el síndrome del intestino irritable (*irritable bowel syndrome*, IBS) (Grundy et al. 2006, Deloose et al. 2012).

Tras la ingesta de alimentos, los Complejos Motores Migratorios son reemplazados por patrones de motilidad postprandiales o digestivos. Se describen básicamente dos patrones motores postprandiales: movimientos de segmentación y movimientos peritálticos. Los movimientos de segmentación consisten en contracciones locales

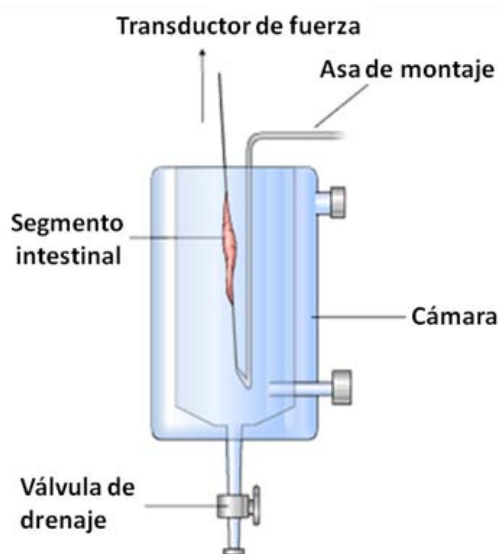
rítmicas de la musculatura circular del intestino. Su finalidad es mezclar el contenido intestinal con las secreciones digestivas y facilitar su exposición al epitelio, favoreciendo así los procesos de digestión y absorción. Por el contrario, los movimientos peristálticos son una actividad motora netamente propulsiva, que resulta de la actividad coordinada de las dos capas de músculo liso y que mueve el contenido intestinal en sentido aboral. Los movimientos peristálticos se desencadenan en respuesta a la deformación de la mucosa y a la distensión intestinal inducidas por el contenido luminal (Barrett 2006).

El patrón conocido como Contracciones Gigantes se observa a nivel del intestino delgado en respuesta a estímulos nocivos. Este patrón está caracterizado por la presencia de contracciones fuertes y prolongadas de la capa circular que se propagan rápidamente. Dichas contracciones son de una magnitud considerablemente mayor a las que tienen lugar durante los patrones interdigestivos o postprandiales. Es, por tanto, un mecanismo propulsor muy eficiente que vacía la luz intestinal de manera muy rápida. Estas contracciones pueden propagarse retrógradamente, desplazando el contenido intestinal en sentido oral, como es el caso de la emesis, y en sentido aboral, hacia el intestino grueso, estimulando la defecación. Esto sugiere que se trata de un mecanismo adaptativo de defensa para expulsar agentes nocivos de la luz intestinal rápidamente. Por otra parte, este patrón está implicado en la sintomatología de dolor abdominal, diarrea y urgencia de defecación asociada a las enteritis infecciosas, la enfermedad inflamatoria intestinal (*inflammatory bowel disease*, IBD) y las enfermedades funcionales gastrointestinales (IBS) (Grundy et al. 2006).

Por todo lo mencionado hasta el momento, es lógico pensar que existe una interrelación directa entre la motilidad intestinal y la función barrera. Por un lado, los patrones motores intestinales determinan el tiempo de permanencia de antígenos y microorganismos, tanto comensales como patógenos, en la luz intestinal y por tanto su capacidad de contactar con el epitelio y penetrar en el organismo (Keita and Soderholm 2010). Por otra parte, la motilidad intestinal condiciona el transporte hidroelectrolítico al determinar el tiempo disponible para el intercambio transepitelial de fluidos. (Barrett 2006, Barrett 2008) Por último, la secreción de agua lubrica los contenidos lumbales y contribuye a la distensión del intestino facilitando los movimientos peristálticos intestinales (Martinez-Augustin et al. 2009).

### Estudio de la Motilidad Intestinal

Al igual que en el caso de la función barrera, existen diferentes métodos *in vivo* e *in vitro* para el estudio de la motilidad intestinal en condiciones experimentales. Entre los métodos *in vivo*, encontramos la valoración de la velocidad de eliminación de heces, la determinación de la actividad mecánica y eléctrica del músculo liso mediante *strain-gauges* o electromiografía, la evaluación del tránsito intestinal y/o el cálculo del centro geométrico tras la administración de sustancias marcadoras y las técnicas de imagen (Jorge et al. 2010, Serna et al. 2006, Engel et al. 2010, Gremlich et al. 2004). Los sistemas *in vitro* van desde las técnicas clásicas de baño de órganos (Fig. 6) hasta las preparaciones de órganos aislados en los que se valoran cambios en la presión endoluminal, la tensión isométrica y/o la motilidad propulsiva mediante diferentes sistemas de registro (Mule et al. 2002, Hoffman et al. 2010, Keating et al. 2010).



**Figura 6. Representación esquemática de un sistema de baño de órganos.** Adaptada de [www.adinstruments.com/solutions/education/ltexp/earthworm-smooth-muscle-english](http://www.adinstruments.com/solutions/education/ltexp/earthworm-smooth-muscle-english).

En el presente trabajo se ha estudiado la actividad contráctil de segmentos aislados de yeyuno empleando un sistema de baño de órganos. En este sistema, el tejido, sumergido en una solución nutritiva tamponada, oxigenada, y a una temperatura controlada, está ligado a un transductor de fuerza que permite registrar la actividad mecánica del músculo liso intestinal, tanto en condiciones basales como las respuestas excitatorias (contracción) o inhibitorias (relajación) generadas por la adición de fármacos



o estímulos eléctricos o mecánicos (Fig. 6). De la misma forma, el sistema se emplea para discernir la contribución del SNE y la muscular en la actividad contráctil.

### **El Sistema Inmune Intestinal**

Si bien es cierto que la barrera epitelial y la motilidad intestinal restringen el paso de antígenos y microorganismos desde la luz intestinal hacia el organismo, ésta limitación no es completa. Por tanto, es necesaria una “vigilancia” permanente que permita una respuesta coordinada y rápida ante la entrada de sustancias extrañas a través de la mucosa intestinal. Esta “vigilancia” depende del sistema inmune residente en el intestino. El correcto funcionamiento del mismo es imprescindible para mantener la homeostasis intestinal, preservando el equilibrio entre la tolerancia y la activación de la respuesta inmune frente a los agentes extraños. De este modo, es posible actuar contra los agentes nocivos, a su vez que se ven inhibidas las reacciones frente a antígenos inocuos, como los de la dieta o la microbiota comensal. Por lo tanto, el sistema inmune residente en el intestino se encuentra en un estado de activación constante, por lo que se dice que el intestino presenta un estado de “inflamación fisiológica” (Khor et al. 2011, MacDonald and Monteleone 2005, Mowat 2003).

El componente innato del sistema inmune está ampliamente representado en el tracto gastrointestinal: barrera epitelial y estructuras asociadas, células dendríticas, células fagocíticas y células linfoides innatas. Los mastocitos (MCs) son uno de los tipos celulares que participan en el sistema inmune inespecífico. Este sistema permite una respuesta rápida, aunque inespecífica, frente a la llegada de antígenos luminales.. Por otro lado, la activación del sistema inmune adaptativo, que incluye los linfocitos T y B, induce una respuesta específica del organismo frente a ciertos antígenos. Dependiendo del perfil citocínico resultante de la activación de las células del sistema inmune adaptativo, las respuestas se clasifican en diferentes tipos (Th1, Th2 y/o Th17) (Khor et al. 2011, Mayer 2010).

En condiciones normales, el sistema inmune es capaz de mantener la homeostasis intestinal al controlar el paso de agentes nocivos al medio interno orgánico. Sin embargo, en individuos con predisposiciones genéticas y/o ambientales se ha visto que estas respuestas inmunes pueden estar alteradas. En estos casos, tiene lugar una activación exacerbada y persistente del sistema inmune que lleva a una perpetuación de un estado

de tipo inflamatorio patológico, más o menos intenso, de carácter crónico o recurrente. Aunque la relación causal no está clara, alteraciones de este tipo pueden ser importantes en la etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal y de las alteraciones funcionales gastrointestinales (Khor et al. 2011, MacDonald and Monteleone 2005, Mowat 2003).

## ***Enfermedades Inflamatorias y Funcionales del Tracto Gastrointestinal***

### **Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD)**

El término enfermedad inflamatoria intestinal (*inflammatory bowel disease*, IBD) agrupa diversas patologías que cursan con inflamación crónica, recurrente y severa del tracto digestivo. Entre dichas patologías, destacan la enfermedad de Crohn (*Crohn's disease*, CD) y la colitis ulcerosa (*ulcerative colitis*, UC). Ambas presentan una clínica similar caracterizada por la presencia de dolor abdominal, retortijones, pérdida de peso, diarrea, indigestión, fiebre y fatiga. Sin embargo, es posible diferenciarlas en base a la localización y características histopatológicas de las lesiones así como por las respuestas inmunológicas asociadas (Tabla 1) (Khor et al. 2011, Rijniere et al. 2007).

La prevalencia de la IBD es mayor en los países occidentales industrializados, siendo más frecuente en las zonas urbanas que en las rurales (Tabla 1). Si bien puede afectar a individuos de todas las edades, generalmente tiene comienzo entre la segunda y la cuarta décadas de la vida, presentándose la incidencia más elevada entre los 20 y 29 años de edad. En lo referente al sexo, las diferencias encontradas son inconsistentes, lo que sugiere que se presenta por igual en varones y mujeres (Molodecky et al. 2012).

### **Enfermedades Funcionales Gastrointestinales: Síndrome del Intestino Irritable (IBS)**

El síndrome del intestino irritable (*irritable bowel syndrome*, IBS) es la enfermedad funcional gastrointestinal más frecuente y una de las principales causas de consulta a las unidades de gastroenterología en los países occidentales. (Ohman and Simren 2010) En concreto, se estima que entre un 10 y un 20% de la población mundial adulta y adolescente padece síntomas compatibles con el IBS y la mayoría de estudios apuntan a una predisposición mayor en el sexo femenino (Longstreth et al. 2006).

**Tabla 1. Características epidemiológicas, histopatológicas e inmunológicas de la enfermedad de Crohn y de la colitis ulcerosa**

	<b>Enfermedad de Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Incidencia</b>	0.4-29.3 casos/100.000 habitantes por año. En el 75% de los estudios incrementa anualmente (1.2-23.3%).	0.1-24.3 casos/100.000 habitantes por año. En el 60% de los estudios incrementa anualmente (2.4%-23.3%) y en el 6% disminuye en el tiempo.
<b>Prevalencia</b>	Generalmente más elevada en Europa (hasta 322 enfermos/100.000 habitantes) y Norteamérica (hasta 319 enfermos/100.000 habitantes) y menor en Asia.	Generalmente más elevada en Europa (hasta 505 enfermos/100.000 habitantes) y Norteamérica (hasta 249 enfermos/100.000 habitantes) y menor en Asia.
<b>Distribución de las lesiones</b>	En cualquier segmento del tracto digestivo, aunque preferentemente se observa en íleon y la región perineal. Lesiones parcheadas. Dolencias extraintestinales.	Restringida al colon. Empieza en el recto y progresa proximalmente de manera continua.
<b>Hallazgos histopatológicos</b>	Inflamación transmural, submucosa engrosada, ulceración que puede derivar en fistulización, granulomas y fibrosis de las musculares externas.	Inflamación restringida a la mucosa y la submucosa, úlceras, inflamación y abscesos en las criptas y reducción del número de células caliciformes.
<b>Respuesta inflamatoria</b>	Todos los tipos celulares están involucrados. Alta infiltración de linfocitos y macrófagos.	Los linfocitos y los neutrófilos son las principales células infiltrantes.
<b>Patrón inmunológico</b>	Th1/Th17: IFN- $\gamma$ , IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-22	Th2/Th17: IL-5, IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17

Ver: Khor et al. 2011, Mayer 2010, Rijniere et al. 2007, Molodecky et al. 2012.

A día de hoy no existen marcadores específicos contrastados de estos procesos y su diagnóstico se basa en el cumplimiento de criterios clínicos estandarizados (Manning, Roma I / II / III) y la exclusión de otras patologías mediante pruebas diagnósticas tales como la sigmoidoscopia, la colonoscopia y análisis coprológicos y sanguíneos (Thompson et al. 1999, Manning et al. 1978, Drossman 2006).

La sintomatología asociada se caracteriza por la presencia de dolor o malestar abdominal y alteraciones en los hábitos de defecación. En función de este último parámetro se pueden establecer subclases de la enfermedad: IBS en que predomina la diarrea, IBS en que predomina el estreñimiento o IBS-mixta o sin subtipo. Sin embargo,

es importante tener en cuenta que en un mismo paciente se puede producir una alternancia entre los diferentes subtipos a lo largo del tiempo (Longstreth et al. 2006). Los síntomas descritos se asocian a alteraciones en la sensibilidad, la motilidad, la secreción y la permeabilidad intestinales (Keszthelyi et al. 2012, Dunlop et al. 2003, Spiller et al. 2000, Wouters and Boeckxstaens 2011).

La base fisiopatológica del IBS aún presenta muchas incógnitas a día de hoy. Sin embargo, la hipótesis más aceptada es que estaría propiciado por disfunciones de la interacción entre los sistemas nerviosos central y entérico, el denominado eje sistema nervioso central-tracto gastrointestinal (*brain-gut axis*), en que participarían factores genéticos, ambientales, psicosociales y fisiológicos (Ohman and Simren 2010, Tanaka et al. 2011). Entre las alteraciones fisiopatológicas que parecen caracterizar al IBS encontramos la presencia de una inflamación leve con una activación sostenida del sistema inmune. Aunque la relación causal no se ha establecido con seguridad, la micro-inflamación y la activación exacerbada del sistema inmune intestinal podrían estar desencadenadas por alteraciones de la permeabilidad epitelial y la microbiota luminal (Ohman and Simren 2010).

Las complicaciones a la hora de establecer un diagnóstico temprano y concluyente y el desconocimiento relativo a la etiología y fisiopatología del IBS explican que únicamente existan por el momento tratamientos paliativos y de una eficacia limitada para el manejo de la enfermedad.

#### *Síndrome del Intestino Irritable Post-infeccioso (PI-IBS)*

La predisposición de un subgrupo de pacientes, sin antecedentes de IBS, a mostrar un cuadro clínico compatible con la enfermedad tras padecer una gastroenteritis infecciosa aguda ha llevado a definir un tipo particular de IBS, el IBS post-infeccioso (*postinfectious IBS*, PI-IBS). En concreto, estudios epidemiológicos han señalado las gastroenteritis infecciosas como el factor de riesgo de origen ambiental más relevante para padecer IBS (Rodriguez and Ruigomez 1999). Así, en individuos que padecen una enteritis infecciosa, el riesgo de desarrollar IBS se incrementa hasta 6 veces y permanece elevado por un periodo de hasta 3 años después de sufrir el episodio inicial de

gastroenteritis. Esto hace que en estas poblaciones la incidencia media de PI-IBS se eleve hasta el 10% (Thabane et al. 2007).

Los estudios realizados hasta el momento en pacientes de PI-IBS han determinado alteraciones a múltiples niveles: motilidad, permeabilidad epitelial, células enterocromafines, microbiota intestinal, ENS e inflamación subclínica, acompañada de un incremento en el número de MCs y linfocitos intraepiteliales y en los niveles de citocinas proinflamatorias (Spiller et al. 2000, Park et al. 2008, Gwee et al. 2003, Spiller and Garsed 2009). Se ha sugerido que la exposición inicial a los agentes patógenos perturbaría la función barrera epitelial, alteraría las funciones neuromusculares y desencadenaría un proceso inflamatorio crónico, resultando, en conjunto, en un estado de tipo IBS.

Si bien los mecanismos implicados en el inicio y la perpetuación de dichas alteraciones una vez superada la infección primaria no se conocen con exactitud, se han identificado factores de riesgo asociados con el agente infeccioso, el huésped y la interacción entre ambos. Por ejemplo, mientras que las enteritis bacterianas y parasitarias desencadenan PI-IBS de curso prolongado, las gastroenteritis víricas parecen tener efectos solamente a corto plazo. Al mismo tiempo, la severidad del proceso infeccioso, indicada por factores tales como la duración de los procesos febril y/o diarreico, parece determinante. Otro factor relevante parece ser la concomitancia de alteraciones psicológicas y la edad de los pacientes infectados. En concreto, la incidencia es menor en sujetos mayores de 60 años, lo cual podría estar relacionado con una menor respuesta inflamatoria ante los agentes infecciosos asociada a un menor número de MCs y linfocitos en la mucosa intestinal (Spiller and Garsed 2009, Halvorson et al. 2006).

Los hallazgos histopatológicos y las alteraciones en la activación inmunológica descritos en los pacientes con PI-IBS, han puesto en entredicho la discriminación entre enfermedades gastrointestinales inflamatorias y funcionales. Tal es así, que se ha llegado a sugerir que la IBD y el IBS son diferentes manifestaciones clínicas con una única base fisiopatológica (Long and Drossman 2010). Ello explicaría la presencia de anomalías funcionales, inmunológicas, genéticas, psicológicas y en la microbiota

comunes en ambas patologías, así como la alternancia entre ambas patologías en determinados pacientes (Pimentel et al. 2000, Isgar et al. 1983).

### **Modelos Animales de IBD y de IBS**

Los modelos animales son un complemento de gran importancia a los estudios con pacientes, ya que permiten indagar en los mecanismos implicados en las fases tempranas de las patologías, la búsqueda de dianas terapéuticas y el estudio de terapias emergentes.

En general, se acepta que los modelos animales no reproducen todos los componentes de la enfermedad humana, sino únicamente un conjunto de síntomas de la misma. Esto se hace más evidente en el caso de la IBD y el IBS si consideramos que los propios enfermos se clasifican en subgrupos con presentaciones clínicas y lesiones diferenciadas. Al mismo tiempo, existen disparidades de origen genético y/o ambiental entre los diferentes modelos animales de una misma patología. Así, nuestro conocimiento en relación a los desórdenes inflamatorios y funcionales intestinales resulta del uso combinado de varios modelos que reproducen parcialmente estas alteraciones. Por consiguiente, la elección del modelo debe ir ligada a las cuestiones que deseamos responder, ya que éste condicionará los resultados obtenidos.

#### *Modelos de enfermedad inflamatoria intestinal*

Dentro de los modelos animales de IBD, se distinguen los espontáneos y los inducidos. Estos últimos pueden generarse mediante modificaciones genéticas, técnicas inmunológicas, productos químicos o fármacos (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

Tanto la fisiopatología como la localización y la gravedad de las lesiones asociadas variarán en función del modelo. Según el modelo, la alteración asociada más relevante se encontrará en la barrera epitelial, la respuesta inmune innata o el sistema inmune adaptativo. Por otro lado, aunque la mayoría de modelos se asocian a una colitis, también los hay en que la inflamación se localiza en el intestino delgado (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

- Modelos de enfermedad inflamatoria intestinal espontáneos

El primer modelo de colitis espontáneo se describió en el tití de cabeza de algodón, que desarrolla colitis espontánea asociada a estados de estrés (Chalifoux, Bronson 1981). Con posterioridad, se detectaron casos de inflamación intestinal espontánea en modelos murinos: ratones C3H/HeJBir y ratones SAMP1/YitFc. Los ratones C3H/HeJBir desarrollan úlceras perineales y colitis debido a alteraciones en la función de los linfocitos T y los SAMP1/YitFc desarrollan ileitis terminal por un fallo primario de la barrera epitelial (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

- Modelos de enfermedad inflamatoria intestinal inducidos

- Modelos en organismos modificados genéticamente

En función de la modificación genética, varían tanto la etiopatogenia como la localización de las lesiones. Por ejemplo, los ratones deficientes en el gen de resistencia a multidrogas presentan colitis como consecuencia de las alteraciones primarias a nivel epitelial. En otras ocasiones, la enfermedad se desencadena por alteraciones en la respuesta inmune innata, como es el caso de los ratones carente de STAT3 en células mieloides. Al mismo tiempo, existen multitud de modelos en los que la inflamación intestinal se debe a alteraciones en el sistema inmune adaptativo. Entre estos últimos, destacan los ratones  $TNF^{\Delta ARE}$ , que sobreexpresan TNF- $\alpha$  y desarrollan ileitis, tal y como sucede en la mayor parte los pacientes de enfermedad de Crohn (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

- Modelos inmunológicos inducidos

En estos modelos, la inflamación intestinal se induce mediante la transferencia de una subpoblación linfocitaria determinada a animales receptores inmunodeficientes. En función de las propiedades de los linfocitos transferidos, variará el segmento intestinal afectado así como el perfil citocínico predominante (Th1 o Th2) (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

- Modelos inducidos químicamente o mediante fármacos

Estos modelos se basan en la administración local o sistémica de agentes que, por diferentes mecanismos, inducen una respuesta de tipo inflamatorio en el intestino, frecuentemente a nivel del colon. La colitis inducida está condicionada, además de por el fondo genético y las condiciones de estabulación, por factores tales como la concentración, la dosis, el volumen, el vehículo, el punto y la vía de administración del compuesto, así como por la frecuencia y la duración del tratamiento (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

En algunos de estos modelos, la administración del agente inductor se realiza por vía intrarectal, precedida o no de una presensibilización cutánea. Dentro de esta categoría se engloban agentes inductores del tipo del ácido trinitrobenzenosulfónico (*trinitrobenzene sulfonic acid*, TNBS), el ácido dinitrobenzenosulfónico (*dinitrobenzene sulfonic acid*, DNBS), la oxazolona, el peptidoglicano-polisacárido o el ácido acético. Algunos de estos productos favorecen las respuestas inmunes al unirse a proteínas autólogas o a la microbiota. Además, se suelen administrar en soluciones con etanol, lo que provoca una disrupción de la barrera epitelial, facilitando la acción del agente inductor (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

En otros modelos, el agente inductor se administra por vía oral, siendo lo más frecuente la utilización de polímeros de sulfato sódico de dextrano (*dextran sulfate sodium*, DSS) en el agua de bebida. La exposición a DSS resulta en un cuadro de colitis, probablemente asociado a la toxicidad de este producto a nivel de las células de las criptas intestinales y la consiguiente afectación de la barrera mucosal (Rijnierse et al. 2007, Pizarro et al. 2003, Wirtz and Neurath 2007).

Por último, nuestro grupo ha desarrollado un modelo de ileitis inducido mediante dosis repetidas del antiinflamatorio no esteroideo indometacina por vía subcutánea. Dicho modelo está relacionado con alteraciones de la microbiota, de la permeabilidad y de la motilidad intestinales, generando fases alternas de inflamación activa y de quiescencia (Porrás et al. 2006, Porrás et al. 2004, Porrás et al. 2008).



### *Modelos de síndrome de intestino irritable*

Los modelos animales de IBS se pueden diferenciar en función de si son desencadenados por estímulos externos o internos y de si producen alteraciones primarias a nivel central o periférico. Un aspecto a tener en consideración son las alteraciones funcionales asociadas a los mismos, ya que el diagnóstico de la enfermedad es sintomático (Rijnierse et al. 2007, Qin et al. 2011, Mayer and Collins 2002).

- Modelos desencadenados por estímulos externos (psicosociales)

En estos modelos, el estímulo inicial actúa a nivel del sistema nervioso central e intentan emular el estrés psicosocial como factor desencadenante de la enfermedad en humanos.

Ampliamente usado es el modelo de estrés neonatal en roedores. Éste consiste en separar a las madres de las crías periódicamente tras su nacimiento comprometiendo la relación materno-filial. Los adultos previamente separados de sus madres presentan una mayor susceptibilidad al estrés y alteraciones en la sensibilidad somática y visceral, la motilidad y la permeabilidad intestinales, reproduciendo por lo tanto los componentes básicos del IBS (Barreau et al. 2007, Zhang et al. 2010, Barreau et al. 2008). También existen modelos de estrés post-traumático en los que diferentes estímulos estresantes se aplican en la edad adulta, lo que genera alteraciones persistentes a nivel intestinal (Gibney et al. 2010, Bradesi et al. 2009). Alternativamente, a fin de mimetizar las respuestas relacionadas con el estrés, se realizan administraciones repetidas de psicoestimulantes o de hormona liberadora de corticotropina (CRH, *corticotropin-releasing hormone*) a nivel central y/o periférico (Cador et al. 1993). Por último, se ha sugerido el empleo de modelos con alteraciones genéticas que afectan a diferentes sistemas neuroendocrinos de modulación, incluyendo la CRH, el GABA o los sistemas noradrenérgico o endocanabinoide (Mayer and Collins 2002). Sin embargo, la validez de algunos de estos modelos para reproducir la patología humana es discutible, precisando de validaciones más extensas.

- Modelos desencadenados por estímulos internos

Éstos se desencadenan por un estímulo físico periférico, asociado a un proceso irritativo y/o inflamatorio, que puede ser o no de origen infeccioso.

La sensibilización neonatal mediante irritación colorectal mecánica (distensión) o química (p. ej. ácido acético) comporta hipersensibilidad a la distensión colorectal y alteración de los hábitos de defecación en la edad adulta, sin alteraciones histopatológicas relevantes asociadas, mimetizando así lo que se observa en algunos pacientes con IBS (Al-Chaer et al. 2000, Winston et al. 2007).

A su vez, se han desarrollado modelos de IBS basados en el estudio de las fases post-inflamatorias de modelos animales diseñados originalmente para el estudio de la IBD en animales adultos. De todos ellos, el más caracterizado y validado a día de hoy es el basado en el empleo de TNBS. Originalmente diseñado como un modelo de colitis, los animales tratados con TNBS, una vez se han recuperado de la inflamación intestinal inicial, presentan alteraciones funcionales que recuerdan al IBS: hipersensibilidad, disfunciones motoras y cambios de permeabilidad y secreción epitelial. (Qin et al. 2011) Otros irritantes tópicos administrados intracolónicamente, como el ácido acético o el butirato, generan modelos similares (Xu et al. 2006, Bourdu et al. 2005).

Por otro lado, existen modelos destinados al estudio de la aparente interrelación existente entre el IBS y los fenómenos de hipersensibilidad. (Atkinson, Sheldon et al. 2004, Vivinus-Nebot, Dainese et al. 2012) En particular, nuestro grupo ha trabajado con modelos de sensibilización a la ovoalbúmina. La administración repetida de dicha proteína del huevo a ratas Sprague-Dawley induce un incremento en el número y la actividad de los MCs de mucosa a nivel intestinal sin que se desencadene una respuesta inmune específica (Saavedra 2005). Además, la sensibilización por vía oral induce hipermotilidad intestinal dependiente de los MCs, ya que es revertida mediante el estabilizador mastocitario ketotifeno (Traver et al. 2010).

Por último, los modelos de infección intestinal experimental transitoria son de especial interés para entender la fisiopatología del PI-IBS. Uno de los modelos de interés es el asociado a la infección en roedores por *Campylobacter jejuni*, al ser esta bacteria

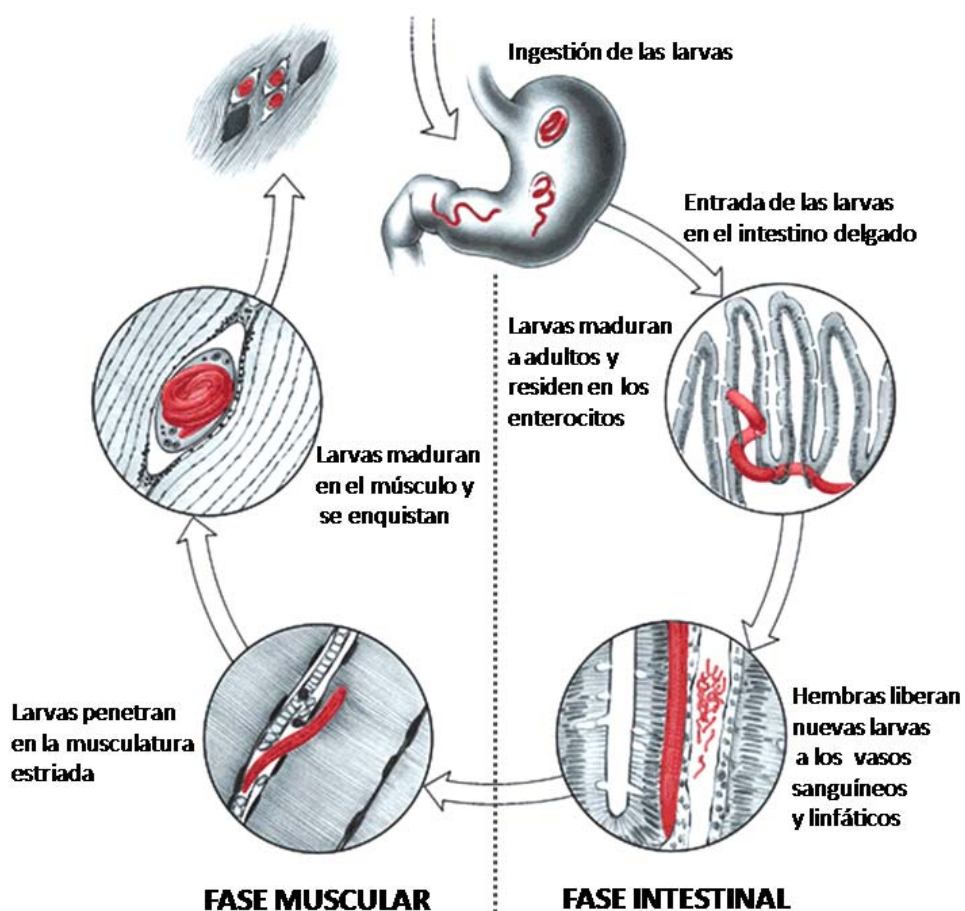
uno de los agentes etiológicos de la enfermedad en humanos. En concreto, las ratas previamente infectadas presentan alteraciones histológicas y en el patrón de defecación que recuerdan a las observadas en el IBS (Pimentel et al. 2008). Sin embargo, por el momento faltan evidencias de alteraciones en nocicepción, motilidad y secreción intestinales que respalden la validez de los modelos basados en infecciones bacterianas. En contraposición, las parasitosis intestinales en rata y ratón se asocian a cambios de sensibilidad, motilidad y función barrera, siendo en consecuencia los modelos más utilizados actualmente. En concreto, gran parte de estos estudios se han realizado tras parasitosis experimentales por *Trichinella spiralis*.

- La parasitosis experimental por *T. spiralis* como modelo de PI-IBS

La parasitosis por *T. spiralis*, se caracteriza por presentar un ciclo con una fase a nivel intestinal seguida de una fase muscular, dentro de un mismo hospedador (Fig. 7). El ciclo se inicia con la ingestión de las larvas, las cuales penetran en los enterocitos a nivel de duodeno y yeyuno, donde evolucionan hasta la fase adulta. Los parásitos adultos se reproducen y las hembras liberan nuevas larvas, que vía sanguínea o linfática se dirigen a la musculatura estriada donde evolucionan y quedan enquistadas a la espera de ser ingeridas por un nuevo hospedador para reiniciar el ciclo vital (Mitreva and Jasmer 2006). La fase intestinal concluye en el momento en que se expulsan los parásitos adultos en las heces (alrededor del día 15 en el caso de la rata) (Stewart et al. 1999, Suzuki et al. 2008). Tanto el curso de la enfermedad como de las alteraciones asociadas vienen condicionados por la especie y la cepa animal empleadas. Por ejemplo, mientras los ratones NIH/Swiss son propensos a desarrollar disfunciones motoras post-infecciosas, éstas no tienen lugar en los ratones B10.BR (Vallance et al. 1997). En el caso de la rata, la capacidad de expulsar el parásito es, por ejemplo, mayor en la cepa Dark Agouti que en la F344, al presentar diferencias genéticas en relación al locus *Tspe* (del inglés *T. spiralis expulsion*) (Suzuki et al. 2006).

El modelo experimental de parasitosis por *T. spiralis* se emplea en su fase intestinal para el estudio de la enteritis y en fases más tardías para el estudio de las disfunciones intestinales post-infecciosas. Su validez como modelo de PI-IBS se sustenta en los cambios funcionales en el músculo liso, el ENS y la barrera epitelial observados

una vez concluida la fase intestinal (Barbara et al. 1997, Kalia et al. 2008). Otros factores que refuerzan su validez son la presencia de alteraciones nociceptivas e histopatológicas y moleculares similares a las observadas en los pacientes con IBS, como por ejemplo la presencia de un infiltrado mastocitario difuso (Leng et al. 2009, Leng et al. 2010). Por último, la validez del modelo se vio definitivamente confirmada al describirse casos de PI-IBS tras un brote de triquinosis en humanos (Soyturk et al. 2007).



**Figura 7. Ciclo biológico del parásito *Trichinella spiralis*.** Adaptado de Mitreva and Jasmer 2006.

En nuestro caso particular, la adopción de este modelo se debe a su contrastada utilidad a la hora de estudiar la evolución de las poblaciones mastocitarias y su expresión de proteinasas así como sus posibles implicaciones funcionales (Serna et al. 2006, McDermott et al. 2003, Friend et al. 1996, Friend et al. 1998), sin olvidar que los

mastocitos se consideran un componente significativo en la fisiopatología del IBS (Rijnierse et al. 2007, Barbara et al. 2004, Guilarte et al. 2007).

### ***Las Mastocitos (Mcs)***

Los MCs son células inmunes residentes que se localizan predominantemente en barreras biológicas con el medio externo, como son la piel y las mucosas. Sus progenitores, originados a partir de células madre hematopoyéticas pluripotenciales, abandonan la médula ósea, migran por sangre periférica y completan su proliferación y diferenciación tras alcanzar el tejido diana (Kitamura et al. 2006, Galli et al. 2011). A fin de llevar a cabo su proceso de maduración requieren determinados estímulos, siendo el más relevante el mediado por la unión del factor de células totipotenciales a su receptor tirosinquinasa KIT (Galli et al. 2011, Tsai et al. 1991). Los MCs maduros se caracterizan por sintetizar y almacenar gran cantidad de mediadores neuro-inmunes que se liberan al medio cuando, como parte de una respuesta inmune, se produce la activación de la célula.

### **Mecanismos de Activación de los Mastocitos**

La activación de los MCs da lugar a la liberación de un gran número de mediadores con funciones proinflamatorias, antiinflamatorias y/o inmunosupresoras (Galli et al. 2011). Algunos de estos mediadores se encuentran preformados y almacenados en los gránulos y se liberan inmediatamente tras la activación celular. Los mediadores preformados incluyen histamina, proteoglicanos, proteinasas, 5-HT, y algunas citocinas como el TNF- $\alpha$ . Otros mediadores, en cambio, se sintetizan *de novo* tras la activación mastocitaria. Este es el caso de derivados lipídicos (prostaglandina D<sub>2</sub>, leucotrienos y tromboxanos), factor activador de plaquetas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, radicales de nitrógeno y oxígeno y multitud de citocinas y quimiocinas, incluyendo IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$  e interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Rijnierse et al. 2007, Krishnaswamy and Chi 2006).

El estímulo más clásico, y seguramente el más efectivo, a la hora de activar los MCs es el mediado por la unión del complejo antígeno-IgE al receptor de alta afinidad

para la fracción constante de la IgE (FcεRI) que expresa el MC. Tras dicha unión, se produce la agregación del receptor y la consiguiente transducción de una señal de activación intracelular que comportará la liberación de mediadores. Éste mecanismo está involucrado en las reacciones de hipersensibilidad inmediata clásicas y en las parasitosis. En ambos casos, tras un primer contacto con el alérgeno o parásito en cuestión, los linfocitos B sintetizan grandes cantidades de IgEs específicas que se unirán a los FcεRI mastocitarios. Por otra parte, la IgE monomérica puede controlar la liberación de citocinas sin necesidad de que un antígeno desencadene el entrecruzamiento de los receptores de IgE (Rijnierse et al. 2007, Galli et al. 2011, Bischoff 2007).

A su vez, los MCs pueden ser activados por componentes del sistema inmune innato y adaptativo independientes de la IgE. Éste es el caso de la activación mediada por diferentes citocinas, el sistema del complemento, receptores de la fracción constante de IgGs, receptores tipo toll (*Toll-like receptors*) o cadenas ligeras libres de Ig (Rijnierse et al. 2007, Bischoff 2007).

Al mismo tiempo, existen estímulos independientes del sistema inmune capaces de modular la activación de los MCs. Ejemplo de ello es la activación mediada por factores neurogénicos, como el factor de crecimiento nervioso (*nerve growth factor*, NGF), o neuropéptidos, como la sustancia P (SP), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). La liberación de mediadores mastocitarios la pueden inducir también secretagogos xenobióticos como la concanavalina A, el compuesto 48/80 o el mastoparan (Roka et al. 2007, Krishnaswamy and Chi 2006, Scott and Maric 1993). Por último, los MCs pueden activarse ante estímulos físicoquímicos como un estrés mecánico, un aumento de la temperatura y alteraciones osmóticas y de pH, fenómenos todos ellos característicos de los procesos inflamatorios (Turner et al. 2007).

### **Proteinasas Mastocitarias: Clasificación de los Mastocitos e Implicaciones Funcionales**

El tejido en el que los MCs finalizan su desarrollo es determinante a la hora de definir sus características fenotípicas. Una de las propiedades que varían en función de

su localización tisular es el tipo de proteinasas [triptasas, quimasas y carboxipeptidasa A mastocitaria (MC-CPA)] que expresan y almacenan en sus gránulos de secreción. Por lo tanto, estas proteinasas son biomarcadores de interés a la hora de diferenciar el fenotipo y el estado de activación de los MCs (Pejler et al. 2007, Pejler et al. 2010, Miller and Pemberton 2002).

Atendiendo a las proteinasas expresadas, en los humanos, los MCs se dividen en dos grupos: los localizados en las mucosas, que expresan únicamente triptasas y se denominan MC<sub>T</sub>; y los localizados en el tejido conectivo, que contienen tanto triptasas como quimasa y se denominan MC<sub>TC</sub> (Tabla 2). En roedores, tanto los MCs de mucosa (*mucosal MCs*, MMCs) como los de tejido conectivo (*connective tissue MCs*, CTMCs) contienen quimasas en sus gránulos, si bien únicamente los CTMCs expresan triptasas (Tabla 2). En el caso del intestino, los MC<sub>T</sub> y los MMC se encuentran predominantemente a nivel epitelial y de la lámina propia mientras que los MC<sub>TC</sub> y los CTMC se sitúan principalmente en la submucosa y la serosa (Pejler et al. 2007, Pejler et al. 2010, Miller and Pemberton 2002).

El patrón de expresión de proteinasas por parte de los MCs tiene implicaciones funcionales relevantes. La acción de cada una de las proteinasas mastocitarias deriva de su capacidad de actuar sobre sustratos específicos. Uno de los sustratos más caracterizados para la acción de proteinasas mastocitarias es el receptor activado por proteinasas (*proteinase-activated receptor*, PAR) de tipo 2 (PAR-2), que se activa tanto por triptasas como por quimasas (Adams et al. 2011, Sharma et al. 2007). Tanto el PAR-2 como los MCs son especialmente abundantes en el tracto gastrointestinal, por lo que su interacción a este nivel es especialmente interesante, sobre todo si tenemos en consideración que el PAR-2 participa en la regulación de numerosas funciones gastrointestinales, como son las respuestas inmunes, la proliferación celular, la motilidad, la nocicepción y la función barrera epitelial (Adams et al. 2011, Vergnolle 2005, Vergnolle et al. 1998).

**Tabla 2. Expresión de proteinasas mastocitarias en las diferentes subclases de mastocitos en la especie humana y en roedores**

Especie	Subclase	Triptasas	Quimasas	MC-CPA
Humano	MC <sub>T</sub>	$\alpha$ , $\beta$ (I, II, III)	No	No
	MC <sub>TC</sub>	$\alpha$ , $\beta$ (I, II, III)	CMA1	Sí
Ratón	MMC	No	mMCP-1, -2	No
	CTMC	mMCP-6, -7	mMCP-4, -5, -9	Sí
Rata	MMC	No	rMCP-2, -3, -4, -8, -9, -10	No
	CTMC	rMCP-6, -7	rMCP-1, -5	Sí

CTMC: MC de tejido conectivo; MC-CPA: carboxipeptidasa A mastocitaria; MC<sub>TC</sub>: MC que contienen quimasa y triptasa; MC<sub>T</sub>: MC que contienen únicamente triptasa; MMC: MC de mucosa; mMCP: Proteinasa mastocitaria de ratón; rMCP: Proteinasa mastocitaria de rata. Basada en Pejler et al. 2007 y Pejler et al. 2010.

Por lo tanto, a través de la activación de receptores PAR-2, las proteinasas mastocitarias podrían regular indirectamente estas mismas funciones. Además, se ha visto que las proteinasas mastocitarias pueden tener efectos enzimáticos directos sobre proteínas de las TJs y regular su interacción con el citoesqueleto, lo que implicaría un efecto directo sobre la permeabilidad epitelial (Scudamore et al. 1995, Groschwitz et al. 2009).

A parte de estas acciones, las proteinasas mastocitarias participan en la regulación de las respuestas inmunes. Por un lado, promueven el reclutamiento de otros tipos celulares, como neutrófilos y eosinófilos. Por otro lado, pueden inducir la degranulación mastocitaria, generando una retroalimentación positiva de la activación de los MCs (Pejler et al. 2007, He 2004).

### **Métodos de Estudio de las Funciones Mastocitarias**

Las funciones y la actividad mastocitarias se pueden estudiar, tanto en humanos como en modelos animales, haciendo uso de diferentes técnicas *in vitro* e *in vivo*. Al igual que en el caso de los estudios funcionales intestinales, cada una de las metodologías tiene ventajas e inconvenientes y es la integración de las observaciones realizadas en cada una de ellas lo que permite conocer el funcionamiento real de estas células.



Los métodos *in vitro* más populares son aquellos que giran en torno al uso de líneas celulares. Si bien lo más deseable sería poder hacer uso de cultivos primarios a partir de tejido humano, la necesidad de disponer de tejido humano fresco y el bajo rendimiento del proceso de purificación celular limitan enormemente las posibilidades de llevar a cabo estudios de este tipo. En consecuencia, la mayoría de los estudios se llevan a cabo en líneas celulares humanas transformadas o inmaduras o con líneas celulares murinas. En caso de trabajar con modelos murinos, lo más habitual es hacer uso de MCs generados a partir de células progenitoras procedentes de la médula ósea (Bischoff 2007).

Por su parte, el estudio de los MCs *in vivo* comprende el uso de técnicas histopatológicas y de inmunomarcaje, la evaluación de mediadores mastocitarios y la utilización de manipulaciones farmacológicas y biológicas. En el caso del trabajo con modelos animales, existe además la posibilidad de usar animales modificados genéticamente (Bischoff 2007, Kalesnikoff 2008, Santos et al. 2006).

Algunas de las manipulaciones farmacológicas y biológicas empleadas están dirigidas a modular el crecimiento, el desarrollo y la migración de los MCs. El ejemplo más paradigmático al respecto son los tratamientos dirigidos a neutralizar KIT o su ligando, el factor de células totipotenciales, induciendo una depleción mastocitaria (Donaldson et al. 1996, Pennock 2004, Newlands et al. 1995). Sin embargo, debemos tener en cuenta que dicha aproximación puede afectar a otros tipos celulares que también expresan KIT, tal y como se describe más adelante en relación a los animales mutantes para este gen. Por lo tanto, la especificidad de este método y la posibilidad de extraer conclusiones definitivas son limitadas.

Otro modo de abordar el estudio de los MCs es el empleo de tratamientos dirigidos a modular la liberación de mediadores derivada de su activación, por ejemplo con el uso de estabilizadores de la membrana mastocitaria, como el cromoglicato disódico o el fumarato de ketotifeno (Norris 1996, Serna et al. 2006). Estos compuestos producen una estabilización de la membrana celular que interfiere con el proceso de degranulación y, por tanto, previene la liberación de mediadores. Sin embargo las dianas moleculares de estos fármacos no están restringidas a los MCs. Así, el cromoglicato

disódico tiene efectos sobre los granulocitos y los linfocitos B mientras que el ketotifeno actúa también sobre neuronas y eosinófilos (Norris 1996, Hasala et al. 2005, Sato et al. 2005).

Por otro lado, existe la posibilidad de interferir en la secreción de mediadores mastocitarios actuando sobre receptores y componentes de las cascadas de señalización intracelular que participan en los procesos de activación/degranulación. Éste sería el caso de los bloqueantes de la activación mastocitaria vía FcεRI, tales como el FcγRIIIB, o de la inactivación farmacológica de la PI3K (Santos et al. 2006).

Por último, es posible utilizar fármacos que modulen la actividad de los mediadores mastocitarios una vez estos ya han sido liberados. Éste sería el caso de fármacos que actúan sobre la triptasa mastocitaria o sobre su diana de acción, el PAR-2 (Adams et al. 2011, Isozaki et al. 2006).

En relación a los modelos modificados genéticamente, existen roedores con mutaciones espontáneas en KIT, asociadas a un déficit mastocitario. No debemos perder de vista que dichos animales presentan otras alteraciones, como una reducción marcada en el número de melanocitos y de células intersticiales de Cajal, siendo estas últimas especialmente importantes en la regulación de la motilidad gastrointestinal. A su vez, los ratones *Kit<sup>W/W<sup>-v</sup></sup>* en particular muestran otras alteraciones fenotípicas como anemia macrocítica, neutropenia y esterilidad, características que limitan su uso en ciertos tipos de estudios. Sin embargo, existen aproximaciones que permiten reconstituir las poblaciones mastocitarias, pudiendo así discernir hasta qué punto las diferencias entre los animales de tipo salvaje y los mutantes son debidas a la diferencia en el número de MCs (Snoek et al. 2012).

Otra aproximación posible al estudio de los MCs es la de estudiar las funciones de mediadores mastocitarios específicos haciendo uso de animales *knock-out* para los mismos. Ésta vía se ha empleado, por ejemplo, para el estudio de las funciones de proteinasas expresadas por los MCs, tales como la mMCP-1 y la mMCP-6 (Shin et al. 2008, Lawrence et al. 2004, Knight et al. 2000).

Por último, recientemente se han desarrollado ratones *knock-out* condicionales que dejan abierta la posibilidad de eliminar la expresión de mediadores concretos selectivamente a nivel mastocitario (Scholten et al. 2008, Musch et al. 2008).

### **Los Mastocitos en la IBD y el IBS**

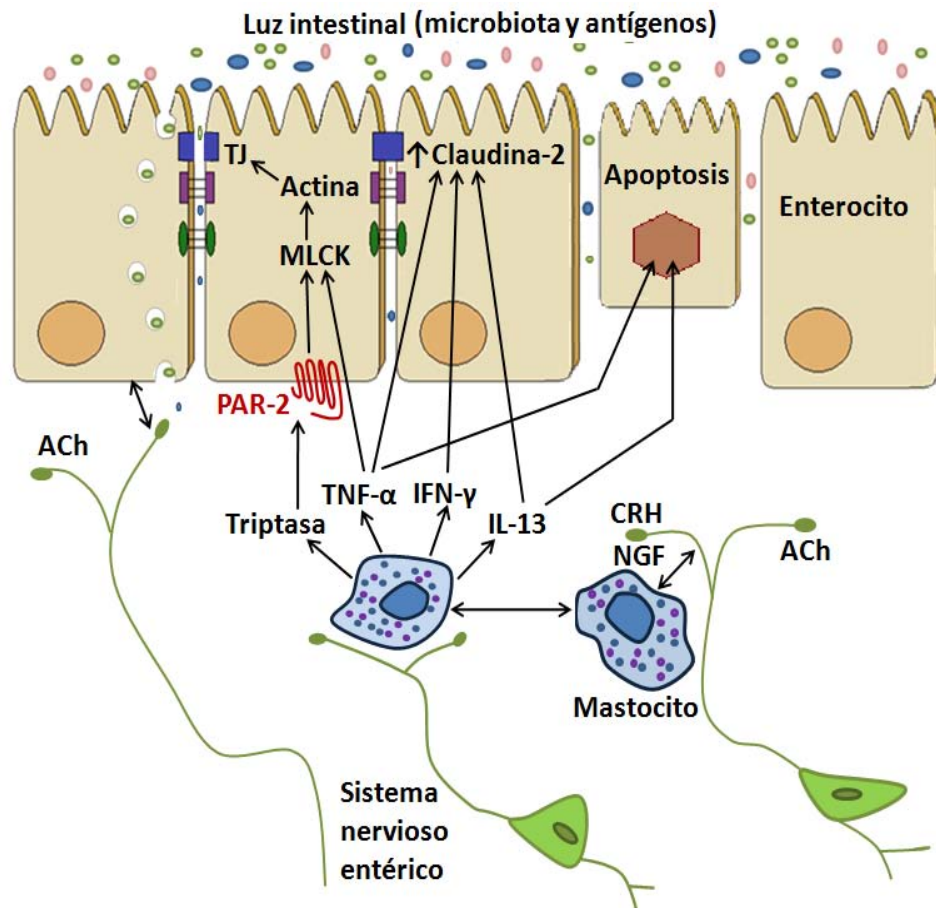
Numerosas evidencias apuntan a una implicación de los MCs en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias y funcionales gastrointestinales. Los datos más concluyentes muestran que en pacientes con IBS o IBD, se ha detectado un incremento en el número y el estado de activación de los MCs intestinales (Rijnierse et al. 2007, Barbara et al. 2004, Guilarte et al. 2007, He 2004). Aunque el mecanismo por el cual se produce este infiltrado mastocitario no se conoce, se ha sugerido que el reclutamiento de células del sistema inmune, incluidos los MCs, vendría propiciado por un incremento de la permeabilidad intestinal y el resultante aumento de la exposición a antígenos de origen luminal (Keita and Soderholm 2010, Hering et al. 2012).

En este sentido, se ha demostrado una predisposición por parte de los enfermos de IBD e IBS a tener defectos genéticos relacionados con la función barrera (Khor et al. 2011, Villani et al. 2010), que se correlacionan a nivel funcional con incrementos de la permeabilidad intestinal (Keita and Soderholm 2010). Estas alteraciones tendrían como base cambios en la expresión, degradación y distribución de las proteínas asociadas a las TJs, alteraciones en la modulación de las uniones intercelulares por parte del citoesqueleto y fenómenos de apoptosis (Keita and Soderholm 2010, Hering et al. 2012). La disfunción de la barrera intestinal asociada podría explicar, al menos parcialmente, las alteraciones del transporte hidroelectrolítico transepitelial asociadas a estas patologías (Martinez-Augustin et al. 2009).

Diversos mediadores mastocitarios podrían participar en estos procesos. Por ejemplo, tanto el TNF- $\alpha$ , como el IFN- $\gamma$  y la IL-13 favorecen la expresión de la proteína formadora de poros claudina-2 (Amasheh et al. 2009, Heller et al. 2005). Por otro lado, el TNF- $\alpha$  y la triptasa mastocitaria inducen la contracción del citoesqueleto y la reorganización de las proteínas de las TJs mediante la activación de la MLCK (Wang et al. 2006, Roka et al. 2008). Además, el TNF- $\alpha$  y la IL-13 son capaces de inducir apoptosis a nivel epitelial (Heller et al. 2005, Schmitz et al. 1999). En su conjunto, todas estas

acciones contribuirían a incrementar la permeabilidad intestinal, como se observa a nivel clínico (Fig. 8). Al mismo tiempo, los mediadores liberados por los propios MCs estimulan la degranulación mastocitaria; generando un sistema de retroalimentación que podría explicar la perpetuación de la disfunción de la barrera intestinal en la IBD y el IBS (He 2004). Hay que considerar que otros tipos celulares, implicados también en la fisiopatología de la IBD y el IBS, pueden contribuir a la producción de alguno de los mediadores mencionados, como es el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que liberan TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-13.

La participación de los mediadores mastocitarios en la inflamación y la disfunción intestinales se ha confirmado mediante el uso de modelos animales y aproximaciones terapéuticas en pacientes. Por ejemplo, estudios llevados a cabo en animales deficientes en MCs señalan la implicación de estas células en el control de la función barrera epitelial en condiciones normales y durante la inflamación intestinal (McDermott et al. 2003, Groschwitz et al. 2009). Por su parte, la estabilización mastocitaria mediante ketotifeno disminuye la hipersensibilidad visceral en pacientes con IBS y previene la dismotilidad intestinal asociada a un modelo de parasitosis por *T. spiralis* en la rata (Serna et al. 2006, Klooker et al. 2010). Del mismo modo, terapias que reducen el número de MCs y/o la disponibilidad de mediadores, como los glucocorticoides y los anticuerpos monoclonales anti-TNF- $\alpha$ , son de utilidad en el tratamiento de la IBD (Rijnierse et al. 2006, Sands et al. 2004). Por último, estudios recientes apuntan a la inhibición de la triptasa mastocitaria como un tratamiento potencialmente beneficioso en pacientes con IBD o IBS (Tremaine et al. 2002, Lee et al. 2010). Esto, junto con otras observaciones, podría sugerir que la participación de los MCs en estas patologías podría estar mediada por la capacidad que tienen sus proteinasas de activar receptores del tipo del PAR-2 (Adams et al. 2011, Sharma et al. 2007).



**Figura 8.** Esquema de los mecanismos potencialmente involucrados en la modulación de la función barrera epitelial por parte de los mastocitos y del sistema nervioso entérico. ACh: acetilcolina (vías colinérgicas); CRH: Hormona liberadora de corticotropina; IFN- $\gamma$ : Interferón  $\gamma$ ; IL: Interleuquina; NGF: Factor de crecimiento nervioso; PAR-2: Receptor activado por proteinasas de tipo 2; TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . Modificado de Keita and Soderholm 2010 y Hering et al. 2012.



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De lo expuesto se desprende que existe una interrelación entre las poblaciones mastocitarias intestinales y la presencia de alteraciones funcionales a nivel del intestino con relevancia fisiopatológica, al menos en lo que se refiere a la enfermedad inflamatoria intestinal y al síndrome de intestino irritable.

Por tanto, este trabajo de investigación parte de la **HIPÓTESIS** de que la evolución en el número, la actividad y el fenotipo mastocitarios juegan un papel fundamental en la respuesta defensiva intestinal al condicionar el funcionamiento de la barrera epitelial. En particular, los mediadores liberados por los mastocitos inducirían cambios a nivel epitelial y del sistema nervioso entérico, modulando la permeabilidad y la secreción intestinales. Estas alteraciones podrían jugar un papel relevante en la cronificación de la inflamación y la disfunción intestinales.

Para demostrar esta hipótesis, se han caracterizado las posibles alteraciones de la función barrera epitelial y su interrelación con la actividad mastocitaria y con el sistema nervioso entérico en un modelo de disfunción intestinal inducido por la parasitosis por *Trichinella spiralis* en la rata.

Con esta finalidad se han planteado los siguientes **OBJETIVOS** específicos de trabajo:

- Estudiar la evolución temporal de las poblaciones mastocitarias intestinales, caracterizando la expresión de proteinasas específicas, a lo largo de la parasitosis por *T. spiralis* en ratas.
- Caracterizar las modificaciones post-infecciosas en la función barrera epitelial (propiedades electrofisiológicas y permeabilidad a macromoléculas).
- Caracterizar los cambios post-infecciosos en la modulación de las respuestas defensivas intestinales mediadas por la activación de PAR-2.
- Estudiar la posible interrelación entre la activación mastocitaria y las alteraciones de la función barrera epitelial y de las respuestas asociadas a la activación de PAR-2 en el periodo post-infeccioso.





## CAPÍTULO 1

### PERSISTENT EPITHELIAL BARRIER ALTERATIONS IN A RAT MODEL OF POSTINFECTIOUS GUT DYSFUNCTION

J. A. Fernández-Blanco, S. Barbosa, F. Sánchez de Medina, V. Martínez and P. Vergara

*Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Veterinary School (J.A. F.-B., S. B., V. M., P. V.) and School of Biosciences (V. M.), Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain (F. S. M.). Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (F. S. M., V. M., P. V.).*

**Running title:** Postinfectious gut barrier dysfunction

**Keywords:** enteric nervous system, epithelial barrier function, mast cell, permeability, postinfectious gut dysfunction



## Abstract

**Introduction:** Mucosal mast cells (MMC), epithelial barrier function (EBF) and the enteric nervous system (ENS) are interactive factors in the pathophysiology of functional gastrointestinal disorders. **Aim:** To characterize postinfectious EBF alterations in the *Trichinella spiralis* infection model of MMC-dependent intestinal dysfunction in rats. **Methods:** Sprague-Dawley rats were infected with *T. spiralis*. 30±2 days post-infection, jejunal EBF (electrophysiological parameters, FITC-dextran fluxes and responses to secretagogues and MMC degranulators) was evaluated (Ussing chamber). In some experiments, participation of secretomotor neurons was examined by tetrodotoxin (TTX) pretreatment. Jejunal histology and MMC count and activity were also assessed. **Results:** 30±2 days post-infection, when only a low grade inflammation was observed, increased MMC number and activity were associated with altered EBF. EBF alterations were characterized by increased mucosal permeability and ion transport. In *T. spiralis*-infected animals, ion transport after serotonin (5-HT) and IgE-dependent activation of MMCs were reduced. In contrast, responses to substance P (SP) and capsaicin were similar in infected and non-infected animals. Neuronal blockade with TTX altered responses to SP and capsaicin only in infected rats. **Conclusions:** *T. spiralis* infection in rats, at late stages, results in persistent postinfectious intestinal barrier dysfunctions and mucosal mastocytosis, accompanied by other signs of lower inflammation such as villi shortening. The altered permeability and the TTX-independent hyporesponsiveness to 5-HT and IgE indicate epithelial alterations. Changes in responses to SP and capsaicin after neuronal blockade suggest an ENS remodelling during this phase. Similar long-lasting neuro-epithelial alterations might contribute to the pathophysiology of functional and postinfectious gastrointestinal disorders.



## Introduction

Although not fully demonstrated, alterations in epithelial, enteric nervous system (ENS) and immune functions are likely to contribute to the initiation and perpetuation of functional gastrointestinal disorders. In particular, neuro-epithelial remodeling associated with mucosal mast cell (MMC) activity could participate as primary and/or secondary events for intestinal barrier dysfunction in gastrointestinal disorders, such as postinfectious irritable bowel syndrome (IBS), and the corresponding animal models.<sup>1</sup> Experimental *T. spiralis* infection has been widely used to study MMC-dependent intestinal inflammation and secretomotor dysfunctions.<sup>2,3,4,5</sup> While most of the studies performed address functional changes during the intestinal phase of *T. spiralis* infection (previous to day 23 post-infection), a limited number have evaluated EBF after the parasite has been eliminated, corresponding to a postinfectious phase with a low grade inflammation.<sup>3,5</sup>

Postinfectious alterations of gut permeability and hydroelectrolytic transport are likely to condition the effectiveness of intestinal barrier function and the development of subsequent immunological responses.<sup>6</sup> In particular, leakiness of the intestinal epithelium could lead to an enhanced penetration of luminal antigens, generating and maintaining an exacerbated local immune response.<sup>7</sup> On the other hand, increased intestinal permeability and secretion could act as a defense mechanism, inducing water movement to the lumen, thus restricting the adherence and penetration of luminal antigens, including gut microbiota.<sup>8</sup>

Growing data suggest that MMC mediators are able to modulate enteric epithelial and neural functions.<sup>9,10,11,12</sup> Therefore, states associated with an increase in the number and/or activity of MMCs, such as *T. spiralis* infection, might represent good models to characterize the mechanisms involved in such MMC-dependent alterations of gut permeability, sensitivity and secretomotor responses.<sup>1,2,3,4,13</sup>

The aim of the present study was to further understand the impact of neuro-epithelial alterations and MMCs in the changes of EBF observed in postinfectious functional gastrointestinal diseases. For this purpose, in the late stages of *T. spiralis* infection in the rat, when only signs of a low grade intestinal inflammation are present

(day 30±2 post-infection), we assessed: (i) epithelial electrophysiological parameters, as an index of intestinal hydroelectrolytic transport and permeability; (ii) paracellular and transcellular passage of macromolecules; (iii) changes in ion transport induced by secretagogues (5-HT, SP and capsaicin); (iii) MMC number and activity and (iv) the effects of the enteric neural transmission and MMC mediators on mucosal secretory responses and permeability.

## Materials and Methods

### Animals

Adult male OFA Sprague-Dawley rats (7-8 weeks old, 250-275 g; Charles River Laboratories, Lyon, France) were used. Rats were housed under conventional conditions in a light (12 h/12 h light-dark cycle) and temperature controlled (20-22 °C) room in groups of two to three per cage, with access to tap water and laboratory rat chow (A04; Safe, Augy, France) *ad libitum*. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and the *Generalitat de Catalunya* (protocols 5352 and 5564). All procedures were in accordance with current European laws concerning animal experimentation.

### *Trichinella spiralis* Infection and Tissue Sampling

Muscle-stage larvae of *T. spiralis* were obtained from infected CD1 mice as previously described.<sup>4,14,15</sup> Rats were infected at 8-9 weeks of age by administration of 7.500 *T. spiralis* larvae suspended in 1 ml of saline by oral gavage. Age-matched rats dosed orally with 1 ml of saline were used as controls. All studies were performed on day 30±2 post-infection. During this time, animals were regularly monitored for clinical signs and body weight changes. Normal course of the infection was confirmed by a significant decrease of body weight after *T. spiralis* infection compared with controls, with a peak reduction on day 9 and a subsequent linear increase over time, as previously described by our group.<sup>15</sup>

At the time of the experiments, animals were euthanatized by decapitation, a laparotomy was performed and jejunal samples (beginning 10 cm distal to the ligament of Treitz) were excised and immediately flushed and placed in ice cold oxygenated (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) Krebs buffer containing glucose. At the same time, jejunal samples for histological and immunohistochemical studies were also obtained. Intestinal samples were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 24 h, processed routinely for paraffin embedding and 5 µm sections obtained for H&E staining or for rat mast cell protease 2 (rMCP-2) immunohistochemistry (see below).

### **Measurement of Electrophysiological Parameters**

Jejunal segments were stripped of the outer muscle layers and myenteric plexus, opened along the mesenteric border and divided into 1 cm<sup>2</sup> flat segments, excluding Peyer's patches. The pieces were mounted in Ussing chambers (World Precision Instruments, Aston, UK) with an exposed window surface area of 0.67 cm<sup>2</sup>. Tissues were bathed bilaterally with 5 mL of oxygenated and warmed (37 °C) Krebs buffer (in mM: 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO<sub>3</sub>, 4.61 KCl, 1.14 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.50 CaCl<sub>2</sub> and 1.16 MgSO<sub>4</sub>; pH: 7.3-7.4). The basolateral buffer also contained 10 mM glucose as energy source, and was osmotically balanced with 10 mM mannitol in the mucosal buffer. The chambers contained two voltage-sensitive electrodes (EKV; World Precision Instruments) to monitor the potential difference (PD) across the tissue and two Ag-AgCl current passing electrodes (EKC; World Precision Instruments) to inject the required short-circuit current (I<sub>sc</sub>) to maintain a zero potential difference, as registered via an automated voltage/current clamp (DVC-1000; World Precision Instruments). A voltage step of 1 mV was applied every 5 min and the change in I<sub>sc</sub> was used to calculate tissue conductance (G) by Ohm's law. Tissues were allowed to stabilize for 15-25 min before baseline values for PD, I<sub>sc</sub> and G were recorded. Data were digitized with an analog-to-digital converter (MP150; Biopac Systems, Goleta, USA) and measurements were recorded and analyzed with Acqknowledge computer software (version 3.8.1; Biopac Systems). I<sub>sc</sub> and G were normalized for the mucosal surface area.

### **Epithelial Responses to Exogenous Secretagogues**

Changes in  $I_{sc}$  were assessed in response to increasing concentrations of serotonin (5-HT,  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M) or substance P (SP,  $3.3 \times 10^{-8}$ - $10^{-6}$  M) added to the Ussing chamber (basolateral side) in a cumulative manner with a 10 min interval between consecutive concentrations. Preliminary studies showed that this time interval allowed tissues to recover stable  $I_{sc}$  values after each addition. In addition, responses to single concentrations of capsaicin ( $5 \times 10^{-8}$  M or  $2 \times 10^{-6}$  M) or to the mast cell degranulators, compound 48/80 ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representing a total of  $150 \mu\text{g}$  in the chamber), concanavalin A type IV ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representing a total of  $500 \mu\text{g}$  in the chamber) and mouse anti-rat IgE ( $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , representing a total of  $35 \mu\text{g}$  in the chamber), added to the chambers (basolateral side) were also assessed. Since continuous exposure to capsaicin leads to desensitization of  $I_{sc}$  responses,<sup>16</sup> a single concentration was tested in each preparation. Changes in  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) are expressed as the difference between the basal value before stimulation and the maximal response observed after treatment.

In some experiments, tissues were pretreated with tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  M), added to the basolateral side 10 min prior to any other treatment.

At the end of the experiments, a single concentration of carbachol (CCh;  $10^{-4}$  M) was added to the basolateral side of the chamber. CCh-induced  $I_{sc}$  changes served to assess the viability of the tissues.

All concentrations tested were selected based on preliminary studies and previously published data.

### **Epithelial Permeability Studies**

Permeability was assessed by measuring mucosal to basolateral fluxes of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextrans (FDs) with mean molecular weights of 4 kD and 40 kD (FD4 and FD40, respectively; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). FD40 was used as a marker of transcellular passage, whereas FD4 was used as a selective marker of paracellular permeation. After stabilization (15-25 min), baseline electrophysiological



parameters were assessed and FD4 or FD40 were added to the mucosal reservoir to a final concentration of  $2.5 \times 10^{-4}$  M and  $5 \times 10^{-5}$  M, respectively. Basolateral samples (250  $\mu$ l, replaced by 250  $\mu$ l of appropriate buffer solution) were taken at 15-min intervals during the following 60 min for measurement of FD4 or at 30-min intervals during the following 180 min for measurement of FD40. Concentration of fluorescein in the samples was determined by fluorometry (Infinite F200; Tecan, Crailsheim, Germany) with an excitation wavelength of 485 nm (20 nm band width) and an emission wavelength of 535 nm (25 nm band width), against a standard curve. Readings are expressed as a percentage (%) of the total amount of FD4 or FD40 added to the mucosal reservoir.

For the measurement of the effect of mast cell degranulation on paracellular permeability, FD4 fluxes were evaluated after the addition to the basolateral side of anti-rat IgE ( $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) or its vehicle (Phosphate-Buffered Saline, PBS). To evaluate the involvement of the ENS, some tissues were pretreated with TTX ( $10^{-6}$  M), added to the basolateral side 10 min prior to IgE or PBS addition.

As previously described for the studies with secretagogues, viability of the tissues at the end of the experiments was tested by assessing responses to CCh ( $10^{-4}$  M).

### **Histopathological and Morphometric Studies**

H&E-stained slices were evaluated in a blinded fashion by two independent investigators. A histological score based on the epithelial structure (0-3), presence of edema (0-3), presence of ulcerations (0-3), presence of inflammatory infiltrate (0-3), relative density of goblet cells (0-3) and relative thickness of the intestinal wall (0-3) was assigned to each animal (maximal score of 18).

The same samples were also used for morphometric studies in which the thickness of mucosa, submucosa and *muscularis externa* layers was measured. For this, digital images were acquired at X200 magnification (Axioskop 40 microscope, Zeiss equipped with a digital camera, Zeiss AxioCam MRm; Carl Zeiss, Jena, Germany) and were analyzed with an image analysis software (Zeiss Axiovision Release 4.8.1; Carl Zeiss). At least 15 random measurements per sample (from 2 slices) were used to obtain a mean

thickness value. All procedures were performed in a blinded manner on coded slides to avoid bias.

### **Rat Mast Cell Protease 2 (rMCP-2) Immunohistochemistry and Mucosal Mast Cells Count**

Immunodetection of rMCP-2 was carried out on jejunal sections following standard immunohistochemical procedures using a monoclonal antibody (MS-RM4, 1:500; Moredun Animal Health, Edinburgh, UK), as previously described by us.<sup>17</sup> Positively stained MMCs were counted in at least 20 well-oriented villus-crypt units (VCU) per animal, at X400 magnification, and expressed as MMCs per VCU. Cell counting was performed in a blinded manner on coded slides, to avoid bias.

### **Measurement of Rat Mast cell Protease-2 (rMCP-2) in Serum and Bathing Media**

To assess systemic levels of rMCP-2, trunk blood was collected at the time of euthanasia and serum obtained by centrifugation (15 min, 3500 rpm, 2465 xg, 4°C).

To assess direct release of rMCP-2 from jejunal MMCs, jejunal sheets from non-infected and *T. spiralis*-infected animals were mounted in Ussing chambers (as described above). After a 20 min incubation period, 300 µl of bathing media were obtained from the basolateral compartment.

Serum and bathing media samples were stored at -80 °C until analysis. Concentrations of rMCP-2 in serum and bathing solution were measured using a commercial ELISA kit (MS-RM2; Moredun Animal Health) following manufacturer's instructions. For this, while bathing media samples were not diluted, serum samples were diluted 1:250 in buffer (0.05% Tween 20 and 4% bovine serum albumin in PBS) and all samples were assayed in duplicates against a standard curve.

## Chemicals

5-HT, SP, capsaicin, CCh, concanavalin A type IV and compound 48/80 were acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). TTX was obtained from Latoxan (Valence, France). Anti-rat IgE was obtained from BD Pharmingen (Madrid, Spain). Stock solutions of 5-HT ( $10^{-1}$  M), SP ( $10^{-3}$  M), CCh ( $10^{-1}$  M), compound 48/80 ( $30 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and TTX ( $10^{-4}$  M) in distilled water were used. Stock solutions of concanavalin A type IV ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and capsaicin ( $10^{-3}$  M) were in sterile PBS and dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), respectively. In all cases, stock solutions were stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  and further dilutions were performed in distilled water. The maximal final concentration of DMSO in the Ussing chamber was 0.2%, which did not affect the electrophysiological parameters in control experiments.

## Statistical Analysis

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between two groups were performed using Student's unpaired *t*-test, with Welch's correction for samples with different variances, or using a nonparametric Mann Whitney test, as appropriate. Comparisons between multiple groups were performed using a one-way or two-way ANOVA, as appropriate; followed, when necessary, by a Bonferroni test. Correlation between parameters was assessed by linear regression and Pearson's analysis. In all cases, results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

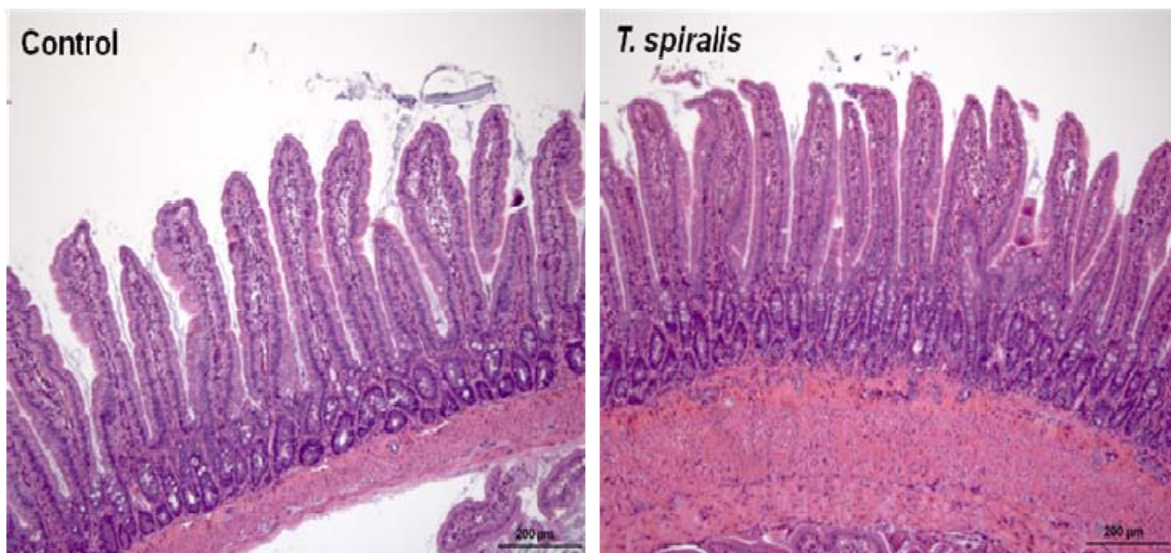
## Results

**Histological Changes after *T. spiralis* Infection.** At  $30 \pm 2$  days post-infection, the microscopic histological score was significantly increased in previously infected rats. This was due to changes in goblet cell density and intestinal wall thickness. Subsequent morphometric studies showed that the thickness of both the submucosal and *muscularis externa* layers was augmented in the postinfectious phase (Table 1 and Figure 1). Moreover, the length of the villi was reduced in previously infected animals, thus reducing mucosal thickness (Table 1 and Figure 1).

**Table 1. Histological changes in the jejunum after *Trichinella spiralis* infection (day 30±2 post-infection).**

		Control	Previously infected
Histological score	Epithelial structure (0-3)	0.25 ± 0.10	0.25 ± 0.10
	Edema (0-3)	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.06
	Ulcerations (0-3)	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
	Inflammatory infiltrate (0-3)	0.00 ± 0.00	0.31 ± 0.16
	Globet cell density (0-3)	0.31 ± 0.13	1.75 ± 0.25 **
	Intestinal wall thickening (0-3)	0.19 ± 0.13	1.63 ± 0.18 ***
	Total (0-18)	0.75 ± 0.29	4.13 ± 0.39 **
Thickness (µm)	Mucosa	570.5 ± 6.8	533.7 ± 11.7 *
	Submucosa	25.7 ± 1.5	32.6 ± 1.4 **
	<i>Muscularis externa</i>	112.1 ± 11.8	182.8 ± 12.6 **

Data are mean ± SEM from 7-8 animals per group. \*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01, \*\*\*: P < 0.001 vs. control.



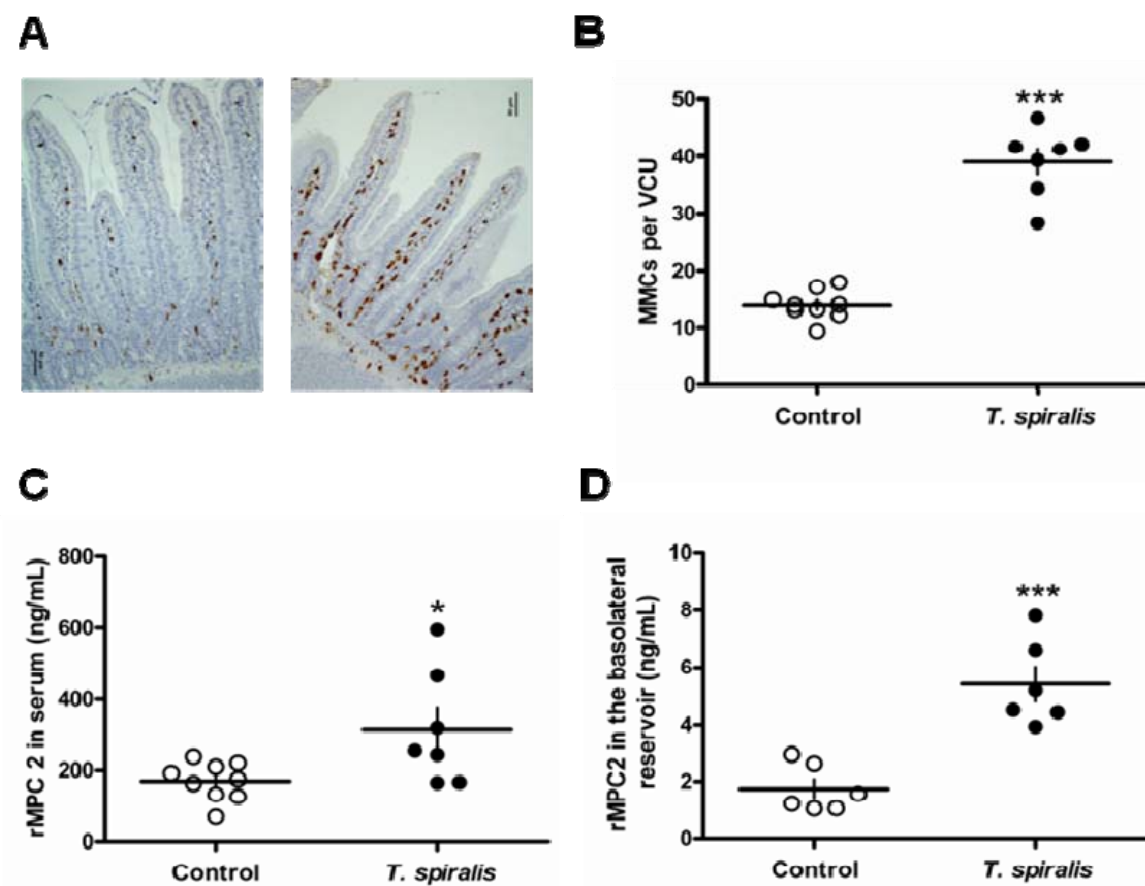
**Figure 1. Jejunal histology after *Trichinella spiralis* infection (day 30±2 post-infection).**

Representative microphotographs showing hematoxylin and eosin-stained jejunal slices from a control and a previously infected rat (*T. spiralis*) (X200 magnification). Notice the integrity of the epithelium, without evidence of any inflammatory infiltrate, and the thickening of the muscle layers in the tissue from the previously infected animal.

**Effects of *T. spiralis* infection on Mucosal Mast Cells Count and Rat Mast cell Protease 2 Levels.** Infection with *T. spiralis* was associated to a 2.8-fold increase in the number of MMCs in the mucosa and submucosa of the jejunum (Fig. 2A-B). Although with relatively high variability, serum levels of rMCP-2 increased by two-fold during the

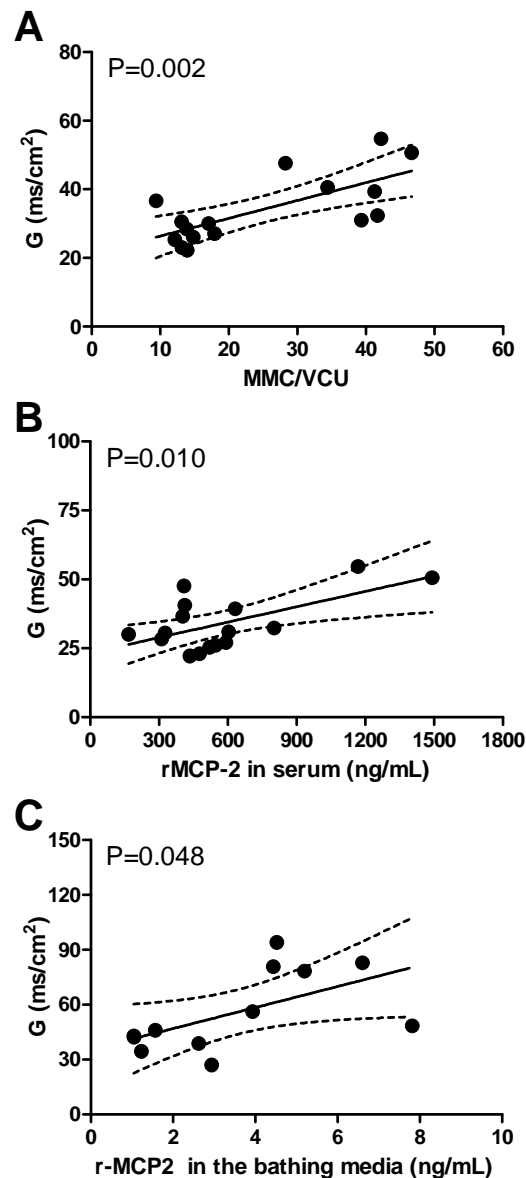
postinfectious phase ( $P < 0.05$  vs. control; Fig. 2C). There was a positive correlation between jejunal MMC counts and rMCP-2 levels in serum ( $r = 0.59$ ,  $P = 0.015$ ).

Local release of rMCP-2 in the jejunum was low in control conditions, as shown by levels detected in the basolateral reservoir of the Ussing chambers after a 20 min incubation period ( $1.7 \pm 0.3$  ng mL<sup>-1</sup>). In the same conditions, rMCP-2 release from tissues of previously infected animals was increased by 3-fold ( $5.4 \pm 0.6$  ng mL<sup>-1</sup>;  $P < 0.001$  vs. control; Fig. 2D).



**Figure 2. Jejunal mucosal mast cells and rat mast cell protease 2 (rMCP-2) release.** A: representative microphotographs showing rMCP-2 immunopositive cells (corresponding to mucosal mast cells, MMCs) in the jejunal mucosa and submucosa of a control and a previously infected rat (*T. spiralis*) (X400 magnification). B: Quantification of jejunal MMCs per villus-crypt unit (VCU). C: rMCP-2 concentration in serum of control and previously infected (*T. spiralis*) rats. In B and C, data correspond to 7-9 animals per group. D: rMCP-2 levels in the basolateral reservoir of the Ussing chamber after a 20 min incubation period of jejunal sheets from non-infected and previously infected (*T. spiralis*) animals. Data correspond to 6 intestinal sheets from 3 animals per group. In B, C and D, dots represent individual rats and the horizontal lines with errors indicate the mean  $\pm$  SEM. \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. control group.

**Effects of *T. spiralis* Infection and Mucosal Mast Cell Hyperplasia on Basal Electrophysiological Parameters.** At day  $30 \pm 2$  post-infection, basal Isc and G were increased, while a decrease in potential difference was observed (Table 2). Only electrical conductance correlated with the jejunal density of MMCs ( $r=0.71$ ;  $P=0.002$ ) and the concentration of rMCP-2 in serum ( $r=0.62$ ;  $P=0.010$ ) and in the bathing solution ( $r=0.58$ ;  $P=0.048$ ) (Fig. 3).



**Figure 3. Correlations between epithelial conductance (G) and levels of rat mast cell protease protease 2 (rMCP-2).** Graphs show correlation between G values and mucosal mast cells (MMCs) count (A) or rMCP-2 levels in serum (B) or the bathing media obtained from the Ussing chambers (C). Individual symbols correspond to values in a single animal (irrespective of the experimental group), solid lines represent the linear fitting and broken lines represent the 95% confidence interval.

None of the electrophysiological parameters assessed was affected by the addition of TTX to the basolateral side in either previously infected or control animals (Table 2)

**Table 2. Basal electrophysiological parameters in jejunal segments from non-infected and previously infected (*T. spiralis*) rats.**

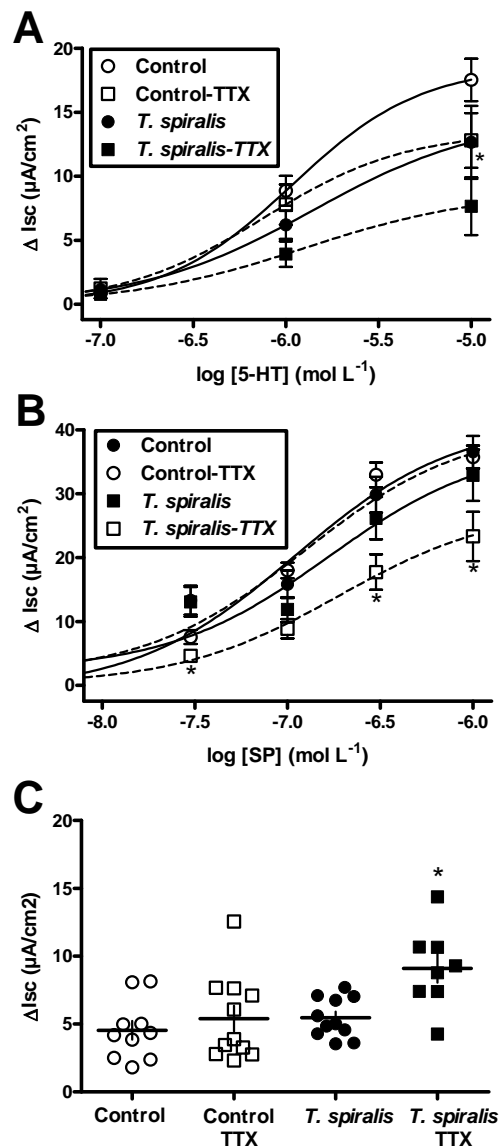
	Animals (number)	Jejunal Sheets (number)	Isc ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	PD (mV)	G ( $\text{ms cm}^{-2}$ )
Control	39-40	115-117	$32.3 \pm 1.5$	$-1.13 \pm 0.01$	$32.2 \pm 0.8$
Control + TTX	17-21	41-52	$30.4 \pm 2.2$	ND	$33.3 \pm 1.7$
Previously infected	39-41	113-121	$42.9 \pm 2.3$ ***	$-0.91 \pm 0.01$ ***	$52.8 \pm 2.1$ ***
Previously infected + TTX	19-21	44-47	$41.8 \pm 2.8$ *	ND	$54.3 \pm 3.2$ ***

Data are mean  $\pm$  SEM of the number of jejunal sheets indicated. \*:  $P < 0.05$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. respective control. G: Conductance; Isc: Short-circuit current; ND: Not determined; PD: Potential difference; TTX: tetrodotoxin.

**Effects of secretagogues on transepithelial ion transport.** Isc was significantly increased by basolateral application of 5-HT, SP, capsaicin or anti-rat IgE. Maximal changes in Isc were observed within the 5 min period after addition of any of these secretagogues.

In control conditions, 5-HT induced a concentration-related increase in Isc, with maximal effects at  $10^{-5}$  M (Fig. 4A). Higher concentrations led to a decrease in the responses observed (data not shown). In previously infected rats, 5-HT-induced Isc increases were attenuated when compared with those obtained in control conditions (Fig. 4A). Neuronal blockade with TTX reduced maximal responses to 5-HT by 28% and 40% in the control and infected groups, respectively, although no statistical significance was reached (Fig. 4A).

Increases in Isc produced by SP were concentration-dependent and similar in magnitude in control and infected groups (Fig. 4B). In control animals, SP-induced responses were unaffected by TTX. However, in tissues from previously infected rats, neuronal blockade with TTX resulted in a 65% and 30% reduction of SP-induced changes at low ( $3.3 \times 10^{-8}$  M) and high concentrations ( $3.3 \times 10^{-7}$  and  $10^{-6}$  M), respectively (Fig. 4B).



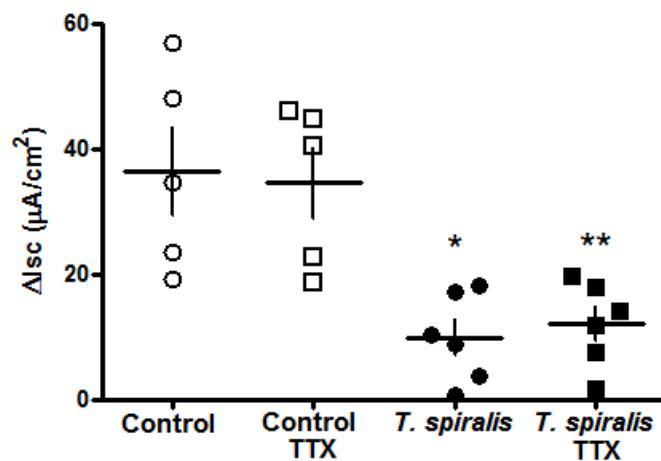
**Figure 4. Effects of secretagogues on epithelial short-circuit current (Isc).** A: Concentration-response curves for serotonin (5-HT), with and without incubation with tetrodotoxin (TTX). Data are mean $\pm$ SEM of 8-13 mucosal sheets from 7-10 animals per group. \*: P<0.05 vs. respective control. B: Concentration-response curves for substance p (SP), with and without incubation with tetrodotoxin (TTX). Data are mean $\pm$ SEM of 10 mucosal sheets from 5 animals per group. \*: P<0.05 vs. all other groups. C: Scatter plot diagram representing peak Isc increases evoked by capsaicin ( $2 \times 10^{-6}$  M). Dots represent individual responses from mucosal sheets; the horizontal lines with errors correspond to the mean $\pm$ SEM. Data correspond to 8-11 mucosal sheets from 5-11 animals per group. \*: P < 0.05 vs. all other groups.

Capsaicin ( $2 \times 10^{-6}$  M) evoked similar increases in Isc in control and previously infected animals (Fig. 4C). After neuronal blockade with TTX, responses to capsaicin were increased by 67% in the infected group, while remaining unaffected in control tissues (Fig. 4C). Lower concentrations ( $5 \times 10^{-8}$  M) had no effect.



Similar Isc increases were observed in control and previously infected animals after CCh challenge, regardless of TTX pretreatment (Control group:  $93.0 \pm 7.2 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; Control-TTX group:  $86.3 \pm 5.5 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; previously infected group:  $111.9 \pm 12.1 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; previously infected-TTX group:  $95.9 \pm 9.2 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; 32-37 mucosal sheets from 20-23 animals per group;  $P > 0.05$ ). Only occasionally (less than 10% of the preparations) tissues were discarded because of lack of response to CCh, as indicative of tissue damage.

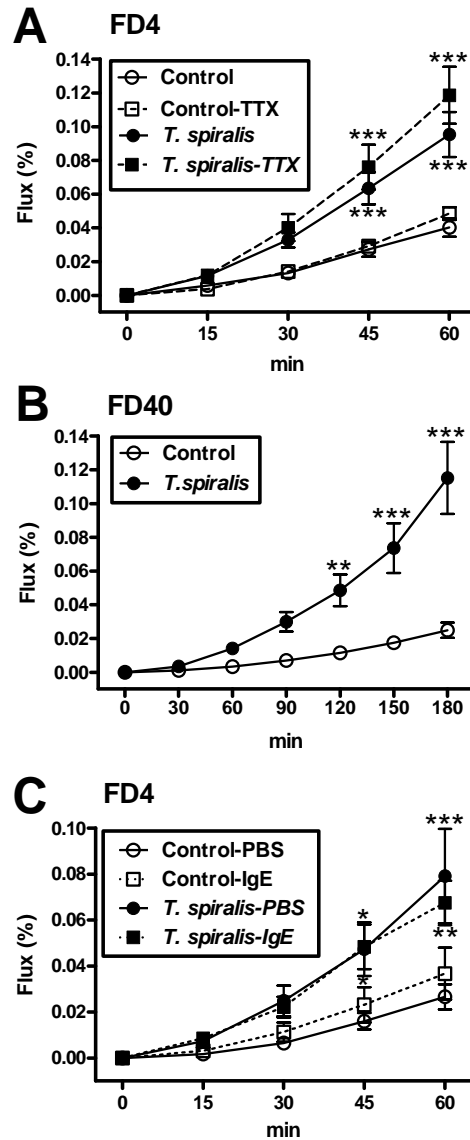
**Effects of mast cell degranulators on transepithelial ion transport and electrical conductance.** Activation of mast cells with anti-rat IgE resulted in a transitory increase in Isc. In control tissues, responses reached a maximum at 3-5 min post-IgE addition and values were back to pre-challenge levels by 10-15 min. Similar time-dependent responses were observed in the previously infected group, although peak Isc values were reduced by 70% when compared with controls (Fig. 5). Incubation with TTX did not affect IgE-induced changes in Isc, either in controls or previously infected animals (Fig. 5).



**Figure 5. Effects of mast cells degranulators on epithelial short-circuit current (Isc).** Scatter plot diagram representing Isc increases evoked by mouse anti-rat IgE ( $7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Dots represent individual responses from mucosal sheets; horizontal lines with errors are mean  $\pm$  SEM. Data correspond to 5-6 mucosal sheets from 5-6 animals per group. \*, \*\*:  $P < 0.05$  or  $0.01$  vs. respective control group.

Neither compound 48/80 nor concanavalin A type IV affected basal electrogenic ion transport. None of the mast cell degranulators tested had any effect on electrical

conductance during the following hour of their addition to the basolateral side (data not shown).



**Figure 6. Transepithelial passage of fluorescent tracers: Effects of neuronal blockade and mast cell degranulation.** A: Mucosal to basolateral passage (as percentage of the amount added to the mucosal reservoir) of fluorescein isothiocyanate-dextran 4kD (FD4) in control and previously infected (*T. spiralis*) animals, in presence or absence of tetrodotoxin (TTX). B: Mucosal to basolateral passage of fluorescein isothiocyanate-dextran 40kD (FD40) in control and previously infected (*T. spiralis*) groups. C: Effects of anti-rat IgE ( $7\mu\text{g mL}^{-1}$ ) on mucosal to basolateral passage of FD4 in jejunal sheets from control and previously infected (*T. spiralis*) rats. Data are mean $\pm$ SEM of 6-12 mucosal sheets from 5-12 animals per group. \*, \*\*, \*\*\*:  $P < 0.05$ ,  $0.01$  or  $0.001$  vs. respective control groups.

**Mucosal permeability to fluorescent tracers after *T. spiralis* infection: Influence of mast cell degranulation and neuronal blockade.** Mucosal to basolateral passage of fluorescent tracers across jejunal segments was time- and size-dependent. Permeability to low- (4 KD, FD4) and high- (40 KD, FD40) molecular weight markers was significantly increased in the jejunum of previously infected animals when compared with jejunal samples from control rats (Figs. 6A and 6B).

Neither TTX nor IgE addition to the basolateral side affected paracellular permeability, assessed by measurement of transepithelial FD4 flux, in the control or previously infected groups (Figs. 6A and 6C).

At the end of the permeability assays, CCh addition evoked similar Isc increases in both groups (Control:  $85.7 \pm 9.9 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; previously infected:  $120.6 \pm 21.6 \mu\text{A cm}^{-2}$ ; 19-21 mucosal sheets from 17 animals per group;  $P > 0.05$ ), thus confirming the viability of the tissues.

## Discussion

The present study shows persistent alterations in jejunal EBF in late stages in a model of MMC-dependent postinfectious gut dysfunction in rats. Changes observed suggest the presence of a neuro-immune-epithelial remodeling leading to long-lasting alterations in secretory functions and permeability. Similar adaptations could be of pathophysiological relevance in human postinfectious functional gastrointestinal disorders.

Histological studies revealed jejunal microscopic alterations (increased MMC number, goblet cell hyperplasia, villi shortening and hypertrophy of the external muscle layers) associated with the postinfectious phase of *T. spiralis* infection in the rat (day  $30 \pm 2$  post-infection), in concordance with previous studies using this model in rats and mice.<sup>15,18,19</sup> Overall, these changes suggest a low grade inflammation-like state, reminiscent of findings described in functional intestinal diseases, such as IBS, and particularly in those patients who developed the disease after suffering an intestinal infection.<sup>10,12</sup>

In addition, Ussing chamber studies performed to evaluate this postinfectious phase demonstrated EBF disruptions which resemble to a certain extent findings in gastrointestinal disorders patients.<sup>20,21,22,23</sup> In particular, alterations in electrical conductance and passage of fluorescent tracers revealed a significant jejunal permeability defect during the postinfectious phase in the rat. This could be associated with alterations in both paracellular and transcellular routes across the epithelium and/or with severe defects in the apical junction complex. Moreover, the rise of the basal Isc observed in previously infected rats is indicative of increased net electrogenic ion transport to the luminal side suggesting an increased basal intestinal secretion. However, this must be interpreted with caution since we can not discern from the present experiments if alterations in intestinal absorption could be associated with the postinfectious phase conditioning Isc values. These functional changes are likely to reflect epithelial alterations, rather than altered neurally-mediated responses, since they were not affected by TTX. Our results differ from previous reports where Isc was not affected during the postinfectious phase of *T. spiralis* infection in mice and ferrets.<sup>3,5</sup> However, species-related differences and the limited number of samples analyzed in these studies might explain this apparent discrepancy.

The practical significance of the barrier function changes described in basal conditions in the postinfectious phase of this model and in patients with functional gastrointestinal disorders is not clear. Increased permeability and net ion movement toward the epithelial basolateral side might represent a defensive mechanism, inducing water transport to the intestinal lumen. In essence, flushing the intestinal lumen would restrict antigens and microorganisms invasion of the mucosa and the development of subsequent local immune responses and inflammatory states.<sup>6,7,8</sup> For instance, preliminary results obtained in our laboratory showed altered bacterial wall adherence during intestinal inflammation in a different experimental model.<sup>24</sup> We suggest that enhanced movement of water to the lumen during the postinfectious phase might represent a protective mechanism, making difficult bacterial wall adherence and translocation and thus modulating immune responses within the gut. However, this remains to be demonstrated. On the other hand, long-lasting perpetuation of these alterations could also induce adverse effects on mucosal homeostasis. In this regard, it is

interesting to note that basal PD was reduced in the jejunum of previously infected rats, consistent with previous studies in chronic inflammation,<sup>25</sup> which would be expected to result in Isc inhibition. However, this was not the case because of the conductance defect, which is a prominent feature in this model. Overall, active ion transport mechanisms appear to be downregulated but result in a heightened state of net movement of ions and water to the lumen due to increased leakiness of the epithelium.

Several studies suggest that remodeling of neural secretomotor pathways might occur during functional and inflammatory states, leading to persistent alterations in EBF and contributing to their chronification. Responses to 5-HT were reduced in infected animals, suggesting an alteration in serotonin-dependent signaling. However, TTX affected in a similar proportion the responses to 5-HT in either infected or non-infected animals. In normal conditions, serotonin-induced electrogenic responses result from a combination of neurally-mediated and direct effects on epithelial cells.<sup>26</sup> Therefore, similar effects of TTX in both animal groups suggest that alterations in 5-HT-elicited Isc changes observed in previously infected rats are likely due to an altered epithelial function with maintenance of the related neural pathways. Nevertheless, changes in TTX-independent mechanisms cannot be ruled out from these observations. Reduced secretory responses to 5-HT might be associated to desensitization mechanisms at the level of the enterocyte. These mechanisms would compensate increased availability of 5-HT within the mucosa, as described in *T. spiralis*-infected mice and in IBS patients.<sup>26,27</sup>

On the other hand, responses to SP were similar in non-infected and infected tissues and were affected (reduced) by TTX only in previously infected animals. This agrees with specific changes in SP-mediated ion transport during colitis in the rat and with the modulation of SP-containing nerves and tachikynin receptor expression during *T. spiralis*-infection.<sup>9,13</sup> The present observations point that changes in the SP-mediated signalling linger after acute inflammation and might represent a long-lasting remodelling of the intestinal secretomotor circuitry. Similarly, capsaicin-elicited secretory responses were only affected by TTX in tissues from previously infected animals, where a post-TTX enhanced response to capsaicin was observed. In particular, increased responses observed after neuronal blockade suggest a specific modulation of capsaicin-stimulated inhibitory neural pathways during the postinfectious state.<sup>28</sup> Indeed, enhanced

capsaicin-mediated post-TTX responses might result from the blockade of an increased tonic ENS-driven inhibition associated to the low degree of inflammation that characterized the postinfectious state. It is interesting to note that these responses are not characteristic of low grade inflammatory states such that observed in previously infected animals and may have relevant mechanistic implications. Overall, these data provide evidence of a selective, long-lasting neuronal remodeling within the enteric secretomotor pathways underlying EBF alterations observed during postinfectious states.

As previously mentioned, MMCs seem to be active components in the pathophysiology of functional gastrointestinal disorders.<sup>10,11</sup> In the present experiments, persistent MMC infiltration and increased tonic activity, as showed by enhanced rMCP-2 levels in serum and *in vitro*, are likely to participate in EBF functional changes. MMC-derived mediators modulate EBF either by direct effects on the enterocytes or by modulation of neuronal mechanisms, as suggested from studies in IBS patients.<sup>1</sup> We previously showed that MMC stabilization normalizes motor responses in *T. spiralis*-infected rats, thus confirming a role for these cells in the functional alterations that characterize this model.<sup>4</sup> In the present study, to further assess the role of MMCs, in particular as EBF relates, we chose to elicit MMC degranulation. While concanavalin A and compound 48/80 addition did not have any effect on mucosal electrophysiological parameters, probably due to lack of specificity,<sup>29,30</sup> MMC mediators release induced by specific IgEs resulted in changes in epithelial ion transport but not in permeability. Interestingly, the IgE-induced responses in *Isc* were attenuated in previously infected animals (see Fig. 5). This, together with the increased tonic activity of MMCs, might suggest the presence of desensitization mechanisms to MMC mediators, as previously described in patients of gastrointestinal disorders associated with mastocytosis.<sup>29</sup> Alternatively, reduced secretory responses to MMC mediators, together with the alterations in epithelial and neural responses discussed previously, might represent the interplay of feed-back regulatory mechanisms aiming to minimize a state of continuous epithelial overstimulation. Finally, the absence of effects of IgEs on paracellular permeability suggests that a more prolonged exposure to MMC mediators may be necessary to alter the paracellular and the transcellular routes. Alternatively, this might

suggest that permeability is already maximally affected (increased) during the postinfectious state, due to the tonic effect of MMC mediators. In this sense, MMC mediators could stimulate recruitment of additional mast cells and led to a sustained intestinal MMC infiltrate and mediators release, contributing to persistent functional changes described here and in human intestinal disorders.<sup>10,11,12,31,32,33</sup>

In summary, we show long-lasting neuro-epithelial alterations in a model of postinfectious gut dysfunction in rats, leading to altered epithelial secretion and permeability. The presence of a persistent infiltrate of tonically active MMCs as the major sign of an active on-going low grade inflammation might represent the underlying mechanism contributing to a neuro-epithelial remodeling as the basis for the EBF alterations observed. Interestingly, functional gastrointestinal diseases, such as IBS, are characterized by a similar persistent, tonically active, MMC infiltrate and EBF alterations.<sup>34</sup> All together, these observations lead to the hypothesis that a sustained process of recruitment-activation of mast cells within the intestine might represent a key step in the pathophysiology of functional and more specifically in postinfectious disorders in the gut.





## **Acknowledgements and disclosures**

A. Acosta, E. Martínez , F. Jardí and I. Romero are thanked for their assistance. This study was supported by grants 2005SGR-00255 and 2009SGR708 from the Generalitat de Catalunya, BFU 2007-62794 from *Ministerio de Educación y Ciencia* and BFU2009-08229, BFU2010-15401 and SAF2008-01432 from *Ministerio de Ciencia e Innovación*. J.A. F.-B. personal support: FPU program (AP2007–01619) from *Ministerio de Ciencia e Innovación*.

J.A. F.-B. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. S. B. participated in the experiments. F. S. de M. participated in the discussion of the results. V. M. designed and performed experiments and wrote the paper. P.V. designed experiments and wrote the paper.

## **Competing interests**

The authors have no competing interests.



## References

1. Keita AV and Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 718-733.
2. Bercik P, Wang L, Verdu EF, Mao YK, Blennerhassett P, Khan WI, Kean I, Tougas G, Collins SM. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterology* 2004; 127: 179-187.
3. Kalia N, Hardcastle J, Keating C, Grasa L, Keating C, Pelegrin P, Bardhan KD, Grundy D. Intestinal secretory and absorptive function in *Trichinella spiralis* mouse model of postinfective gut dysfunction: role of bile acids. *Gut* 2008; 57: 41-49.
4. Serna H, Porras M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9 H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1104-1111.
5. Venkova K and van Greenwood MB. Long-lasting changes in small intestinal transport following the recovery from *Trichinella spiralis* infection. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 234-242.
6. Barrett KE and Keely SJ. Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 535-572.
7. Natividad JM, Huang X, Slack E, Jury J, Sanz Y, David C, Denou E, Yang P, Murray J, McCoy KD, Verdú EF. Host responses to intestinal microbial antigens in gluten-sensitive mice. *PLoS One* 2009; 4: e6472.
8. Murray M, Jarrett WF, Jennings FW. Mast cells and macromolecular leak in intestinal immunological reactions. The influence of sex of rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 1971; 21: 17-31.
9. Appleyard CB, Morales M, Santiago C. Chronic inflammation alters the contribution of neurokinin receptor subtypes to epithelial function in rat colon. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 220-228.
10. Barbara G, Stanghellini V, De GR, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 693-702.
11. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, De GR, Cremon C, Di NG, Trevisani M, Campi B, Geppetti P, Tonini M, Bunnett NW, Grundy D, Corinaldesi R. Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 26-37.
12. Wang LH, Fang XC, Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; 53: 1096-1101.

13. De Giorgio R., Barbara G, Blennerhassett P, Wang L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Collins SM, Tougas G. Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 2001; 49: 822-827.
14. Castro GA and Fairbairn D. Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol* 1969; 55: 51-58.
15. Torrents D and Vergara P. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G543-G551.
16. Vanner S and MacNaughton WK. Capsaicin-sensitive afferent nerves activate submucosal secretomotor neurons in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 1995; 269: G203-G209.
17. Saavedra Y and Vergara P. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 112-122.
18. Knight PA, Brown JK, Pemberton AD. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology* 2008; 135: 655-670.
19. Lawrence CE, Paterson YY, Wright SH, Knight PA, Miller HR. Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterology* 2004; 127: 155-165.
20. Edmonds CJ and Pilcher D. Electrical potential difference and sodium and potassium fluxes across rectal mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 1973; 14: 784-789.
21. Pienkowski P, Fioramonti J, Frexinos J. Rectal potential differences in irritable bowel syndrome and in inflammatory bowel diseases in man. *J Intern Med* 1989; 226: 423-427.
22. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, Sjobahl R. Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 1999; 117: 65-72.
23. Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP, Hebden JM, Wright T, Skinner M, Neal KR. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; 47: 804-811.
24. Aguilera M, Terán E, Vergara P, Martínez V. Gut commensal microbiota and bacterial wall adherence are altered during indomethacin-induced acute enteritis in rat. *Gut* 2010; 59 (Suppl III): A49-A50.
25. Martinez-Augustin O, Romero-Calvo I, Suarez MD, Zarzuelo A, de Medina FS. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 114-127.

26. Hansen MB and Witte AB. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 193: 311-323.
27. Wheatcroft J, Wakelin D, Smith A, Mahoney CR, Mawe G, Spiller R. Enterochromaffin cell hyperplasia and decreased serotonin transporter in a mouse model of postinfectious bowel dysfunction. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 863-870.
28. Szolcsanyi J and Bartho L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J Physiol Paris* 2001; 95: 181-188.
29. Crowe SE, Luthra GK, Perdue MH. Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; 41: 785-792.
30. Oliver MR, Tan DT, Scott RB. Colonic motor response to IgE-mediated mast cell degranulation in the Hooded-Lister rat. *Neurogastroenterol Motil* 1996; 8: 121-130.
31. Dunlop SP, Jenkins D, Spiller RC. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1578-1583.
32. Marshall JS. Repeated antigen challenge in rats induces a mucosal mast cell hyperplasia. *Gastroenterology* 1993; 105: 391-398.
33. Rijniere A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther* 2007; 116: 207-235.
34. Guilarte M, Santos J, de T, I, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Martinez C, Casellas F, Saperas E, Malagelada JR. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut* 2007; 56: 203-209.



## CAPÍTULO 2

### PAR-2-MEDIATED CONTROL OF BARRIER FUNCTION AND MOTILITY DIFFERS BETWEEN EARLY AND LATE PHASES OF POSTINFECTIOUS GUT DYSFUNCTION IN THE RAT

J. A. Fernández-Blanco, M.D. Hollenberg, V. Martínez and P. Vergara

*Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Veterinary School (JAF-B, VM, PV) and School of Biosciences (VM); Instituto de Neurociencias (VM, PV), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Department of Physiology & Pharmacology and Department of Medicine, Faculty of Medicine, University of Calgary, Alberta, Canada (MDH). Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (VM, PV).*

**Running head:** Postinfectious PAR-2-associated intestinal dysfunction

**Keywords:** Functional gastrointestinal disorders, mast cell, irritable bowel syndrome, proteinase-activated receptors, tryptase





## Abstract

**Introduction:** Proteinase-activated receptor 2 (PAR-2) and mast cell (MC) mediators contribute to inflammatory and functional gastrointestinal disorders. **Aim:** To characterize PAR-2-mediated responses and the potential MC involvement in the early and late phases of a rat model of postinfectious gut dysfunction. **Methods:** Jejunal tissues of control and *Trichinella spiralis*-infected (14 and 30 days postinfection) rats, treated or not with the MC stabilizer ketotifen, were used. Histopathological and immunostaining techniques were used to characterize inflammation, PAR-2 expression and mucosal and connective tissue MCs. Epithelial barrier function (EBF; hydroelectrolytic transport and permeability) and motility were assessed *in vitro* in basal conditions and after PAR-2 activation. **Results:** Intestinal inflammation observed on day 14 postinfection (early phase) was significantly reverted by day 30 (late phase), although MCs counts and epithelial permeability remained increased. PAR-2-mediated ion transport and PAR-2 expression on the epithelial surface were reduced in the early phase, with a trend towards normalization during the late phase. In control conditions, PAR-2 activation induced biphasic motor responses (relaxation followed by excitation). At 14 days postinfection, spontaneous contractibility and PAR-2-mediated relaxations were enhanced; motor responses were normalized on day 30. Postinfectious changes in PAR-2 functions were not affected by ketotifen treatment. **Conclusions:** In the rat model of *T. spiralis* infection, alterations of intestinal PAR-2 function and expression depend upon the phase considered. Lack of effects of ketotifen suggests no interplay between MCs and PAR-2 mediating motility and ion transport alterations. These observations question the role of MC mediators in PAR-2 modulation during postinfectious gut dysfunction.



## Introduction

It is well known that proteinases act as signalling molecules by cleaving the proteinase-activated receptor (PAR) family members (PAR-1, -2, -3 and -4). In particular, PAR-2 can be activated by endogenous and exogenous proteinases, including mast cell (MC)-derived tryptase and bacterial and parasite proteinases. Within the gut, PAR-2 activation has been shown to modulate nociception, permeability, motility and ion transport.<sup>1,2</sup> Accordingly, PAR-2 and its activating proteinases have been suggested to participate in intestinal diseases characterized by sensory and secretomotor alterations, such as irritable bowel syndrome (IBS) and inflammatory bowel disease (IBD). This idea was further reinforced when changes in the expression of PAR-2 and its agonists were reported in IBD and IBS patients.<sup>3-7</sup> However, the mechanisms underlying these expression changes and their functional significance are still far to be completely understood.

MCs have been suggested as effector cells in the functional alterations observed in several gastrointestinal disorders, including IBS or intestinal inflammation.<sup>8</sup> Since MCs release a variety of proteinases upon activation and degranulation, a link between MCs and PAR-2 has been suggested. Indeed, several evidences indicate that MC-derived proteinases can act as local activators of PAR-2, leading to PAR-2-mediated functional responses.<sup>2,9-11</sup>

The aim of the present work was to further investigate the interplay between PAR-2 and MCs during intestinal inflammation and dysfunction. With this purpose, we used *Trichinella spiralis*-infected rats, a validated model of MC-associated enteritis and gut dysfunction that is regarded as a valid model of IBS.<sup>12-15</sup> We studied how intestinal function was affected in basal conditions and after PAR-2 activation in the early and the late postinfectious phases. In particular, spontaneous and PAR-2-mediated intestinal hydroelectrolytic transport, paracellular permeability and contractility were assessed *in vitro*. Thereafter, PAR-2 immunostaining was performed to elucidate if functional changes observed were related to alterations in the receptor expression. In addition, we studied intestinal mucosal and connective tissue MC populations, which express proteinases able to modulate intestinal functions and to activate PAR-2.<sup>1,11,16</sup> Finally, to

directly assess a potential role of MC-derived proteinases in postinfectious gut dysfunction, the influence of MC stabilization along the course of infection on epithelial barrier function and contractility was assessed.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Adult male OFA Sprague-Dawley rats (7-8 weeks old, 250-275 g; Charles River Laboratories, Lyon, France) were used. Rats were housed under conventional conditions in a light (12h/12h light-dark cycle) and temperature controlled (20-22 °C) room, with access to tap water and laboratory rat chow *ad libitum*. Animals were kept in groups of two to three per cage, except otherwise stated. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and the *Generalitat de Catalunya* (protocols 5352 and 5564).

### ***Trichinella spiralis* Infection**

Muscle-stage larvae of *T. spiralis* were obtained from infected CD1 mice as previously described.<sup>13,14,17</sup> Rats were infected at 8-9 weeks of age by administration of 7.500 *T. spiralis* larvae suspended in 1 ml of saline by oral gavage and studies were performed on days 14 and 30 postinfection. Age-matched rats dosed orally with 1 ml of saline were used as controls. During this time, animals were regularly monitored for clinical signs and body weight changes. Normal course of the infection was confirmed by a significant decrease of body weight after *T. spiralis* infection compared with controls, with a peak reduction on day 9 and a subsequent linear increase over time, as previously described by us.<sup>12,14</sup>

### **Ketotifen Treatment**

For the stabilization of mast cells, ketotifen was added to the drinking water. The compound was dissolved in water at an initial concentration of 0.1 mg/ml, allowing an estimated dosage of 10 mg/kg/day (taking a mean water consumption of 30 ml/day). During the treatment period, animals were housed individually and the amount of water drunk by each rat was monitored daily and the concentration of ketotifen adjusted to ensure the desired dosage. Ketotifen solutions were freshly prepared every two days.

### **Tissue Sampling**

At the time of the experiments, animals were euthanatized by decapitation, a laparotomy was performed and jejunal samples (beginning 10 cm distal to the ligament of Treitz) were excised. For functional studies (motility and barrier function), jejunal segments were immediately flushed and placed in ice cold oxygenated Krebs buffer containing glucose. At the same time, jejunal samples for histological and immunostaining studies were obtained and fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 24 h. Thereafter, fixed samples were processed routinely for paraffin embedding and 5 µm sections were obtained for H&E staining, rat mast cell proteinase 2 (rMCP-2) chymase or rat mast cell proteinase-6 (rMCP-6) tryptase immunohistochemistry or PAR-2 immunofluorescence.

### **Histopathological Studies**

H&E-stained slides were evaluated in a blinded fashion by two independent investigators. A histological score based on the epithelial structure (0-3), presence of edema (0-3), presence of ulcerations (0-3), presence of inflammatory infiltrate (0-3), relative density of goblet cells (0-3) and relative thickness of the intestinal wall (0-3) was assigned to each animal (maximal score of 18).

### **Immunohistochemistry for Rat Mast Cell Proteinase 2 (rMCP-2) Chymase and Mucosal Mast Cells (MMCs) Count**

Immunodetection of rMCP-2 was carried out on jejunal sections following standard immunohistochemical procedures using a monoclonal antibody (MS-RM4, 1:500; Moredun Animal Health, Edinburgh, UK), as previously described by us.<sup>12</sup> Positively stained MMCs were counted in at least 20 well-oriented villus-crypt units (VCU) per animal, at X400 magnification, and expressed as MMCs per VCU. Cell counting was performed in a blinded manner on coded slides, to avoid bias.

### **Immunohistochemistry for Rat Mast Cell Proteinase 6 (rMCP-6) Tryptase and Connective Tissue Mast Cells (CTMCs) Count**

Paraformaldehyde-fixed jejunal sections were rehydrated and microwave antigen retrieval was performed (10mM Tris Base, 1mM EDTA Solution, 0.05% Tween 20, pH 9.0; 2 cycles of 5 min, 800W). After inhibition of endogenous peroxidases with 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 40 min and incubation in rabbit serum for 1h at room temperature, sections were incubated with goat anti-mast cell tryptase antibody (sc-32473; Santa Cruz Biotechnology; overnight, 4°C, 1:50), followed by biotinylated rabbit anti-goat IgG (sc-2774; Santa Cruz Biotechnology; 1h, room temperature, 1:200) and detection was performed with an avidin/peroxidase kit (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Antigen-antibody complexes were revealed using 3-3' diaminobenzidine (SK-4100 DAB; Vector Laboratories). Specificity of the staining was confirmed by omission of the primary antibody. Sections were counterstained with haematoxylin and the total number of positively stained CTMCs in the serosa, muscle and submucosa areas was determined in two complete tissue sections of the jejunum for each animal, at X600 magnification. Cell counting was normalized for the surface area of submucosa, *muscularis externa* and serosa layers, as evaluated in digital images (Axioskop 40 microscope, Zeiss equipped with a digital camera, Zeiss AxioCam MRm; image analysis software: Zeiss Axiovision Release 4.8.1; Carl Zeiss, Jena, Germany). Analysis of all data was performed in a blinded manner to avoid observer's bias.

## **Proteinase-Activated Receptor-2 (PAR-2) Expression: Immunofluorescent Staining and Analysis**

Paraformaldehyde-fixed jejunal sections were rehydrated and microwave antigen retrieval was performed (Citrate buffer, 10mM, pH 6; 2 cycles of 5 min, 800W). After blockade with 10% goat serum for 40 min at room temperature, the slides were incubated with rabbit anti-PAR-2 antibody (overnight, 4°C, 1:750; antibody A5, M.D. Hollenberg; <sup>18,19</sup>). Expression of PAR-2 was visualized using a Cy3-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (1h, room temperature, 1:250; PA43004, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The slides were cover-slipped and at least 16 representative photographs (original magnification X1000) were taken per animal with a Zeiss Axioskop 40 microscope equipped with a digital camera (Zeiss AxioCam MRm). The mean intensity of staining per square micrometer was measured employing the software ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, USA). Changes in PAR-2 expression induced after *T. spiralis* infection were expressed as a percentage of the mean fluorescent intensity detected in the slides from the control group processed simultaneously. Specificity of the staining was confirmed by omission of the primary antibody. Analysis of all data was performed in a blinded manner to avoid observer's bias.

## **Ussing Chambers Studies**

### *Measurement of Electrophysiological Parameters*

Electrophysiological parameters were measured in jejunal segments stripped of the outer muscle layers and myenteric plexus in Ussing chambers, as previously described by us. <sup>12</sup> Tissues were bathed bilaterally with 5ml of 37 °C oxygenated Krebs buffer. The basolateral buffer contained 10 mM glucose, osmotically balanced with 10 mM mannitol in the apical buffer. Agar-salt bridges and electrodes were used to monitor potential difference (PD) and to inject the required short-circuit current (Isc) to maintain a zero PD. A voltage step of 1mV was applied every 5 min and the change in Isc was used to calculate tissue conductance (G) by Ohm's law. Tissues were allowed to stabilize for 15-25 min before baseline values were recorded. Data were digitized with an analog-to-

digital converter and measurements were recorded and analyzed with Acqknowledge computer software. I<sub>sc</sub> and G were normalized for the exposed surface area (0.67 cm<sup>2</sup>).

#### *Electrical Responses to PAR-2 Activation*

Changes in I<sub>sc</sub> ( $\Delta I_{sc}$ ) in response to a single concentration of the PAR-2 activating peptide SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $3 \cdot 10^{-5}$  M; basolateral or apical addition) were assessed in control conditions and after *T. spiralis* infection. In addition,  $\Delta I_{sc}$  in response to increasing concentrations of SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $10^{-6}$ - $3 \cdot 10^{-5}$  M, 10 min interval between consecutive doses) added to the Ussing chamber (basolateral side) in a cumulative manner were studied. Some tissues were challenged with the control inactive reverse peptide LRGILS-NH<sub>2</sub> ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) to assess specificity of the responses observed. In some experiments, to evaluate the involvement of the ENS, tissues were pretreated with tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  M), added to the basolateral side 10 min prior to SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $3 \cdot 10^{-5}$  M) addition. At the end of the experiments, a single dose of carbachol (CCh,  $10^{-4}$  M) was added to the basolateral side of the chamber. CCh-induced I<sub>sc</sub> changes served to assess the viability of the tissues.  $\Delta I_{sc}$  are expressed as the difference between the basal value before stimulation and the maximal response observed after treatment. All concentrations tested were selected based on preliminary studies and previously published data.

#### *Assessment of Epithelial Permeability*

Paracellular permeability was assessed by measuring mucosal to basolateral flux of fluorescein isothiocyanate-labeled dextran with an average molecular weight of 4kD (FD4; Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously described.<sup>12</sup> After stabilization, FD4 was added to the mucosal reservoir to a final concentration of  $2.5 \times 10^{-4}$  M. Basolateral samples (250  $\mu$ l, replaced by 250  $\mu$ l of appropriate buffer solution) were taken for subsequent fluorescence measurement against a standard curve. Readings are expressed as a percentage (%) of the total amount of FD4 added to the mucosal reservoir. FD4 fluxes were evaluated after the addition of SLIGRL-NH<sub>2</sub> or LRGILS-NH<sub>2</sub> ( $3 \times 10^{-5}$  M, basolateral or apical side) or trypsin (800 IU/mL, apical side). Ethylene glycol



tetraacetic acid (EGTA;  $8 \times 10^{-3}$  M), added simultaneously to each side of the Ussing chambers, was used as a positive control for induced enhanced permeability.<sup>20</sup> Viability of the tissues was tested at the end of the permeability experiments by assessing responses to CCh ( $10^{-4}$  M, basolateral side).

Tissues with abnormal baseline values of electrophysiological parameters (Isc, G and PD) or with lack of response to CCh were considered damaged and were excluded. Overall, these represented less than 5% of the preparations tested.

### **Contractile Responses *in Vitro***

Full thickness preparations of the jejunum were cut 1 cm long and hung for organ bath studies, oriented to record longitudinal muscle activity. Strips were mounted under 1 g tension in a 10 mL organ bath containing 37 °C oxygenated Krebs buffer with glucose. One strip edge was tied to the bottom of the muscle bath and the other one to an isometric force transducer (Harvard VF-1 Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA) using silk 2/0 suture. Output from the transducer was fed to a PC through an amplifier. Data were digitalized using Data 2001 software (Panlab, Barcelona, Spain). Strips were allowed to equilibrate for about 1h. To determine the spontaneous contractile activity, the preparation tone was measured for 5 minutes and the area under the curve (AUC) measured (in g). After this, maximal contractile responses to the PAR-2-activating peptide SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $6 \times 10^{-5}$  M) were assessed. Thereafter, bath solution was replaced, tissues were allowed to reequilibrate (20 min) and then maximal changes in contractility induced by CCh ( $10^{-4}$  M) were determined. In some experiments, contractile responses were studied in the presence of TTX ( $10^{-6}$  M), added to the bath 30 min before addition of SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $6 \times 10^{-5}$  M). In some experiments, the PAR-2 reverse peptide LRGILS-NH<sub>2</sub> ( $6 \times 10^{-5}$  M) was also tested.

## Solutions and drugs

The composition of the Krebs buffer was (in mM): 10 glucose or mannitol; 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO<sub>3</sub>; 4.61 KCl; 1.14 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2.50 CaCl<sub>2</sub>; 1.16 MgSO<sub>4</sub> (pH: 7.3-7.4).

SLIGRL-NH<sub>2</sub> and LRGILS-NH<sub>2</sub> were obtained from Bachem (Essex, UK). Ketotifen fumarate salt, EGTA, trypsin and CCh were acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). TTX was obtained from Latoxan (Valence, France). Stock solutions of SLIGRL-NH<sub>2</sub> (10<sup>-2</sup> M), LRGILS-NH<sub>2</sub> (10<sup>-2</sup> M), CCh (10<sup>-1</sup> M) and TTX (10<sup>-4</sup> M) in distilled water were used. Stock solutions of EGTA (1 M) and trypsin (80,000 IU mL<sup>-1</sup>) were made up in NaOH 3 N and saline containing ascorbic acid (pH 5), respectively. In all cases, stock solutions were stored at -30 °C and further dilutions were performed in distilled water.

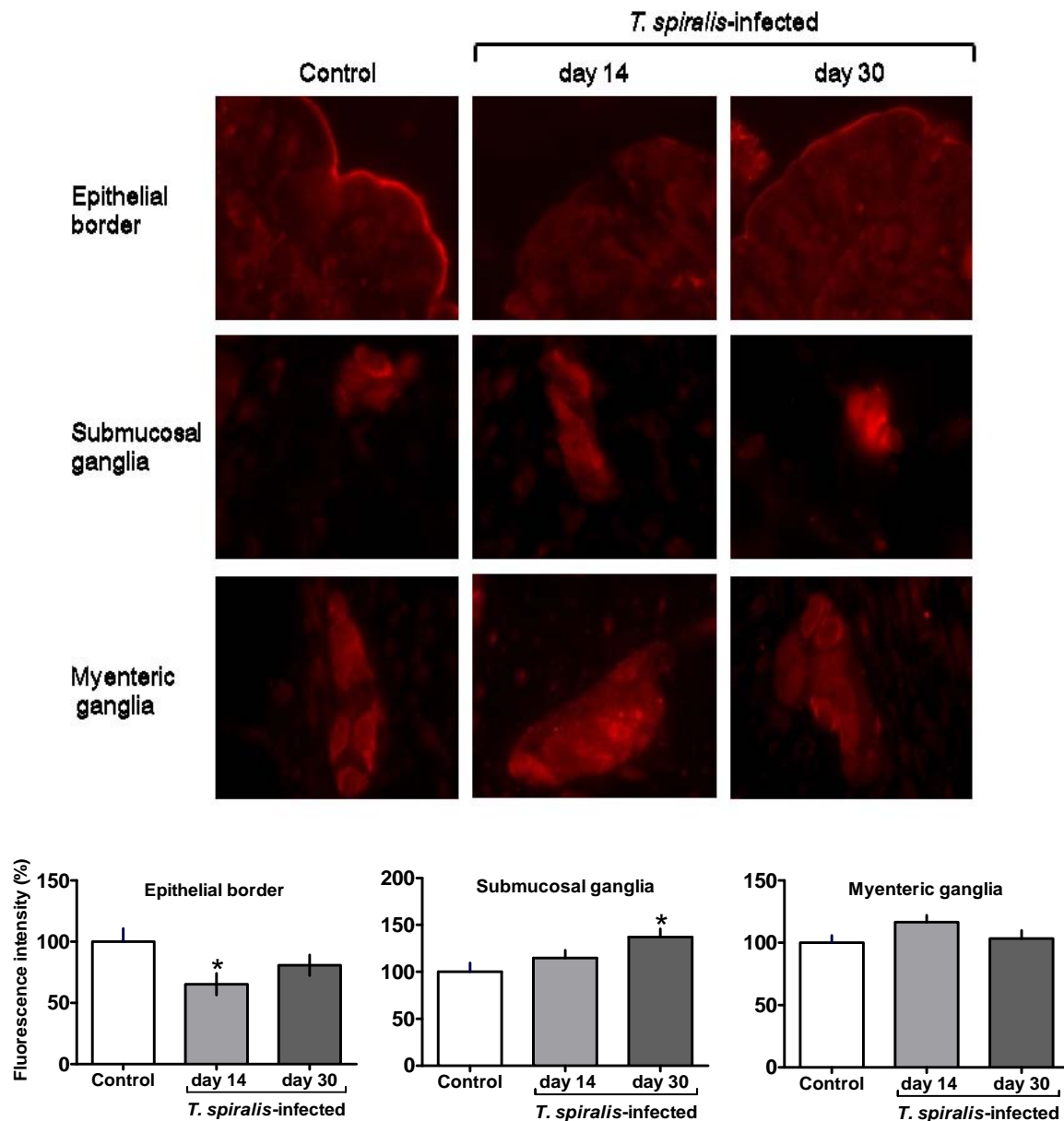
## Statistical Analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Comparisons between multiple groups were performed using a one-way, two-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, as appropriate; followed, when necessary, by a Newman-Keuls or a Dunns comparisons test. In all cases, results were considered statistically significant when p<0.05.

## Results

**Effects of *T. spiralis* Infection on Intestinal Histology.** Histological alterations observed in the jejunum after *T. spiralis* infection were in concordance with our previously described findings.<sup>12,14,21</sup> Briefly, inflammatory infiltrate observed in the jejunum was more severe on day 14 postinfection (score; control: 0.0 ± 0.0 vs. day 14 postinfection: 1.47 ± 0.27; P<0.001; n= 4-12), when it was accompanied by submucosal edema (score; control: 0.0 ± 0.0 vs. day 14 postinfection: 0.5 ± 0.1; P<0.001; n= 4-12) and epithelial damage, mainly villus atrophy and crypt hyperplasia (score; control: 0.25 ± 0.08 vs. day 14 postinfection: 2.53 ± 0.28; P<0.01; n= 4-12). By day 30 postinfection, intestinal mucosa had mostly recovered its normal appearance although a slight

inflammation was still present (inflammatory infiltrate score:  $0.31 \pm 0.16$ ;  $n=8$ ;  $P>0.05$  vs. control). Hypertrophy of external muscular layers was visible during the entire postinfectious period (score; control:  $0.16 \pm 0.09$  vs. day 14 postinfection:  $2.40 \pm 0.37$  or day 30 postinfection:  $1.62 \pm 0.18$ ; both  $P<0.001$  vs. control;  $n=4-12$ ).



**Figure 1. PAR-2 expression in the jejunum.** Representative microphotographs showing immunofluorescence staining for PAR-2 in the jejunal epithelial border and in submucosal and myenteric ganglia in control conditions and at 14 and 30 days after *T. spiralis* infection (X1000 magnification). Bar graphs show the quantification of fluorescence intensity of PAR-2 immunostaining in the different areas, expressed as percentage of the intensity in control conditions (taken as 100%). Data are mean  $\pm$  SEM;  $N=6-7$  animals per group. \* $P<0.05$  vs. control.

**Effects of *T. spiralis* Infection and PAR-2 Activation on Transepithelial Ion Transport.** At days 14 and 30 postinfection, basal Isc was not affected while an increase in G and a decrease in PD were observed (Table 1). None of these parameters was affected by the addition of TTX to the basolateral side (Table 1).

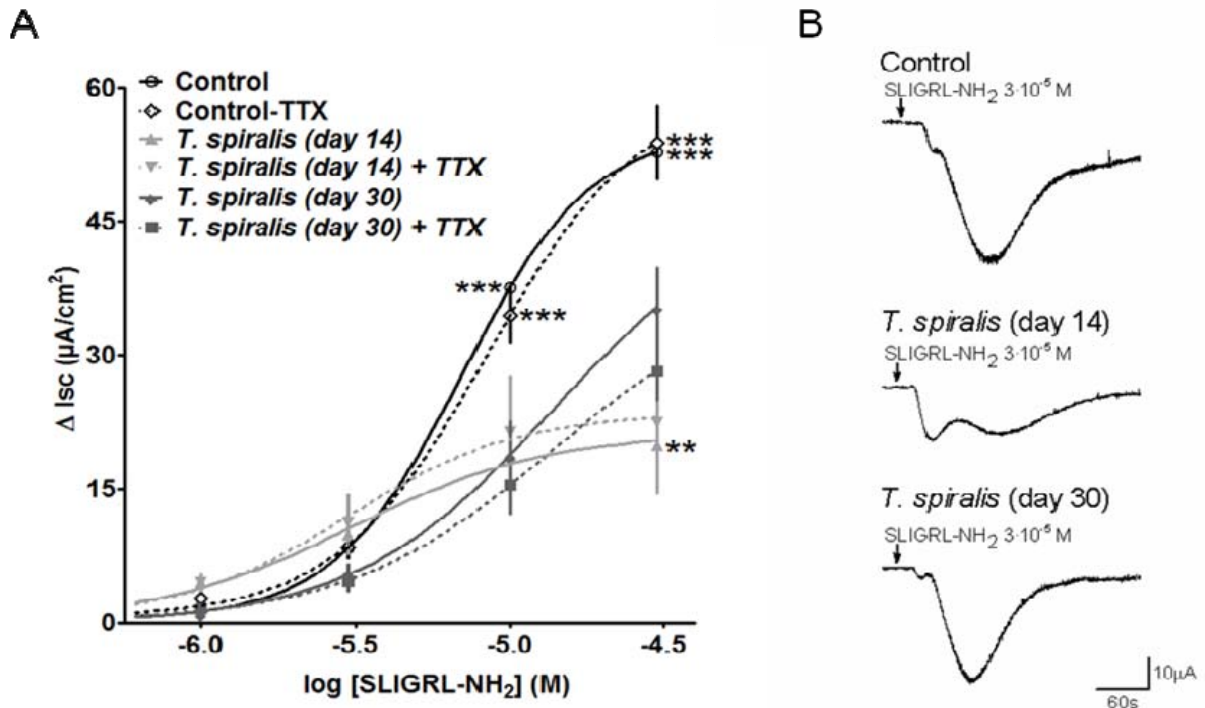
**Table 1. Basal electrophysiological parameters in jejunal segments from non-infected and previously infected (*T. spiralis*) rats.**

	Animals (number)	Jejunal Sheets (number)	Isc ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )	PD (mV)	G ( $\text{ms cm}^{-2}$ )
Control	18	45-48	$-28.12 \pm 1.89$	$1.17 \pm 0.08$	$29.98 \pm 1.05$
Control + TTX	9	9	$-31.73 \pm 5.80$	ND	$28.67 \pm 3.14$
<i>T. spiralis</i> (day 14)	6	23	$-34.35 \pm 1.74$	$0.94 \pm 0.06$ *	$44.11 \pm 2.63$ ***
<i>T. spiralis</i> (day 14)+ TTX	6	6	$-35.95 \pm 5.49$	ND	$48.86 \pm 4.93$ ***
<i>T. spiralis</i> (day 30)	18	42-43	$-28.45 \pm 2.06$	$0.75 \pm 0.04$ ***	$43.32 \pm 1.73$ ***
<i>T. spiralis</i> (day 30)+ TTX	7-8	7-8	$-34.99 \pm 4.28$	ND	$45.15 \pm 3.02$ **

Data are mean  $\pm$  SEM of the number of jejunal sheets indicated. \*, \*\*, \*\*\*:  $P < 0.05$ ,  $0.01$  or  $0.001$  vs. control group. G: Conductance; Isc: Short-circuit current; ND: Not determined; PD: Potential difference; TTX: tetrodotoxin.

In control conditions, basolateral, but not apical, application of SLIGRL-NH<sub>2</sub> lead to a rapid increase in Isc. In contrast, LRGILS-NH<sub>2</sub>, the inactive form of the peptide, applied to either the basolateral or the apical side, did not affect Isc.

Basolateral application of SLIGRL-NH<sub>2</sub> induced concentration-dependent changes in electrogenic ion transport (Fig. 2A). Cumulative concentrations of SLIGRL-NH<sub>2</sub> did not result in tissue desensitization as Isc responses to the highest concentration tested were similar after single or cumulative application both in controls (single dose of  $3 \times 10^{-5}$  M:  $51.76 \pm 8.15 \mu\text{A/cm}^2$  vs.  $3 \times 10^{-5}$  M in cumulative dose-response curves:  $52.78 \pm 6.50 \mu\text{A/cm}^2$ ;  $P > 0.05$ ;  $n = 8-10$ ) and in rats on 30 days postinfection (single dose of  $3 \times 10^{-5}$  M:  $28.47 \pm 5.52 \mu\text{A/cm}^2$  vs.  $3 \times 10^{-5}$  M in cumulative dose-response curves:  $35.36 \pm 4.50$ ;  $P > 0.05$ ;  $n = 7-12$ ).



**Figure 2. Effects of basolateral activation of PAR-2 on epithelial short-circuit current (Isc).** A: Cumulative concentration-response curves for the PAR-2 activating peptide (SLIGRL-NH<sub>2</sub>), with and without pre-incubation with tetrodotoxin (TTX). Data are mean±SEM of 6-12 mucosal sheets from 6-11 animals per group. \*\*, \*\*\*: P < 0.01 or 0.001 vs. respective group at day 30 postinfection [*T. spiralis* (day30) or *T. spiralis* (day30) + TTX]. B: Representative tracings showing changes in Isc induced by SLIGRL-NH<sub>2</sub> (3·10<sup>-5</sup> M) in the different experimental groups. Note the biphasic response elicited by PAR-2 activation and the changes associated to the acute phase of inflammation (day 14 postinfection), with a clear recovery by day 30 postinfection.

SLIGRL-NH<sub>2</sub>-induced changes in Isc were transitory and rapid, beginning within 1 min after the application of the peptide, reaching a peak within 2-3 min and recovering stable Isc values during the subsequent 3 min. At the higher doses tested (10<sup>-5</sup> and 3×10<sup>-5</sup> M), Isc changes were biphasic, with a primary response of low magnitude followed by a second peak of higher magnitude (Fig. 2B). Magnitude and morphology of the responses to PAR-2 activation were significantly altered during the early postinfectious phase. At day 14 postinfection, maximal responses to PAR-2 activation were reduced by 62 % (P<0.001 vs. control), affecting mainly the second phase of the responses (Fig. 2). A significant recovery in both the magnitude and the morphology of the responses was observed on day 30 compared to day 14, although increases in Isc were still attenuated (by 33 %) with respect to the control group (Fig. 2). Regardless the group considered, responses to SLIGRL-NH<sub>2</sub> were not affected by TTX-pretreatment (Fig. 2A).

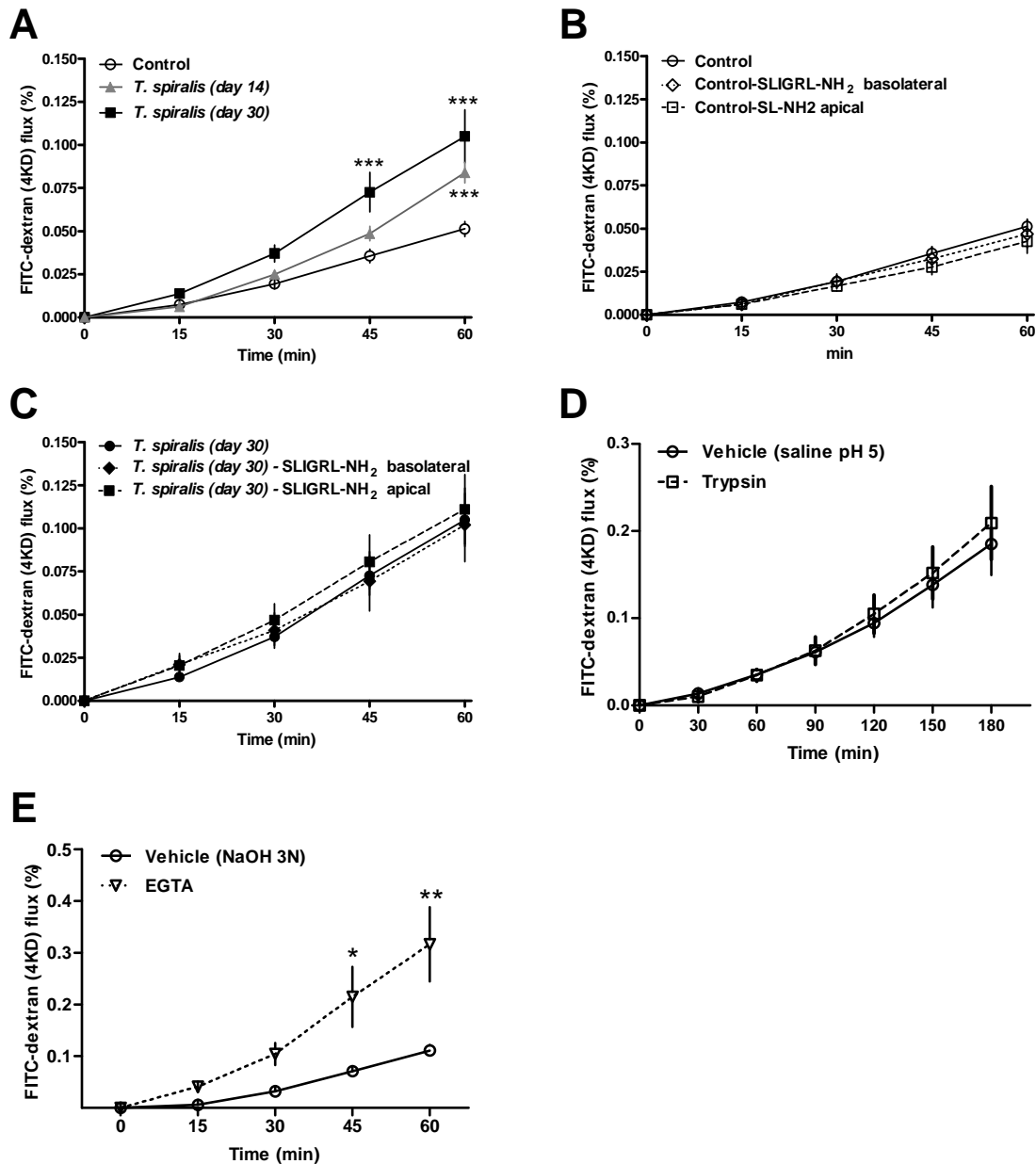
**Effects of *T. spiralis* Infection and PAR-2 Activation on Paracellular Permeability to Fluorescent Tracers.** Mucosal to basolateral passage of FD4 across jejunal segments was time-dependent in all groups. However, permeability to FD4 was significantly increased in the jejunum of previously infected animals (Fig. 3A).

Neither apical nor basolateral addition of SLIGRL-NH<sub>2</sub> affected paracellular permeability to FD4 in the control conditions or on day 30 postinfection (Figs. 3B and 3C). Mucosal application of EGTA, but not trypsin, significantly increased FD4 flux in control conditions (Fig. 3D-E). The inactive peptide LRGILS-NH<sub>2</sub> did not affect epithelial permeability.

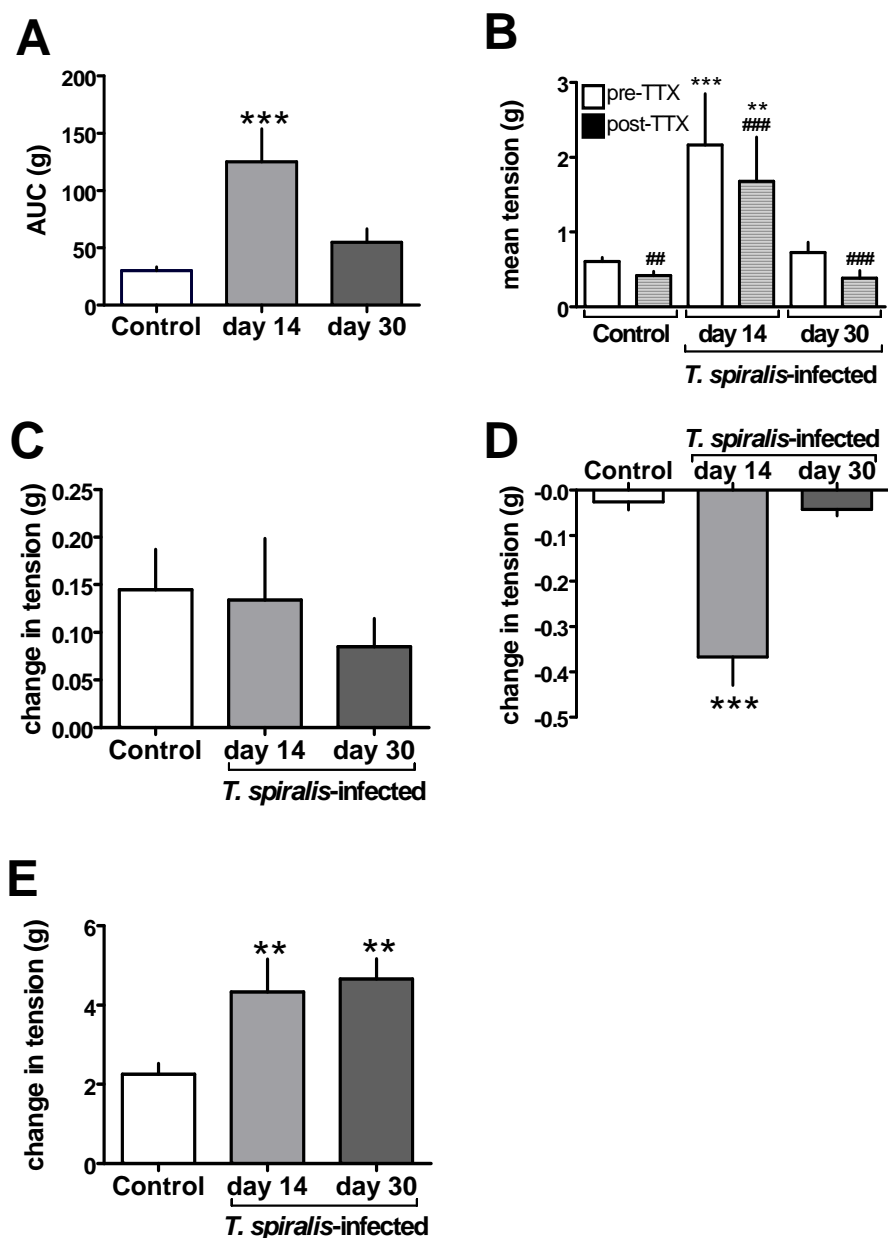
**Effects of *T. spiralis* Infection and PAR-2 Activation on Jejunal Contractility.** Spontaneous jejunal contractility was increased at day 14 postinfection, returning to control values by day 30. Neural blockade with TTX inhibited spontaneous contractility by 32%, 23% and 48% in control conditions and at days 14 and 30 postinfection, respectively (Figs. 4A-B)

In all cases, addition to the bath of the PAR-2 agonist SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $6 \cdot 10^{-5}$  M) induced a contractile response. A transient relaxation before the contraction was observed in about 50% of the muscle strips in controls and on day 30 postinfection while it was present in all the strips on day 14 postinfection. Moreover, the magnitude of the initial relaxation to SLIGRL-NH<sub>2</sub> was enhanced (by 14-fold) on day 14 postinfection (Figs 4C-D). No response was observed following exposure to the reverse peptide LRGILS-NH<sub>2</sub>.

The increase in tension generated after CCh addition was increased after *T. spiralis* infection, with similar responses on days 14 and 30 postinfection (Fig 4E). Responses to PAR-2 activation and CCh were insensitive to TTX (data not shown).

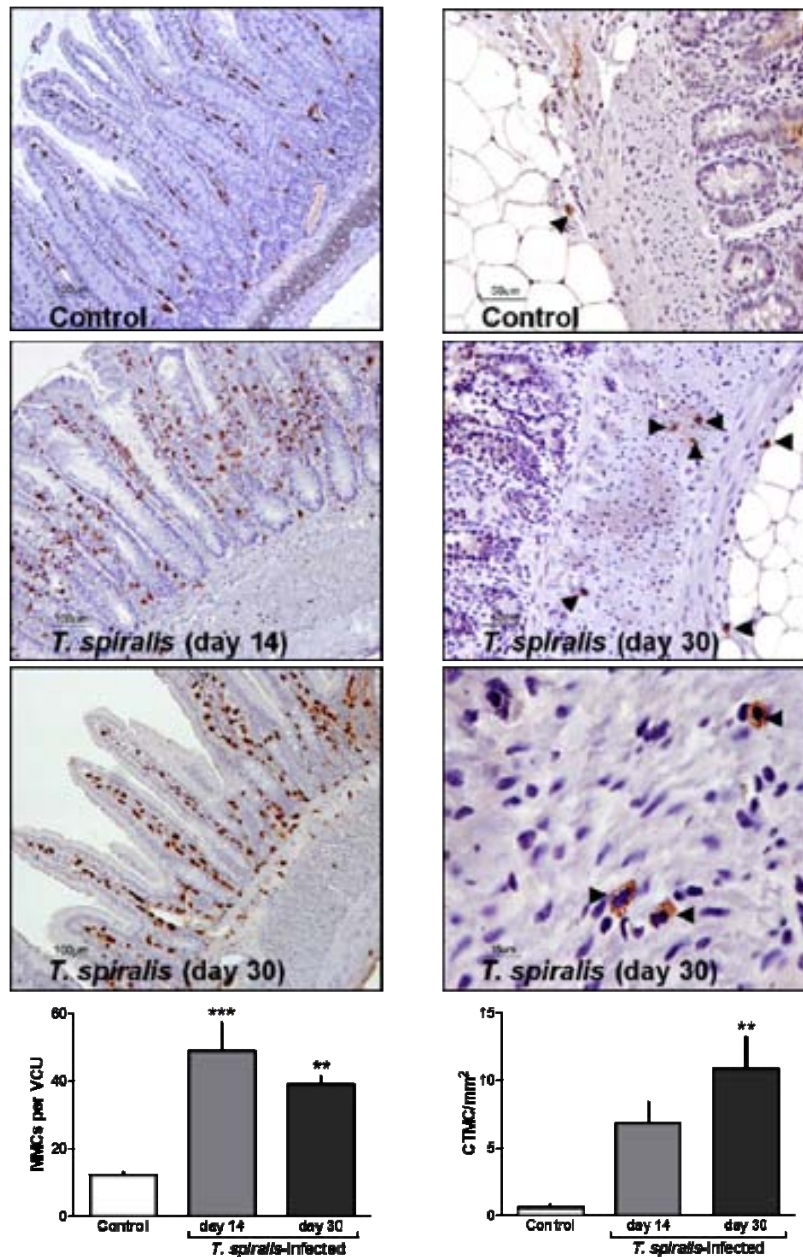


**Figure 3. Transepithelial passage of fluorescent tracers in the jejunum: Effects of *T. spiralis* infection and PAR-2 activation.** A: Mucosal to basolateral passage (as percentage of the amount added to the mucosal reservoir) of fluorescein isothiocyanate-dextran 4kD (FD4) in control and *T. spiralis*-infected animals at days 14 and 30 postinfection. Data are mean±SEM of 8-11 mucosal sheets from 6-8 animals per group. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. control group. B: Effects of apical or basolateral addition of PAR-2 activating peptide (SLIGRL-NH<sub>2</sub>;  $3 \cdot 10^{-5}$  M) in the transepithelial passage of FD4 in jejunal sheets from control and previously infected (day 30 postinfection) rats. Data are mean±SEM of 5-10 mucosal sheets from 5-10 animals per group. C: Effects of apical addition of trypsin ( $800 \text{ IU mL}^{-1}$ ) in FD4 fluxes in non-infected animals. Data are mean±SEM of 6 mucosal sheets from 3 animals per group. D: Changes in FD4 passage after apical and basolateral addition of ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA;  $8 \cdot 10^{-3}$  M), used as a positive control for induced enhanced permeability. Data are mean±SEM of 3-4 mucosal sheets from 2 animals per group. \*, \*\*:  $P < 0.05$  or  $0.01$  vs. vehicle group.



**Figure 4. Jejunal spontaneous contractility and responses to PAR-2 activation and cholinergic stimulation.** A: Spontaneous contractility in control conditions and in acute (day 14) and chronic (day 30) postinfectious phases, expressed as the area under the curve (AUC) in 5 min. Data are mean $\pm$ SEM of 12-25 mucosal sheets from 5-12 animals per group. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. other groups. B: Effects of neuronal blockade with tetrodotoxin (TTX;  $10^{-6}$  M) in spontaneous contractility. Data are mean $\pm$ SEM of 4-9 mucosal sheets from 4-9 animals per group. \*\*, \*\*\*:  $P < 0.01$  or  $0.001$  vs. respective control group; #, ###:  $P < 0.01$  or  $0.001$  vs. respective response in the absence of TTX. C, D: Relaxation (C) and contractile responses (D) to the selective PAR-2 activating peptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $6 \cdot 10^{-5}$  M), in control and *T. spiralis*-infected animals at days 14 and 30 postinfection. Data are mean $\pm$ SEM of 6-7 mucosal sheets from 5-7 animals per group. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. other groups. E: Contractile responses to carbachol (CCh;  $10^{-4}$  M) in control conditions and in postinfectious phases. Data are mean $\pm$ SEM of 6-12 mucosal sheets from 5-8 animals per group. \*\*:  $P < 0.01$  vs. control group.

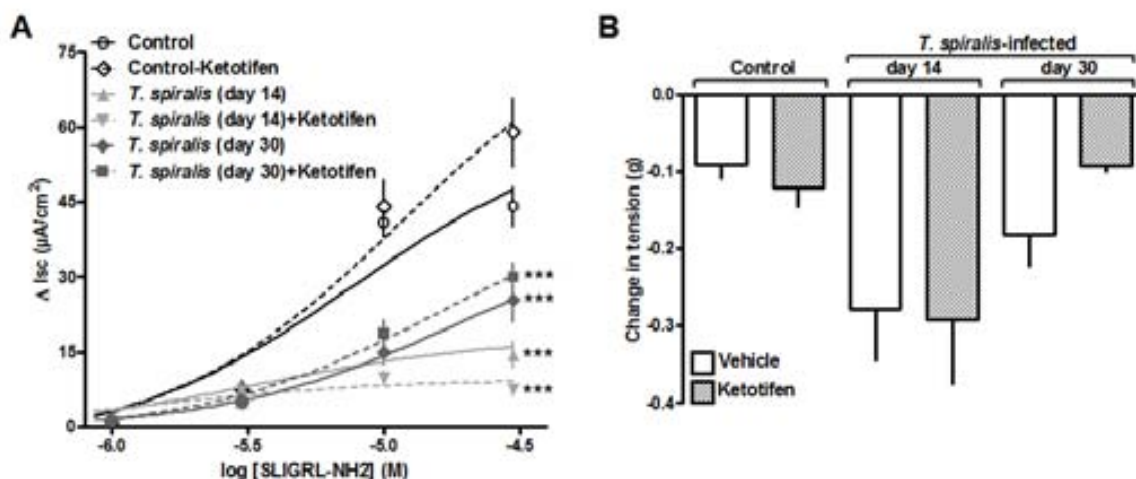




**Figure 5. Jejunum mucosal and connective tissue mast cells.** Left column: microphotographs showing rMCP-2 positive cells (mucosal mast cells, MMCs) in the jejunum of a control and *T. spiralis*-infected rats at days 14 and 30 postinfection. The bar graph at the bottom shows the number of MMCs per villus-crypt unit (VCU). Data correspond to mean±SEM, from 6-13 animals per group. \*\*, \*\*\*:  $P < 0.01$  or  $0.001$  vs. control group. Right column: microphotographs showing rMCP-6 immunopositive cells (connective tissue mast cells, CTMCs; arrow heads) in the jejunum of a control and previously infected animals. The bar graph at the bottom shows the number of CTMCs per surface area ( $\text{mm}^2$ ) of submucosa, *muscularis externa* and *serosa* layers. Data correspond to mean±SEM from 5-6 animals per group. \*\*:  $P < 0.01$  vs. control group.

**Effects of *T. spiralis* Infection on Mast Cell Counts.** In control rats, MMCs were located in the mucosa and the submucosa, while CTMCs were only occasionally observed in the serosa (Fig. 5). Infection with *T. spiralis* was associated with an infiltration of MMCs and CTMCs in the jejunum. During the postinfectious stages, CTMCs were observed in the serosal surface but also infiltrating the external muscle layers (Fig. 5).

**Effects of Ketotifen on Intestinal Epithelial Barrier Function and Motility.** Ketotifen treatment, *per se*, did not affect basal jejunal EBF or contractility or the responses to PAR-2 activation (Fig. 6). Likewise, postinfectious-associated changes in PAR-2-mediated control of EBF and contractility were not affected by ketotifen (Fig. 6). However, although no statistical significance was reached, spontaneous contractility was reduced by 30% after MC stabilization, both at 14 or 30 days postinfection (AUC/5 min; day 14 postinfection:  $103.19 \pm 23.66$  g; day 14 postinfection+ketotifen:  $71.99 \pm 8.67$  g; day 30 postinfection:  $102.62 \pm 23.49$  g; day 30 postinfection+ketotifen:  $73.03 \pm 8.36$  g).



**Figure 6. Effects of ketotifen on PAR-2-mediated control of intestinal epithelial barrier function and contractility.** A: I<sub>sc</sub> responses to the PAR-2 activating peptide, SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $3 \cdot 10^{-5}$  M). B: Relaxation phase of motor responses induced by SLIGRL-NH<sub>2</sub> ( $6 \cdot 10^{-5}$  M). Data are mean  $\pm$  SEM of 10-12 mucosal sheets from 5-6 animals per group. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. respective control group (control or control-ketotifen).

## Discussion

The present study describes changes in PAR-2 function and expression related to the early and late phases of a rat model of postinfectious gut dysfunction. Results obtained show alterations in PAR-2 epithelial expression and PAR-2-dependent control of secretomotor and contractile responses during the early phase (day 14 postinfection), associated with a severe inflammation. In contrast, a clear trend towards normality in PAR-2 epithelial levels and PAR-2-mediated responses was observed during the late phase (day 30 post infection). However, an increase in PAR-2 expression was observed in the submucosal ganglia in the late postinfectious phase, when the main finding is a persistent MC infiltrate. To our knowledge, this is the first study comparing PAR-2 expression and control of epithelial barrier function (EBF) and contractility in different phases of a postinfectious gut dysfunction model.

We evaluated how PAR-2 activation could modulate jejunal permeability in the rat, as previously shown in the colon.<sup>18,19</sup> However, against that observed in the colon, the PAR-2 activating peptide SLIGRL-NH<sub>2</sub> did not affect jejunal permeability in our conditions. This was not associated with an absence of activity of the peptide since it induced significant secretory and contractile responses at similar concentrations. Furthermore, this was not due to a lack of sensitivity of the Ussing chambers since changes in permeability could be detected when present, such as after infection or EGTA addition.<sup>12,20</sup> Recent data point to differences in EBF modulation by the PAR-2 activating peptide and endogenous agonists with enzymatic activity.<sup>22</sup> In consequence, we tested if trypsin, as endogenous activator of PAR-2, was able to modulate intestinal permeability. However, results obtained with trypsin were negative, as those with SLIGRL-NH<sub>2</sub>. These data suggest that PAR-2 activation is not able to modulate paracellular permeability in the rat jejunum, thus pointing to a differential PAR-2-mediated control of permeability between the small intestine and the colon.

In contrast to permeability, PAR-2 activation clearly influenced jejunal motility and hydroelectrolytic transport. Overall, contractile responses to PAR-2 activation were biphasic, with a transient relaxation followed by a contraction. In control conditions, the contractile phase predominated over the relaxation, in agreement with the PAR-2-

mediated enhancement of intestinal motility observed in *in vivo* conditions.<sup>23</sup> Similar PAR-2-induced biphasic responses were also observed when assessing hydroelectrolytic transport. PAR-2-mediated changes in *I*<sub>sc</sub> would reflect ionic movement to the lumen, leading to the secretion of water.<sup>24,25</sup> Therefore, it is feasible that PAR-2-mediated increased motility and luminal secretion would contribute to a defensive-like response, controlling luminal antigens' penetration and interaction with the epithelium and bacterial overgrowth in physiological conditions.<sup>26,27</sup> In addition, these PAR-2-mediated defensive responses are apparently induced by direct effects on the epithelium and the muscle, as the modulation of secretion and motility by SLIGRL-NH<sub>2</sub> was TTX-independent.<sup>25,28,29</sup> Nevertheless, we cannot rule out the participation of specific neurotransmitters in the different phases of PAR-2-mediated responses, as previously described in the rat colon.<sup>28</sup> Therefore, further studies are needed to characterize the underlying mechanisms generating PAR-2-mediated biphasic secretory and motor responses in the jejunum.

On day 14 postinfection, corresponding to the intestinal phase of *T. spiralis* infection, increased intestinal spontaneous motility and permeability could contribute to the expulsion of the nematode.<sup>30,31</sup> In this early postinfectious phase, in agreement with observations in nematode-infected mice, PAR-2 activation induced a predominant relaxation of the smooth muscle, in contrast to the responses described above for control conditions. At the same time, TTX-independent reductions in secretory responses to SLIGRL-NH<sub>2</sub> point to a postinfectious epithelial dysfunction, rather than to a neurally-mediated effect. Indeed, immunostaining studies suggest that PAR-2 dysfunction is originated by a loss of receptors in the epithelial surface after nematode infection.<sup>32</sup> This could be related to enhanced levels of proteinases, including those produced by the parasites, in infected animals, which would increase PAR-2 activation and internalization, leading to a reduced receptor presence on the cell surface.<sup>32-35</sup> Changes in motor and epithelial effects of PAR-2 activation associated with the early postinfectious state might have a dual role. On the one hand, these changes might be beneficial, minimizing the lost of liquid during diarrheic-type states. On the contrary, reduced motor and secretory responses may delay parasite expulsion and facilitate its interaction with the epithelium and penetration. Moreover, these changes could favour

host-microbial interactions and the penetration of luminal antigens and/or bacterial translocation, thus contributing to the inflammatory process observed at the histopathological level.

Interestingly, by day 30 postinfection, both basal motility and contractile responses to SLIGRL-NH<sub>2</sub> were normalized. Therefore, changes in PAR-2-mediated motor responses were only observed in association with altered basal motility and would contribute to normalize the intestinal transit. In consequence, our results support a modulatory role of PAR-2 activation in intestinal motility. Regarding PAR-2-mediated secretory responses, although a significant recovery was observed during the late postinfectious phase, EBF alterations had a long-term persistence after parasite expulsion from the intestinal lumen.<sup>36</sup> This was associated with an incomplete recovery of PAR-2 expression in the epithelial border and an increased PAR-2 expression in the submucosal ganglia. In that respect, PAR-2 activating proteinases, such as those released by MCs, could condition ENS excitability and, in turn, secretion, motility and visceral sensation.<sup>11</sup> However, as previously discussed for control conditions and the early postinfectious phase, motility and secretory responses to SLIGRL-NH<sub>2</sub> were insensitive to TTX on day 30 postinfection. Therefore, PAR-2 dysfunction seems to contribute to the chronic epithelial remodelling observed in the late postinfectious phase.<sup>12</sup> Taking into consideration the rapid turnover of the epithelial cells lining the gut,<sup>37</sup> other factors, different of the presence of the parasite, would condition epithelial PAR-2 expression and function in late postinfectious stages.

Several endogenous and exogenous proteinases, other than those produced by the parasites, are candidates to modulate postinfectious changes in PAR-2 expression and functionality. In that respect, one of the main features of *T. spiralis* infection is a persistent MC infiltration, an important source of endogenous proteinases.<sup>12,13,16</sup> In particular, MC-derived tryptase has been suggested as one of the main endogenous activators of PAR-2.<sup>1</sup> In our case, the infiltration of CTMCs, expressing tryptase, in the smooth muscle and the serosa supports their potential role in the functional changes observed. Nevertheless, we cannot discard the involvement of MMCs-derived proteinases in the activation of PAR-2 receptors.<sup>38</sup> Supporting this view, increasing evidences implicate MMCs in the EBF and motility changes observed in inflammatory

and functional gut disorders.<sup>8,12,13,30</sup> As to further assess a role of MC proteinases in PAR-2 activation, the effects of the MC stabilization with ketotifen were characterized. Since ketotifen treatment did not affect PAR-2-mediated effects, postinfectious PAR-2 alterations seem to be independent of a functional interplay between MCs and PAR-2. This would explain why postinfectious PAR-2 alterations were mostly reverted by day 30 postinfection despite the persistent MC hyperplasia. These results are unlikely to be associated to a defective ketotifen treatment. Protocols and doses followed effectively block MC proteinase release, preventing gut dysmotility in *T. spiralis*-infected rats, as shown in previous studies in similar experimental conditions.<sup>13,39</sup> Indeed, in our conditions, ketotifen reduced spontaneous hypermotility by one third in infected animals, suggesting an effective blockade of MC degranulation and confirming MCs implication in the intestinal hypermotility that characterize this model.

In summary, we show that postinfectious intestinal alterations in PAR-2-induced secretory and contractile responses are mainly associated with the early phase of gut dysfunction and related to a reduction in the receptor expression in the epithelial border. In contrast, most changes in PAR-2 are reverted in the late postinfectious phase, although MC hyperplasia, involving both MMCs and CTMCs, persists. This, together with the lack of influence of MC stabilization, suggests that MC mediators are not responsible for PAR-2-mediated responses in this model. Therefore, further studies assessing alternative activators of PAR-2, other than MC proteinases, are necessary to understand the underlying mechanisms involved in PAR-2 alterations related to gastrointestinal diseases.

## **Acknowledgements and Grants**

A. Acosta, E. Martínez, F. Jardí and J. Estévez are thanked for their assistance.

This study was supported by grants 2009SGR708 from the Generalitat de Catalunya, and BFU2009-08229 and BFU2010-15401 from *Ministerio de Ciencia e Innovación*. J.A. F.-B. personal support: FPU program (AP2007–01619) from *Ministerio de Ciencia e Innovación*.

## **Author Contributions**

J.A. F.-B. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. M.D.H contributed with essential reagents. V. M. designed and performed experiments and wrote the paper. P.V. designed experiments and wrote the paper.

## **Competing interests**

The authors have no competing interests.





## References

1. Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther.* 2011;130(3):248-282.
2. Roka R, Wittmann T, Bueno L. Altered protease signalling in the gut: A novel pathophysiological factor in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(8):853-856.
3. Kim JA, Choi SC, Yun KJ, et al. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2003;9(4):224-229.
4. Tahara T, Shibata T, Nakamura M, et al. Promoter methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis (UC). *Clin Exp Med.* 2009;9(2):125-130.
5. Kerckhoffs AP, Ter Linde JJ, Akkermans LM, Samsom M. Trypsinogen IV, serotonin transporter transcript levels and serotonin content are increased in small intestine of irritable bowel syndrome patients. *Neurogastroenterol Motil.* 2008;20(8):900-907.
6. Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut.* 2007;56(2):203-209.
7. Stoyanova II, Gulubova MV. Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta Histochem.* 2002;104(2):185-192.
8. Rijniere A, Nijkamp FP, Kraneveld AD. Mast cells and nerves tickle in the tummy: Implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacol Ther.* 2007;116(2):207-235.
9. Tremaine WJ, Brzezinski A, Katz JA, et al. Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): An open-label pilot study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(3):407-413.
10. Lee JW, Park JH, Park DI, et al. Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase. *Dig Dis Sci.* 2010;55(10):2922-2928.
11. Reed DE, Barajas-Lopez C, Cottrell G, et al. Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J Physiol.* 2003;547(Pt 2):531-542.
12. Fernandez-Blanco JA, Barbosa S, Sanchez de Medina F, Martinez V, Vergara P. Persistent epithelial barrier alterations in a rat model of postinfectious gut dysfunction. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(11):e523-33.

13. Serna H, Porrás M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental trichinella spiralis inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1104-1111.
14. Torrents D, Vergara P. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(3):G543-51.
15. De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P, et al. Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: A functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut.* 2001;49(6):822-827.
16. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol.* 2007;95:167-255.
17. Castro GA, Fairbairn D. Carbohydrates and lipids in trichinella spiralis larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol.* 1969;55(1):51-58.
18. Roka R, Ait-Belgnaoui A, Salvador-Cartier C, et al. Dexamethasone prevents visceral hyperalgesia but not colonic permeability increase induced by luminal protease-activated receptor-2 agonist in rats. *Gut.* 2007;56(8):1072-1078.
19. Roka R, Demaude J, Cenac N, et al. Colonic luminal proteases activate colonocyte proteinase-activated receptor-2 and regulate paracellular permeability in mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2007;19(1):57-65.
20. Schepens MA, Rijniere A, Schonewille AJ, et al. Dietary calcium decreases but short-chain fructo-oligosaccharides increase colonic permeability in rats. *Br J Nutr.* 2010;104(12):1780-1786.
21. Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E. Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from trichinella spiralis infected rats. *Life Sci.* 2002;71(26):3121-3136.
22. Swystun VA, Renaux B, Moreau F, et al. Serine proteases decrease intestinal epithelial ion permeability by activation of protein kinase  $\zeta$ . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(1):G60-70.
23. Kawabata A, Kuroda R, Nagata N, et al. In vivo evidence that protease-activated receptors 1 and 2 modulate gastrointestinal transit in the mouse. *Br J Pharmacol.* 2001;133(8):1213-1218.
24. Martínez-Augustín O, Romero-Calvo I, Suárez MD, Zarzuelo A, de Medina FS. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(1):114-127.
25. Vergnolle N, Macnaughton WK, Al-Ani B, Saifeddine M, Wallace JL, Hollenberg MD. Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: Identification of a

- receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7766-7771.
26. Bures J, Cyrany J, Kohoutova D, et al. Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World J Gastroenterol*. 2010;16(24):2978-2990.
  27. Norkina O, Burnett TG, De Lisle RC. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect Immun*. 2004;72(10):6040-6049.
  28. Mule F, Baffi MC, Capparelli A, Pizzuti R. Involvement of nitric oxide and tachykinins in the effects induced by protease-activated receptors in rat colon longitudinal muscle. *Br J Pharmacol*. 2003;139(3):598-604.
  29. Mule F, Baffi MC, Cerra MC. Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon. *Br J Pharmacol*. 2002;136(3):367-374.
  30. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7761-7766.
  31. Khan WI, Collins SM. Immune-mediated alteration in gut physiology and its role in host defence in nematode infection. *Parasite Immunol*. 2004;26(8-9):319-326.
  32. Shea-Donohue T, Notari L, Stiltz J, et al. Role of enteric nerves in immune-mediated changes in protease-activated receptor 2 effects on gut function. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(10):1138-e291.
  33. Knecht W, Cottrell GS, Amadesi S, et al. Trypsin IV or mesotrypsin and p23 cleave protease-activated receptors 1 and 2 to induce inflammation and hyperalgesia. *J Biol Chem*. 2007;282(36):26089-26100.
  34. Devlin MG, Gasser RB, Cocks TM. Initial support for the hypothesis that PAR2 is involved in the immune response to *nippostrongylus brasiliensis* in mice. *Parasitol Res*. 2007;101(1):105-109.
  35. Trap C, Fu B, Le Guerhier F, et al. Cloning and analysis of a cDNA encoding a putative serine protease comprising two trypsin-like domains of *trichinella spiralis*. *Parasitol Res*. 2006;98(4):288-294.
  36. Stewart GL, Na H, Smart L, Seelig LL, Jr. The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *trichinella spiralis*. *Parasitol Res*. 1999;85(8-9):672-677.
  37. Gunther C, Neumann H, Neurath MF, Becker C. Apoptosis, necrosis and necroptosis: Cell death regulation in the intestinal epithelium. *Gut*. 2012.
  38. Sharma R, Prasad V, McCarthy ET, et al. Chymase increases glomerular albumin permeability via protease-activated receptor-2. *Mol Cell Biochem*. 2007;297(1-2):161-169.

39. Juanola C, Giralt M, Jimenez M, Mourelle M, Vergara P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol.* 1998;275(1 Pt 1):G63-7.

## CAPÍTULO 3

### **DYNAMICS OF MAST CELL SERINE PROTEINASES AND TIGHT JUNCTIONS-RELATED PROTEINS IN A RAT MODEL OF GUT DYSFUNCTION INDUCED BY TRICHINELLA SPIRALIS INFECTION**

J. A. Fernández-Blanco, V. Martínez and P. Vergara

*Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Veterinary School (JAF-B, VM, PV) and School of Biosciences (VM); Instituto de Neurociencias (VM, PV), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain (VM, PV).*

**Running title:** Postinfectious changes in jejunum mast cell proteinases and tight junctions

**Keywords:** Mast cell, postinfectious, proteinases, tight junction, *Trichinella spiralis*.



## Abstract

**INTRODUCTION:** Mast cell (MC) proteinases and epithelial barrier alterations participate in the pathogenesis of inflammatory and functional bowel disorders. **AIM:** To characterize the kinetics of MC serine proteinases (chymases and tryptases) and barrier function-related tight junction (TJ) proteins in a rat model of postinfectious bowel inflammation and dysfunction. **METHODS:** Jejunal tissues of control and *Trichinella spiralis*-infected rats (2, 6, 14 and 30 days postinfection) were used. Histopathological changes and interleukin (IL)-6 expression were assessed to characterize intestinal inflammation. Time-related changes in the MC infiltrate and the expression of tight junction-related proteins were evaluated by immunostaining and RT-qPCR. **RESULTS:** Following infection, a generalized overexpression of MC chymases, peaking between days 6 and 14 postinfection was observed. This preceded a mucosal MC (MMC, rMCP-2 positive) hyperplasia (observed from day 6) and a late increase in connective tissue MCs (CTMC, rMCP-6 positive) counts (from day 14). MMC hyperplasia was mostly restricted to the mucosa and the submucosa. Nevertheless, rMCP-2 positive cells were occasionally observed infiltrating the smooth muscle of infected rats. CTMC hyperplasia was restricted to the external muscles and the serosa, in concordance with RT-qPCR results. From day 2 postinfection, coinciding with early signs of enteritis, the expression of the TJ proteins occludin and claudin-3 was reduced while expression of the pore-formation protein claudin-2 was up-regulated. Expression of proglucagon, precursor of the barrier-enhancing factor glucagon-like peptide-2, showed a clear tendency to be reduced along the process. **CONCLUSIONS:** The evolution in the expression of proteinases and the location of rMCP-2 (MMCs) and rMCP-6 (CTMCs) positive cells are indicative of a time-related pattern in the maturation of intestinal MCs following *T. spiralis* infection. Altered expression of TJ-related proteins is consistent with a loss of epithelial tightness, and provides a molecular mechanism for the long-term increased epithelial permeability observed in the *T. spiralis* infection model.





## Introduction

Mast cells (MCs) have been suggested to participate in the pathophysiology of inflammatory and functional gut disorders. Indeed, an increased number of intestinal MCs, together with a persistent state of activation, has been described for both inflammatory bowel disease (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS).<sup>1-3</sup> As MC mediators can modulate gut functions, including epithelial barrier function, it is feasible that these cells participate in the enhancement of intestinal permeability associated with IBD and IBS.<sup>4</sup>

Regardless the species considered, mature MCs are classified taking into account their tissue location (mucosae vs. connective tissue) and their enzymatic characteristics, particularly their serine proteinases (chymases and tryptases). Accordingly, in rodents, MCs are usually classified as mucosal MCs (MMCs) or connective tissue MCs (CTMCs). In the intestine, MMCs are preferentially located in the epithelium and the *lamina propria*, whereas CTMCs are situated in the submucosa and the serosa layers. In the rat, MMCs express predominantly chymases; in particular, rat mast cell proteinase (rMCP)-2, -3, -4 and the three members of the rMCP-8 subfamily (rMCP-8, -9 and -10). In contrast, rat CTMCs express two chymases, rMCP-1 and -5, and two tryptases, rMCP-6 and -7.<sup>5,6</sup>

Since each proteinase cleaves different target substrates, the profile of serine proteinases expressed by MCs conditions the potential biological effects to be observed in states of cell activation-degranulation.<sup>5,6</sup> In the gut, one of the main effects of these enzymes, once released after MC activation, is to modulate epithelial permeability.<sup>7-11</sup> MC proteinases are able to directly alter the expression and location of epithelial tight junction (TJ) proteins.<sup>8,10</sup> At the same time, they also regulate TJs indirectly, by their effects over scaffolding proteins, like the zonula occludens (ZO) proteins, and the cytoskeleton.<sup>8,12</sup> Overall, these changes would lead to an increase in epithelial permeability.

The increase in epithelial permeability induced by MC proteinases could favor the movement of fluids to the lumen, facilitating in turn intestinal motility.<sup>10,13</sup> However, in parallel, epithelial barrier disruption would facilitate luminal antigens penetration into the organism, activating the immune system and generating an inflammatory-like state.<sup>4</sup>

Therefore, MC proteinases-mediated effects on the enterocytes' TJs might determine part of the underlying pathophysiological alterations observed in inflammatory and functional bowel disorders.

The main goal of the present study was to further understand changes in MC populations and intestinal permeability associated with inflammatory and functional gastrointestinal diseases. For this purpose, experiments were performed in a rat model induced by *Trichinella spiralis* infection, which is related to jejunal MC hyperplasia and epithelial barrier dysfunctions.<sup>14</sup> During acute inflammation and in the recovery postinfectious phase (days 2 to 30 after the infection), were assessed: (i) the kinetics of MC hyperplasia, with emphasis in the appearance of phenotypically differentiated populations of MCs; and (ii) time-related changes in MC serine proteinases gene expression. In addition, we studied changes in the expression of TJ-related proteins as a way to further understand the mechanisms implicated in infection-related epithelial barrier alterations. We also assessed the expression of the barrier-enhancing factor glucagon-like peptide 2 (GLP-2).<sup>15</sup> For this, we determined the local expression of proglucagon, the precursor of GLP-2.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Adult male OFA Sprague-Dawley rats (7-8 weeks old, 250-275 g; Charles River Laboratories, Lyon, France) were used. Rats were housed under conventional conditions in a light (12h/12h light-dark cycle) and temperature controlled (20-22 °C) room, with access to tap water and laboratory rat chow *ad libitum*. Animals were kept in groups of two to three per cage. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the *Universitat Autònoma de Barcelona* and the *Generalitat de Catalunya* (protocols 5352 and 5564).

### ***Trichinella spiralis* Infection**

Muscle-stage larvae of *T. spiralis* were obtained from infected CD1 mice as previously described.<sup>16-18</sup> Rats were infected at 8-9 weeks of age by administration of

7.500 *T. spiralis* larvae suspended in 1 ml of saline by oral gavage and studies were performed on days 2, 6, 14 and 30 postinfection. Age- and time-matched rats dosed orally with 1 ml of saline were used as controls. During this time, animals were regularly monitored for clinical signs and body weight changes. Normal course of the infection was confirmed by a significant decrease of body weight after *T. spiralis* infection compared with controls, with a peak reduction on day 9 and a subsequent linear increase over time, as previously described by us.<sup>14,18</sup>

### **Tissue Sampling**

At the time of the experiments, animals were euthanatized by decapitation. A laparotomy was performed and jejunal samples (beginning 10 cm distal to the ligament of Treitz) were excised. Immediately, the intestines were flushed and placed in ice cold oxygenated Krebs buffer containing glucose. Intestinal mucosa and submucosa of jejunal segments (~ 2cm) were scraped off very gently with blunt-edged glass slides. The mucosa-submucosal and underlying smooth muscle-serosal samples obtained by this procedure were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further RT-qPCR analysis. At the same time, jejunal samples for histological and immunostaining studies were obtained and fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer for 24 h. Thereafter, fixed samples were processed routinely for paraffin embedding and 5 µm sections were obtained for H&E staining, rat mast cell proteinase (rMCP) 2 chymase or rMCP-6 tryptase immunohistochemistry.

### **Histopathological Studies**

H&E-stained slides were evaluated in a blinded fashion by two independent investigators. A histological score based on the epithelial structure (0-3), presence of edema (0-3), presence of ulcerations (0-3), presence of inflammatory infiltrate (0-3), relative density of goblet cells (0-3) and relative thickness of the intestinal wall (0-3) was assigned to each animal (maximal score of 18).

### **Immunohistochemistry for Rat Mast Cell Proteinases 2 and 6 and MCs Counts**

Immunodetection of rMCP-2 was carried out on jejunal sections following standard immunohistochemical procedures using a monoclonal antibody (MS-RM4, 1:500; Moredun Animal Health, Edinburgh, UK), as previously described by us.<sup>14</sup>

For rMCP-6 detection, paraformaldehyde-fixed jejunal sections were rehydrated and microwave antigen retrieval was performed (10mM Tris Base, 1mM EDTA Solution, 0.05% Tween 20, pH 9.0; 2 cycles of 5 min, 800W). After inhibition of endogenous peroxidases with 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 40 min and incubation in rabbit serum for 1h at room temperature, sections were incubated with goat anti-mast cell tryptase antibody (sc-32473; Santa Cruz Biotechnology; overnight, 4°C, 1:50), followed by biotinylated rabbit anti-goat IgG (sc-2774; Santa Cruz Biotechnology; 1h, room temperature, 1:200) and detection was performed with an avidin/peroxidase kit (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Antigen-antibody complexes were revealed using 3-3' diaminobenzidine (SK-4100 DAB; Vector Laboratories) and sections were counterstained with haematoxylin. Specificity of the staining was confirmed by omission of the primary antibody.

Stained MMCs (rMCP-2 positive) were counted in at least 20 well-oriented villus-crypt units (VCU) per animal, at X400 magnification, and expressed as MMCs per VCU. The total number of stained CTMCs (rMCP-6 positive) in the submucosa, external smooth muscle and serosa areas was determined in two complete tissue sections of the jejunum for each animal (X600). CTMCs counting was normalized for the surface area of submucosa, external smooth muscle and serosa layers, as evaluated in digital images (Axioskop 40 microscope, Zeiss equipped with a digital camera, Zeiss AxioCam MRm; image analysis software: Zeiss Axiovision Release 4.8.1; Carl Zeiss, Jena, Germany). Cell counting and analysis of all data were performed in a blinded manner on coded slides, to avoid observer's bias.

### **Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)**

Extractions of total RNA from frozen jejunal mucosa-submucosa and smooth muscle-serosa samples were performed using TRI reagent and the Ribopure RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). RNA was quantified by Nanodrop (Nanodrop Technologies, Rockland, DE, USA) and 1 µg of RNA was reverse-transcribed in

a 20  $\mu$ l reaction volume for cDNA synthesis, using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Validated TaqMan<sup>®</sup> gene expressions assays with hydrolysis probes for rat mast cell proteinases, epithelial barrier function-related proteins, interleukin-6 (IL-6) and reference genes were used (Applied Biosystems) (Table 1). PCR reaction mixtures were transferred to clear 384-well reaction plates (HSP-3801; Bio-Rad, Barcelona, Spain; 20  $\mu$ l/well), sealed by adhesives and incubated on a CFX384 Touch real-time PCR detection system (Bio-Rad). Amplification conditions were as follows: 95°C for 10 min; 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1min. Fluorescence signals measured during amplification were processed after amplification. Bio-Rad CFX Manager 2.1 software was used to obtain the quantification cycle (Cq) for each sample. Each sample was run in triplicate and data were analyzed by the comparative Cq method ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ), as previously described.<sup>19</sup> Rps18 and Actb were tested as reference genes. Actb expression levels were used for normalizing the mRNA levels of the target gens because of their constancy across the different experimental groups. The fold-change was calculated individually respect to the average of the control group. Controls of analytical specificity included omission of reverse transcriptase, to exclude contamination with genomic DNA, and no-template controls, omitting the cDNA.

### **Statistical analysis**

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. A robust analysis (one iteration) was used to obtain mean  $\pm$  SEM for qPCR data. Comparisons between multiple groups were performed using a one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test, as appropriate; followed, when necessary, by a Newman-Keuls or a Dunns comparisons test. In all cases, results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

**Table 1. TaqMan® gene expression assays**

<b>Protein</b>	<b>Gene Symbol</b>	<b>Assay Reference</b>
<b>Mast cell Proteinases</b>		
Rat mast cell proteinase 1 (rMCP-1)	<i>Mcpt1</i>	Rn01481927_gH
Rat mast cell proteinase 2 (rMCP-2)	<i>Mcpt2</i>	Rn01478347_m1
Rat mast cell proteinase 4 (rMCP-4)	<i>Mcpt4</i>	Rn00820964_g1
Rat mast cell proteinase 5 (rMCP-5)	<i>CMA1</i>	Rn01645022_m1
Rat mast cell proteinase 6 (rMCP-6)	<i>Tpsb2</i>	Rn00569857_g1
Rat mast cell proteinase 8 (rMCP-8)	<i>Mcpt8</i>	Rn01789238-g1
Rat mast cell proteinase 9 (rMCP-9)	<i>Mcpt9</i>	Rn00755366_g1
Rat mast cell proteinase 10 (rMCP-10)	<i>Mcp10</i>	Rn03417709_sh
<b>Barrier function-related proteins</b>		
Claudin 2	<i>Cldn2</i>	Rn02063575_s1
Claudin 3	<i>Cldn3</i>	Rn00581751_s1
Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1)	<i>F11r</i>	Rn00587389_m1
Occludin	<i>Ocln</i>	Rn00580064_m1
Tricellulin	<i>Marveld2</i>	Rn01494284_m1
<i>Zonula occludens</i> 1 (ZO-1)	<i>Tjp1</i>	Rn02116071_s1
<i>Myosin light chain kinase</i> (MLCK)	<i>Mylk</i>	Rn01439252_m1
Proglucagon	<i>Gcg</i>	Rn00562293_m1
<b>Inflammatory markers</b>		
<i>Interleukin 6</i> (IL-6)	<i>Il6</i>	Rn01410330_m1
<b>Reference genes</b>		
ribosomal protein S18	<i>Rps18</i>	Rn01428915_g1
$\beta$ -Actin	<i>Actb</i>	Rn00667869_m1

## Results

**Effects of *T. spiralis* Infection on Intestinal Histology and IL-6 Expression.** In concordance with previous findings, *T. spiralis* infection lead to time-related (from day 2 to day 30 postinfection) histological alterations in the jejunum consistent with the induction of an enteritis (Table 2).<sup>18,20</sup>

Signs of mucosal and submucosal inflammation, accompanied by epithelial damage, were already observed at day 2 postinfection and reached peak scores on day 14 (Table 2). During this period, parasites were observed penetrating intestinal epithelial cells. By day 30 postinfection, when parasites were not detected any more, intestinal

epithelium mostly recovered its normal appearance although a goblet cell hyperplasia and histological signs of a slight inflammation were still present (Table 2). Overall, these alterations were in concordance with the time-related changes in mucosa-submucosa levels of IL-6 gene expression, which were up-regulated from day 2 to day 14 postinfection and trended towards normality by day 30, although still with a 12-fold increase over controls (Fig. 1). Hypertrophy of both circular and longitudinal external smooth muscle was observed during the entire postinfectious period, being maximal on day 14 (Table 2). An up-regulation of genes encoding IL-6 expression was also observed in the external muscular layers from day 2 to day 14 postinfection. However, the magnitude of these changes was smaller than in the mucosa and IL-6 expression was completely normalized by day 30 (Fig. 1).

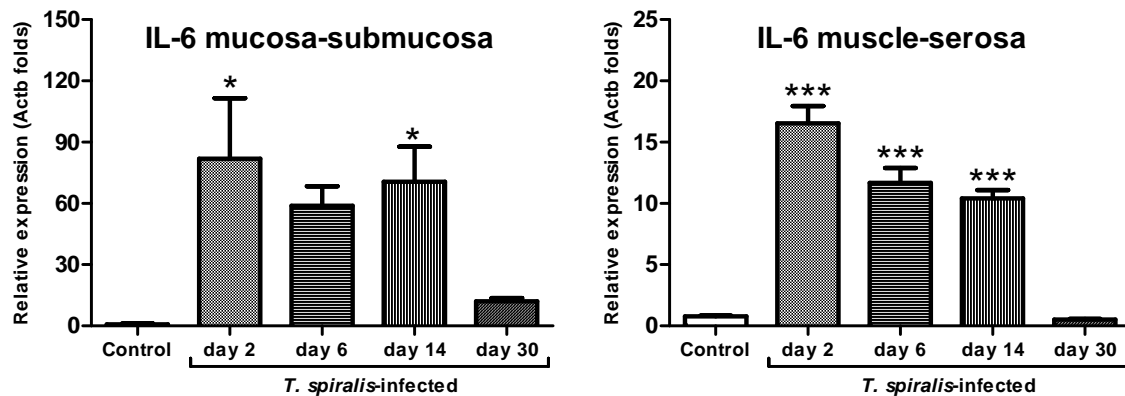
**Table 2. Time-related changes in histopathological scores for the jejunum after *Trichinella spiralis* infection in rats**

	Group				
	Control	<i>T. spiralis</i> -infected			
		Day 2	Day 6	Day 14	Day 30
Epithelial structure (0-3)	0.32 ± 0.12	1.56 ± 0.40	1.31 ± 0.12	2.53 ± 0.28**	0.25 ± 0.09
Edema (0-3)	0.02 ± 0.02	0.22 ± 0.15	0.03 ± 0.03	0.50 ± 0.10	0.06 ± 0.06
Ulcerations (0-3)	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.06	0.31 ± 0.19	0.00 ± 0.00	0.13 ± 0.13
Inflammatory infiltrate (0-3)	0.08 ± 0.06	0.75 ± 0.34	0.94 ± 0.16	1.47 ± 0.27**	0.31 ± 0.16
Goblet cell density (0-3)	0.42 ± 0.11	0.03 ± 0.03	2.50 ± 0.18*	1.72 ± 0.66	1.75 ± 0.25
Intestinal wall thickening (0-3)	0.22 ± 0.09	1.25 ± 0.23	1.75 ± 0.11*	2.41 ± 0.37**	1.63 ± 0.18**
<b>TOTAL (0-18)</b>	<b>1.05 ± 0.26</b>	<b>3.88 ± 1.10</b>	<b>6.84 ± 0.48*</b>	<b>8.63 ± 0.55***</b>	<b>4.13 ± 0.39</b>

Data are mean±SEM of 4-15 animals per group. \*, \*\*, \*\*\*: P<0.05, 0.01 or 0.001 vs. control group

**Effects of *T. spiralis* Infection on Mast Cell Populations: Immunohistochemical characterization.** In the jejunum of control rats MMCs, identified as rMCP-2 positive, were abundantly located in the mucosa (by 94%) and the submucosa (by 6%). No rMCP-

2 positive cells were observed in other locations. However, CTMCs, identified as rMCP-6 positive, were rarely found and, when present, were essentially located in the serosa.

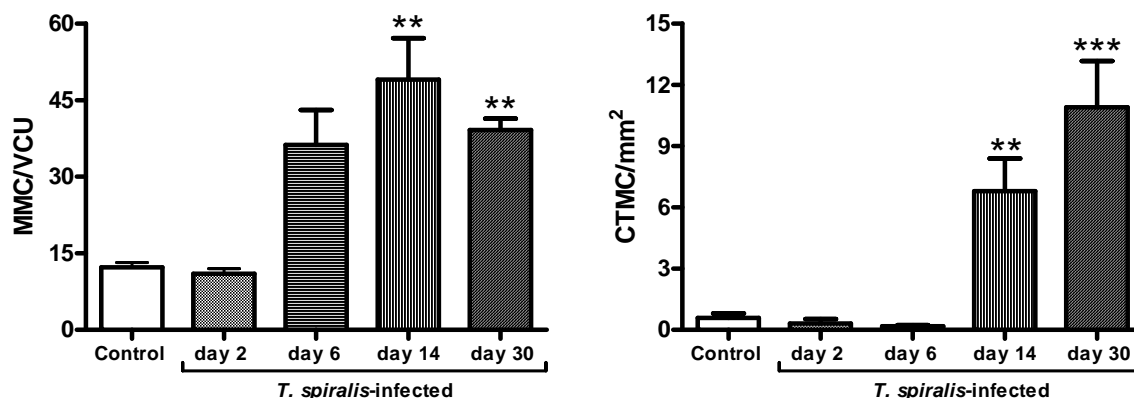


**Figure 1. Effects of *T. spiralis* infection on interleukin 6 (IL-6) gene expression in the jejunum.** Relative expression of IL-6 mRNA in jejunal mucosa-submucosa and external muscle-serosa samples from control and previously infected rats. Data are mean $\pm$ SEM of 4-5 animals per group. \*, \*\*\*: P<0.05 or 0.001 vs. control group.

*T. spiralis* infection was associated with an intestinal hyperplasia of both MMCs and CTMCs. MMCs maintained their pattern of distribution between the mucosa (93-96%) and the submucosa (4-7%), where their number began to increase at day 6, peaking by day 14 postinfection (by 4-fold increase over control values, P<0.05). Similarly, CTMCs, identified as rMCP-6 positive, also appeared within the smooth muscle layers of infected rats and a significant hyperplasia was detected from day 14, being maximal at day 30 postinfection (by 19-fold increase over control values; P<0.05) (Fig. 2). Occasionally, scattered rMCP-2 positive cells were also observed infiltrating the smooth muscle of infected rats.

**Effects of *T. spiralis* Infection on Mast Cell Populations: Serine Proteinases Gene Expression.** Serine proteases genes assessed were detected in jejunal samples in control conditions with different relative expression levels (Table 3). In particular, expression of the gene for rMCP-6 could not be detected in 4/5 and 2/5 of mucosa-submucosa and smooth muscle-serosa samples, respectively, and, when detected, expression levels were comparatively low.





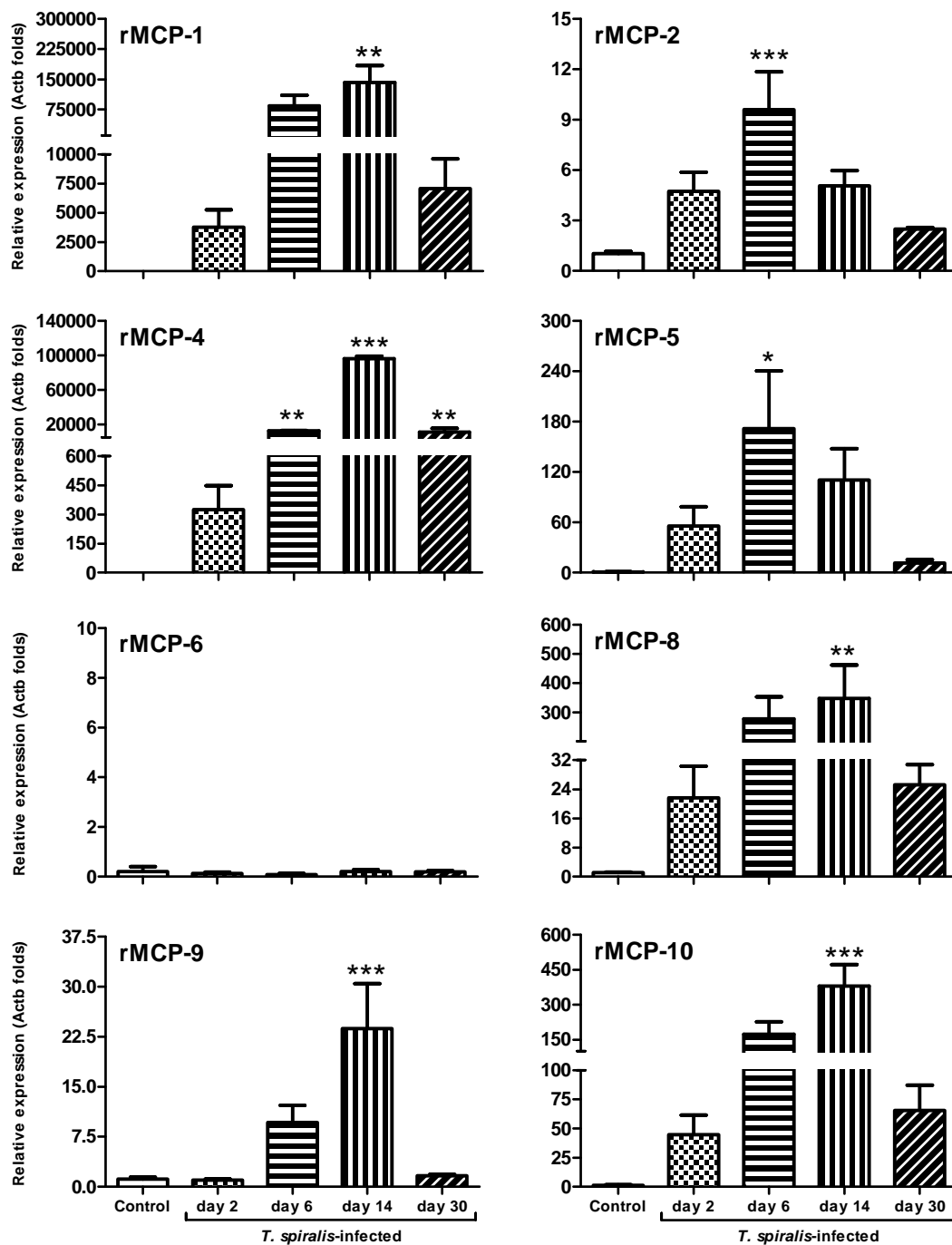
**Figure 2. Effects of *T. spiralis* infection on mucosal and connective tissue mast cells number.** Left graph: Quantification of rMCP-2 immunopositive cells (corresponding to mucosal mast cells, MMCs; number/VCU) in the jejunal mucosa and submucosa of control and *T. spiralis*-infected rats. Right graph: Quantification of rMCP-6 immunopositive cells (corresponding to connective tissue mast cells, CTMCs; number/mm<sup>2</sup>) in the jejunal submucosa, external smooth muscle and serosa layers of control and previously infected animals. Data correspond to mean±SEM from 4-13 animals per group. \*\*, \*\*\*:  $P < 0.01$  or  $0.001$  vs. control group.

**Table 3. Relative expression of mast cell serine proteinases genes in control conditions**

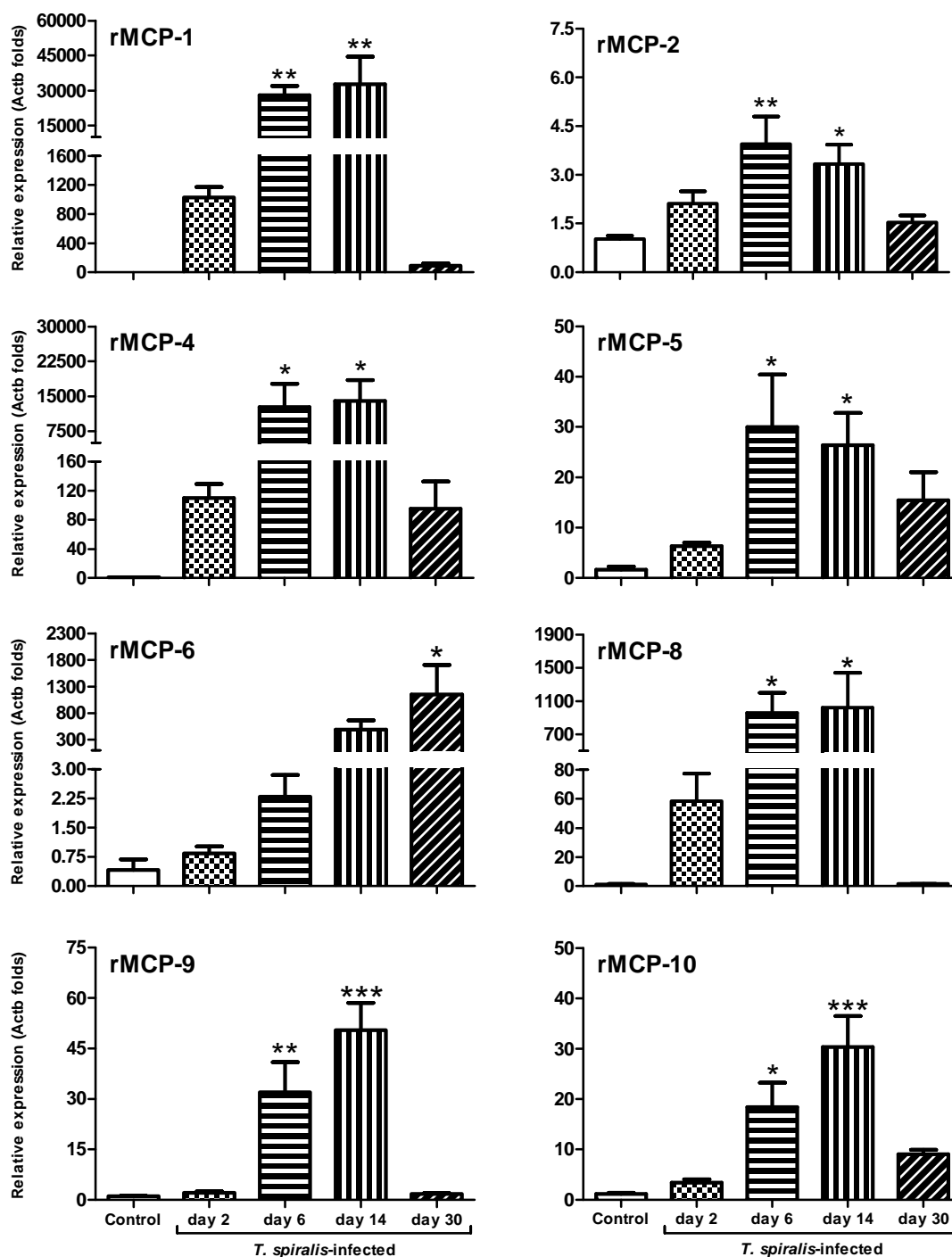
<b>Mucosa-sumucosa</b>	rMCP-9 > rMCP-2 > rMCP-10 >> rMCP-5 > rMCP-8 > rMCP-1 > rMCP-4 > rMCP-6
<b>Smooth muscle-serosa</b>	rMCP-10 > rMCP-9 > rMCP-2 > rMCP-5 >> rMCP-8 ≥ rMCP-1 > rMCP-4 > rMCP-6

After *T. spiralis* infection, a time-related up-regulation in gene expression for all the serine proteinases, except for rMCP-6, was observed in mucosa-submucosa samples (Fig. 3). Overall, gene expression levels peaked between days 6 and 14 postinfection, declining towards the expression observed in control conditions by day 30 (Fig. 3).

Similar postinfectious up-regulation in gene expression was detected in the smooth muscle-serosa (Fig. 4). However, in this case, gene expression of rMCP-6 was also up-regulated, showing a progressive time-related increase, with the highest level of expression detected by day 30 postinfection (Fig. 4).

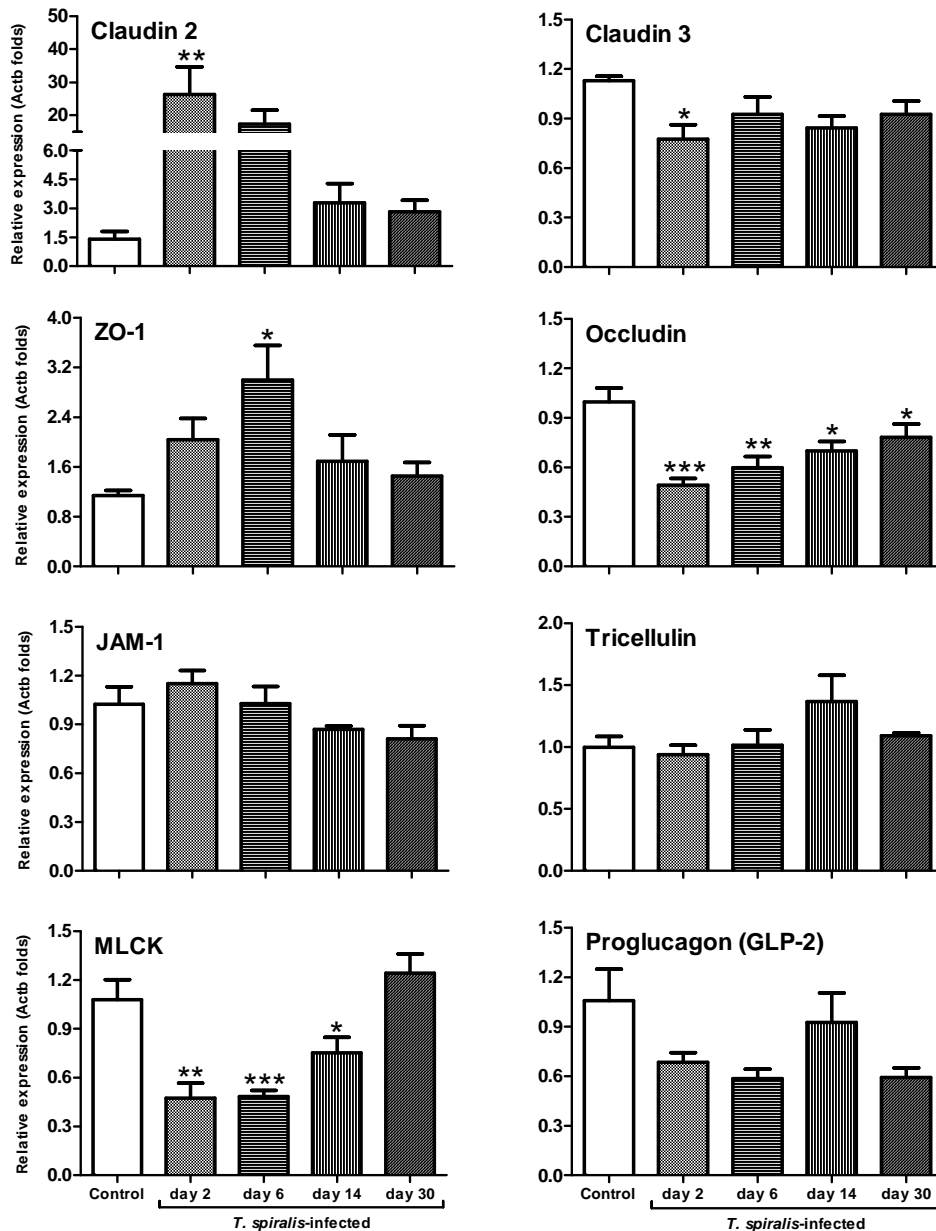


**Figure 3. Effects of *T. spiralis* infection on mast cell proteinases gene expression in the mucosa-submucosa area.** Relative expression of rat mast cell proteinases mRNA normalized to transcript levels of Actb in jejunal mucosa-submucosa samples from control and previously infected rats measured by RT-qPCR. Data are mean $\pm$ SEM of 4-5 animals per group. \*, \*\*, \*\*\*: P < 0.05, < 0.01 or P < 0.001 vs. control group.



**Figure 4. Effects of *T. spiralis* infection on mast cell proteinases gene expression in the external smooth muscle-serosa area.** Relative expression of rat mast cell proteinases mRNA normalized to transcript levels of Actb in jejunal samples of external smooth muscle and serosa layers from control and previously infected rats measured by RT-qPCR. Data are mean±SEM of 4-5 animals per group. \*, \*\*, \*\*\*:  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  or  $P < 0.001$  vs. control group.

**Effects of *T. spiralis* Infection on the Expression of TJ-Related Proteins.** Expression of all genes assessed for TJ-related proteins was detected in jejunal samples (mucosa-submucosa) in control conditions. Relative expression levels were: claudin 3 > occludin > JAM-1 >> tricellulin > ZO-1 > claudin 2.



**Figure 5. Effects of *T. spiralis* infection on the expression of epithelial barrier function-related genes in the mucosa and the submucosa.** Relative expression of the mRNA of proteins associated with the control of epithelial barrier function normalized to transcript levels of Actb in jejunal mucosa-submucosa samples from control and previously infected rats measured by RT-qPCR. Data are mean±SEM of 4-5 animals per group. \*, \*\*, \*\*\*: P < 0.05, < 0.01 or P < 0.001 vs. control group.

Similar order of magnitude in the relative expression levels was maintained after the infection. However, time-dependent changes in the absolute levels of expression were detected, and both up-regulation and down-regulation of genes could be observed. While the expression of genes for claudin 2 and ZO-1 was increased, genes encoding claudin 3, occludin and MLCK were down-regulated (Fig. 5). Expression changes were fast in time, as maximal variations were observed between 2 and 6 days postinfection (Fig. 5). JAM-1 and tricellulin expression levels were not affected.

Gene expression of proglucagon, the GLP-2 precursor, showed a clear tendency to be down-regulated over time ( $P= 0.06$ ; Fig. 5).

## Discussion

The present study shows time-related changes in intestinal MC populations in a rat model of gut dysfunction induced by *T. spiralis* infection. A persistent infiltrate of MCs was observed in the jejunum during the postinfectious phases, characterized by an early MMC hyperplasia and a late increase in CTMC. At the same time, changes in MC subtypes were associated with time-dependent variations in the expression of MC proteinases. In addition, alterations in the expression of TJ-related proteins, which are potentially modulated by MC proteinases and consistent with an increase of epithelial permeability, were also observed. Modulation of TJ proteins might serve as a basis for the intestinal barrier dysfunctions related to this model.

One of the main characteristics of the *T. spiralis* infection model in rats is the presence of a long-lasting postinfectious infiltrate of MMC populating the mucosa-submucosa of the small intestine.<sup>14</sup> Here we show that, in addition, a hyperplasia of CTMCs (rMCP-6 positive) also occurs. Infiltration of MMCs and CTMCs takes place at different times along the postinfectious process. Overall, the results obtained suggest that in early phases of the infectious process (by day 2), when MCs hyperplasia is not yet present, there is an activation of the resident MCs in the intestine. Gene expression data shows that this implies an up-regulation of the rMCP-2 gene, thus suggesting the initiation of a preferential phenotypic differentiation towards mature MMCs. Indeed, this phase is followed by the development of a sustained infiltration of MMCs, as shown by the gene expression data and the immunohistochemistry for rMCP-2. This coincides

with the intestinal phase of the infection and might represent an early defensive response towards the presence of the parasite in the mucosa.<sup>21-23</sup>

Interestingly, during the postinfectious phase, MCs with phenotypic characteristics of CTMCs (rMCP-6-expressing cells) appear infiltrating the muscle layers. At the same time, scattered rMCP-2 positive cells were also observed within the muscle layers. This could be related to the recruitment to the smooth muscle of submucosal MCs with an immature phenotype, which can express rMCP-2.<sup>24,25</sup>

The intestinal MC hyperplasia originates probably from the arrival of immature MCs to the intestine and is favored by the production of MC progenitors in the bone marrow in response to the infection.<sup>26</sup> These progenitors, with an immature phenotype, circulate in the periphery before migrating into the inflamed tissue, where they initiate a process of maturation.<sup>26</sup> Our observations suggest that immature MCs express rMCP-2. Therefore, in the early phase of differentiation towards CTMCs, it is feasible to assume that there might be a co-expression of rMCP-2 and rMCP-6 while they migrate across the muscle to generate CTMCs.<sup>24</sup> In fact, an equivalent situation has been described in the mucosa of *T. spiralis*-infected mice, where cells co-expressing mouse mast cell proteinases (mMCPs) 2 and 6 are observed.<sup>27</sup> As in the epithelium,<sup>21</sup> MCs infiltrating the muscle layers might represent a defensive response towards the penetration of *T. spiralis* larvae into the gut wall. It is feasible to assume that CTMCs infiltrating the muscle layer and their mediators might contribute to the hypercontractile responses observed in infected animals.<sup>17,18</sup>

Some overlapping in proteinases expression was observed between MMCs and CTMCs. For instance, MMC- and CTMC-associated chymases were equally expressed in mucosa-submucosa and smooth muscle-serosa samples, confirming that tissue location alone does not fully predict the phenotypic pattern of proteinases expression.<sup>28,29</sup> This could be explained by the expression of chymases classically associated with CTMCs in both MMCs and transitional populations of MCs, as previously showed for rMCP-1 and mMCP-5.<sup>29-31</sup> Only the expression of the tryptase rMCP-6 seems to be fully specific of mature CTMCs. Indeed, rMCP-6 expression was virtually undetectable in early phases of the infective process, before any MCs differentiation takes place, or in mucosa-submucosa samples. However, expression levels were reliably detected in muscle-serosa

samples with CTMCs infiltrate; thus suggesting that rMCP-6 is a good and selective marker for the phenotypic characterization of CTMCs.

It is worthy to mention that the overexpression of genes for both rMCP-2 and rMCP-6 preceded the detection of postinfectious increases in the number of MMC and CTMC, respectively. This indicates that the up-regulation in gene expression is not only the result of the MC hyperplasia observed after the infection. On the contrary, this would reflect the overexpression of the genes for these enzymes in individual MCs, at least during the early phase of the process.

The variable pattern of expression of MC proteinases might be related to functional changes along the postinfectious phase. Since MCs-derived proteinases are substrate-specific, variations in their expression might lead to the activation of different targets and, therefore, the generation of different time- and proteinase-related functional responses. One of the major effects of substrates cleavage mediated by MC proteinases may be the modulation of the epithelial barrier function. In particular, MC proteinases could regulate intestinal permeability by controlling the expression of TJ transmembrane components.<sup>8,9,21</sup> Our studies show a postinfectious down-regulation of TJ proteins with adhesive properties, claudin 3 and occludin, together with an over-expression of the pore-forming protein claudin 2. These changes suggest an increased epithelial permeability, at least through the paracellular pathway, thus providing a mechanistic substratum for the increased epithelial permeability previously demonstrated by us in this model.<sup>14</sup> In particular, chronic underexpression of occludin, related to gene down-regulation and posttranscriptional disorganizations, would result in an increase of paracellular permeability even at late phases after *T. spiralis* infection.<sup>14,21,32</sup> Interestingly, similar structural and functional alterations have been observed in patients with inflammatory and functional gastrointestinal disorders, such are IBD and IBS.<sup>33-36</sup>

Occludin expression, and the subsequent modulation of barrier function, has been also associated to the release of barrier-enhancement factors, namely glucagon-like peptide 2 (GLP-2).<sup>15</sup> In our conditions, proglucagon, the precursor of GLP-2, expression tended to be down-regulated after the infection, which suggests a reduction in the local levels of GLP-2. This is in agreement with occludin underexpression and the subsequent increase in epithelial permeability observed in functional studies.<sup>14</sup> This warrants further studies to confirm the possible implications of GLP-2 in postinfectious barrier

dysfunction. On the other hand, increased rMCP-2 release associated with the postinfectious phase could favor occludin degradation.<sup>8,14,17</sup> Therefore, at least part of the changes observed in epithelial barrier function might be explained by an altered turnover of occludin, characterized by an increased rate of cleavage together with a reduced synthesis.

In addition, paracellular permeability is modulated by the interactions of the claudins and occludin with the cytoskeleton, through the macromolecules at the intracellular plaque ZO.<sup>8,36</sup> In that respect, the genes for MLCK, which catalyses cytoskeleton contraction,<sup>12</sup> and the scaffolding protein ZO-1 were down- and up-regulated, respectively, in infected rats. At a functional level, these changes might translate into a TJ reorganization leading to an increase in epithelial tightness. We should be cautious interpreting these observations as they are in contradiction with results obtained in similar animal models or in patients with IBD or IBS, where changes in MLCK and ZO-1 were consistent with the presence of an increased epithelial permeability.<sup>32,36</sup> However, it is tempting to speculate that these changes might represent a compensatory mechanism to modulate increased epithelial permeability due to the disruption of the TJ transmembrane proteins in infected animals.

In summary, the present study reveals that CTMCs are also a significant component of the response to *T. spiralis* infection in rats. There is a differential time profile in the infiltration of MMC and CTMCs and in the expression of MC serine proteinases in the rat jejunum after *T. spiralis* infection. Mucosal and muscular MC infiltrates might be active components in the epithelial and motor defensive responses generated against the infection. We also show that long-lasting postinfectious increases in intestinal permeability probably reflect a dysregulation in the expression of TJ transmembrane proteins, which at least partially, might be associated to the effects of MMCs-derived proteinases. From a translational point of view, these observations suggest that MC proteinases and TJs represent potential pharmacological targets for the treatment of inflammatory and functional gastrointestinal disorders.



## **Acknowledgements and Grants**

A. Acosta, F. Jardí, M. Aguilera, J. Estévez and S. Bartolomé are thanked for their assistance.

This study was supported by grants 2009SGR708 from the Generalitat de Catalunya, and BFU2009-08229 and BFU2010-15401 from *Ministerio de Ciencia e Innovación*. J.A. F.-B. personal support: FPU program (AP2007–01619) from *Ministerio de Ciencia e Innovación*.

## **Author Contributions**

J.A. F.-B. designed and performed experiments, analyzed data and wrote the paper. V. M. designed and performed experiments and wrote the paper. P.V. designed experiments and wrote the paper.

## **Competing interests**

The authors have no competing interests.



## References

1. Guilarte M, Santos J, de Torres I, et al. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut*. 2007;56(2):203-209.
2. He SH. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2004;10(3):309-318.
3. Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004;20 Suppl 2:1-9.
4. Keita AV, Soderholm JD. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22(7):718-733.
5. Miller HR, Pemberton AD. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology*. 2002;105(4):375-390.
6. Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S. Mast cell proteases. *Adv Immunol*. 2007;95:167-255.
7. Scudamore CL, Thornton EM, McMillan L, Newlands GF, Miller HR. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J Exp Med*. 1995;182(6):1871-1881.
8. Scudamore CL, Jepson MA, Hirst BH, Miller HR. The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *Eur J Cell Biol*. 1998;75(4):321-330.
9. Groschwitz KR, Ahrens R, Osterfeld H, et al. Mast cells regulate homeostatic intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(52):22381-22386.
10. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7761-7766.
11. Cenac N, Coelho AM, Nguyen C, et al. Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *Am J Pathol*. 2002;161(5):1903-1915.
12. Bueno L, Fioramonti J. Protease-activated receptor 2 and gut permeability: A review. *Neurogastroenterol Motil*. 2008;20(6):580-587.
13. Martinez-Augustin O, Romero-Calvo I, Suarez MD, Zarzuelo A, de Medina FS. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(1):114-127.

14. Fernandez-Blanco JA, Barbosa S, Sanchez de Medina F, Martinez V, Vergara P. Persistent epithelial barrier alterations in a rat model of postinfectious gut dysfunction. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(11):e523-33.
15. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, et al. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut.* 2009;58(8):1091-1103.
16. Castro GA, Fairbairn D. Carbohydrates and lipids in trichinella spiralis larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol.* 1969;55(1):51-58.
17. Serna H, Porras M, Vergara P. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental trichinella spiralis inflammation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1104-1111.
18. Torrents D, Vergara P. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;279(3):G543-51.
19. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108.
20. Tanovic A, Jimenez M, Fernandez E. Changes in the inhibitory responses to electrical field stimulation of intestinal smooth muscle from trichinella spiralis infected rats. *Life Sci.* 2002;71(26):3121-3136.
21. McDermott JR, Bartram RE, Knight PA, Miller HR, Garrod DR, Grecis RK. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7761-7766.
22. Stewart GL, Na H, Smart L, Seelig LL, Jr. The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with trichinella spiralis. *Parasitol Res.* 1999;85(8-9):672-677.
23. Suzuki T, Sasaki T, Takagi H, Sato K, Ueda K. The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, trichinella spiralis, expulsion in rats. *Parasitol Res.* 2008;103(6):1289-1295.
24. Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1987;82(3-4):244-248.
25. MacDonald AJ, Pick J, Bissonnette EY, Befus AD. Rat mucosal mast cells: The cultured bone marrow-derived mast cell is biochemically and functionally analogous to its counterpart in vivo. *Immunology.* 1998;93(4):533-539.
26. Pennock JL, Grecis RK. In vivo exit of c-kit+/CD49d(hi)/beta7+ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode trichinella spiralis. *Blood.* 2004;103(7):2655-2660.

27. Friend DS, Ghildyal N, Gurish MF, et al. Reversible expression of tryptases and chymases in the jejunal mast cells of mice infected with trichinella spiralis. *J Immunol.* 1998;160(11):5537-5545.
28. Hyland NP, Julio-Pieper M, O'Mahony SM, et al. A distinct subset of submucosal mast cells undergoes hyperplasia following neonatal maternal separation: A role in visceral hypersensitivity? *Gut.* 2009;58(7):1029-30; author reply 1030-1.
29. Kruger PG, Huntley JF, MacKellar A, Roli J, Newlands GF. Mast cell and mast cell granule phenotypes in normal and nippostrongylus-infected rats. A qualitative laser confocal microscopic study. *APMIS.* 1997;105(3):229-237.
30. Friend DS, Ghildyal N, Austen KF, Gurish MF, Matsumoto R, Stevens RL. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with trichinella spiralis exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J Cell Biol.* 1996;135(1):279-290.
31. Lutzelschwab C, Lunderius C, Enerback L, Hellman L. A kinetic analysis of the expression of mast cell protease mRNA in the intestines of nippostrongylus brasiliensis-infected rats. *Eur J Immunol.* 1998;28(11):3730-3737.
32. Knight PA, Wright SH, Lawrence CE, Paterson YY, Miller HR. Delayed expulsion of the nematode trichinella spiralis in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J Exp Med.* 2000;192(12):1849-1856.
33. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest.* 2005;85(9):1139-1162.
34. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active crohn's disease. *Gut.* 2007;56(1):61-72.
35. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2001-2009.
36. Martinez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: An organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut.* 2012.



## DISCUSIÓN GENERAL

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y el síndrome del intestino irritable (IBS) agrupan un conjunto de desórdenes inflamatorios y funcionales crónicos del tracto gastrointestinal con una etiopatogenia en gran parte desconocida (Khor et al. 2011, Rijniense et al. 2007, Ohman and Simren 2010). Sin embargo, estudios recientes demuestran la existencia de mecanismos fisiopatológicos comunes en ambas enfermedades, como son las alteraciones de la función barrera epitelial y de la respuesta inmune local (Keita and Soderholm 2010, Long and Drossman 2010, Hering et al. 2012). Esto ha llevado a sugerir que el IBD y el IBS podrían tratarse de distintas manifestaciones clínicas de un mismo proceso (Long and Drossman 2010).

Concretamente, los mastocitos (MCs) parecen ser uno de los agentes comunes implicados en la fisiopatología de estas enfermedades. De hecho, en el intestino de estos pacientes se observan aumentos tanto del número como de la actividad de estas células (Rijniense et al. 2007, Barbara et al. 2004, Guilarte et al. 2007, He 2004). El reclutamiento y la activación mastocitarios estarían propiciados por un incremento de la permeabilidad intestinal, al mismo tiempo que los MCs serían capaces de modular por ellos mismos la función barrera epitelial (Keita and Soderholm 2010, McDermott et al. 2003, Groschwitz et al. 2009, Hering et al. 2012). Por esta razón, la hipótesis de este trabajo ha sido que los MCs podrían jugar un papel relevante en los fenómenos que conducen a la autoperpetuación y cronificación de las disfunciones de la barrera epitelial asociadas a estas enfermedades.

Teniendo en cuenta estas premisas, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar las posibles alteraciones de la función barrera epitelial y su interrelación con la actividad mastocitaria en un modelo animal de disfunción intestinal. Concretamente, se empleó un modelo inducido por la parasitosis por *Trichinella spiralis* en la rata. Este modelo está asociado a un incremento en el número y la actividad de los MCs intestinales, los cuales participan en las alteraciones funcionales post-infecciosas (Serna et al. 2006, McDermott et al. 2003), tal y como se sugiere que tendría lugar en los

pacientes de IBD e IBS (Rijnierse et al. 2007, He 2004). En nuestro caso, se realizaron estudios tanto en la fase intestinal del proceso (que concluye alrededor del día 15 post-infección), en que el parásito se localiza en los enterocitos, como en la fase muscular, tras la expulsión de los nematodos intestinales (Mitreva and Jasmer 2006, Suzuki et al. 2008, Stewart et al. 1999). De este modo, se pudieron investigar las posibles causas de la perpetuación de las alteraciones intestinales tras un proceso infeccioso, tal y como sucede en el caso del IBS post-infeccioso (PI-IBS) (Spiller and Garsed 2009).

### ***La Parasitosis por *T. spiralis* Induce un Infiltrado Mastocitario que Evoluciona en el Tiempo***

En función de su localización y de los mediadores contenidos en sus gránulos, en el caso de los roedores, los MCs se diferencian en dos grupos: los de mucosa (*mucosal MCs*, MMCs) y los de tejido conectivo (*connective tissue MCs*, CTMCs). A nivel intestinal, los MMC se encuentran predominantemente en el epitelio y la lámina propia mientras que los CTMC se sitúan principalmente en la submucosa y la serosa. Además, MMCs y CTMCs pueden diferenciarse por las serinproteinasas que expresan. Los MMCs únicamente expresan quimasas [proteinasas mastocitarias de rata (rMCPs) 2, 3, 4, 8, 9, y 10] mientras que los CTMCs expresan tanto quimasas (rMCP-1 y -5) como triptasas (rMCP-6, -7) (Krishnaswamy and Chi 2006, Pejler et al. 2007, Pejler et al. 2010).

Como era de esperar, tras la parasitosis por *T. spiralis*, se produjo una hiperplasia de los MMCs (positivos para la rMCP-2) (Serna et al. 2006). Los estudios de expresión génica mostraron que antes del inicio de la hiperplasia se produce un aumento en la expresión de los genes asociados a proteinasas mastocitarias. Esto sugiere que la infiltración mastocitaria se origina a partir de una activación de los MCs residentes en la lámina propia y la submucosa. Este proceso, en fases tempranas de la parasitosis, podría estar ligado a la presencia del parásito en la mucosa y representar, por tanto, un mecanismo de tipo defensivo frente a la parasitosis (McDermott et al. 2003, Knight et al. 2000). En fases más tardías del proceso, cuando el parásito se ha eliminado, se presenta una hiperplasia de los CTMCs, que característicamente se localizan en las capas de músculo y en la serosa. Es interesante destacar que en esta fase se observaron también



MCs con características fenotípicas de MMCs infiltrando el músculo. Esto podría deberse a la migración hacia la musculatura lisa de MCs inmaduros que expresen rMCP-2 (MacDonald et al. 1998), al igual que los MMC maduros, durante las fases post-infecciosas. Este fenómeno se vería favorecido por la estimulación de la producción de MCs inmaduros en la médula ósea y su posterior migración por la circulación periférica hacia el tejido diana, donde terminarán su maduración (Pennock and Grecis 2004). Por lo tanto, es posible que los MCs que infiltran las capas musculares presenten características fenotípicas intermedias durante el proceso de diferenciación (Friend et al. 1996, Friend et al. 1998, Kitamura et al. 1987). Los cambios resultantes en las poblaciones mastocitarias podrían participar en la remodelación neuromuscular y en las respuestas funcionales anómalas que tienen lugar tanto en la fase de expulsión del parásito como en fases posteriores (Serna et al. 2006, Barbara et al. 1997, Kalia et al. 2008, Torrents and Vergara 2000).

Hay que destacar que las hiperplasias mastocitarias, una vez originadas, perduran en el tiempo. Esto sugiere que existen mecanismos de autoperpetuación que implicarían una persistencia de los MCs en el tejido y, por lo tanto, de las alteraciones funcionales derivadas de los mismos. Si bien el mecanismo de perpetuación no se conoce con exactitud, se ha sugerido que los mediadores liberados tras la activación de los MCs, incluidas las proteinasas, pueden a su vez activar otros MCs (He 2004). Esto haría posible que se generase una cascada de retroalimentación positiva, favoreciendo su activación sostenida a lo largo del tiempo. Este fenómeno podría explicar la perpetuación de la hiperplasia mastocitaria intestinal y el estado tónico de activación de los MCs, demostrado por los altos niveles locales y sistémicos de rMCP-2, que se observa en nuestro modelo. Desde el punto de vista traslacional, fenómenos similares podrían tener lugar en los procesos inflamatorios intestinales y en el IBS (Rijnierse et al. 2007, Barbara et al. 2004, Guilarte et al. 2007, He 2004).

### ***La Parasitosis por *T. spiralis* Induce Alteraciones Neuroepiteliales que Condicionan la Permeabilidad y la Secreción Intestinales***

Los MCs, y por extensión los productos derivados de su degranulación, se han implicado directamente en las alteraciones funcionales que se observan en el IBS o la IBD, incluyendo la disfunción de la barrera intestinal (Keita and Soderholm 2010). En este trabajo nos hemos centrado en la caracterización de las repercusiones funcionales derivadas de la parasitosis sobre la función barrera en el yeyuno; haciendo hincapié en la implicación de los MCs. En concreto, se indagó en la participación del epitelio y del sistema nervioso entérico (ENS) en la regulación del transporte hidroelectrolítico y la permeabilidad intestinales, especialmente en la fase crónica del proceso post-infeccioso (día 30 post-infección), por ser la que más se asemeja al estado que se describe en pacientes de IBD en periodo de remisión o de IBS.

En consonancia con otros trabajos, el transporte hidroelectrolítico intestinal se vio alterado tras la parasitosis por *T. spiralis* (Kalia et al. 2008, Venkova and Greenwood-van Meerveld 2006). En primer lugar, se observó un incremento del movimiento de iones hacia el lumen intestinal en condiciones basales, lo cual resultaría de un aumento en la secreción y/o de una disminución en la absorción de fluidos. Al mismo tiempo, el paso de macromoléculas desde el lumen al medio interno, estaba favorecido en los animales parasitados.

Las respuestas secretoras a agonistas específicos pusieron de manifiesto alteraciones post-infecciosas tanto a nivel epitelial como nervioso. En primer lugar, las repuestas secretoras generadas por la adición de serotonina (con y sin bloqueo de la transmisión nerviosa entérica) sugieren alteraciones funcionales en las propias células del epitelio intestinal. En segundo lugar, las respuestas secretoras asociadas a mecanismos nerviosos locales (dependientes probablemente del plexo submucoso, que es el único que se encuentra en las preparaciones empleadas) estaban alteradas, con características diferenciales dependiendo del secretagogo o la vía nerviosa considerada. En conjunto, estas observaciones sugieren que las alteraciones de la función barrera se deben a una remodelación neuroepitelial durante el proceso post-infeccioso. Algunos autores, que han observado cambios similares en pacientes de IBS y en modelos animales, han sugerido que las remodelaciones neuroepiteliales podrían estar asociadas

a los MCs (Keita and Soderholm 2010, Barbara et al. 2004, He 2004). Esto es consistente con la infiltración de MMCs que caracteriza la parasitosis por *T. spiralis* y por el estado de activación que muestran estos MCs, tal y como se ha discutido con anterioridad.

Como se ha mencionado, las alteraciones en el transporte hidroelectrolítico se acompañaron de un incremento sostenido de la permeabilidad intestinal a macromoléculas. Ambos fenómenos podrían estar interrelacionados, ya que la permeabilidad paracelular condiciona el movimiento transepitelial de iones y, por tanto, de agua (Martinez-Augustin et al. 2009). En la fase intestinal, es posible que este defecto de la permeabilidad se deba a la disrupción epitelial asociada a la presencia del parásito. Sin embargo, en fases post-infecciosas posteriores (día 30 post-infección), otros mecanismos deberían contribuir a esta alteración.

De nuevo, los MCs y sus mediadores se han sugerido como potenciales factores moduladores de la permeabilidad epitelial mediante la inducción de remodelaciones epiteliales (McDermott et al. 2003, Scudamore et al. 1995, Groschwitz et al. 2009). En nuestro caso, se pudo observar una correlación positiva entre la conductancia transepitelial y el número de MCs de mucosa (MMCs) y los niveles locales de la proteinasa mastocitaria de rata (rMCP) 2. Ello, si bien no es concluyente, sugeriría la participación de los MCs en los incrementos de permeabilidad post-infecciosos.

Para determinar la influencia directa de los mediadores mastocitarios sobre la función barrera, se estudiaron los efectos de la activación mastocitaria sobre la secreción y la permeabilidad intestinales *in vitro*. En condiciones basales, la inducción de la degranulación mastocitaria produjo cambios en la actividad secretora intestinal, confirmando una acción directa de los mediadores mastocitarios en la función barrera. Sin embargo, en animales parasitados, con hiperplasia mastocitaria, las respuestas secretoras inducidas por la degranulación mastocitaria estaban disminuidas. Esto podría explicarse por un fenómeno de desensibilización epitelial a los mediadores mastocitarios, debido a una exposición prolongada a los mismos y asociada a un estado permanente de activación celular, tal y como se ha discutido anteriormente (Crowe et al. 1997). De todos modos, no puede descartarse un estado hiposecretor generalizado, algo frecuente en casos de inflamación intestinal (Martinez-Augustin et al. 2009).

### ***Tras la Parasitosis por *T. spiralis* se Producen Alteraciones a Largo plazo en las Uniones Intercelulares del Epitelio Intestinal***

Con la finalidad de conocer mejor el mecanismo por el cual la función barrera intestinal, sobre todo la permeabilidad, se altera durante la parasitación por *T. spiralis*, se valoró la expresión de proteínas de las uniones estrechas (TJs) intercelulares.

En concreto, y especialmente al inicio de la parasitosis, se pudo observar un aumento en la expresión de la proteína formadora de poros claudina 2, acompañado de una disminución de la expresión de claudina 3 y ocludina. Estos cambios están en consonancia con observaciones previas asociadas a procesos de inflamación y disfunción intestinal y contribuirían a incrementar la permeabilidad paracelular (Prasad et al. 2005, Zeissig et al. 2007, Kucharzik et al. 2001, Martinez et al. 2012). Por un lado, la alteraciones en la expresión de las proteínas transmembrana asociadas a la fase aguda post-infecciosa, sugieren una alteración estructural de las TJs. Esta alteración podría persistir a largo plazo y derivar en los incrementos de permeabilidad epitelial asociados a la fase post-infecciosa crónica. Por otra parte, los incrementos de la permeabilidad observados en fases post-infecciosas podrían estar asociados a la disminución sostenida de la expresión de ocludina, proteína que se considera clave en la regulación y la funcionalidad de las uniones estrechas epiteliales (Hering et al. 2012). En cualquier caso, los resultados obtenidos sugieren una modulación a largo plazo de las estructuras que forman las uniones intercelulares como base de los aumentos de permeabilidad epitelial.

Estudios previos muestran que las proteínas celulares implicadas en la formación de las uniones intercelulares son dianas enzimáticas de diferentes proteinasas, entre ellas las derivadas de los MCs (Scudamore et al. 1998). En particular, la ocludina es un sustrato de las proteinasas mastocitarias, a través del cual éstas podrían modular directamente la permeabilidad epitelial (Scudamore et al. 1998). Para demostrar esta acción, se valoró la permeabilidad epitelial durante la degranulación mastocitaria. Este proceso, que resulta en cambios significativos de la secreción, como se discutió anteriormente, no afectó a la permeabilidad, ni en condiciones basales ni en animales con hiperplasia mastocitaria. La falta de efectos en condiciones basales podría deberse a que los incrementos de permeabilidad epitelial dependientes de MCs requieren de una

liberación de mediadores sostenida y prolongada en el tiempo, más que de una acción aguda. Por otro lado, la falta de efectos en animales parasitados, en los que la permeabilidad ya está alterada y los MCs están tónicamente activados, podría reflejar un estado de máxima alteración de la barrera epitelial.

### ***Las Respuestas Secretomotoras Dependientes de la Activación de PAR-2 Están Alteradas tras la Parasitosis por *T. spiralis****

Las quimasas y triptasas mastocitarias tienen la capacidad de actuar como moléculas de señalización a través de los receptores activados por proteinasas de tipo 2 (PAR-2) (Sharma et al. 2007). A nivel gastrointestinal, los receptores PAR-2 desempeñan funciones moduladoras de la barrera epitelial, la motilidad y la sensibilidad. Numerosos estudios indican que su expresión se encuentra alterada durante la inflamación intestinal y que participan en las alteraciones fisiopatológicas que acompañan a la inflamación (Adams et al. 2011, Roka et al. 2008, Kim et al. 2003). Por este motivo, se decidió estudiar si en las fases post-infecciosas estaba afectada la regulación de las funciones secretomotoras intestinales dependiente de PAR-2.

Los resultados obtenidos muestran que la respuesta secretora inducida por la activación de PAR-2 se ve disminuida tras la parasitosis. Este fenómeno se correlaciona con una disminución en la expresión epitelial de los receptores, como sugieren los estudios inmunohistoquímicos realizados así como observaciones en modelos similares (Shea-Donohue et al. 2010). Por otro lado, los agonistas de PAR-2 no afectaron la permeabilidad epitelial paracelular *in vitro*.

Además de estar condicionada por la secreción y la permeabilidad epiteliales, la función barrera está relacionada con la motilidad intestinal. La actividad motora determina el tiempo disponible para el movimiento hidroelectrolítico transepitelial, así como para la interacción y penetración de antígenos y microorganismos lumbales (Barrett 2006, Keita and Soderholm 2010). Por este motivo, nos propusimos explorar la motilidad intestinal basal así como las respuestas motoras inducidas por la activación de PAR-2.

Durante la fase intestinal de la parasitosis, se observó un incremento de la contractilidad intestinal espontánea, lo que indica un aumento en la actividad motora. Estudios morfológicos y funcionales sugieren que esta respuesta se asocia a la hipertrofia de las musculares externas intestinales (Torrents and Vergara 2000). Al mismo tiempo, se alteró transitoriamente (fases tempranas de la parasitosis) el patrón bifásico (relajación seguida de contracción) que caracteriza las respuestas motoras asociadas a la activación del PAR-2. Por lo tanto, sería posible que las proteinasas mastocitarias modulasen la respuesta motora post-infecciosa a través de la activación de este receptor.

En su conjunto, estos estudios muestran que los receptores de tipo PAR-2 pueden estar implicados en las alteraciones secretomotoras que se asocian a la parasitosis por *T. spiralis* y sugieren una implicación similar en alteraciones funcionales e inflamatorias gastrointestinales. Además, puesto que los receptores PAR-2 son susceptibles de activación por proteinasas mastocitarias, este mecanismo puede representar una vía efectora por la que los MCs participen en la fisiopatología de estos procesos.

### ***Las Alteraciones Post-Infecciosas de la Función Barrera y de las Respuestas Asociadas a PAR-2 no se Revierten Mediante el Bloqueo de la Degranulación Mastocitaria***

Como se ha discutido con anterioridad, muchos de los resultados obtenidos sugieren una participación directa de los MCs en las alteraciones funcionales que caracterizan el modelo de parasitosis por *T. spiralis* en la rata. Con la finalidad de obtener evidencias directas de que los cambios funcionales post-infecciosos están asociados a la activación persistente de los MCs, se estudiaron los efectos del tratamiento crónico con ketotifeno, un estabilizador de membrana mastocitaria (Serna et al. 2006), sobre la función barrera epitelial y la motilidad intestinal en condiciones basales y en respuesta a la activación del PAR-2.

La administración preventiva de ketotifeno no influyó en la conductancia epitelial en condiciones basales ni moduló las respuestas secretomotoras inducidas por la activación de PAR-2. Esto descartaría a las proteinasas mastocitarias como agentes efectores de dichas alteraciones funcionales; sugiriendo, por tanto, que otras fuentes de proteinasas

deben participar la modulación de PAR-2 durante el proceso infeccioso. En este sentido, cabe destacar que los propios parásitos producen y liberan al medio grandes cantidades de proteinasas para facilitar su actividad invasiva, siendo los candidatos más plausibles para este proceso (Shea-Donohue et al. 2010, Trap et al. 2006). Por otro lado, el tratamiento con ketotifeno bloqueó parcialmente la hipermotilidad espontánea asociada al modelo. Ello confirmaría tanto la eficacia del fármaco como la participación de los MCs en los cambios motores post-infecciosos. Sin embargo, estos resultados sugieren que, tras la parasitosis, los MCs inducirían la hipermotilidad intestinal por mecanismos independientes de PAR-2 (Serna et al. 2006).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, si bien el ketotifeno revierte parcialmente la hiperplasia mastocitaria tras la parasitosis, el número de MCs y su actividad siguen siendo mayores que en condiciones normales (Serna et al. 2006). Con lo cual, sería factible que los MCs estuviesen directamente implicados en el proceso y aún así no observar una reversión de las alteraciones funcionales durante su bloqueo farmacológico. A fin de descartar totalmente la posibilidad de que los MCs estén implicados en las alteraciones de la función barrera y las respuestas a PAR-2, se debería valorar la necesidad de emplear otras aproximaciones, tales como el uso de animales deficientes en MCs (Santos et al. 2001).

En su conjunto, los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que, en procesos intestinales asociados a alteraciones fisiopatológicas características del IBD y el IBS, se producen infiltrados mastocitarios que evolucionan fenotípicamente en el tiempo. Estos infiltrados mastocitarios podrían estar implicados en las alteraciones de la función barrera resultantes de las remodelaciones neuroepiteliales post-infecciosas. Sin embargo la relación causal no es clara. El proceso de reclutamiento y activación de los MCs no parece representar un mecanismo indispensable para que estas alteraciones se presenten y/o persistan en el tiempo. Procesos similares podrían formar parte de la etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal o del síndrome de intestino irritable; caracterizados por la presencia de disfunciones de la barrera epitelial.





## CONCLUSIONES

1. La parasitosis por *Trichinella spiralis* en la rata induce, a nivel intestinal, un estado de tipo inflamatorio que, en su fase post-infecciosa, genera alteraciones morfofuncionales semejantes a las observadas en el síndrome del intestino irritable; constituyendo por tanto un modelo válido de esta enfermedad.
2. La respuesta a la parasitosis se caracteriza por una hiperplasia persistente de la población mastocitaria yeyunal. Esta hiperplasia presenta una evolución temporal diferenciada según el fenotipo mastocitario considerado: un incremento en el número de mastocitos de mucosa se observa ya en fases tempranas del proceso; mientras que los mastocitos de tejido conectivo, ausentes en condiciones fisiológicas, infiltran las capas musculares con posterioridad.
3. Durante las fases post-infecciosas, tiene lugar una alteración de la función barrera caracterizada por cambios en las respuestas secretoras y un aumento de la permeabilidad transepitelial. Estos cambios coinciden con variaciones en la expresión génica de proteínas asociadas a las uniones estrechas intercelulares y con cambios funcionales neuroepiteliales.
4. Tras la parasitosis, y de forma más severa durante la fase intestinal del proceso, se producen alteraciones en la expresión y la función del receptor activado por proteínasas de tipo 2 (PAR-2). En fases tempranas, la expresión epitelial de PAR-2 se ve reducida, recuperándose posteriormente. Estos cambios se correlacionan con la disminución de las respuestas secretoras asociadas a la activación de este receptor. A pesar de no haberse observado diferencias en la expresión en el plexo mientérico del PAR-2, en fases tempranas, se observa un incremento de la respuesta motora relajatoria inducida por la activación de este receptor.

5. El bloqueo farmacológico con ketotifeno de la degranulación mastocitaria previene parcialmente el estado de hipermotilidad intestinal asociado a la parasitosis, demostrando la implicación de los mastocitos en la disfunción intestinal asociada a este modelo experimental. Sin embargo, el mismo tratamiento no afectó a las alteraciones observadas en la función barrera. Por tanto, el reclutamiento y la activación mastocitaria podrían no ser un mecanismo indispensable en las alteraciones post-infecciosas de la barrera epitelial.

## REFERENCIAS

ADAMS, M.N., RAMACHANDRAN, R., YAU, M.K., SUEN, J.Y., FAIRLIE, D.P., HOLLENBERG, M.D. and HOOPER, J.D., 2011. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 130(3): 248-282.

AL-CHAER, E.D., KAWASAKI, M. and PASRICHA, P.J., 2000. A new model of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development. *Gastroenterology*, 119(5): 1276-1285.

AMASHEH, M., GROTHJANN, I., AMASHEH, S., FROMM, A., SODERHOLM, J.D., ZEITZ, M., FROMM, M. and SCHULZKE, J.D., 2009. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in vitro: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(10): 1226-1235.

ASSIMAKOPOULOS, S.F., PAPAGEORGIOU, I. and CHARONIS, A., 2011. Enterocytes' tight junctions: From molecules to diseases. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2(6): 123-137.

ATKINSON, W., SHELDON, T.A., SHAATH, N. and WHORWELL, P.J., 2004. Food elimination based on IgG antibodies in irritable bowel syndrome: a randomised controlled trial. *Gut*, 53(10): 1459-1464.

BARBARA, G., DE GIORGIO, R., STANGHELLINI, V., CREMON, C., SALVIOLI, B. and CORINALDESI, R., 2004. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 20 Suppl 2: 1-9.

BARBARA, G., VALLANCE, B.A. and COLLINS, S.M., 1997. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology*, 113(4): 1224-1232.

BARREAU, F., CARTIER, C., LEVEQUE, M., FERRIER, L., MORIEZ, R., LAROUTE, V., ROSZTOCZY, A., FIORAMONTI, J. and BUENO, L., 2007. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *The Journal of physiology*, 580(Pt 1): 347-356.

BARREAU, F., SALVADOR-CARTIER, C., HOUDEAU, E., BUENO, L. and FIORAMONTI, J., 2008. Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut*, 57(5): 582-590.

BARRETT, K.E., 2006. *Gastrointestinal Physiology*. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

BARRETT, K.E., 2008. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Advances in Physiology Education*, 32(1): 25-34.

BISCHOFF, S.C., 2007. Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature reviews.Immunology*, 7(2): 93-104.

BOURDU, S., DAPOIGNY, M., CHAPUY, E., ARTIGUE, F., VASSON, M.P., DECHELOTTE, P., BOMMELAER, G., ESCHALIER, A. and ARDID, D., 2005. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology*, 128(7): 1996-2008.

BRADESI, S., MARTINEZ, V., LAO, L., LARSSON, H. and MAYER, E.A., 2009. Involvement of vasopressin 3 receptors in chronic psychological stress-induced visceral hyperalgesia in rats. *American journal of physiology.Gastrointestinal and liver physiology*, 296(2): G302-9.

CADOR, M., COLE, B.J., KOOB, G.F., STINUS, L. and LE MOAL, M., 1993. Central administration of corticotropin releasing factor induces long-term sensitization to D-amphetamine. *Brain research*, 606(2): 181-186.

CAMILLERI, M., MADSEN, K., SPILLER, R., VAN MEERVELD, B.G. and VERNE, G.N., 2012. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(6): 503-512.

CASTRO, G.A. and FAIRBAIRN, D., 1969. Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *The Journal of parasitology*, 55(1): 51-58.

CHALIFOUX, L.V. and BRONSON, R.T., 1981. Colonic adenocarcinoma associated with chronic colitis in cotton top marmosets, *Saguinus oedipus*. *Gastroenterology*, 80(5 pt 1): 942-946.

CLARKE, L.L., 2009. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American journal of physiology.Gastrointestinal and liver physiology*, 296(6): G1151-66.

CROSNIER, C., STAMATAKI, D. and LEWIS, J., 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature reviews.Genetics*, 7(5): 349-359.

CROWE, S.E., LUTHRA, G.K. and PERDUE, M.H., 1997. Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut*, 41(6): 785-792.

DELOOSE, E., JANSSEN, P., DEPOORTERE, I. and TACK, J., 2012. The migrating motor complex: control mechanisms and its role in health and disease. *Nature reviews.Gastroenterology & hepatology*, 9(5): 271-285.

DONALDSON, L.E., SCHMITT, E., HUNTLEY, J.F., NEWLANDS, G.F. and GRENCIS, R.K., 1996. A critical role for stem cell factor and c-kit in host protective immunity to an intestinal helminth. *International immunology*, 8(4): 559-567.

DROSSMAN, D.A., 2006. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology*, 130(5): 1377-1390.

DUNLOP, S.P., JENKINS, D. and SPILLER, R.C., 2003. Distinctive clinical, psychological, and histological features of postinfective irritable bowel syndrome. *The American Journal of Gastroenterology*, 98(7): 1578-1583.

DYE, J.F., LEACH, L., CLARK, P. and FIRTH, J.A., 2001. Cyclic AMP and acidic fibroblast growth factor have opposing effects on tight and adherens junctions in microvascular endothelial cells in vitro. *Microvascular research*, 62(2): 94-113.

ENGEL, D.R., KOSCIELNY, A., WEHNER, S., MAURER, J., SCHIWON, M., FRANKEN, L., SCHUMAK, B., LIMMER, A., SPARWASSER, T., HIRNER, A., KNOLLE, P.A., KALFF, J.C. and KURTS, C., 2010. T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract. *Nature medicine*, 16(12): 1407-1413.

FRIEND, D.S., GHILDYAL, N., AUSTEN, K.F., GURISH, M.F., MATSUMOTO, R. and STEVENS, R.L., 1996. Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *The Journal of cell biology*, 135(1): 279-290.

FRIEND, D.S., GHILDYAL, N., GURISH, M.F., HUNT, J., HU, X., AUSTEN, K.F. and STEVENS, R.L., 1998. Reversible expression of tryptases and chymases in the jejunal mast cells of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(11): 5537-5545.

GALLI, S.J., BORREGAARD, N. and WYNN, T.A., 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature immunology*, 12(11): 1035-1044.

GARTNER, L.P. and HIATT, J.L., 2002. *Texto y atlas de histología*. Madrid: McGraw. Hill-Interamericana.

GIBNEY, S.M., GOSELIN, R.D., DINAN, T.G. and CRYAN, J.F., 2010. Colorectal distension-induced prefrontal cortex activation in the Wistar-Kyoto rat: implications for irritable bowel syndrome. *Neuroscience*, 165(3): 675-683.

GRANGER, D.N., BARROWMAN, J.A. and KVIETYS, P.R., 1985. The small intestine. *Clinical Gastrointestinal Physiology*. Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company: 189.

GREMLICH, H.U., MARTINEZ, V., KNEUER, R., KINZY, W., WEBER, E., PFANNKUCHE, H.J. and RUDIN, M., 2004. Noninvasive assessment of gastric emptying by near-infrared fluorescence reflectance imaging in mice: pharmacological validation with tegaserod, cisapride, and clonidine. *Molecular imaging*, 3(4): 303-311.

GROSCWITZ, K.R., AHRENS, R., OSTERFELD, H., GURISH, M.F., HAN, X., ABRINK, M., FINKELMAN, F.D., PEJLER, G. and HOGAN, S.P., 2009. Mast cells regulate homeostatic

intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52): 22381-22386.

GRUNDY, D., AL-CHAER, E.D., AZIZ, Q., COLLINS, S.M., KE, M., TACHE, Y. and WOOD, J.D., 2006. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology*, 130(5): 1391-1411.

GUILARTE, M., SANTOS, J., DE TORRES, I., ALONSO, C., VICARIO, M., RAMOS, L., MARTINEZ, C., CASELLAS, F., SAPERAS, E. and MALAGELADA, J.R., 2007. Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut*, 56(2): 203-209.

GWEE, K.A., COLLINS, S.M., READ, N.W., RAJNAKOVA, A., DENG, Y., GRAHAM, J.C., MCKENDRICK, M.W. and MOOCHHALA, S.M., 2003. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut*, 52(4): 523-526.

HALVORSON, H.A., SCHLETT, C.D. and RIDDLE, M.S., 2006. Postinfectious irritable bowel syndrome--a meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(8): 1894-9; quiz 1942.

HASALA, H., MALM-ERJEFALT, M., ERJEFALT, J., GIEMBYCZ, M.A., ZHANG, X., MOILANEN, E. and KANKAANRANTA, H., 2005. Ketotifen induces primary necrosis of human eosinophils. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21(4): 318-327.

HE, S.H., 2004. Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, 10(3): 309-318.

HELLER, F., FLORIAN, P., BOJARSKI, C., RICHTER, J., CHRIST, M., HILLENBRAND, B., MANKERTZ, J., GITTER, A.H., BURGEL, N., FROMM, M., ZEITZ, M., FUSS, I., STROBER, W. and SCHULZKE, J.D., 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129(2): 550-564.

HERING, N.A., FROMM, M. and SCHULZKE, J.D., 2012. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *The Journal of physiology*, 590(Pt 5): 1035-1044.

HOFFMAN, J.M., BROOKS, E.M. and MAWE, G.M., 2010. Gastrointestinal Motility Monitor (GIMM). *Journal of visualized experiments : JoVE*, (46). pii: 2435. doi(46): 10.3791/2435.

ISGAR, B., HARMAN, M., KAYE, M.D. and WHORWELL, P.J., 1983. Symptoms of irritable bowel syndrome in ulcerative colitis in remission. *Gut*, 24(3): 190-192.

ISOZAKI, Y., YOSHIDA, N., KURODA, M., HANDA, O., TAKAGI, T., KOKURA, S., ICHIKAWA, H., NAITO, Y., OKANOUE, T. and YOSHIKAWA, T., 2006. Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 41(8): 944-953.

JORGE, E., FERNANDEZ, J.A., TORRES, R., VERGARA, P. and MARTIN, M.T., 2010. Functional changes induced by psychological stress are not enough to cause intestinal inflammation in Sprague-Dawley rats. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(8): e241-50.

KALESNIKOFF, J. and GALLI, S.J., 2008. New developments in mast cell biology. *Nature immunology*, 9(11): 1215-1223.

KALIA, N., HARDCASTLE, J., KEATING, C., GRASA, L., KEATING, C., PELEGRIN, P., BARDHAN, K.D. and GRUNDY, D., 2008. Intestinal secretory and absorptive function in *Trichinella spiralis* mouse model of postinfective gut dysfunction: role of bile acids. *Gut*, 57(1): 41-49.

KEATING, C., MARTINEZ, V., EWART, L., GIBBONS, S., GRUNDY, L., VALENTIN, J.P. and GRUNDY, D., 2010. The validation of an in vitro colonic motility assay as a biomarker for gastrointestinal adverse drug reactions. *Toxicology and applied pharmacology*, 245(3): 299-309.

KEITA, A.V. and SODERHOLM, J.D., 2010. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(7): 718-733.

KESZTHELYI, D., TROOST, F.J., SIMREN, M., LUDIDI, S., KRUIJMEL, J.W., CONCHILLO, J.M. and MASCLÉE, A.A., 2012. Revisiting concepts of visceral nociception in irritable bowel syndrome. *European journal of pain (London, England)*, .

KHOR, B., GARDET, A. and XAVIER, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351): 307-317.

KIM, J.A., CHOI, S.C., YUN, K.J., KIM, D.K., HAN, M.K., SEO, G.S., YEOM, J.J., KIM, T.H., NAH, Y.H. and LEE, Y.M., 2003. Expression of protease-activated receptor 2 in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 9(4): 224-229.

KITAMURA, Y., KANAKURA, Y., SONODA, S., ASAI, H. and NAKANO, T., 1987. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cells. *International archives of allergy and applied immunology*, 82(3-4): 244-248.

KITAMURA, Y., OBOKI, K. and ITO, A., 2006. Molecular mechanisms of mast cell development. *Immunology and allergy clinics of North America*, 26(3): 387-405; v.

KLOOKER, T.K., BRAAK, B., KOOPMAN, K.E., WELTING, O., WOUTERS, M.M., VAN DER HEIDE, S., SCHEMANN, M., BISCHOFF, S.C., VAN DEN WIJNGAARD, R.M. and BOECKXSTAENS, G.E., 2010. The mast cell stabiliser ketotifen decreases visceral

hypersensitivity and improves intestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Gut*, 59(9): 1213-1221.

KNIGHT, P.A., WRIGHT, S.H., LAWRENCE, C.E., PATERSON, Y.Y. and MILLER, H.R., 2000. Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *The Journal of experimental medicine*, 192(12): 1849-1856.

KRISHNASWAMY, G. and CHI, D.S., 2006. *Mast Cells: Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.

KUCHARZIK, T., WALSH, S.V., CHEN, J., PARKOS, C.A. and NUSRAT, A., 2001. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *The American journal of pathology*, 159(6): 2001-2009.

KUNZELMANN, K. and MALL, M., 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews*, 82(1): 245-289.

LAWRENCE, C.E., PATERSON, Y.Y., WRIGHT, S.H., KNIGHT, P.A. and MILLER, H.R., 2004. Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterology*, 127(1): 155-165.

LE FERREC, E., CHESNE, C., ARTUSSON, P., BRAYDEN, D., FABRE, G., GIRES, P., GUILLOU, F., ROUSSET, M., RUBAS, W. and SCARINO, M.L., 2001. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Alternatives to Laboratory Animals : ATLA*, 29(6): 649-668.

LEE, J.W., PARK, J.H., PARK, D.I., PARK, J.H., KIM, H.J., CHO, Y.K., SOHN, C.I., JEON, W.K. and KIM, B.I., 2010. Subjects with diarrhea-predominant IBS have increased rectal permeability responsive to tryptase. *Digestive diseases and sciences*, 55(10): 2922-2928.

LENG, Y.X., WEI, Y.Y., CHEN, H., ZHOU, S.P., YANG, Y.L. and DUAN, L.P., 2010. Alteration of cholinergic and peptidergic neurotransmitters in rat ileum induced by acute stress following transient intestinal infection is mast cell dependent. *Chinese medical journal*, 123(2): 227-233.

LENG, Y.X., WEI, Y.Y., ZHOU, S.P. and DUAN, L.P., 2009. Establishment of irritable bowel syndrome rat model by combination of intestinal infection with *Trichinella spiralis* and acute stress. *Zhonghua yi xue za zhi*, 89(42): 2992-2996.

LONG, M.D. and DROSSMAN, D.A., 2010. Inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome, or what?: A challenge to the functional-organic dichotomy. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(8): 1796-1798.

LONGSTRETH, G.F., THOMPSON, W.G., CHEY, W.D., HOUGHTON, L.A., MEARIN, F. and SPILLER, R.C., 2006. Functional bowel disorders. *Gastroenterology*, 130(5): 1480-1491.



MACDONALD, A.J., PICK, J., BISSONNETTE, E.Y. and BEFUS, A.D., 1998. Rat mucosal mast cells: the cultured bone marrow-derived mast cell is biochemically and functionally analogous to its counterpart in vivo. *Immunology*, 93(4): 533-539.

MACDONALD, T.T. and MONTELEONE, G., 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5717): 1920-1925.

MADARA, J.L. and ANDERSON, J.M., 2003. *Textbook of Gastroenterology*. 4 edn. Lippincott Williams & Wilkins.

MADARA, J.L., 1990. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *The American journal of pathology*, 137(6): 1273-1281.

MAKHLOUF, G.M., 1994. Neuromuscular function of the small intestine. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. New York, New York, USA: Raven Press, pp. 997.

MANNING, A.P., THOMPSON, W.G., HEATON, K.W. and MORRIS, A.F., 1978. Towards positive diagnosis of the irritable bowel. *British medical journal*, 2(6138): 653-654.

MARTINEZ, C., LOBO, B., PIGRAU, M., RAMOS, L., GONZALEZ-CASTRO, A.M., ALONSO, C., GUILARTE, M., GUILA, M., DE TORRES, I., AZPIROZ, F., SANTOS, J. and VICARIO, M., 2012. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut*: In press.

MARTINEZ-AUGUSTIN, O., ROMERO-CALVO, I., SUAREZ, M.D., ZARZUELO, A. and DE MEDINA, F.S., 2009. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 15(1): 114-127.

MAYER, E.A. and COLLINS, S.M., 2002. Evolving pathophysiologic models of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology*, 122(7): 2032-2048.

MAYER, L., 2010. Evolving paradigms in the pathogenesis of IBD. *Journal of gastroenterology*, 45(1): 9-16.

MCDERMOTT, J.R., BARTRAM, R.E., KNIGHT, P.A., MILLER, H.R., GARROD, D.R. and GRENCIS, R.K., 2003. Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(13): 7761-7766.

MILLER, H.R. and PEMBERTON, A.D., 2002. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. *Immunology*, 105(4): 375-390.

MITREVA, M. AND JASMER, D.P. Biology and genome of *Trichinella spiralis* (November 23, 2006), WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.124.1, <http://www.wormbook.org>.

MOLODECKY, N.A., SOON, I.S., RABI, D.M., GHALI, W.A., FERRIS, M., CHERNOFF, G., BENCHIMOL, E.I., PANACCIONE, R., GHOSH, S., BARKEMA, H.W. and KAPLAN, G.G., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142(1): 46-54.e42; quiz e30.

MOWAT, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews.Immunology*, 3(4): 331-341.

MULE, F., BAFFI, M.C. and CERRA, M.C., 2002. Dual effect mediated by protease-activated receptors on the mechanical activity of rat colon. *British journal of pharmacology*, 136(3): 367-374.

MUSCH, W., WEGE, A.K., MANNEL, D.N. and HEHLGANS, T., 2008. Generation and characterization of alpha-chymase-Cre transgenic mice. *Genesis (New York, N.Y.: 2000)*, 46(3): 163-166.

NAPOLITANO, L.M., KORUDA, M.J., MEYER, A.A. and BAKER, C.C., 1996. The impact of femur fracture with associated soft tissue injury on immune function and intestinal permeability. *Shock (Augusta, Ga.)*, 5(3): 202-207.

NEWLANDS, G.F., MILLER, H.R., MACKELLAR, A. and GALLI, S.J., 1995. Stem cell factor contributes to intestinal mucosal mast cell hyperplasia in rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis* or *Trichinella spiralis*, but anti-stem cell factor treatment decreases parasite egg production during *N. brasiliensis* infection. *Blood*, 86(5): 1968-1976.

NORRIS, A.A., 1996. Pharmacology of sodium cromoglycate. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 26 Suppl 4: 5-7.

OHMAN, L. and SIMREN, M., 2010. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nature reviews.Gastroenterology & hepatology*, 7(3): 163-173.

PARK, K.S., AHN, S.H., HWANG, J.S., CHO, K.B., CHUNG, W.J., JANG, B.K., KANG, Y.N., KWON, J.H. and KIM, Y.H., 2008. A survey about irritable bowel syndrome in South Korea: prevalence and observable organic abnormalities in IBS patients. *Digestive diseases and sciences*, 53(3): 704-711.

PEJLER, G., ABRINK, M., RINGVALL, M. and WERNERSSON, S., 2007. Mast cell proteases. *Advances in Immunology*, 95: 167-255.

PEJLER, G., RONNBERG, E., WAERN, I. and WERNERSSON, S., 2010. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*, 115(24): 4981-4990.

PENNOCK, J.L. and GRENCIS, R.K., 2004. In vivo exit of c-kit+/CD49d(hi)/beta7+ mucosal mast cell precursors from the bone marrow following infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Blood*, 103(7): 2655-2660.

PIMENTEL, M., CHANG, M., CHOW, E.J., TABIBZADEH, S., KIRIT-KIRIAK, V., TARGAN, S.R. and LIN, H.C., 2000. Identification of a prodromal period in Crohn's disease but not ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(12): 3458-3462.

PIMENTEL, M., CHATTERJEE, S., CHANG, C., LOW, K., SONG, Y., LIU, C., MORALES, W., ALI, L., LEZCANO, S., CONKLIN, J. and FINEGOLD, S., 2008. A new rat model links two contemporary theories in irritable bowel syndrome. *Digestive diseases and sciences*, 53(4): 982-989.

PIZARRO, T.T., ARSENEAU, K.O., BAMIAS, G. and COMINELLI, F., 2003. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends in molecular medicine*, 9(5): 218-222.

PORRAS, M., MARTIN, M.T., SOLER, M. and VERGARA, P., 2004. Intestinal motor disorders associated with cyclical bacterial overgrowth in a rat model of enteritis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287(1): G58-64.

PORRAS, M., MARTIN, M.T., TERAN, E., MOURELLE, M. and VERGARA, P., 2008. The nitric oxide donor LA-419 [S-(6-Nitro-oxi-hexahydro-furo[3,2-b]furan-3-1-il)thioacetate] prevents intestinal dysmotility, bacterial translocation, and inflammation in a rat model of enteritis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324(2): 740-748.

PORRAS, M., MARTIN, M.T., YANG, P.C., JURY, J., PERDUE, M.H. and VERGARA, P., 2006. Correlation between cyclical epithelial barrier dysfunction and bacterial translocation in the relapses of intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*, 12(9): 843-852.

PRASAD, S., MINGRINO, R., KAUKINEN, K., HAYES, K.L., POWELL, R.M., MACDONALD, T.T. and COLLINS, J.E., 2005. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 85(9): 1139-1162.

QIN, H.Y., WU, J.C., TONG, X.D., SUNG, J.J., XU, H.X. and BIAN, Z.X., 2011. Systematic review of animal models of post-infectious/post-inflammatory irritable bowel syndrome. *Journal of gastroenterology*, 46(2): 164-174.

RIEGLER, M. and MATTHEWS, J.B., 2001. Models of Intestinal Secretion and Absorption. In: ., ed, San Diego, CA, USA: Academic Press, pp. 533.

RIJNIERSE, A., KOSTER, A.S., NIJKAMP, F.P. and KRANEVELD, A.D., 2006. TNF-alpha is crucial for the development of mast cell-dependent colitis in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 291(5): G969-76.

RIJNIERSE, A., NIJKAMP, F.P. and KRANEVELD, A.D., 2007. Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacology & therapeutics*, 116(2): 207-235.

RODRIGUEZ, L.A. and RUIGOMEZ, A., 1999. Increased risk of irritable bowel syndrome after bacterial gastroenteritis: cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 318(7183): 565-566.

ROKA, R., AIT-BELGNAOUI, A., SALVADOR-CARTIER, C., GARCIA-VILLAR, R., FIORAMONTI, J., EUTAMENE, H. and BUENO, L., 2007. Dexamethasone prevents visceral hyperalgesia but not colonic permeability increase induced by luminal protease-activated receptor-2 agonist in rats. *Gut*, 56(8): 1072-1078.

ROKA, R., WITTMANN, T. and BUENO, L., 2008. Altered protease signalling in the gut: a novel pathophysiological factor in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 20(8): 853-856.

SAAVEDRA, Y. and VERGARA, P., 2005. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17(1): 112-122.

SANDS, B.E., ANDERSON, F.H., BERNSTEIN, C.N., CHEY, W.Y., FEAGAN, B.G., FEDORAK, R.N., KAMM, M.A., KORZENIK, J.R., LASHNER, B.A., ONKEN, J.E., RACHMILEWITZ, D., RUTGEERTS, P., WILD, G., WOLF, D.C., MARSTERS, P.A., TRAVERS, S.B., BLANK, M.A. and VAN DEVENTER, S.J., 2004. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *The New England journal of medicine*, 350(9): 876-885.

SANTOS, J., ALONSO, C., GUILARTE, M., VICARIO, M. and MALAGELADA, J.R., 2006. Targeting mast cells in the treatment of functional gastrointestinal disorders. *Current opinion in pharmacology*, 6(6): 541-546.

SANTOS, J., YANG, P.C., SODERHOLM, J.D., BENJAMIN, M. and PERDUE, M.H., 2001. Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*, 48(5): 630-636.

SATO, I., MUNAKATA, M. and IINUMA, K., 2005. Histamine H1 antagonists block M-currents in dissociated rat cortical neurons. *Brain research*, 1057(1-2): 81-87.

SCHMITZ, H., FROMM, M., BENTZEL, C.J., SCHOLZ, P., DETJEN, K., MANKERTZ, J., BODE, H., EPPLE, H.J., RIECKEN, E.O. and SCHULZKE, J.D., 1999. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *Journal of cell science*, 112 ( Pt 1)(Pt 1): 137-146.

SCHOLTEN, J., HARTMANN, K., GERBAULET, A., KRIEG, T., MULLER, W., TESTA, G. and ROERS, A., 2008. Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic research*, 17(2): 307-315.

SCOTT, R.B. and MARIC, M., 1993. Mediation of anaphylaxis-induced jejunal circular smooth muscle contraction in rats. *Digestive diseases and sciences*, 38(3): 396-402.

SCUDAMORE, C.L., JEPSON, M.A., HIRST, B.H. and MILLER, H.R., 1998. The rat mucosal mast cell chymase, RMCP-II, alters epithelial cell monolayer permeability in association with altered distribution of the tight junction proteins ZO-1 and occludin. *European journal of cell biology*, 75(4): 321-330.

SCUDAMORE, C.L., THORNTON, E.M., MCMILLAN, L., NEWLANDS, G.F. and MILLER, H.R., 1995. Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *The Journal of experimental medicine*, 182(6): 1871-1881.

SERNA, H., PORRAS, M. and VERGARA, P., 2006. Mast cell stabilizer ketotifen [4-(1-methyl-4-piperidylidene)-4h-benzo[4,5]cyclohepta[1,2-b]thiophen-10(9H)-one fumarate] prevents mucosal mast cell hyperplasia and intestinal dysmotility in experimental *Trichinella spiralis* inflammation in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 319(3): 1104-1111.

SHARMA, R., PRASAD, V., MCCARTHY, E.T., SAVIN, V.J., DILEEPAN, K.N., STECHSCHULTE, D.J., LIANOS, E., WIEGMANN, T. and SHARMA, M., 2007. Chymase increases glomerular albumin permeability via protease-activated receptor-2. *Molecular and cellular biochemistry*, 297(1-2): 161-169.

SHEA-DONOHUE, T., NOTARI, L., STILTZ, J., SUN, R., MADDEN, K.B., URBAN, J.F., JR and ZHAO, A., 2010. Role of enteric nerves in immune-mediated changes in protease-activated receptor 2 effects on gut function. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(10): 1138-e291.

SHEN, L., WEBER, C.R., RALEIGH, D.R., YU, D. and TURNER, J.R., 2011. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annual Review of Physiology*, 73: 283-309.

SHIN, K., WATTS, G.F., OETTGEN, H.C., FRIEND, D.S., PEMBERTON, A.D., GURISH, M.F. and LEE, D.M., 2008. Mouse mast cell tryptase mMCP-6 is a critical link between adaptive and innate immunity in the chronic phase of *Trichinella spiralis* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(7): 4885-4891.

SNOEK, S.A., DHAWAN, S., VAN BREE, S.H., CAILOTTO, C., VAN DIEST, S.A., DUARTE, J.M., STANISOR, O.I., HILBERS, F.W., NIJHUIS, L., KOEMAN, A., VAN DEN WIJNGAARD, R.M., ZUURBIER, C.J., BOECKXSTAENS, G.E. and DE JONGE, W.J., 2012. Mast cells trigger epithelial barrier dysfunction, bacterial translocation and postoperative ileus in a mouse model. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(2): 172-e91.

SOYTURK, M., AKPINAR, H., GURLER, O., POZIO, E., SARI, I., AKAR, S., AKARSU, M., BIRLIK, M., ONEN, F. and AKKOC, N., 2007. Irritable bowel syndrome in persons who acquired trichinellosis. *The American Journal of Gastroenterology*, 102(5): 1064-1069.

SPILLER, R. and GARSEED, K., 2009. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 136(6): 1979-1988.

SPILLER, R.C., JENKINS, D., THORNLEY, J.P., HEBDEN, J.M., WRIGHT, T., SKINNER, M. and NEAL, K.R., 2000. Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut*, 47(6): 804-811.

STEWART, G.L., NA, H., SMART, L. and SEELIG, L.L.,JR, 1999. The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *Trichinella spiralis*. *Parasitology research*, 85(8-9): 672-677.

SUZUKI, T., ISHII, A., KINO, H., MUREGI, F.W., TAKABAYASHI, S., NISHIKAWA, T., TAKAGI, H. and TERADA, M., 2006. Chromosomal mapping of host resistance loci to *Trichinella spiralis* nematode infection in rats. *Immunogenetics*, 58(1): 26-30.

SUZUKI, T., SASAKI, T., TAKAGI, H., SATO, K. and UEDA, K., 2008. The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. *Parasitology research*, 103(6): 1289-1295.

TAKAKI, M., 2003. Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *Journal of smooth muscle research = Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*, 39(5): 137-161.

TANAKA, Y., KANAZAWA, M., FUKUDO, S. and DROSSMAN, D.A., 2011. Biopsychosocial model of irritable bowel syndrome. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 17(2): 131-139.

THABANE, M., KOTTACHCHI, D.T. and MARSHALL, J.K., 2007. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prognosis of post-infectious irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(4): 535-544.

THOMPSON, W.G., LONGSTRETH, G.F., DROSSMAN, D.A., HEATON, K.W., IRVINE, E.J. and MULLER-LISSNER, S.A., 1999. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut*, 45 Suppl 2: II43-7.

TORRENTS, D. and VERGARA, P., 2000. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 279(3): G543-51.

TRAP, C., FU, B., LE GUERHIER, F., LIU, M., LE RHUN, D., ROMAND, T., PERRET, C., BLAGA, R. and BOIREAU, P., 2006. Cloning and analysis of a cDNA encoding a putative serine protease comprising two trypsin-like domains of *Trichinella spiralis*. *Parasitology research*, 98(4): 288-294.

TRAVER, E., TORRES, R., DE MORA, F. and VERGARA, P., 2010. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(1): e34-43.

TREMAINE, W.J., BRZEZINSKI, A., KATZ, J.A., WOLF, D.C., FLEMING, T.J., MORDENTI, J., STRENKOSKI-NIX, L.C., KURTH, M.C. and AXYS ULCERATIVE COLITIS STUDY GROUP, 2002.

Treatment of mildly to moderately active ulcerative colitis with a tryptase inhibitor (APC 2059): an open-label pilot study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 16(3): 407-413.

TSAI, M., TAKEISHI, T., THOMPSON, H., LANGLEY, K.E., ZSEBO, K.M., METCALFE, D.D., GEISLER, E.N. and GALLI, S.J., 1991. Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(14): 6382-6386.

TURNER, H., DEL CARMEN, K.A. and STOKES, A., 2007. Link between TRPV channels and mast cell function. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (179)(179): 457-471.

VALLANCE, B.A., BLENNERHASSETT, P.A. and COLLINS, S.M., 1997. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *The American Journal of Physiology*, 272(2 Pt 1): G321-7.

VENKOVA, K. and GREENWOOD-VAN MEERVELD, B., 2006. Long-lasting changes in small intestinal transport following the recovery from *Trichinella spiralis* infection. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 18(3): 234-242.

VERGNOLLE, N., 2005. Clinical relevance of proteinase activated receptors (pars) in the gut. *Gut*, 54(6): 867-874.

VERGNOLLE, N., MACNAUGHTON, W.K., AL-ANI, B., SAIFEDDINE, M., WALLACE, J.L. and HOLLENBERG, M.D., 1998. Proteinase-activated receptor 2 (PAR2)-activating peptides: identification of a receptor distinct from PAR2 that regulates intestinal transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13): 7766-7771.

VILLANI, A.C., LEMIRE, M., THABANE, M., BELISLE, A., GENEAU, G., GARG, A.X., CLARK, W.F., MOAYYEDI, P., COLLINS, S.M., FRANCHIMONT, D. and MARSHALL, J.K., 2010. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology*, 138(4): 1502-1513.

VIVINUS-NEBOT, M., DAINESE, R., ANTY, R., SAINT-PAUL, M.C., NANO, J.L., GONTHIER, N., MARJOUX, S., FRIN-MATHY, G., BERNARD, G., HEBUTERNE, X., TRAN, A., THEODOROU, V. and PICHE, T., 2012. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *The American Journal of Gastroenterology*, 107(1): 75-81.

WANG, F., SCHWARZ, B.T., GRAHAM, W.V., WANG, Y., SU, L., CLAYBURGH, D.R., ABRAHAM, C. and TURNER, J.R., 2006. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. *Gastroenterology*, 131(4): 1153-1163.

WINSTON, J., SHENOY, M., MEDLEY, D., NANIWADEKAR, A. and PASRICHA, P.J., 2007. The vanilloid receptor initiates and maintains colonic hypersensitivity induced by neonatal colon irritation in rats. *Gastroenterology*, 132(2): 615-627.

WIRTZ, S. and NEURATH, M.F., 2007. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(11): 1073-1083.

WOUTERS, M.M. and BOECKXSTAENS, G.E., 2011. Neuroimmune mechanisms in functional bowel disorders. *The Netherlands journal of medicine*, 69(2): 55-61.

XU, J.R., LUO, J.Y., SHANG, L. and KONG, W.M., 2006. Effect of change in an inhibitory neurotransmitter of the myenteric plexus on the pathogenetic mechanism of irritable bowel syndrome subgroups in rat models. *Chinese journal of digestive diseases*, 7(2): 89-96.

ZEISSIG, S., BURGEL, N., GUNZEL, D., RICHTER, J., MANKERTZ, J., WAHNSCHAFFE, U., KROESEN, A.J., ZEITZ, M., FROMM, M. and SCHULZKE, J.D., 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56(1): 61-72.

ZHANG, M., LEUNG, F.P., HUANG, Y. and BIAN, Z.X., 2010. Increased colonic motility in a rat model of irritable bowel syndrome is associated with up-regulation of L-type calcium channels in colonic smooth muscle cells. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 22(5): e162-70.



## PUBLICACIONES Y PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

En forma de artículos publicados o en fase de revisión:

- J. A. Fernández-Blanco, S. Barbosa, F. Sánchez de Medina, V. Martínez & P. Vergara. Persistent Epithelial Barrier Alterations in a Rat Model of Postinfectious Gut Dysfunction. *Neurogastroenterology and Motility* 2011; 23(11):e523-33.
- J. A. Fernández-Blanco, M.D. Hollenberg, V. Martínez and P. Vergara. PAR-2-Mediated Control of Barrier Function and Motility Differs Between Early and Late Phases of Postinfectious Gut Dysfunction in the Rat. *American J Physiol (Gastrointest Liver Physiol)*. En evaluación.

En forma de comunicaciones a congresos:

- J. A. Fernandez-Blanco, F. Jardí, M. D. Hollenberg, V. Martinez, P. Vergara. Differential Effects of PAR-2 Activation on Barrier Function and Motility during Acute and Chronic Inflammation in a Rat Model of Postinfectious Gut Dysfunction. *Gastroenterology* Vol. 142, Issue 5, Supplement 1, Pages S-4-S-5. Digestive Disease Week 2012. 19-22 de mayo de 2012. San Diego, Estados Unidos de América. Comunicación oral.
- J. A. Fernández-Blanco, F. Jardí, T. Shea-Donohue, V. Martínez, P. Vergara. PAR-2: A Feasible Target to Modulate Intestinal Barrier Function and Motility Dysfunctions Related to a Rat Model of Intestinal Nematode Infection. *Woods Hole Immunoparasitology Conference*. 22-25 de abril de 2012. Woods Hole, Estados Unidos de América. Comunicación oral.
- J. A. Fernández-Blanco, V. Martinez, P. Vergara. Remodelling of Epithelial Barrier Function in a Rat Model of Post-Inflammatory Gut Dysfunction with Persistent Mucosal Mast Cell Infiltration. *15th International Congress of Mucosal Immunology (ICMI 2011) Abstract Supplement, W.133: Page 75*. 5-9 de julio 2011. Paris, Francia.
- J. A. Fernandez-Blanco, V. Martinez, P. Vergara. Increased Mast Cell Tryptase Levels and Altered Proteinase-Activated Receptor 2 (PAR-2)-Dependent Control of Epithelial Barrier Function in a Rat Model of Post-Inflammatory Gut Dysfunction. *Gastroenterology* Vol.

140, Issue 1, Supplement, Su 1700. Digestive Disease Week 2011. 7-10 de mayo de 2011. Chicago, Estados Unidos de América.

- J. A. Fernández Blanco, V. Martínez, P. Vergara. Long-lasting Disruption of Epithelial Barrier Function in a Rat Model of Postinfective Irritable Bowel Syndrome. Gut Vol. 59, Supplement 3, Page A134. 18th United European Gastroenterology Week. 23-27 de octubre de 2010. Barcelona, España.
- J. A. Fernández-Blanco, V. Martínez, M. T. Martín, P. Vergara. Persistent Epithelial Barrier Alterations in a Rat model of Post-inflammatory Gut Dysfunction. Gastroenterology Vol. 138, Issue 5, Supplement 1, Page S-623. Digestive Disease Week. 1-5 de mayo de 2010. Nueva Orleans, Estados Unidos de América.