




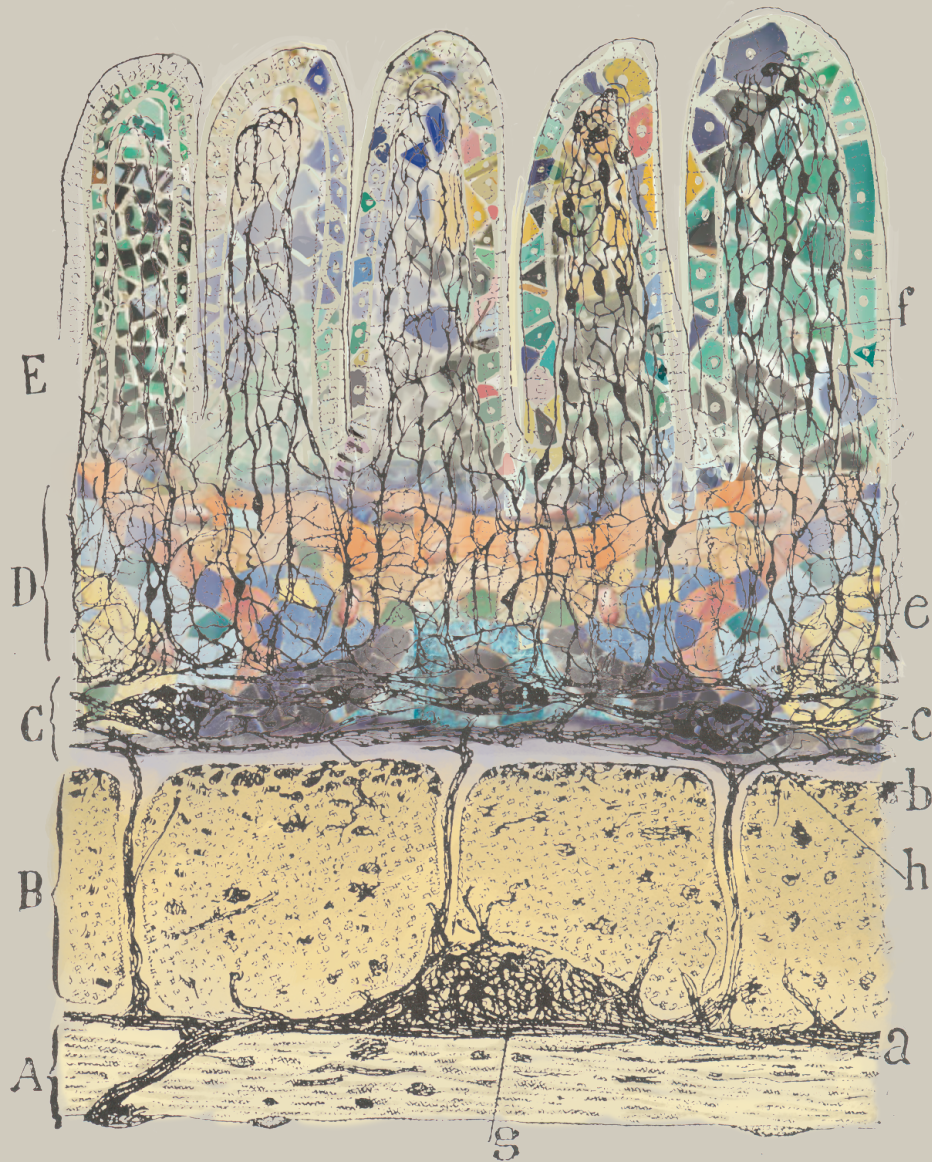


Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Caracterització dels mecanismes neuromotors i neurosecretors en el còlon de porc. Canvis associats a la infecció per *E. coli* i a la socialització durant la lactació

Memòria presentada per
Sara Traserra Call

Programa de doctorat en Immunologia Avançada
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia
Universitat Autònoma de Barcelona
Tesi Doctoral dirigida per Marcel Jiménez i Patrocínio Vergara
Bellaterra, Juliol 2021



Universitat Autònoma
de Barcelona

**Caracterització dels mecanismes neuromotors i neurosecretors
en el còlon de porc. Canvis associats a la infecció per *E. coli* i a la
socialització durant la lactació.**

Memòria presentada per

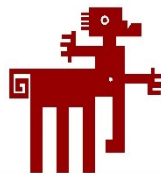
Sara Traserra Call

Per optar al grau de Doctora dins del programa de Doctorat en Immunologia Avançada

Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia

Universitat Autònoma de Barcelona

Dirigida per **Marcel Jiménez Farrerons, Patrocínio Vergara Esteras**



**FACULTAT DE
VETERINÀRIA**

Facultat de Veterinària

Juliol 2021



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

MARCEL JIMÉNEZ FARRERONS, Catedràtic d'Universitat a la Unitat de Fisiologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Veterinària; Universitat Autònoma de Barcelona i **PATROCINIO VERGARA ESTERAS**, Catedràtica d'Universitat a la Unitat de Fisiologia, Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Facultat de Veterinària; Universitat Autònoma de Barcelona

Fem constar que la tesi titulada “Caracterització dels mecanismes neuromotors i neurosecretors en el còlon de porc. Canvis associats a la infecció per *E. coli* i a la socialització durant la lactació” presentada per Sara Traserra Call per optar al grau de Doctora, ha estat realitzada sota la nostra supervisió i autoritzem la presentació per realitzar la seva defensa oral.

I, perquè així consti, signem aquest document,

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) a 14 de juliol 2021

Dr. Marcel Jiménez Farrerons

Dra. Patrocinio Vergara Esteras

La imatge de la portada és una adaptació del *Corte longitudinal del intestino delgado del conejillo de Indias* (figura semi esquemática destinada a presentar la totalidad de los plexos y ganglios del intestino), procedent del llibre *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados* de Santiago Ramón y Cajal (1904). Adaptació gràfica realitzada per Xènia Martínez i Paula Gnf.

A, capa de las fibras musculares longitudinales; B, capa de fibras musculares circulares; C, tejido conjuntivo submucoso, con el plexo y ganglios de Meissner; D, capa de las glándulas de Lieberkühn; E, vellosidades; a, plexo de Auerbach; g, ganglio de Auerbach; b, plexo muscular profundo cortado de través; c, fascículos del plexo de Meissner; e, haces del plexo peri-glandular; f, plexo intraviloso.

A la meva família

M^a Teresa, Martí, Mireia, Rixi

Agraïments

Primer de tot, i d'una manera especial, vull agrair a les persones que han viscut aquest treball de primera mà, els meus directors de tesi. Al Marcel, per tota l'ajuda i dedicació. Sense el teu suport aquest treball no hauria estat possible. A la Patri, per donar-me la oportunitat d'iniciar-me en la investigació i guiar-me durant tots aquests anys. Heu estat un referent de coneixement i dedicació.

També vull agrair al personal de l'Hospital Vall d'Hebron, per la coordinació del teixit. Al personal del SNI BA, Heng-Lun Ko, Mireia Salardigas, Pol Llonch, José Francisco Pérez i, en especial, a la Susana M^a Martín, per contribuir en aquest treball. Al Charles Kennedy, per l'aportació científica. A l'Andrew Hudson, per la revisió del text i al Martí Torrents, per l'ajuda informàtica.

Als companys de departament; A la Sandra, per totes les hores d'experimental juntes i per ensenyar-me tantes coses durant la residència; A la Marina i al Sergio, pel suport i per l'amistat que hem acabat creant; Al Sergi C, per totes les hores al microscopi; A l'Estefanía, per ser la meva companya i amiga, per tot el que hem viscut juntes i per estar al meu costat quan ho he necessitat; A l'Emma i a l'Antonio, per estar sempre disposats a ajudar-me; A la resta de companys/es i professores del departament Glòria, Joan Antoni, Roberto, Laura, Adriana, Sònia, Cristina i Ester; I als companys del tercer pis, Alberto i Sergi L, per acollir-me com una més de nutrició.

He de donar les gràcies, també, a totes les persones que de manera personal m'han acompanyat en aquesta etapa. Amb afecte als meus amics, podollets, la colla d'en Marri, el Tirabol i vetspixurris per ser-hi sempre i animar-me a continuar endavant.

Per últim, vull donar les gràcies a la meva família, M^a Teresa, Martí, Mireia, Rixi, Lluïsa, Joan, Maria i Pere. Sou el motor de la meva vida i sense vosaltres res hagués estat possible.

A tots, moltes gràcies.

Abreviacions

5HT	serotonina o 5-hidroxitriptamina	<i>serotonin or 5-hydroxytryptamine</i>
AB-PAS	blau alcià-PAS	<i>alcian blue-PAS</i>
AC	adenilat ciclase	<i>adenylate cyclase</i>
ACh	acetilcolina	<i>acetylcholine</i>
ACTH	hormona adrenocorticotròpica	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
Ap₄A	diadenosina tetrafosfat	<i>diadenosine tetraphosphate</i>
AU	unitats arbitràries	<i>arbitrary units</i>
AUC	àrea sota la corba	<i>area under the curve</i>
CaCC	canals de clor activats per calci	<i>calcium-activated chloride channels</i>
cAMP	fosfat d'adenosina cíclic	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Cch	carbacol	<i>carbachol</i>
CD	malaltia de Crohn	<i>Crohn's disease</i>
CFTR	canal regulador de la conductància transmembrana de la fibrosis quística	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFU	unitat formadora de colònies	<i>colony-forming unit</i>
cGMP	monofosfat de guanosina cíclic	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
CLDN	claudina	<i>claudin</i>
CO	monòxid de carboni	<i>carbon monoxide</i>
CRF	factor d'alliberament de la corticotropina	<i>corticotropin-releasing factor</i>
CT	toxina del còlera	<i>cholera toxin</i>
CTR	grup control	<i>control treatment</i>
EAST-1	toxina 1 termostable de l' <i>Escherichia coli</i> enteroagregant	<i>Heat-stable toxin 1 of entero- aggregative Escherichia coli</i>
ECL	cèl·lules enterocromafines	<i>enterochromaffin-like cells</i>
EFS	estimulació de camp elèctric	<i>electrical field stimulation</i>
ENR	grup enriquit	<i>enriched treatment</i>
ENS	sistema nerviós entèric	<i>enteric nervous system</i>
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigènic	<i>enterotoxigenic Escherichia coli</i>
FD4	Dextrà isotiocianat de 4kDa marcat amb fluoresceïna	<i>fluorescein isothiocyanate labeled dextran 4kDa</i>
G	conductància	<i>conductance</i>

GC	guanilat ciclasa	<i>guanylate cyclase</i>
GI	gastrointestinal	<i>gastrointestinal</i>
GPCR	receptor acoblat a proteïna G	<i>G protein-coupled receptors</i>
HAPC	contraccions de propagació d'alta amplitud	<i>high-amplitude propagated contractions</i>
HPA	eix hipotalàmic-hipofisiari-suprarenal	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>
IBD	malaltia inflamatòria intestinal	<i>inflammatory bowel disease</i>
IBS	síndrome de l'intestí irritable	<i>irritable bowel syndrome</i>
IBS-C	síndrome de l'intestí irritable - constipació	<i>irritable bowel syndrome - constipation</i>
IBS-D	síndrome de l'intestí irritable - diarrea	<i>irritable bowel syndrome - diarrhoea</i>
IBS-M	síndrome de l'intestí irritable - mixt	<i>irritable bowel syndrome - mixed</i>
ICC	cèl·lules intersticials de Cajal	<i>interstitial cells of Cajal</i>
ICC-IM	cèl·lules intersticials de Cajal intramusculars	<i>intramuscular interstitial cells of Cajal</i>
ICC-MP	cèl·lules intersticials de Cajal properes al MP	<i>myenteric interstitial cells of Cajal</i>
ICC-SEP	cèl·lules intersticials de Cajal septals	<i>septal interstitial cells of Cajal</i>
ICC-SMP	cèl·lules intersticials de Cajal properes al SMP	<i>submuscular interstitial cells of Cajal</i>
ICC-SS	cèl·lules intersticials de Cajal serosals	<i>subserosal interstitial cells of Cajal</i>
IFAN	neurones intestinofugals	<i>intestinofugal afferent neurone</i>
IgA	immunoglobulina A	<i>immunoglobulin A</i>
IJP	potencial post-unió inhibitori	<i>inhibitory junction potential</i>
IJPf	potencial post-unió inhibitori ràpid	<i>fast inhibitory junction potential</i>
IJPs	potencial post-unió inhibitori lent	<i>slow inhibitory junction potential</i>
IL-13	interleuquina 13	<i>interleukin 13</i>
IPANs	neurones aferents intrínseques primàries	<i>intrinsic primary afferent neuron</i>
I_{sc}	current de cortocircuit	<i>short-circuit current</i>
ISP	plexus submucós intern	<i>inner submucosal plexus</i>
JAM	molècules d'adhesió	<i>junctional adhesion molecules</i>

LAPC	contraccions de propagació de baixa amplitud	<i>low-amplitude propagated contractions</i>
LT	toxina termolàbil	<i>heat-labile enterotoxin</i>
MC	mastòcit	<i>mast cell</i>
MP	plexus mientèric o d'Auerbach	<i>myenteric or Auerbach's plexus</i>
NANC	no-adrenèrgic no-colinèrgic	<i>non-adrenergic non-cholinergic</i>
NKA	neuroquinina A	<i>neurokinin A</i>
NNNP	no-nitrèrgic no-purinèrgic	<i>non-nitrgic non-purinergetic</i>
NO	òxid nítric	<i>nitric oxide</i>
NOS	òxid nítric sintasa	<i>nitric oxide synthase</i>
OCLN	occludina	<i>occludin</i>
OSP	plexus submucós extern	<i>outer submucous plexus</i>
PAMPs	patrons moleculars associats a patògens	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PCAP	polipèptid activador de l'adenilat ciclase pituitària	<i>pituitary adenylate cyclase activating polypeptide</i>
PD	diferència de potencial	<i>potential difference</i>
PGE2	prostaglandina E2	<i>prostaglandin E2</i>
PRR	receptors de reconeixement de patrons	<i>pattern recognition receptors</i>
RMP	potencial de membrana en repòs	<i>resting membrane potential</i>
SCFAs	àcids grassos de cadena curta	<i>short-chain fatty acids</i>
SIP	síncit de cèl·lula múscul llis/ICC/cèl·lula PDGFR α +	<i>smooth muscle cells, ICC, and PDGFRα+ cells syncytium</i>
SMP	plexus submucós o de Meissner	<i>submucosal or Meissner's plexus</i>
SPC	contraccions fàsiques espontànies	<i>spontaneous phasic contractions</i>
ST_a	toxina termostable a	<i>heat-stable enterotoxin a</i>
ST_b	toxina termostable b	<i>heat-stable enterotoxin b</i>
SW	ones lentes	<i>slow waves</i>
TEER	resistència transepitelial	<i>transepithelial resistance</i>
TJ	unions estretes	<i>tight junctions</i>
TLR	receptor de tipus Toll	<i>Toll like receptor</i>
TTX	tetrodotoxina	<i>tetrodotoxin</i>
UC	colitis ulcerosa	<i>ulcerative colitis</i>
Ucn	urocortina	<i>urocortin</i>
VIP	pèptid intestinal vasoactiu	<i>vasoactive intestinal peptide</i>

ZO	proteïnes adaptadores de membrana perifèrica	<i>zonula occludens</i>
α-cmt	α -quimotripsina	<i>α-chymotrypsin</i>

ÍNDEX

SUMMARY	1
RESUM	5
INTRODUCCIÓ	9
1. Estructura del còlon	11
2. Sistema nerviós entèric.....	13
3. Funcions del còlon	15
3.1 Funció barrera intestinal.....	15
3.2 Transport hidroelectrolític.....	18
3.3 Motilitat intestinal.....	22
4. Sistema immune intestinal	29
4.1 Mastòcits	29
5. Malalties inflamatòries i funcionals del tracte GI	31
5.1 Rol dels patògens entèrics	32
5.2 Rol de l'estrès	33
Referències.....	35
HIPÒTESI I OBJECTIUS	49
CAPÍTOL 1. Different responses of the blockade of the P2Y₁ receptor with BPTU in human and porcine intestinal tissues and in cell cultures	53
Abstract.....	55
Introduction.....	56
Materials and Methods	57
Cell culture	57
Tissue preparation	57
Ca ²⁺ imaging	59
Mechanical experiments.....	60
Electrophysiological experiments	60
Solutions and drugs	61
Data analysis and statistics	62

Results.....	62
Effect of BPTU on ADP-induced Ca ²⁺ release	62
Effect of BPTU on EFS-induced relaxation	63
Effect of BPTU on IJPF	68
Effect of BPTU on agonists targeting the P2Y ₁ receptor	69
Discussion	71
Bibliography.....	75
CAPÍTOL 2. Characterization of neurosecretory and neuromuscular mechanisms in the pig colon and its impairment after an acute <i>E. coli</i> infection	79
Abstract.....	81
Introduction.....	82
Materials and Methods	83
Animals	83
<i>E. coli</i> infection	83
Solutions and drugs	84
Measurement of electrophysiological parameters	85
Assessment of epithelial permeability	85
Mechanical experiments.....	86
MCs staining and counting	87
Data analysis and statistics	87
Results.....	88
Effect of Cch on colonic secretion and motility	88
Effect of VIP and forskolin on colonic secretion and motility.....	89
Effect of nicotine on colonic secretion and motility	91
Effect of serotonin on colonic secretion and motility.....	93
Effect of histamine on colonic secretion and motility.....	95
Neural evoked mucosal chloride secretion.....	97
Effect of ETEC infection on electrophysiological parameters and epithelial permeability.....	99
Effect of neural blockade on I _{sc}	100
Effect of ETEC infection on muscular excitatory pathway	102
Effect of ETEC infection on colonic MCs	104
Discussion	105
Bibliography.....	111

CAPÍTOL 3. Effect of early socialization and environmental enrichment of lactating piglets on colonic functionality.....	117
Abstract.....	119
Introduction.....	120
Materials and Methods	121
Experimental groups	121
Intestinal sampling	122
Colonic tissue for functional studies	122
Drugs and solutions	123
Measurement of electrophysiological parameters	123
Assessment of epithelial permeability	124
Mechanical experiments.....	124
Histological studies	125
Data analysis.....	125
Results.....	126
Effect of early socialization and environmental enrichment on Transepithelial Ion Transport and Paracellular Permeability to Fluorescent Tracers.....	126
Effect of early socialization and environmental enrichment on mechanical activity	127
Effect of early socialization and environmental enrichment on intestinal MCs	129
Effect of early socialization and environmental enrichment on colonic goblet cells.....	131
Discussion	132
Bibliography.....	137
DISCUSSIÓ GENERAL	141
Estudi selectiu de la transmissió neuromuscular	143
Estudi de la transmissió neuromuscular inhibidora.....	145
To neural inhibitori	149
Altres mecanismes no neurals d'inhibició.....	151
Estudi de la transmissió neuromuscular excitatòria.....	151
Altres mecanismes contràctils	153

Caracterització de la resposta neurosecretora	155
Estudi del transport actiu electrogènic	157
Estudi de la funció barrera	160
Referències.....	165
CONCLUSIONS.....	175

SUMMARY

In this work, we have characterized the neuromuscular and neurosecretory mechanisms and the barrier function of the pig colon in two animal models representative of the productive porcine cycle, namely, an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection and a model of early socialization and environmental enrichment during lactation.

In both animal models, we observed an inhibitory neural tone that was sensitive to L-NNA (a competitive inhibitor of the nitric oxide synthase, NOS) and MRS2500 (an orthosteric antagonist of the P2Y₁ receptor). To characterize the inhibitory neuromuscular transmission, we compared MRS2500 with BPTU, which is an allosteric antagonist of the P2Y₁ receptor that could develop a more selective response compared with the MRS2500. In our work, BPTU produced a partial reversion of the inhibitory response induced by electrical field stimulation and the P2Y agonist, ADPβS, although the complete blockade of the response was only achieved with the addition of MRS2500. To characterize the excitatory neuromuscular transmission, we used non-nitroergic non-purinergic conditions (incubation of L-NNA and MRS2500) to selectively stimulate the cholinergic excitatory neurons.

The neurosecretory response was characterized by electrical field stimulation. We observed that the two major neurotransmitters involved in the secretory response were acetylcholine and vasoactive intestinal peptide. In addition, different mediators, such as carbachol, vasoactive intestinal peptide, serotonin, nicotine, forskolin and histamine stimulated epithelial secretion of chloride.

Regarding the experimental infection model with ETEC, we observed that animals showed an intestinal barrier dysfunction (day 4 post-infection), an increase in the active electrogenic transport (day 4 and 9 post-infection), as well as an increase of the number of mucosal mast cells (day 9 post-infection). These alterations were probably due to the stimulation of the immune and the enteric nervous systems by the enterotoxins released by the ETEC. In contrast, the neuromuscular mechanisms remained unchanged.

In the early socialization and environmental enrichment model during lactation, we observed that enriched animals showed a decrease in active electrogenic transport

(at day 3 post-weaning). This observation was probably due to the etiological treatment and the environmental enrichment that provided a better adaptation to the stress situation caused by weaning as compared with the control animals. In contrast, the neuromuscular mechanisms remained unchanged.

In this work, we have therefore explored new pharmacological tools that have allowed us to adequately characterize the neural mechanisms that lead to muscle contraction and relaxation and epithelial secretion. We did not observe motor changes in either of the two models studied. In contrast, ETEC infection transiently increased the colonic permeability and activated a neurosecretory mechanism that could be partly responsible for diarrhoea. In the socialization model, we observed a decrease in electrogenic active transport that could be a result of a better adaptation of the animals to weaning.

RESUM

En aquest treball hem caracteritzat els mecanismes neuromusculars i neurosecretors i la funció barrera del còlon distal del porc. A més a més, hem valorat aquests mecanismes en dos models animals representatius del cicle productiu porcí, un model d'infecció experimental per l'*Escherichia coli* enterotoxigènic (ETEC) i un model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental durant la lactació.

En els dos models utilitzats, vam observar la presència d'un to neural inhibitori basal que es va poder bloquejar amb l'addició de L-NNA (inhibidor competitiu de l'òxid nítric sintasa, NOS) i de MRS2500 (antagonista ortostèric del receptor P2Y₁). Per caracteritzar la resposta inhibitoria vam comparar el MRS2500 amb el BPTU, un antagonista al·lostèric del receptor P2Y₁, que podria guanyar selectivitat en la resposta comparat amb el MRS2500. En el nostre estudi, el BPTU va mostrar una recuperació parcial de la resposta inhibitoria induïda per estímul de camp i per l'agonista P2Y, ADPβS, tot i que, la reversió total només es va assolir amb l'addició de MRS2500. Per caracteritzar la neurotransmissió excitatòria, vam utilitzat unes condicions "no-nitrèrgiques, no purinèrgiques" (incubació amb L-NNA i MRS2500) per estimular, de manera selectiva, les neurones excitatòries colinèrgiques.

La caracterització de la resposta neurosecretora mitjançant l'estimulació elèctrica de camp va demostrar que els principals neurotransmissors implicats en la resposta secretora són l'acetilcolina i el pèptid intestinal vasoactiu. A més a més, diferents mediadors, com són el carbacol, el pèptid intestinal vasoactiu, la serotonina, la nicotina, el forskolin i la histamina van estimular la secreció epitelial de clor.

Pel que fa al model d'infecció experimental per ETEC, vam observar que els animals presentaven una alteració de la funció barrera (dia 4 post-infecció), un increment del transport actiu electrogènic (dia 4 i 9 post-infecció), així com un increment del nombre de mastòcits de la mucosa (dia 9 post-infecció). Aquests canvis, van ser probablement deguts a l'estimulació del sistema nerviós entèric i del sistema immune per part de les toxines alliberades per l'ETEC i a un efecte epitelial. En canvi, els mecanismes neuromusculars es van mantenir inalterats.

En el model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental, vam observar que els animals enriquits presentaven una disminució del transport actiu

electrogènic (a dia 3 post-deslletament), probablement degut a que el tractament etiològic i l'enriquiment ambiental van proporcionar una millor adaptació a la situació d'estrès originada pel deslletament. En canvi, els mecanismes neuromusculars es van mantenir inalterats.

En aquest treball, per tant, hem explorat noves eines farmacològiques que ens han permès caracteritzar, de manera adequada, els mecanismes neurals que porten a la contracció i relaxació muscular i a la secreció epitelial. No hem observat canvis motors en cap dels dos models estudiats. En canvi, la infecció per ETEC va incrementar de manera transitòria la permeabilitat de la barrera i va activar un mecanisme neurosecretor que és en part responsable de la diarrea. En el model de socialització vam observar una disminució del transport actiu electrogènic que podria ser interpretada com una millor adaptació dels animals al deslletament.

INTRODUCCIÓ

1. Estructura del còlon

L'intestí gruixut és el segment final del tracte digestiu i està format per tres regions diferenciades que, d'oral a aboral, són: el cec, el còlon i el recte. El còlon és el tram més llarg de l'intestí gruixut i en l'humà es subdivideix en quatre seccions: ascendent, transvers, descendent i sigmoide. El còlon ascendent comença a nivell de la vàlvula-ileocecal i s'estén pel costat dret de l'abdomen fins a la curvatura hepàtica. Seguidament, trobem el còlon transvers que va de la curvatura hepàtica fins a la curvatura esplènica, punt a on s'uneix amb el còlon descendent. Aquest últim, discórrer pel costat esquerre de l'abdomen i enllaça amb el còlon sigmoide que desemboca al recte (Christenen, 1991; Reinus & Douglas Simon, 2014).

El còlon humà presenta una complexitat superior a la resta d'omnívors i es caracteritza per tenir un cec relativament petit i tres bandes longitudinals de múscul llis, anomenades *taeniae coli*. Les *taeniae coli* s'estenen des del còlon proximal fins al còlon sigmoide, en aquest punt del còlon, les tres bandes de múscul llis longitudinal es fusionen per formar una única capa de múscul que continua fins al recte (Christenen, 1991). L'intestí gruixut del porc, en canvi, es caracteritza per la disposició en forma d'espiral del cec, del còlon ascendent, transvers i de la porció proximal del còlon descendent, veure revisió (Meurens et al., 2012). A nivell translacional, el porc es considera un model d'elecció per a l'estudi dels mecanismes intrínsecs que regulen les funcions del tracte gastrointestinal (GI), així com per a l'estudi de la patogènesi de diferents malalties digestives, ja que comparteix varies similituds amb l'humà: els dos són omnívors, tenen una mida semblant, una anatomia del tracte GI comparable, desenvolupen processos inflamatoris similars i presenten un sistema nerviós entèric (ENS) amb una organització anatòmica i unes característiques neuroquímiques semblants (Hens et al., 2000; Brown & Timmermans, 2004), veure revisions (Gonzalez et al., 2015; Yin et al., 2017).

Histològicament, el còlon està format per diferents capes disposades de manera concèntrica. Des de l'interior del lumen cap a l'exterior trobem la mucosa, la submucosa, la capa muscular llisa circular i longitudinal i la serosa (Figura 1):

La mucosa està revestida per un epitelí columnar simple que conté invaginacions en forma tubular anomenades criptes de Lieberkuhn. Les criptes colòniques contenen cèl·lules caliciformes, responsables de la producció de moc, i cèl·lules enteroendocrines, que produeixen i secreten diferents hormones i neuropèptids. De manera adjacent a l'epitelí trobem la làmina pròpia, formada per una capa de teixit connectiu amb una important xarxa vascular, terminacions nervioses i cèl·lules del sistema immune. Seguidament, separant la mucosa de la submucosa, es situa la *muscularis mucosae*, o muscular de la mucosa que està constituïda per feixos dispersos de fibres de múscul llis.

La submucosa, està formada per teixit connectiu i conté el plexe submucós o de Meissner (SMP). El SMP innerva la mucosa i els vasos sanguinis, controlant així, el transport hidroelectrolític i el flux sanguini. En espècies com el porc, el cavall o el gos es diferencien dos plexes submucosos independents interconnectats entre sí; un localitzat al voltant de la *muscularis mucosae*, el plexe submucós intern (ISP), i l'altre situat més proper a la capa de múscul circular, conegut com a plexe submucós extern (OSP). A més a més, a l'intestí humà s'ha descrit un tercer plexe submucós intermig que es situa entre l'ISP i l'OSP, veure revisió (Timmermans et al., 2001).

La muscular, està formada per dues capes, una interna de musculatura llisa amb fibres orientades de manera circular i una externa amb fibres disposades de manera longitudinal. Entre les dues capes musculars es situa l'altre plexe nerviós, el plexe mientèric o d'Auerbach (MP), que té com a funció principal el control de la contractilitat del múscul llis.

Finalment, es disposa la serosa que està constituïda per un epitelí simple escamós, que redueix les forces de fricció durant el moviment de les parets del tracte GI (Christenen, 1991; Hall, 2006; Reinus & Douglas Simon, 2014; Welcome, 2018).

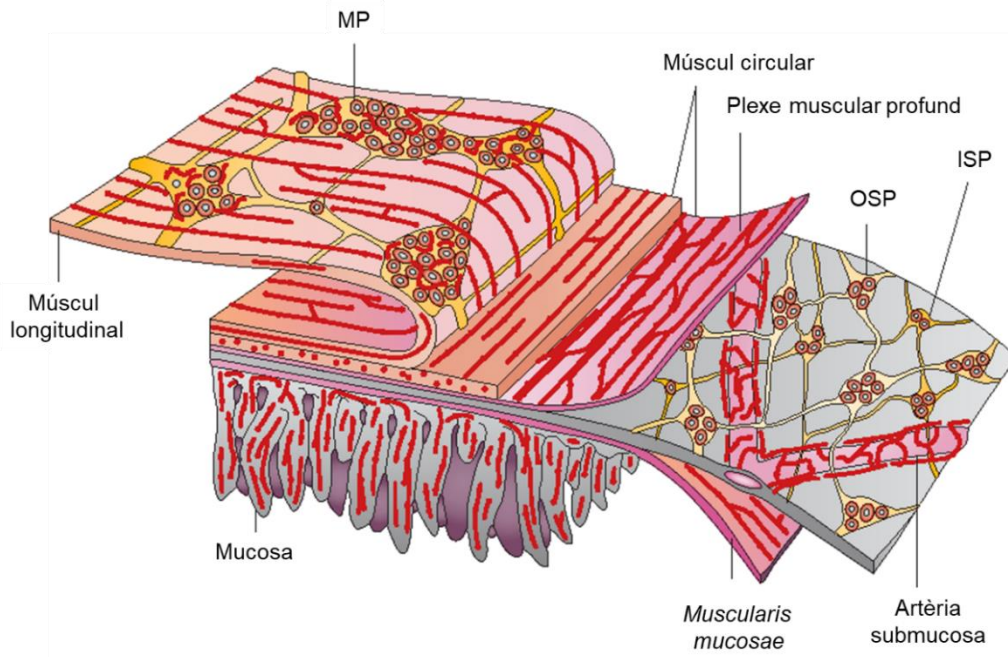


Figura 1. Estructura de l'intestí de mamífers mitjans-grans i de l'humà. Estructura general de les capes intestinals amb els plexes entèrics. *MP* plexe mientèric, *OSP* plexe submucós extern i *ISP* plexe submucós intern. Imatge modificada de la revisió Furness, 2012.

2. Sistema nerviós entèric

El tracte digestiu posseeix innervacions extrínseques i intrínseques. Les connexions extrínseques provenen de vies simpàtiques i parasimpàtiques. Per altra banda, l'ENS, format per neurones i cèl·lules de la glia organitzades en dos plexes ganglionars, proporciona la innervació intrínseca localitzada a la pròpia paret intestinal. Les principals funcions de l'ENS són les de regular els reflexes intestinals locals implicats en els processos de motilitat, de secreció / absorció, el flux sanguini i les respostes immunològiques del tracte GI. Per aquest motiu, és important que hi hagi una correcta interacció entre els dos plexes nerviosos i les cèl·lules efectores, per tal de coordinar de manera eficaç les diferents funcions GI.

Les neurones de l'ENS es poden classificar segons les seves propietats morfològiques, electrofisiològiques i funcionals. A nivell funcional, les neurones es diferencien en neurones aferents intrínseques primàries (IPANs), interneurons i neurones motores (Figura 2). Les IPANs tenen els cossos cel·lulars en els ganglis del MP i del SMP, estan connectades entre elles a través de les interneurons i directament amb les motoneurons. A més a més, responen a estímuls mecànics i químics generant un reflex. Pel que fa a les interneurons, es poden classificar en neurones ascendents o descendents i són les encarregades d'integrar la informació generada per les IPANs i d'enviar-la a les neurones motores. Finalment, trobem les motoneurons, tan inhibidores com excitatòries, que innerven les capes musculars del tub digestiu (motoneurons musculars) i neurones que regulen la secreció d'aigua i electròlits (secretomotors) i el flux sanguini (vasomotors) (Furness, 2006; Brierley & Costa, 2016), veure revisions (Hansen, 2003; Furness et al., 2014; Fleming et al., 2020).

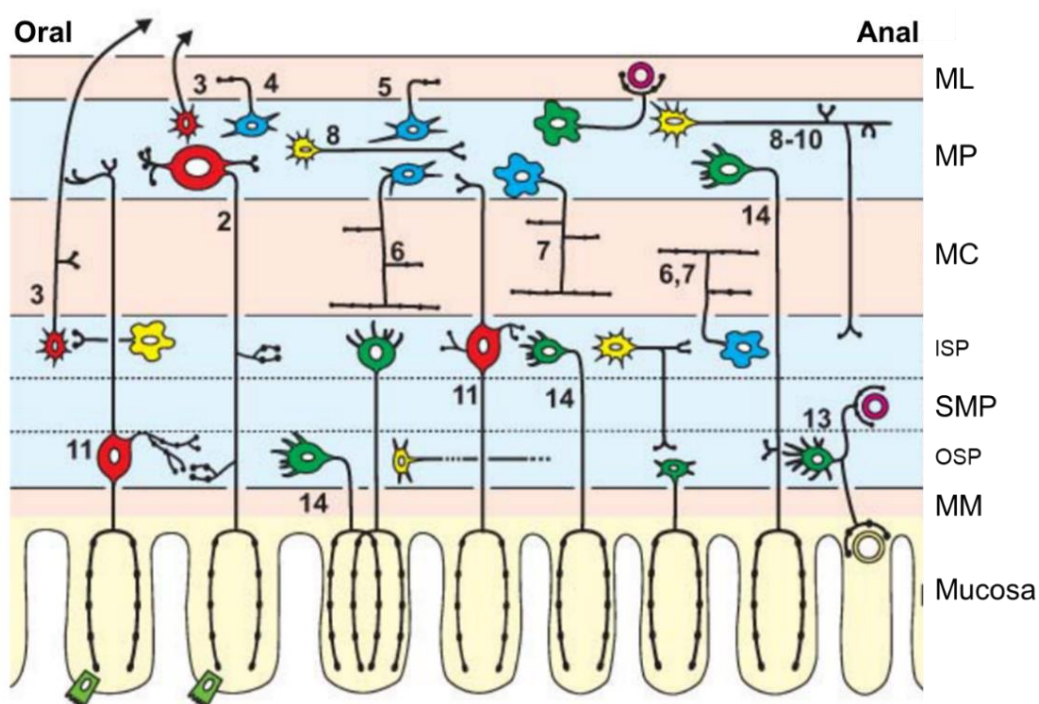


Figura 2. Tipus de neurones de l'ENS. Tipus de neurones de l'intestí prim del porc segons les seves característiques funcionals: 2) IPAN mientèrica, 3) IFAN, 4) motoneurona longitudinal excitatòria, 5) motoneurona longitudinal inhibidora, 6) motoneurona circular excitatòria i 7) motoneurona circular inhibidora, 8-10) interneurona descendent; 11) IPAN submucosa, 13-14) neurones secretomotors i/o vasodilatadores. *ML*

múscul longitudinal, *MP* plexe mientèric, *MC* múscul circular, *SMP* plexe submucós (*ISP* intern i *OSP* extern), *MM* muscular de la mucosa. Imatge modificada de Furness, 2006.

En el tracte digestiu també trobem neurones intestinofugals (IFAN), que tenen el cos neuronal en els ganglis del MP i els seus axons migren de la paret del tub digestiu per contactar amb ganglis simpàtics vertebrals (Figura 2). Les IFAN tenen mecanoreceptors que els hi permeten generar una resposta a estímuls d'estirament de la capa muscular (Furness, 2006; Brierley & Costa, 2016), veure revisions (Hansen, 2003; Furness et al., 2014; Fleming et al., 2020).

3. Funcions del còlon

3.1 Funció barrera intestinal

L'epiteli GI té la capacitat de funcionar com una barrera física entre el contingut luminal i el medi intern. Aquest mecanisme de barrera està format per varis components que interactuen entre ells sota un control neurohormonal. La primera línia de defensa es troba en el lumen, on els microorganismes i els antígens luminals són degradats pel pH, així com per secrecions gàstriques, pancreàtiques i biliars. A més a més, les pròpies bactèries comensals també poden inhibir la colonització de patògens mitjançant canvis de pH i produint substàncies antimicrobianes. Recobrint l'epiteli, també trobem una capa de moc especialitzat que és secretada, predominantment, per les cèl·lules caliciformes i que té un paper defensiu. En el còlon, el moc està organitzat en dues capes que difereixen en composició i funció: una capa exterior que proporciona l'hàbitat per a la flora comensal i una capa interior que protegeix els enteròcits, ja que és impermeable a les bactèries (Farré & Vicario, 2016; Welcome, 2018), veure revisió (Camilleri et al., 2012).

La següent línia de defensa està constituïda per les pròpies cèl·lules epitelials, que es troben interconnectades entre elles formant una monocapa continua que regula, de manera selectiva, el transport de molècules mitjançant dues vies principals: la transcel·lular i la paracel·lular (Figura 3) (Welcome, 2018), veure revisió (Camilleri

et al., 2012). Una altra característica important de les cèl·lules epitelials és que estan polaritzades, de manera que el costat apical o luminal és estructuralment i funcionalment diferent del costat basolateral o serosal. D'aquesta manera, es genera un gradient a través de la cèl·lula que permet articular mecanismes de secreció i d'absorció (veure apartat transport hidroelectrolític més endavant).

La permeabilitat transcel·lular fa referència al pas de molècules a través de les cèl·lules epitelials (via intracel·lular), que es pot dur a terme mitjançant mecanismes de transport passiu simple, a favor del gradient de concentració, o a través de mecanismes de transport actiu o endocitosi, veure revisió (Ménard et al., 2010).

La via paracel·lular està regulada, principalment, per complexos d'unió situats a l'espai comprès entre dues cèl·lules epitelials contigües (espai intercel·lular). Aquests complexos són capaços de discriminar entre els soluts en base al seu tamany i càrrega i permeten la difusió selectiva d'ions i soluts de petit tamany i sense càrrega. Els principals complexos d'unió que participen en el manteniment de la funció barrera són: les unions estretes (TJ), les unions d'ancoratge (*adherents or anchoring junctions*) i els desmosomes, veure revisions (Powell, 1981; Schneeberger & Lynch, 2004) (Figura 2). Les TJ són les estructures més apicals i constitueixen el factor limitant tan pel moviment com per la velocitat de penetració paracel·lular d'aigua, soluts, ions i antígens luminals a través de l'epiteli. La plasticitat de les TJ està controlada, bàsicament, per proteïnes transmembrana com són les claudines (CLDN), les molècules d'adhesió (JAM), la ocludina (OCLN) i la tricelulina. A més a més, els dominis intracel·lulars d'aquestes proteïnes interactuen amb proteïnes adaptadores de membrana perifèrica, *zonula occludens* (ZO)-1, ZO-2 i ZO-3, per unir-les a components del citoesquelet d'actina, veure revisions (Tlaskalová-Hogenová et al., 2004; Ménard et al., 2010).

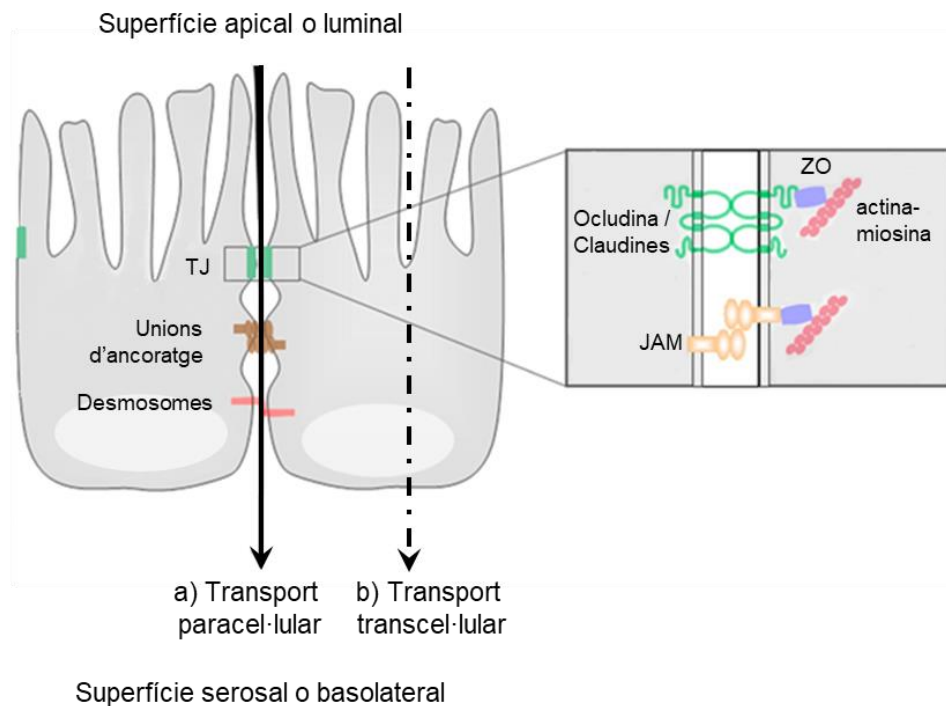


Figura 3. Vies de transport a través de l'epiteli intestinal i unions intercel·lulars de l'epiteli intestinal. Esquema que representa a) Transport paracel·lular. Les unions estretes (TJ) regulen la difusió de molècules. Les proteïnes transmembrana (occludina, claudines, JAM) s'uneixen al citoesquelet d'actina i miosina a través de les proteïnes *zonula occludens* (ZO). b) Difusió passiva transcel·lular de molècules. Imatge modificada de la revisió Ménard et al., 2010.

La barrera intestinal no és un element estàtic, sinó que està regulada per diversos estímuls fisiològics, com són les interaccions entre la microbiota, les cèl·lules epitelials, el sistema immune i l'ENS, així com per estímuls farmacològics i patològics. En condicions normals, la barrera epitelial té la capacitat de restablir-se una vegada desapareix l'estímul desencadenant del defecte de barrera. No obstant, en certes condicions l'epiteli perd la seva capacitat d'autoregulació afavorint, així, un estat inflamatori crònic com succeeix en la malaltia celíaca, el síndrome de l'intestí irritable (IBS) o en malalties inflamatòries intestinals (IBD), com són la malaltia de Crohn (CD) o la colitis ulcerosa (UC). Per exemple, en l'epiteli GI de pacients amb CD s'ha descrit una reducció de l'expressió de CLDN que no formen porus així com un augment de les que sí que en formen (Zeissig et al., 2007). Per altra banda, en l'UC s'ha observat un increment de la interleuquina-13 (IL-13) que augmenta l'expressió de CLDNs formadores de porus relacionades amb l'aparició de microerosions, veure revisió (Mankertz & Schulzke, 2007). Altres condicions com

els bacteris patògens, per exemple l'*Escherichia coli* (*E. coli*), o factors ambientals, com l'estrès, també poden influir en la permeabilitat paracel·lular intestinal (Farré & Vicario, 2016), veure revisions (Ménard et al., 2010; Salvo-Romero et al., 2015; Odenwald & Turner, 2017; Albert-Bayo et al., 2019).

3.2 Transport hidroelectrolític

Una altra de les funcions principals del còlon és el transport hidroelectrolític, que es caracteritza per l'absorció i la secreció de fluids luminals. L'absorció de fluids es deu, principalment, a l'absorció de NaCl, àcids grassos de cadena curta (SCFAs) produïts per la flora intestinal i d'aigua, mentre que el procés de secreció es caracteritza per la secreció de KCl, HCO_3^- i moc, veure revisió (Kunzelmann & Mall, 2002). A l'estómac i a l'intestí prim, es produeixen mecanismes de secreció amb l'objectiu de facilitar la digestió dels aliments en un medi aquós. A nivell del còlon, el procés predominant és el d'absorció, que permet l'expulsió de femtes amb un baix contingut d'aigua i electròlits, tot i que també es duen a terme mecanismes de secreció, que faciliten el transport del moc des de les criptes a la superfície epitelial (Reinus & Douglas Simon, 2014), veure revisions (Barrett & Keely, 2000; Kunzelmann & Mall, 2002; Hirota & McKay, 2006).

El principal ió involucrat en els processos d'absorció és el Na^+ , que aprofita el gradient electroquímic de Na^+ configurat per la bomba sodi i potassi, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, per entrar a la cèl·lula. Encara que el Na^+ es pot absorbir de manera passiva, la major part s'absorbeix a través de transportadors vinculats a altres ions o soluts de la membrana apical, com el NHE2 i NHE3, que intercanvien de manera electroneura Na^+ per H^+ , veure revisions (Kunzelmann & Mall, 2002; Moeser & Blikslager, 2007).

El procés de secreció de Cl^- ve definit pel cotransportador basolateral $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+$, NKCC1, que transporta, de manera electroneutra, 2 Cl^- , juntament amb 1 Na^+ i 1 K^+ . A més a més, a la membrana basolateral trobem la $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, que impulsa l'acumulació de Cl^- pel gradient de concentració de Na^+ i canals de K^+ que

permeten el seu reciclatge. Aquests mecanismes fan que el Cl^- s'acumuli a la cèl·lula per sobre del seu equilibri electroquímic produint l'obertura dels canals de Cl^- apicals (Figura 4) (Reinus & Douglas Simon, 2014), veure revisions (Barrett & Keely, 2000; Kunzelmann & Mall, 2002; Hirota & McKay, 2006).

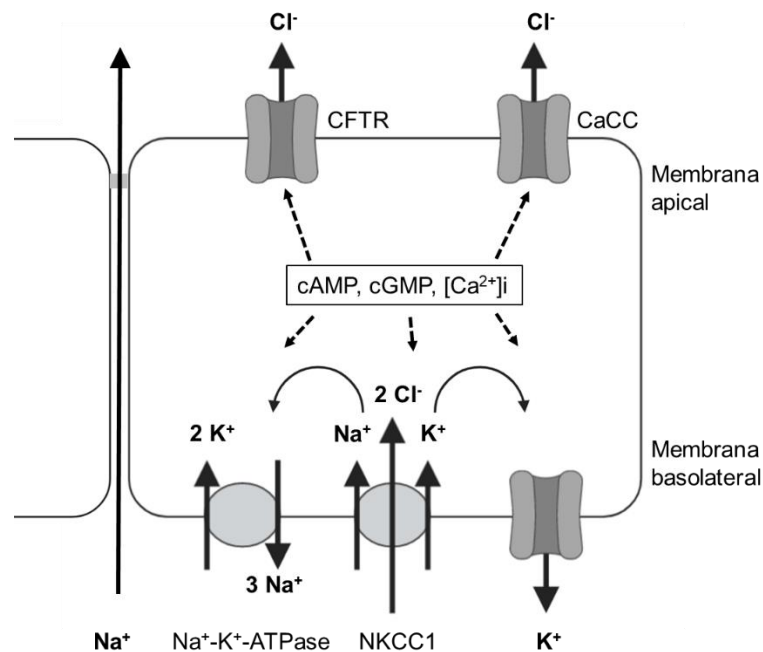


Figura 4. Mecanisme de secreció de Cl^- a les criptes i a la superfície de la cèl·lula epitelial del còlon. L'augment dels missatgers secundaris intracel·lulars com el fosfat d'adenosina cíclic (cAMP), el monofosfat de guanosina cíclic (cGMP) i el calci (Ca^{2+}) activa proteïnes de transport a les membranes apical i basolateral. La secreció luminal de Cl^- es duu a terme a través dels canals CFTR i CaCC. Imatge modificada de la revisió Barrett & Keely, 2000.

El canal regulador de la conductància transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) és el canal de Cl^- predominant en el còlon i és l'encarregat de la secreció de Cl^- després de l'activació de missatgers secundaris, com el fosfat d'adenosina cíclic (cAMP), veure revisió (Greger, 2000). Tot i així, a la membrana apical de l'epiteli intestinal també trobem altres canals de Cl^- , com són els canals de Cl^- activats per calci (CaCC) (Figura 4) (Reinus & Douglas Simon, 2014), veure revisions (Barrett & Keely, 2000; Kunzelmann & Mall, 2002; Hirota & McKay, 2006).

Diferents factors luminals, humorals, neurals i immunològics (Taula 1) tenen la capacitat de regular la secreció luminal de Cl⁻ modulant els nivells intracel·lulars de missatgers secundaris (cAMP, monofosfat de guanosina cíclic (cGMP) i el Ca²⁺) (Reinus & Douglas Simon, 2014), veure revisions (Barrett & Keely, 2000; Kunzelmann & Mall, 2002; Hirota & McKay, 2006).

Taula 1. Agents endògens i exògens que regulen la secreció intestinal de Cl⁻ (Keely et al., 2009; Reinus & Douglas Simon, 2014; Ahsan et al., 2017), veure revisió (Barrett & Keely, 2000)

Substància	Missatger secundari
Estímuls secretors endògens (hormones, neurotransmissors, mediadors inflamatoris / immunes)	
Acetilcolina (ACh)	↑ Ca ²⁺
Pèptid intestinal vasoactiu (VIP)	↑ cAMP
Histamina	↑ Ca ²⁺ , cAMP
Serotonina (5-HT)	↑ Ca ²⁺ , cAMP
Prostaglandines	↑ cAMP
Guanilina, uroguanilina	↑ cGMP
Adenosina, 5'AMP	↑ cAMP
Estímuls secretors exògens (productes bacterians, agents actius a nivell luminal)	
Toxina del còlera (CT)	↑ cAMP
Toxina <i>E. coli</i> termolàbil (LT)	↑ cAMP
Toxina <i>E. coli</i> termoestable (ST _b)	↑ Ca ²⁺
Toxina <i>E. coli</i> termoestable (ST _a)	↑ cGMP
Toxina A i B <i>C. difficile</i>	↑ Ca ²⁺
Àcids biliars	↑ Ca ²⁺
Agents farmacològics laxants (linaclotide)	↑ cGMP

3.2.1 Estudi funcional de la barrera epitelial i del transport hidroelectrolític

El sistema de les càmeres Ussing va ser dissenyat per Ussing i Zerahn a la dècada de 1950 per mesurar el transport net d'ions a través de la pell de la granota (Ussing & Zerahn, 1951). Avui en dia, aquest sistema s'utilitza per mesurar la funció barrera intestinal i el transport epitelial d'ions, nutrients o fàrmacs.

Les càmeres Ussing consten de dues semi-càmeres separades per una monocapa de cèl·lules o per una mostra epitelial, de manera que la membrana apical contacta amb una meitat de la càmera i la membrana basolateral amb l'altra. Cada una de les semi-càmeres consta d'un reservori que s'omple amb una solució fisiològica (solució de Krebs) termoregulada (37 °C) i amb un pH controlat (7.4) gràcies a un mecanisme de re-circulació d'aigua i a un sistema de regulació de gasos (95% O₂ i 5% CO₂), respectivament. El sistema consta també de quatre elèctrodes de clorur de plata (Ag/AgCl), una parella d'elèctrodes per mesurar voltatge i una altra per injectar corrent (Riegler & Matthews, 2001; Verhoeckx et al., 2015), veure revisió (Hirota & McKay, 2006).

Electrofisiològicament, l'epiteli intestinal es caracteritza per la diferència de potencial (PD, mV), la corrent de cortocircuit (I_{sc} , $\mu A/cm^2$), la resistència transepitelial (TEER, $\Omega \cdot cm^2$) i la seva inversa, la conductància (G, mS/cm^2). Aquests paràmetres es relacionen entre ells per la llei d'Ohm ($TEER = PD/I_{sc}$). Els quatre elèctrodes del sistema Ussing es connecten a un aparell que manté el voltatge a 0, és a dir, l'equip injecta la corrent necessària per anul·lar la PD entre la membrana apical i la membrana basolateral. Aquesta situació fa que es pugui mesurar específicament, a partir de la I_{sc} , el transport actiu electrogènic, tan en condicions basals com després de l'addició de fàrmacs o d'aplicar estímuls elèctrics (Riegler & Matthews, 2001), veure revisions (Hirota & McKay, 2006; Clarke, 2009).

La funció barrera intestinal es pot avaluar mitjançant la TEER. La TEER proporciona una mesura general de la integritat intestinal, dona informació sobre el flux net

d'ions a través de l'epiteli i conseqüentment, sobre la funció de les TJ, que representen la ruta principal pel moviment passiu d'ions. Per a mesurar la TEER, s'aplica un voltatge conegut i es mesura el canvi produït en la I_{sc} i, a través de la llei d'Ohm, s'obté la TEER i la G. Una altra eina per a mesurar la integritat de la barrera intestinal és la utilització de marcadors moleculars. Aquests, segons la seva mida, permeten avaluar la via paracel·lular o transcel·lular. Alguns exemples de marcadors paracel·lulars són el radiomarcador Cr-EDTA o un dextrà isotiocianat de 4kD marcat amb fluoresceïna (FD4). Per a l'estudi de la via transcel·lular s'utilitzen antigens proteics, com és la *horseradish peroxidase* (HRP), així com partícules i bacteries marcades amb un fluorocrom. Una vegada administrat el marcador a un costat de l'epiteli, s'obtenen mostres seriades del compartiment oposat per avaluar el flux de pas del marcador al llarg del temps (Porras et al., 2006; Fernández-Blanco et al., 2015; Fernández-Blanco et al., 2011), veure revisió (Schoultz & Keita, 2020).

3.3 Motilitat intestinal

La motilitat de l'intestí gruixut permet l'emmagatzematge prolongat del contingut luminal per tal de facilitar l'absorció d'aigua i electròlits, un transport lent i gradual del contingut fecal, així com l'evacuació poc freqüent d'una proporció substancial del contingut luminal (Dinning et al., 2010). En aquest sentit, la motilitat del còlon inclou moviments segmentaris i propulsius (Bassotti & Battaglia, 2015) que estan regulats per l'ENS juntament amb elements de control miogènic, com són les cèl·lules intersticials de Cajal (ICC) i les cèl·lules PDGFR α +, veure revisions (Sanders et al., 2014; Spencer et al., 2016; Corsetti et al., 2019).

Les cèl·lules musculars llises expressen una varietat de conductàncies iòniques, algunes d'elles dependents de voltatge, que estableixen el potencial de membrana. En el tracte GI, el potencial de membrana de les cèl·lules musculars llises oscil·la entre -80 i -40 mV. Diferents canals de K⁺ i canals catiónics no selectius participen en l'establiment del potencial de membrana de la cèl·lula muscular llisa, però no és fins que s'activen els canals de Ca²⁺ dependents de voltatge que es produeix un

potencial d'acció i, conseqüentment, la contractilitat del múscul, veure revisió (Koh et al., 2012).

Les cèl·lules intersticials del sistema GI, les ICC i les cèl·lules PDGFR α +, estan acoblades elèctricament amb les cèl·lules de múscul llis contribuint a la seva excitabilitat. Això fa que el múscul GI actuï com un síncit elèctric multicel·lular conegut com a síncit de cèl·lula múscul llis/ICC/cèl·lula PDGFR α + (SIP) (Figura 5), veure revisió (Sanders et al., 2014).

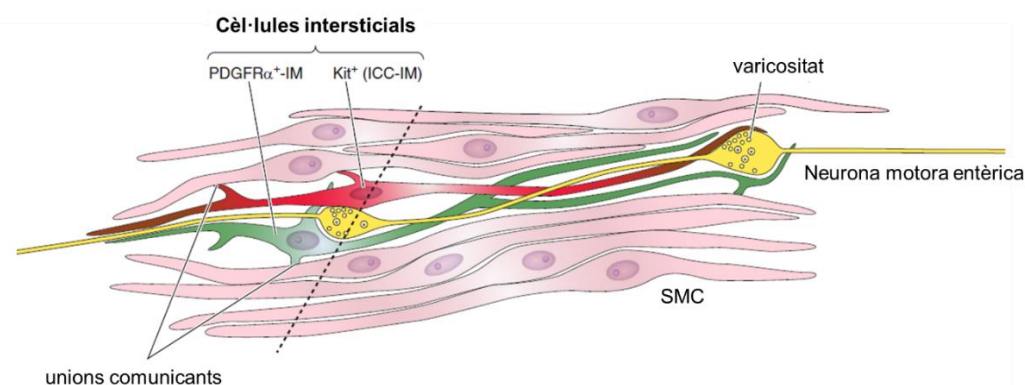


Figura 5. Síncit de cèl·lula múscul llis/ICC/cèl·lula PDGFR α + (SIP). Les cèl·lules de múscul llis, les ICC i les cèl·lules PDGFR α + estan situades al voltant de projeccions de motoneurons excitatòries i inhibidores. Imatge modificada de la revisió, Sanders et al., 2014.

Les ICC són cèl·lules d'origen mesenquimal descrites per primera vegada a principis del segle XX per Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1893), però no va ser fins més endavant que es va suggerir que les ICC podien actuar com a cèl·lules marcapassos degut a la seva capacitat de generar activitat elèctrica espontània (Thuneberg, 1982). A les cèl·lules intersticials de l'intestí també se'ls hi ha atribuït un paper intermediari en la transmissió neuromuscular, les ICC modulen la transmissió neuromuscular nitrèrgica i les cèl·lules PDGFR α + la purinèrgica (Taula 2), veure revisió (Koh et al., 2012).

En el còlon, s'han establert diferents subtipus d'ICC en base a la seva distribució anatòmica, (Drumm et al., 2020), veure revisions (Faussone-Pellegrini & Thuneberg, 1999; Sanders et al., 2014):

- ICC properes al SMP (ICC-SMP): situades entre la capa muscular circular i la capa submucosa del còlon.
- ICC properes al MP (ICC-MP): situades entre les capes de múscul llis circular i longitudinal del còlon.
- ICC intramusculars (ICC-IM): situades al llarg de la capa de múscul llis circular i longitudinal.
- ICC septals (ICC-SEP): situades entre feixos musculars.
- ICC serosals (ICC-SS): situades a la superfície serosal de la capa de múscul longitudinal. S'han descrit en el gos, en primats i en l'humà.

Les ones lentes generades per les ICC són despolaritzacions transitòries que es transmeten gràcies a la presència d'unions comunicants (*gap junctions*) que comuniquen les ICC entre elles així com amb les cèl·lules musculars llises. A nivell de l'intestí prim, existeix un únic marcapàs provinent de les ICC-MP, juntament amb les ICCs properes al plexe muscular profund que podrien ser accessòries (Jiménez et al., 1999). En el còlon, la situació no és tan clara, i es creu que existeix més d'un marcapàs. En espècies com el gos, el gat i el porc s'ha descrit que les ones lentes del còlon s'originen a nivell de les ICC-SMP (Huizinga et al., 1983; Sanders & Smith, 1986). A més a més, també s'ha descrit una altra activitat marcapàs anomenada *myenteric potential oscillations*, teòricament provinent de les ICC-MP que desencadenen despolaritzacions cícliques d'alta freqüència dependents de canals de Ca^{2+} tipus L (T. K. Smith et al., 1987). Altres resultats també demostren la presència de despolaritzacions cícliques de baixa freqüència que podrien ser atribuïbles a les ICC-MP (Plujà et al., 2001; Albertí et al., 2005).

Corsetti et al., 2019 han dut a terme un concens en la terminologia utilitzada pels diversos patrons motors observats, tan en animals com en l'humà. En el còlon de diferents espècies animals s'han descrit diversos patrons motors colònics *ex vivo*

que inclouen contraccions d'origen miogènic, com són: *ripples*, *slow phasic contractions*, així com contraccions d'origen neurogènic, *neural peristalsis*, que interactuen entre elles formant els complexos motors colònics. Aquests patrons motors, coordinen els mecanismes de segmentació i peristalsis. En l'humà, també s'ha descrit la presència de contraccions espontànies d'origen miogènic *ex vivo* que es poden diferenciar segons si són de freqüència alta, mitja o baixa i es correlacionen amb les *ripples* i *slow phasic contractions* observades en animals (Dinning et al., 2010), veure revisió (Corsetti et al., 2019).

Gràcies a la introducció de la manometria d'alta resolució, que disposa d'un sensor de pressió intraluminal cada 1-2.5 cm, s'ha augmentat la precisió dels patrons motors detectats *in vivo*, veure revisió (Corsetti et al., 2019). Aquesta tècnica ha permès l'estudi de la organització en espai i temps de les contraccions, que dóna una informació més precisa per a l'estudi del trànsit intestinal i de l'expulsió del contingut luminal comparat amb els índexs de freqüència i amplitud (Dinning et al., 2010). Els principals patrons de propagació reportats a l'espècie humana són: el patró motor de propagació cíclica (*cyclic propagating motor pattern*), les contraccions de baixa amplitud (*low amplitude propagated contractions*, LAPC) i d'alta amplitud (*high amplitude propagated contractions*, HAPC).

El patró motor de propagació cíclica és el més freqüent, amb una freqüència de 2-6 per minut. Aquest patró motor s'ha suggerit que pot estar originat per les ones lentes i que els *inputs* neurals, excitatoris o inhibitoris, poden amplificar o inhibir el fenomen marcapàs, respectivament (Mañé et al., 2015).

Les LAPC es produeixen fins a 61 vegades al dia amb una amplitud < 50 mmHg, i s'han associat amb el transport del contingut luminal, l'expulsió de gas i la relaxació de l'esfínter anal. Gràcies a la manometria d'alta resolució s'han dividit en 3 subtipus: *short single motor pattern*, *long single motor pattern* i *slow retrograde motor pattern*, en funció del tram colònic a on s'inicien i per la distància i el sentit de la propagació (Bassotti & Battaglia, 2015; Ratto, 2017).

Les HAPC tenen una propagació ràpida i s'estenen a grans distàncies (10 – 30 cm) i en sentit caudal facilitant el moviment aboral del contingut intestinal i la defecació. Normalment, s'inicien en el còlon proximal de manera espontània amb una freqüència d'entre 4-23 vegades al dia. Es creu que les HAPC estan originades per un augment de la distensió luminal produïda per l'acumulació de contingut, ja que la seva freqüència augmenta de manera postprandial. Per altra banda, també s'ha descrit un augment de les HAPC en processos inflamatoris, que produeixen diarrea al impulsar la matèria fecal ràpidament, sense deixar temps per a l'absorció d'aigua i electròlits. En el sentit contrari, en pacients amb restrenyiment sever s'ha observat una disminució de les HAPC (Bassotti & Battaglia, 2015; Ratto, 2017).

3.3.1 *Estudi funcional*

La tècnica de bany d'òrgans permet estudiar l'activitat motora de segments intestinals *ex vivo*. El teixit intestinal es col·loca submergit en una solució fisiològica (solució de Krebs) amb temperatura (37°C) i pH (7.4) controlats i es lliga a un transductor isomètric que mesura força. Això permet registrar tan l'activitat motora com el to en condicions basals i després de l'addició de fàrmacs o estímuls elèctrics. Per a l'estudi selectiu de la transmissió neuromuscular, cal aplicar unes condicions farmacològiques i d'estimulació concretes per poder aïllar, selectivament, una sola via neural (inhibitòria o excitatòria) com passa *in vivo*. Per aïllar la transmissió neuromuscular inhibitòria cal aplicar unes condicions no-adrenèrgiques i no-colinèrgiques (NANC), en canvi, per a l'estudi de la transmissió neuromuscular excitatòria, és indispensable aplicar condicions farmacològiques no-nitrèrgiques i no-purinèrgiques (NNNP) utilitzant antagonistes com el L-NNA (inhibidor competitiu de l'enzim òxid nítric sintetasa, NOS) i el MRS2500 (antagonista del receptor P2Y₁) (Mañé et al., 2015).

3.3.2 *Estudi electrofisiològic*

La tècnica electrofisiològica de microelectrodes permet mesurar el potencial de membrana (*resting membrane potential*, RMP) de cèl·lules musculars llises col·locant un elèctrode intracel·lular i un elèctrode extracel·lular de referència.

Aquesta tècnica permet estimular, de manera selectiva, les neurones inhibidores en condicions NANC i observar la hiperpolarització de les cèl·lules musculars, anomenada potencial post-unió inhibitori (IJP), que és la base electrofisiològica de la relaxació intestinal observada amb la tècnica de bany d'òrgans. Aquesta tècnica també permet avaluar l'efecte de l'addició exògena de diferents antagonistes sobre els IJP.

3.3.3 Transmissió neuromuscular inhibidora

Els principals neurotransmissors alliberats per les motoneurones entèriques inhibidores són l'ATP, o una purina relacionada, (Burnstock et al., 1970) i l'òxid nítric (NO) (Bult et al., 1990). Altres neurotransmissors com el VIP, el polipèptid activador de l'adenilat ciclasa pituitària (PCAP) i el monòxid de carboni (CO) també s'han relacionat amb la transmissió neuromuscular inhibidora, tot i que, les evidències funcionals són menys clares, veure revisions (McConalogue & Furness, 1994; Furness & Sanger, 2002).

En la majoria d'espècies i d'àrees del tracte GI, el IJP està format per dues fases, una primera hiperpolarització ràpida i transitòria (IJP *fast*, IJPf) depenent d'ATP, seguida d'una segona fase d'hiperpolarització més lenta i sostinguda (IJP *slow*, IJPs) produïda pel NO, veure revisió (Jiménez et al., 2014), en excepció de l'esòfag humà, en el que l'IJP està mediat únicament per NO (Lecea et al., 2011) (Taula 2).

El receptor P2Y₁ s'ha identificat com el receptor de purines responsable de la transmissió neuromuscular inhibidora del tracte GI. El desenvolupament de diversos antagonistes ortostèrics purinèrgics ha permès demostrar que l'ATP actua a través del P2Y₁ a nivell post-sinàptic, veure revisió (Jiménez et al., 2014). En els últims anys, s'ha desenvolupat un nou antagonista al·lostèric d'aquest receptor, anomenat BPTU. Aquest antagonista P2Y₁ té dues característiques rellevants que el diferencien dels antagonistes ortostèrics i que li proporcionen un interès especial pel desenvolupament de respostes específiques, veure revisions (Conn et al., 2009; Canals et al., 2019): 1) s'uneix a un lloc d'unió diferent al lligand endogen (en

contacte amb la bicapa lipídica) (D. Zhang et al., 2015) i 2) no és un nucleòtid, sinó que és un derivat de la urea (Chao et al., 2013).

La via nitrèrgica, en canvi, està mediada per l'activació de guanilat ciclasa (GC) que produeix cGMP. Es coneixen diferents inhibidors de la via nitrèrgica, com són el L-NNA (inhibidor de la síntesi de NOS) i l'ODQ (blocador de GC) (Taula 2).

Taula 2. Transmissió neuromuscular inhibitòria purinèrgica i nitrèrgica.

	Resposta purinèrgica	Resposta nitrèrgica
IJP	IJPf	IJPs
Freqüència d'estimulació	Baixa freqüència	Alta freqüència
Receptor	P2Y ₁	GC
Agonistes	ADP, ADPβS, α,β-meATP, Ap ₄ A	NO, NaNP
Antagonistes / inhibidors síntesi	MRS2179, MRS2279, MRS2500, BPTU	L-NNA ODQ
Cèl·lula	Cèl·lula muscular PDGFRα +	Cèl·lula muscular ICC
Via d'acció	Obertura canals sK _(Ca)	Supressió de canals de Cl ⁻ activats per Ca ²⁺ Ano1
Activació via d'acció	CYPPA	-
Bloqueig via d'acció	Apamina	-

Pel que fa a la transmissió neuromuscular excitatòria, s'ha descrit l'ACh com a principal neurotransmissor implicat en la contracció intestinal. Tot i així, altres neurotransmissors, com les taquinies (la substància P i la NKA) es creu que també poden estar involucrats en la resposta a partir de la seva interacció amb els

receptors NK1 i NK2, veure revisions (Furness & Sanger, 2002; Sarna, 2006; Sanders et al., 2012).

4. Sistema immune intestinal

La mucosa intestinal constitueix la superfície més gran que separa el medi intern del medi extern i està constantment exposada a antígens luminals. En condicions fisiològiques, l'intestí limita el pas d'antígens, bacteris i altres substàncies nocives a través de l'epiteli. Aquesta funció defensiva està altament regulada per mecanismes immunes que distingeixen els patògens invasius dels antígens innocus. Tot i així, en certes condicions es pot dur a terme una resposta inadequada en front als aliments innocus i als antígens comensals que afavoreix el desenvolupament de trastorns inflamatoris com la malaltia celíaca o l'IBD (Porrás et al., 2006), veure revisions (Salvo-Romero et al., 2015; Albert-Bayo et al., 2019).

El lloc efector del sistema immune intestinal es troba a nivell de l'epiteli i de la làmina pròpia adjacent. La làmina pròpia de l'intestí conté diferents cèl·lules immunes com són les cèl·lules plasmàtiques madures que produeixen IgA, limfòcits T, i altres tipus cel·lulars com macròfags, cèl·lules dendrítiques i mastòcits (MCs) que actuen sota la influència de les bacteries comensals, veure revisió (Perdue & McKay, 1994; Constantinescu et al., 2016).

4.1 Mastòcits

Els MCs intestinals són cèl·lules reguladores i efectores de la immunitat innata i adaptativa de mucosa que tenen un paper fonamental en la funció defensiva del tracte GI. Els MCs intervenen en diversos processos fisiològics, com és la integritat de barrera, així com en el manteniment d'interaccions neuro-immunes necessàries per a un correcte funcionament intestinal (Fernández-Blanco et al., 2011; Fernández-Blanco et al., 2015), veure revisió (Perdue & McKay, 1994). Aproximadament, un 70% dels MCs intestinals de mucosa estan en contacte directe amb l'ENS, i un altre 20% estan a una distància d'aproximadament 2 μm . Aquesta

posició estratègica dels MCs, els hi permet respondre a una gran varietat de neurotransmissors i neuropèptids com són l'ACh, el 5-HT, la substància P, el VIP i el factor d'alliberament de la corticotropina (CRF). Així mateix, també poden respondre a altres tipus d'estímuls, microbians, immunes, hormonals, metabòlics o químics gràcies a la varietat de receptors que posseeixen, veure revisions (L. Zhang et al., 2016; Albert-Bayo et al., 2019).

La immunitat innata a l'intestí es desencadena a través dels receptors de reconeixement de patrons (PRRs), que actuen com a sensors de patrons moleculars associats a patògens (PAMPs) i de patrons moleculars associats a danys (DAMPs), veure revisió (Santaolalla et al., 2011). Els receptors de tipus Toll (TLR) són els PRRs més estudiats en relació amb el reconeixement de PAMPs. Els MCs s'ha descrit que expressen els TLR1-10, veure revisió (Agier et al., 2018) a través dels quals desencadenen respostes específiques en funció dels PAMPs reconeguts. Per exemple, en rosegadors, s'ha descrit que l'activació del TLR4, per part de lipopolisacàrids, estimula la producció de citokines (TNF, IL-6, IL-13 i IL-1 β), sense produir la desgranulació mastocitària i que, en canvi, l'estimulació del TLR2, per peptidoglicans, indueix la producció d'altres citokines (TNF, IL-6, IL-13, IL-4 i IL-5) i la desgranulació dels MCs (Supajatura et al., 2002).

Una vegada es duu a terme l'activació mastocitària, es desencadena una resposta vehiculada mitjançant l'alliberació de mediadors continguts en els seus grànuls citoplasmàtics i cossos lipídics (com són la histamina i els proteoglicans) o d'altres que són sintetitzats *de novo* (com són les prostaglandines, els leucotriens i els tromboxans). L'alliberació dels mediadors mastocitaris afecta la integritat i viabilitat epitelial, promou la secreció d'aigua i ions, estimula respostes immunes i facilita les interaccions neuroimmunes que, a la vegada, promouen mecanismes secretors i motors. En els desordres intestinals, com l'IBD o l'IBS, s'ha descrit un augment del nombre de MCs, anomenat hiperplàsia mastocitària, així com de la taxa de desgranulació o activació dels MCs i de l'alliberament de mediadors mastocitaris com són la triptasa i la histamina (Barbara et al., 2004; Serna et al., 2006; Guilarte

et al., 2007; Buhner et al., 2009), veure revisions (Perdue & McKay, 1994; L. Zhang et al., 2016; Wouters et al., 2016; Albert-Bayo et al., 2019).

La histamina és un mediador mastocitari que exerceix els seus efectes a través de quatre receptors d'histamina (H) H₁, H₂, H₃ i H₄. A nivell intestinal, s'ha descrit l'expressió dels receptors H₁ i H₂ a l'epiteli, a la capa muscular i a les cèl·lules ganglionars del MP (Sander et al., 2006). Pel que fa als receptors H₃, s'ha reportat que produeixen l'excitabilitat de les neurones del SMP de l'intestí humà però, en canvi, els seus nivells d'expressió són mínims a nivell intestinal (Sander et al., 2006; Breunig et al., 2007).

5. Malalties inflamatòries i funcionals del tracte GI

Sota la denominació d'IBD hi trobem diverses entitats patològiques que cursen amb inflamació crònica de l'intestí. Les dues malalties més prevalents són la UC i la CD. El procés inflamatori de la UC es localitza especialment a la part més superficial del còlon (capa mucosa) i s'estén des del recte cap a altres zones del còlon, veure revisió (Sands, 2004). En canvi, la CD pot afectar tant l'intestí prim com el gruixut, presentant un procés inflamatori transmural. Tot i que no es coneix l'etiopatogènia exacte de la UC i de la CD, estudis en aquest àmbit suggereixen que pot ser deguda a respostes immunològiques i inflamatòries exacerbades en front a microorganismes luminals en individus genèticament susceptibles (Constantinescu et al., 2016).

Per altra banda, l'IBS és un dels desordres funcionals del tracte GI (FGID) més freqüent, que pot cursar amb episodis de diarrea (IBS-D), de constipació (IBS-C) o d'alternança entre ambdós (IBS-M). La simptomatologia de l'IBS és inespecífica i, per aquest motiu, el diagnòstic es sol basar en l'exclusió de malalties orgàniques, veure revisió (Borghini et al., 2017). Tot i que no es coneix exactament la seva base fisiopatològica, s'ha descrit que l'IBS es pot desencadenar per disfuncions en la senyalització bioquímica entre el sistema nerviós central i el tracte GI anomenada,

brain-gut axis, així com per l'activació immunitària, l'alteració de la funció barrera i l'augment de la sensibilitat neuronal (Wouters et al., 2016). A més a més, els factors psicosocials, com l'estrès i els factors ambientals, com són les infeccions intestinals, també s'ha descrit que participen en la resposta (Drossman, 2016; Constantinescu et al., 2016), veure revisió (Wouters et al., 2016).

5.1 Rol dels patògens entèrics

L'*E. coli* enterotoxigènic (ETEC) és la causa de diarrea més comuna en nens i té un paper predominant en la diarrea del viatger, veure revisió (Mirhoseini et al., 2018). A més a més, en el cicle productiu porcí, també és responsable del síndrome de diarrea post-deslletament, veure revisió (Luppi, 2017).

L'ETEC utilitza els factors de colonització, com les fimbries (F4 o K88, F5 o K99, F6 o 987P, F17 i F18), per adherir-se als enteròcits. Seguidament, prolifera a l'organisme i colonitza l'intestí prim. A més a més, la seva fase de proliferació està associada amb la producció i l'alliberació de diverses enterotoxines (LT, ST_a, ST_b, EAST1) que estimulen la secreció intestinal a través de diferents mecanismes d'acció, veure revisió (Moeser & Blikslager, 2007).

La enterotoxina termolàbil (LT) posseeix una estructura i un mecanisme d'acció similar a la CT produïda pel *Vibrio cholerae*. A partir d'una subunitat activa, que s'interioritza a les cèl·lules epitelials, activa l'adenilat ciclasa (AC) dels enteròcits i consegüentment incrementa els nivells intracel·lulars de cAMP (Peterson & Whipp, 1995). En canvi, les enterotoxines termoestables, ST_a i EAST1, s'uneixen al domini extracel·lular del GC, augmentant els nivells intracel·lulars de cGMP. Pel que fa a la enterotoxina termoestable ST_b, el seu mecanisme d'acció no es coneix amb tanta exactitud, però hi ha estudis que demostren que augmenta els nivells intracel·lulars de Ca²⁺ (Dreyfus et al., 1993; Fujii et al., 1997). Per altra banda, la CT i la ST_b, a més a més de l'efecte directe sobre l'epiteli, també tenen un efecte indirecte sobre la síntesi de PGE2 i l'alliberació de 5-HT per part de les cèl·lules enterocromafines (ECL) (Peterson & Whipp, 1995).

5.2 Rol de l'estrès

L'estrès influeix en el desenvolupament de malalties funcionals com l'IBS, ja que produeix alteracions en la motilitat, en els mecanismes secretors, en la funció barrera i en l'activació de MCs, tan en animals com en l'humà, veure revisions (Kunzelmann & Mall, 2002; Wouters et al., 2016). En malalties orgàniques com l'IBD, també s'ha descrit que l'estrès psicosocial contribueix en l'agreujament de la inflamació i dels símptomes intestinals observats (Bitton et al., 2003; Bernstein et al., 2010). Diversos models animals han descrit que l'augment de la permeabilitat intestinal és l'enllaç entre l'estrès i l'activació de la resposta immune, ja que permet el pas d'antígens luminals (Söderholm et al., 2002; F. Smith et al., 2010; Vicario et al., 2010). En paral·lel, en humans també s'ha descrit que els estressors psicosocials incrementen la permeabilitat intestinal de l'intestí prim, degut a l'activació d'una resposta d'estrès en la qual hi intervenen els MCs (Vanuytsel et al., 2014).

Un dels principals coordinadors de la resposta d'estrès és el CRF i pèptids relacionats, urocortina (Ucn) 1, 2 i 3. El CRF és un pèptid de 41 aminoàcids que s'allibera a nivell del nucli paraventricular de l'hipotàlem, aquest activa l'eix hipotalàmic-hipofisiari-suprarenal (HPA) que estimula l'alliberació d'ACTH (hormona adrenocorticotròpica) que posteriorment actua en els receptors de la glàndula suprarenal per estimular la síntesi i alliberament de glucocorticoides, veure revisió (Bale & Vale, 2004). A més a més, el CRF també té accions perifèriques. A l'intestí, el CRF mostra diferents accions biològiques a través de la interacció amb els receptors CRFR₁ i CRFR₂, que són receptors acoblats a proteïna G (GPCR). El CRF i la Ucn 1 tenen una afinitat equivalent pel CRFR₁, en canvi, la Ucn 1 és 40 vegades més potent que el CRF per unir-se al CRFR₂. Per altra banda, la Ucn 2 i 3, s'uneixen selectivament al CRFR₂. Els MCs intestinals subepitelials, posseeixen receptors CRFR₁ i CRFR₂ que els hi permeten regular l'alliberació de mucina, la secreció d'ions i aigua, la permeabilitat intestinal, la hipersensibilitat visceral i la motilitat, veure revisions (Wouters et al., 2016; Albert-Bayo et al., 2019).

Existeixen diferents models animals que s'han utilitzat per estudiar l'impacte de l'estrès en els desordres GI. Tot i així, els models més validats són els que simulen unes condicions d'estrès similars a les que es duen a terme en l'entorn natural, a partir d'estressors socials o psicològics, com són la derrota social o la formació de la jerarquia social, veure revisió (Tamashiro et al., 2005). En l'espècie porcina, l'estrès ocasionat durant l'etapa del deslletament té una alta importància per les conseqüències clíniques observades en el període del post-deslletament. A diferència del que passa a la natura, en el cicle productiu porcí el deslletament es duu a terme en edats més primerenques i de manera abrupta. Això fa que els animals estiguin sotmesos a canvis psicosocials (transport a unes noves instal·lacions, establiment de noves jerarquies, separació de la mare) i immunològics (exposició a nous antígens alimentaris i patògens) que acaben produint alteracions en el tracte GI. Diversos estudis en aquest àmbit demostren que el deslletament és un factor que desencadena alteracions en la permeabilitat intestinal i un augment de la susceptibilitat a patògens entèrics, que clínicament s'ha relacionat amb cursos de diarrea crònica comparables amb els observats en l'IBS humà, veure revisions (Pohl et al., 2015; Moeser et al., 2017).

Referències

- Agier, J., Pastwińska, J., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2018). An overview of mast cell pattern recognition receptors. *Inflammation Research*, *67*(9), 737–746. <https://doi.org/10.1007/s00011-018-1164-5>
- Ahsan, M. K., Tchernychev, B., Kessler, M. M., Solinga, R. M., Arthur, D., Linde, C. I., Silos-Santiago, I., Hannig, G., & Ameen, N. A. (2017). Linacotide activates guanylate cyclase-C/cGMP/protein kinase-II-dependent trafficking of CFTR in the intestine. *Physiological Reports*, *5*(11), e13299. <https://doi.org/10.14814/phy2.13299>
- Albert-Bayo, M., Paracuellos, I., González-Castro, A. M., Rodríguez-Urrutia, A., Rodríguez-Lagunas, M. J., Alonso-Cotoner, C., Santos, J., & Vicario, M. (2019). Intestinal Mucosal Mast Cells: Key Modulators of Barrier Function and Homeostasis. *Cells*, *8*(2), 135. <https://doi.org/10.3390/cells8020135>
- Albertí, E., Mikkelsen, H. B., Larsen, J. O., & Jiménez, M. (2005). Motility patterns and distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in the proximal, mid- and distal-colon of the rat. *Neurogastroenterology and Motility*, *17*(1), 133–147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2004.00603.x>
- Bale, T. L., & Vale, W. W. (2004). CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*, 525–557. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410>
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G. S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A. M., Grady, E. F., Bunnett, N. W., Collins, S. M., & Corinaldesi, R. (2004). Activated Mast Cells in Proximity to Colonic Nerves Correlate with Abdominal Pain in Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, *126*(3), 693–702. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.11.055>
- Barrett, K. E., & Keely, S. J. (2000). Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annual Review of Physiology*, *62*, 535–572. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.535>
- Bassotti, G., & Battaglia, E. (2015). Physiology of the Colon. In C. Ratto, A. Parrello,

- L. Dionisi, & F. Litta (Eds.), *Coloproctology*. Springer.
- Bernstein, C. N., Singh, S., Graff, L. A., Walker, J. R., Miller, N., & Cheang, M. (2010). A prospective population-based study of triggers of symptomatic flares in IBD. *The American Journal of Gastroenterology*, *105*(9), 1994–2002. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.140>
- Bitton, A., Sewitch, M. J., Peppercorn, M. A., deB Edwardes, M. D., Shah, S., Ransil, B., & Locke, S. E. (2003). Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *The American Journal of Gastroenterology*, *98*(10), 2203–2208. [https://doi.org/10.1016/s0002-9270\(03\)00750-0](https://doi.org/10.1016/s0002-9270(03)00750-0)
- Borghini, R., Donato, G., Alvaro, D., & Picarelli, A. (2017). New insights in IBS-like disorders: Pandora's box has been opened; a review. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, *10*(2), 79–89. <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v0i0.1011>
- Breunig, E., Michel, K., Zeller, F., Seidl, S., Weyhern, C. W., & Schemann, M. (2007). Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *The Journal of Physiology*, *583*(Pt 2), 731–742. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.139352>
- Brierley, S., & Costa, M. (2016). *The Enteric Nervous System*. Springer.
- Brown, D. R., & Timmermans, J. P. (2004). Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterology and Motility*, *16 Suppl 1*, 50–54. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00475.x>
- Buhner, S., Li, Q., Vignali, S., Barbara, G., De Giorgio, R., Stanghellini, V., Cremon, C., Zeller, F., Langer, R., Daniel, H., Michel, K., & Schemann, M. (2009). Activation of Human Enteric Neurons by Supernatants of Colonic Biopsy Specimens From Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology*, *137*(4), 1425–1434. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.07.005>
- Bult, H., Boeckstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maercke, Y. M., & Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, *345*(6273), 346–347.

- Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., & Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *British Journal of Pharmacology*, 40(4), 668–688. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1997.tb06815.x>
- Cajal, S. R. (1893). Sur les ganglions et plexus de l'intestin. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales*, 45, 217-223.
- Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Greenwood-Van Meerveld, B., & Verne, G. N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and Motility*, 24(6), 503–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01921.x>.Intestinal
- Canals, M., Poole, D., Veldhuis, N., Schmidt, B., & Bunnett, N. (2019). G-Protein–Coupled Receptors Are Dynamic Regulators of Digestion and Targets for Digestive Diseases. *Gastroenterology*, 156(6), 1600–1616. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.01.266>.G-Protein
- Chao, H., Turdi, H., Herpin, T. F., Roberge, J. Y., Liu, Y., Schnur, D. M., Poss, M. A., Rehfuss, R., Hua, J., Wu, Q., Price, L. A., Abell, L. M., Schumacher, W. A., Bostwick, J. S., Steinbacher, T. E., Stewart, A. B., Ogletree, M. L., Huang, C. S., Chang, M., ... Lawrence, R. M. (2013). Discovery of 2-(phenoxy pyridine)-3-phenylureas as small molecule P2Y1 antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(4), 1704–1714. <https://doi.org/10.1021/jm301708u>
- Christenen, J. (1991). Gross and microscopic anatomy of the large. In S. F. Philips, J. H. Pemberton, & R. G. Shorter (Eds.), *The Large Intestine: physiology, pathophysiology, and disease*. Reven Pres.
- Clarke, L. L. (2009). A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), G1151–G1166. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90649.2008>
- Conn, P. J., Christopoulos, A., & Lindsley, C. W. (2009). Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 8(1), 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrd2760>.Allosteric

- Constantinescu, C. S., Arsenescu, R. I., & Arsenescu, V. (2016). *Neuro-Immuno-Gastroenterology*. Springer.
- Corsetti, M., Costa, M., Bassotti, G., Bharucha, A. E., Borrelli, O., Dinning, P., Di Lorenzo, C., Huizinga, J. D., Jimenez, M., Rao, S., Spiller, R., Spencer, N. J., Lentle, R., Pannemans, J., Thys, A., Benninga, M., & Tack, J. (2019). First translational consensus on terminology and definitions of colonic motility in animals and humans studied by manometric and other techniques. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(9), 559–579. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0167-1>
- Dinning, P. G., Zarate, N., Hunt, L. M., Fuentealba, S. E., Mohammed, S. D., Szczesniak, M. M., Lubowski, D. Z., Preston, S. L., Fairclough, P. D., Lunniss, P. J., Scott, S. M., & Cook, I. J. (2010). Pancolonic spatiotemporal mapping reveals regional deficiencies in, and disorganization of colonic propagating pressure waves in severe constipation. *Neurogastroenterology and Motility*, 22(12), e340–e349. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01597.x>
- Dreyfus, L. A., Harville, B., Howard, D. E., Shaban, R., Beatty, D. M., & Morris, S. J. (1993). Calcium influx mediated by the Escherichia coli heat-stable enterotoxin B (STB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), 3202–3206. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3202>
- Drossman, D. A. (2016). Functional gastrointestinal disorders: History, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. *Gastroenterology*, S0016-5085(16)00223-7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.032>
- Drumm, B. T., Rembetski, B. E., Messersmith, K., Manierka, M. S., Baker, S. A., & Sanders, K. M. (2020). Pacemaker function and neural responsiveness of subserosal interstitial cells of Cajal in the mouse colon. *The Journal of Physiology*, 598(4), 651–681. <https://doi.org/10.1113/JP279102.Pacemaker>
- Farré, R., & Vicario, M. (2016). Abnormal Barrier Function in Gastrointestinal Disorders. In B. Greenwood-Van Meerveld (Ed.), *Gastrointestinal Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer, Cham.
- Faussone-Pellegrini, M. S., & Thuneberg, L. (1999). Guide to the identification of

- interstitial cells of Cajal. *Microscopy Research and Technique*, 47(4), 248–266. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19991115\)47:4<248::AID-JEMT4>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19991115)47:4<248::AID-JEMT4>3.0.CO;2-W)
- Fernández-Blanco, J. A., Barbosa, S., Sánchez de Medina, F., Martínez, V., & Vergara, P. (2011). Persistent epithelial barrier alterations in a rat model of postinfectious gut dysfunction. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(11), e523–e533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01777.x>
- Fernández-Blanco, J. A., Estévez, J., Shea-Donohue, T., Martínez, V., & Vergara, P. (2015). Changes in epithelial barrier function in response to parasitic infection: Implications for IBD pathogenesis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 9(6), 463–476. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv056>
- Fleming, M. A., Ehsan, L., Moore, S., & Levin, D. (2020). The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. *Gastroenterology Research and Practice*, 2020, 8024171. <https://doi.org/10.1155/2020/8024171>
- Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H., & Okamoto, K. (1997). Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of Escherichia coli heat-stable enterotoxin II. *Microbiology and Immunology*, 41(8), 633–636. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01904.x>
- Furness, J. B. (2006). *The Enteric Nervous System*. Blackwell, Oxford.
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology*, 9(5), 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Furness, J. B., & Sanger, G. J. (2002). Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: Identification of drug targets. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(6), 612–622. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00219-9)

- Gonzalez, L. M., Moeser, A. J., & Blikslager, A. T. (2015). Porcine models of digestive disease: The future of large animal translational research. *Translational Research*, 166(1), 12–27. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.01.004>
- Greger, R. (2000). Role of CFTR in the colon. *Annual Review of Physiology*, 62, 467–491. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.467>
- Guilarte, M., Santos, J., de Torres, I., Alonso, C., Vicario, M., Ramos, L., Martinez, C., Casellas, F., Saperas, E., & Malagelada, J. R. (2007). Diarrhoea-predominant IBS patients show mast cell activation and hyperplasia in the jejunum. *Gut*, 56(2), 203–209. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.100594>
- Hall, J. E. (2006). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. Twelfth edition.* Saunders Elsevier.
- Hansen, M. B. (2003). The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacology & Toxicology*, 92(3), 105–113. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.t01-1-920301.x>
- Hens, J., Schrödl, F., Brehmer, A., Adriaensen, D., Neuhuber, W., Scheuermann, D. W., Schemann, M., & Timmermans, J. P. (2000). Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *The Journal of Comparative Neurology*, 421(3), 429–436.
- Hirota, C. L., & McKay, D. M. (2006). Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *British Journal of Pharmacology*, 149(5), 463–479. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706889>
- Huizinga, J. D., Diamant, N. E., & El-Sharkawy, T. Y. (1983). Electrical basis of contractions in the muscle layers of the pig colon. *The American Journal of Physiology*, 245(4), G482–G491. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1983.245.4.g482>
- Jiménez, M., Borderies, J. R., Vergara, P., Wang, Y., & Daniel, E. E. (1999). Slow waves in circular muscle of porcine ileum: Structural and electrophysiological studies. *The American Journal of Physiology*, 276(2), G393–G406. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.2.g393>

- Jiménez, M., Clavé, P., Accarino, A., & Gallego, D. (2014). Purinergic neuromuscular transmission in the gastrointestinal tract; functional basis for future clinical and pharmacological studies. *British Journal of Pharmacology*, *171*(19), 4360–4375. <https://doi.org/10.1111/bph.12802>
- Keely, S. J., Montrose, M. H., & Barrett, K. E. (2009). Electrolyte Secretion and Absorption: Small Intestine and Colon. In M. Yamada (Ed.), *Textbook of Gastroenterology, Fifth Edition* (Vol. 1, pp. 330–367). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444303254.ch14>
- Koh, S. D., Ward, S. M., & Sanders, K. M. (2012). Ionic conductances regulating the excitability of colonic smooth muscles. *Neurogastroenterology and Motility*, *24*(8), 705–718. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2012.01956.x.Ionic>
- Kunzelmann, K., & Mall, M. (2002). Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiological Reviews*, *82*(1), 245–289. <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2001>
- Lecea, B., Gallego, D., Farré, R., Opazo, A., Aulí, M., Jiménez, M., & Clavé, P. (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitrenergic and nonnitrenergic coneurotransmission in the human esophagus. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *300*(5), G782–G794. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00514.2009>
- Luppi, A. (2017). Swine enteric colibacillosis: Diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, *3*, 16. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>
- Mañé, N., Martínez-Cutillas, M., Gallego, D., & Jimenez, M. (2015). Enteric motor pattern generators involve both myogenic and neurogenic mechanisms in the human colon. *Frontiers in Physiology*, *6*, 205. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00205>
- Mankertz, J., & Schulzke, J. D. (2007). Altered permeability in inflammatory bowel disease: Pathophysiology and clinical implications. *Current Opinion in Gastroenterology*, *23*(4), 379–383. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32816aa392>

- McConalogue, K., & Furness, J. B. (1994). Gastrointestinal neurotransmitters. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 8(1), 51–76. [https://doi.org/10.1016/s0950-351x\(05\)80226-5](https://doi.org/10.1016/s0950-351x(05)80226-5)
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunology*, 3(3), 247–259. <https://doi.org/10.1038/mi.2010.5>
- Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., & Gerdtts, V. (2012). The pig: A model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 20(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.002>
- Mirhoseini, A., Amani, J., & Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.032>
- Moeser, A. J., & Blikslager, A. T. (2007). Mechanisms of porcine diarrheal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 231(1), 56–67. <https://doi.org/10.2460/javma.231.1.56>
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., & Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*, 3(4), 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>
- Odenwald, M. A., & Turner, J. R. (2017). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(1), 9–21. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.169>
- Perdue, M. H., & McKay, D. M. (1994). Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *The American Journal of Physiology*, 267(2 Pt 1), G151–G165. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.267.2.g151>
- Peterson, J. W., & Whipp, S. C. (1995). Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63(4), 1452–1461. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1452-1461.1995>
- Plujà, L., Albertí, E., Fernández, E., Mikkelsen, H. B., Thuneberg, L., & Jiménez, M.

- (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(1), G255–G266. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.1.g255>
- Pohl, C. S., Medland, J. E., & Moeser, A. J. (2015). Early-life stress origins of gastrointestinal disease: Animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(12), G927–G941. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00206.2015>
- Porras, M., Martín, M. T., Yang, P. C., Jury, J., Perdue, M. H., & 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. <https://doi.org/10.1097/01.mib.0000231571.88806.62>
- Powell, D. W. (1981). Barrier function of epithelia. *The American Journal of Physiology*, 241(4), G275–G288.
- Ratto, C. (2017). Colon, Rectum and Anus: Anatomic, Physiologic and Diagnostic Bases for Disease Management. In C. Ratto, A. Parrello, L. Donisi, & F. Litta (Eds.), *Coloproctology*. Springer International Publishing.
- Reinus, J. F., & Douglas Simon, M. D. (2014). *Gastrointestinal Anatomy and Physiology: The Essentials*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Riegler, M., & Matthews, J. B. (2001). Models of Intestinal Secretion and Absorption. In W. W. Souba & D. W. Wilmore (Eds.), *Surgical Research* (pp. 533–546). Academic Press, an Imprint of Elsevier, Inc.
- Salvo-Romero, E., Alonso-Cotner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M., & Vicario, M. (2015). The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Revista Espanola de Enfermedades Digestivas*, 107(11), 686–696. <https://doi.org/10.17235/reed.2015.3846/2015>
- Sander, L. E., Lorentz, A., Sellge, G., Coëffier, M., Neipp, M., Veres, T., Frieling, T., Meier, P. N., Manns, M. P., & Bischoff, S. C. (2006). Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal

- tract. *Gut*, 55(4), 498–504. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.061762>
- Sanders, K. M., Koh, S. D., Ro, S., & Ward, S. M. (2012). Regulation of gastrointestinal motility-insights from smooth muscle biology. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(11), 633–645. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.168>
- Sanders, K. M., & Smith, T. K. (1986). Enteric neural regulation of slow waves in circular muscle of the canine proximal colon. *The Journal of Physiology*, 377, 297–313. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1986.sp016188>
- Sanders, K. M., Ward, S. M., & Koh, S. D. (2014). Interstitial cells: Regulators of smooth muscle function. *Physiological Reviews*, 94(3), 859–907. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2013>
- Sands, B. E. (2004). From symptom to diagnosis: Clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*, 126(6), 1518–1532. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.072>
- Santaolalla, R., Fukata, M., & Abreu, M. T. (2011). Innate immunity in the small intestine. *Current Opinion in Gastroenterology*, 27(2), 125–131. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3283438dea.Innate>
- Sarna, S. K. (2006). Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291(4), G545–G555. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00122.2006>
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: A multifunctional complex. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 286(6), C1213–C1228. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003>
- Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8), 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Serna, H., Porrás, M., & 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. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.104620>
- Smith, F., Clark, J. E., Overman, B. L., Tozel, C. C., Huang, J. H., Rivier, J. E., Blisklager, A. T., & Moeser, A. J. (2010). Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(3), G352–G363. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00081.2009>
- Smith, T. K., Reed, J. B., & Sanders, K. M. (1987). Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *The American Journal of Physiology*, 252(3 Pt 1), C290–C299. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1987.252.3.c290>
- Söderholm, J. D., Yang, P. C., Ceponis, P., Vohra, A., Riddell, R., Sherman, P. M., & Perdue, M. H. (2002). Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology*, 123(4), 1099–1108. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36019>
- Spencer, N. J., Dinning, P. G., Brookes, S. J., & Costa, M. (2016). Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns. *The Journal of Physiology*, 594(15), 4099–4116. <https://doi.org/10.1113/JP271919>
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., & Ogawa, H. (2002). Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(10), 1351–1359. <https://doi.org/10.1172/jci200214704>
- Tamashiro, K. L., Nguyen, M. M., & Sakai, R. R. (2005). Social stress: From rodents to primates. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.03.001>
- Thuneberg L. (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells. *Advances in Anatomy, Embriology and Cell Biology*, 71(1), 130.

- Timmermans, J., Hens, J., & Adriaensen, D. (2001). Outer submucous plexus: An intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *The Anatomical Record*, 262(1), 71–78. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20010101\)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20010101)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A)
- Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., Kozáková, H., Rossmann, P., Bártová, J., Sokol, D., Funda, D. P., Borovská, D., Řeháková, Z., Šinkora, J., Hofman, J., Drastich, P., & Kokešová, A. (2004). Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunology Letters*, 93(2–3), 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.02.005>
- Ussing, H. H., & Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiologica Scandinavica*, 23(2–3), 110–127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>
- Vanuytsel, T., van Wanrooy, S., Vanheel, H., Vanormelingen, C., Verschueren, S., Houben, E., Salim Rasoel, S., Tóth, J., Holvoet, L., Farré, R., Van Oudenhove, L., Boeckxstaens, G., Verbeke, K., & Tack, J. (2014). Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut*, 63(8), 1293–1299. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305690>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Tor, L., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (Eds.). (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer.
- Vicario, M., Guilarte, M., Alonso, C., Yang, P., Martínez, C., Ramos, L., Lobo, B., González, A., Guilà, M., Pigrau, M., Saperas, E., Azpiroz, F., & Santos, J. (2010). Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(7), 1166–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.06.002>
- Welcome, M. O. (2018). *Gastrointestinal physiology. Development, Principles and*

Mechanisms of Regulation. Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3422-0.00001-8>

- Wouters, M. M., Vicario, M., & Santos, J. (2016). The role of mast cells in functional GI disorders. *Gut*, *65*(1), 155–168. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309151>
- Yin, L., Yang, H., Li, J., Li, Y., Ding, X., Wu, G., & Yin, Y. (2017). Pig models on intestinal development and therapeutics. *Amino Acids*, *49*(12), 2099–2106. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2497-z>
- Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M., & 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. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.094375>
- Zhang, D., Gao, Z., Zhang, K., Kiselev, E., Crane, S., Wang, J., Paoletta, S., Yi, C., Ma, L., Zhang, W., Han, G. W., Liu, H., Cherezov, V., Katritch, V., Jiang, H., Stevens, R. C., Jacobson, K. A., Zhao, Q., & Wu, B. (2015). Two disparate ligand binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature*, *520*(7547), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Zhang, L., Song, J., & Hou, X. (2016). Mast cells and irritable bowel syndrome: From the bench to the bedside. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *22*(2), 181–192. <https://doi.org/10.5056/jnm15137>

HIPÒTESI I OBJECTIUS

Per poder entendre les diferents alteracions intestinals observades en el cicle productiu porcí i conèixer els mecanismes implicats, cal establir el paper del sistema immune i l'ENS en les funcions del tracte GI. En aquest context, la hipòtesi central d'aquest treball és que l'estrès a les primeres etapes de la vida, així com la infecció intestinal per patògens entèrics, com l'ETEC, alteren les respostes motores i secretores del còlon porcí durant el post-deslletament.

Per tal de testar aquesta hipòtesi, primerament s'ha estudiat i caracteritzat la transmissió neuromuscular i els mecanismes neurosecretors del còlon del porc. Posteriorment, també s'han avaluat els mecanismes de barrera, de motilitat i el transport actiu iònic en els dos models animals estudiats: un model d'infecció intestinal per ETEC en l'etapa posterior al deslletament i un model de socialització primerenca durant el deslletament.

Els objectius principals d'aquesta tesi doctoral, que s'ha centrat en el còlon porcí, han sigut:

- Caracteritzar la transmissió neuromuscular, inhibidora i excitatòria
- Caracteritzar la resposta neurosecretora
- Estudiar els canvis en la transmissió neuromuscular, en el transport actiu iònic i en la funció barrera en un model porcí d'infecció experimental per ETEC en l'etapa del postdeslletament
- Estudiar els canvis en la transmissió neuromuscular, en el transport actiu iònic i en la funció barrera en un model etiològic de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental en l'etapa del postdeslletament

CAPÍTOL 1

Different responses of the blockade of the P2Y₁ receptor with BPTU in human and porcine intestinal tissues and in cell cultures.

Neurogastroenterology and Motility 22:e14101 (2021)

Abstract

Background: GI smooth muscle relaxation is accomplished by activation of P2Y₁ receptors, therefore this receptor plays an important role in regulation of gut motility. Recently, BPTU was developed as a negative allosteric modulator of the P2Y₁ receptor. Accordingly, the aim of this study was to assess the effect of BPTU on purinergic neurotransmission in pig and human GI tissues.

Methods: Ca²⁺ imaging in tSA201 cells that express the human P2Y₁ receptor, organ bath and microelectrodes in tissues were used to evaluate the effects of BPTU on purinergic responses.

Key results: BPTU concentration-dependently (0.1 and 1 μM) inhibited the rise in intracellular Ca²⁺ evoked by ADP in tSA201 cells. In the pig small intestine, 30 μM BPTU reduced the IJPF by 80%. Smooth muscle relaxations induced by electrical field stimulation (EFS) were reduced both in pig ileum (EC₅₀ = 6 μM) and colon (EC₅₀ = 35 μM), but high concentrations of BPTU (up to 100 μM) had no effect on human colonic muscle. MRS2500 (1 μM) abolished all responses. Finally, 10 μM ADPβS inhibited spontaneous motility and this was partially reversed by 30 μM BPTU in pig, but not human colonic tissue and abolished by MRS2500 (1 μM).

Conclusions and inferences: BPTU blocks purinergic responses elicited via P2Y₁ receptors in cell cultures and in pig GI tissue. However, the concentrations needed are higher in pig tissue compared to cell cultures and BPTU was ineffective in human colonic tissue.

Key words: P2Y₁ receptors, purinergic response, BPTU, colon, tSA201 cells.

Introduction

GPCRs are involved in many GI mechanisms related to perception, motility and secretion, so GPCR agonists and antagonists are important modulators of GI function. The orthosteric site of the receptor is often highly conserved and consequently, drugs that bind to this site can lack selectivity between different receptor subtypes. One approach to increasing selectivity is to develop pharmacological tools that bind to allosteric sites, which, therefore, can potentiate or inhibit endogenous agonists. Allosteric sites are usually less conserved than the orthosteric site and so offer opportunities for receptor subtype-selective GI modulation ¹.

Two main neurotransmitters, NO and ATP, or a related purine, mediate inhibitory neuromuscular transmission in the GI tract. The electrophysiological mechanism responsible for the relaxation is an IJP, which consists of a IJPf, followed by a IJPs component that are mediated by purines and NO, respectively ^{2 3}. It is well established that P2Y₁ receptors (a Class A GPCR) are responsible for nerve-mediated purinergic relaxation in the GI tract. The IJPf and the corresponding purinergic relaxation is absent in Knockout mice that lack P2Y₁ receptors ^{4 5 6}. Furthermore, the P2Y₁ receptor orthosteric inhibitors, MRS2179, MRS2279, MRS2500, all inhibit the IJPf and purine-mediated relaxation of both the small and large human intestine in a concentration-dependent manner ^{7 8}.

Recently, an allosteric inhibitor, 1-(2-(2-(tert-butyl)phenoxy)pyridin-3-yl)-3-(4-(trifluoromethoxy)-phenyl)urea (BPTU) was developed, which binds to a pocket at the external interface of the P2Y₁ receptor with the lipid bilayer, making it the first structurally characterized, selective GPCR ligand that acts entirely outside of the helical bundle ⁹. The molecular mechanism of P2Y₁ receptor activation and blockade has been characterized in detail ^{10 11}. A pharmacological study performed *in vitro* has shown that the inhibitory effects of BPTU and MRS2500 can be surmountable or unsurmountable depending on the signalling pathway measured, and the agonist used to activate the receptor ¹².

All these studies have been performed in cell cultures and therefore, it is mandatory to study these compounds in tissues. In 2016, we reported that BPTU blocked the IJPF and the mechanical purinergic relaxation in colonic muscle strips of rodents ¹³. Recently, we demonstrated that both MRS2500 and BPTU blocked the hyperpolarization and relaxation induced by diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) in the rat colon ¹⁴. Accordingly, the aim of this work was to determine the effects of BPTU first in a large animal model and then in human tissue. Finally, due to possible discrepancies between these results we wanted to compare these actions with mouse colonic tissue and cultured cells in which the human P2Y₁ receptor is endogenously expressed.

Materials and Methods

Cell culture

tSA201 cells (ECACC Cat# 96121229, RRID:CVCL_2737), a modified HEK293 cell line, were grown and prepared for recording of intracellular Ca²⁺ levels as described previously ^{15 16}. Briefly, cells were maintained in 5% CO₂, 95% O₂ in a humidified incubator at 37°C, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Life Technologies, Paisley, UK), supplemented with 10% foetal calf serum, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin (10,000 units mL⁻¹) and streptomycin (10 mg mL⁻¹). Prior to recording, the cells were plated onto 13 mm glass coverslips coated with poly-L-lysine (0.1 mg mL⁻¹) and experiments performed once a confluent monolayer of cells had developed.

Tissue preparation

Mouse Tissue. Eight CD1 mice (male, 8-18 wk old) were housed under controlled conditions: constant temperature (22 ± 2 °C) and humidity (55 ± 10 %), 12 h light/dark cycle and *ad libitum* access to water and food. Mice were euthanized by cervical dislocation. The colon was quickly removed and placed in carboxygenated (5 % CO₂:95 % O₂) Krebs solution. The mesenteric fat was removed, the colon was opened along the mesenteric border and pinned to a Sylgard base with the mucosa facing up. The mucosal and submucosal layers were removed, and 1 cm long by

0.4 cm wide strips were cut in a circular direction. The experimental protocol was review and authorised by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Pig Tissue. Sixteen Danbred piglets (male, 4-5 wk old, 6-9 kg) were group-housed under conventional conditions in a light (13 h:11 h light/dark cycle) and temperature-controlled (28 ± 2 °C) room. To maintain an optimal temperature, partial floor heating and a heat lamp were provided in the pen. Commercial feed and drinking water were provided *ad libitum*. Euthanasia was performed under intramuscular sedation with Xylazine (2.2 mg kg⁻¹ BW; Rompun, Bayer) and Zolazepam - Tiletamine (8 mg kg⁻¹ BW; Zoletil 100, Virbac) and carried out by means of intravenous sodium pentobarbital (200 mg kg⁻¹ BW; Dolethal, Vetoquinol S.A.) in the Animal Facility of the Veterinary Faculty (UAB). Pieces of colon (n=16) and ileum (n=16) were used to perform the experiments. Tissues were collected and transported to the laboratory in ice-cold carbogenated Krebs solution. Once in the laboratory, specimens were placed on a dissection dish, and the mucosal and submucosal layers were gently removed. Muscle strips (1 cm long by 0.4 cm wide) were cut in circular orientation. The experimental protocol was review and authorised by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Human Tissue. Samples of colon from macroscopically normal regions were obtained from patients (n = 10; 5 woman and 5 men, aged 57–89 years, supplementary figure 1) during colon resections for neoplasm and transported to the laboratory in cold saline buffer. The tissue was placed in Krebs solution on a dissection dish and the mucosal layer was removed. Circular muscle strips (1 cm long by 0.4 cm wide) were cut. The patients of this study provided written, informed consent, and the experimental procedure was approved by the Ethics Committee of the Hospital de la Vall d'Hebron (Barcelona).

Ca²⁺ imaging

Cells were bathed in a buffer comprising (in mM): NaCl 122; KCl 5; HEPES 10; KH₂PO₄ 0.5; NaH₂PO₄ 0.5; MgCl₂ 1; glucose 11; CaCl₂ 1.8, titrated to pH 7.3 with NaOH. Intracellular Ca²⁺ was monitored using the Ca²⁺-sensitive fluorescent indicator, Cal-520. Cells on a coverslip were incubated for 1 h at 37°C in the dark in buffer containing Cal-520-AM ester (5 µM) and Pluronic™ F-127 (0.05% w/v in DMSO) (Life Technologies, Paisley, UK). The coverslip was then placed vertically in the recording chamber of a Perkin Elmer LS50B luminescence spectrophotometer and the cells superfused continuously with buffer, applied under gravity at 4 mL min⁻¹ and room temperature. Cal-520 fluorescence, measured as arbitrary units (AU) in a population of cells, was sampled at 10 Hz following stimulation at 490 ± 15 nm and the emission recorded at 525 ± 15 nm using FL Winlab software (V4.00.02). Resting Ca²⁺ levels were stable over the course of the experiment. Agonists were added in the superfusate until the response reached a peak (60-90 s) at 10 min intervals. For each drug addition, the peak response amplitude was determined. The following drugs were used in the experimental protocol: Adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP) (Sigma-Aldrich Co, Gillingham, Dorset, UK) which was dissolved in deionised water and BPTU (Tocris, Bristol, UK) that was dissolved in DMSO. 0.1% DMSO has no effect on Ca²⁺ levels or nucleotide evoked responses in tSA201 cells (Kennedy, *unpublished observations*).

All coverslips of tSA201 cells were first exposed to ADP (10 µM) twice to confirm cell viability. To determine the potency of ADP, concentration-response curves were then generated by superfusing cells with increasing concentrations of ADP. The data were normalised by calculating each response in AU as a percentage of the response to ADP 10 µM within the concentration-response curves. When characterising the actions of BPTU, only one concentration of ADP and BPTU were applied to each coverslip of cells. Cells were first exposed to ADP 10 µM twice, then the test concentration of ADP was applied three times. This protocol evoked reproducible responses. BPTU 100 nM or 1 µM was then applied to the cells for 5 min, before co-administration with ADP. The responses to ADP in AU were

normalised by expressing them as a percentage of the amplitude of the second response to ADP 10 μ M.

Mechanical experiments

Ileum and colon circularly oriented muscle strips were mounted in a 10 mL organ bath filled with Krebs solution maintained at 37 ± 1 °C. A tension of 0.5, 1 and 4 g were applied to mouse, pig and human strips, respectively and they were allowed to equilibrate for 1 h. After this period, strips displayed spontaneous phasic contractions (SPC). In order to increase the spontaneous mechanical activity, pig and human tissues were incubated with carbachol (Cch) (1 μ M). An isometric force transducer (Harvard VF-1) connected to an amplifier was used to record the mechanical activity. Data were digitalized (25 Hz) using DATAWIN1 software (Panlab, Barcelona, Spain) coupled to an ISC-16 analog-to-digital card installed in a PC. EFS was applied through two platinum electrodes placed on the support holding the tissue. Colonic preparations were stimulated at 5 Hz, 0.4 ms pulse duration and 10 to 30 V for 1 to 2 min. The area under the curve (AUC) (g min^{-1}) of contractions from the baseline was measured to estimate mechanical activity before and after drug addition or before and during EFS. In order to normalize mechanical data, responses to drugs and EFS were expressed as a percentage of the basal AUC using the following formula: $1 - (\text{AUC during EFS or after drug incubation} / \text{AUC previous to EFS or drug addition})$ thus 0% represents complete cessation of spontaneous motility and 100% no change compared to basal activity.

Electrophysiological experiments

Electrophysiological experiments were performed with pig ileum strips dissected parallel to the circular muscle and pinned in a Sylgard- coated recording chamber. The tissue was continuously superfused with carboxygenated Krebs solution maintained at 37 ± 1 °C and allowed to equilibrate for approximately 1 h before experiments were undertaken. Phentolamine, atropine and propranolol (all at 1 μ M) were added to create NANC conditions. To obtain stable impalements, tissues were superfused with nifedipine (1 μ M) to abolish mechanical activity. L-NNA (1 mM) was

also added to the Krebs solution to block nitrenergic neurotransmission. Circular muscle cells were impaled with single, sharp glass microelectrodes filled with KCl (3 M) and with a tip resistance of 40 – 60 M Ω in order to record membrane potential responses to EFS and drugs. Membrane potential was measured using a standard electrometer, Duo773 (WPI, Sarasota, FL, USA). Recordings were displayed on an oscilloscope, 4026 (Racal-Dana Ltd., Windsor, UK) and simultaneously digitalized (100 Hz) with Power-Lab 4/30 system and Chart 5 software for Windows (both from ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). Intramuscular neurons were stimulated by EFS using a pair of silver chloride electrodes, one on each side of the preparation. IJPs were elicited by EFS (0.3 ms pulse width, supramaximal voltage). The amplitude (mV) of the IJp_f was calculated by measuring the difference between the maximal hyperpolarization and the resting membrane potential (rmp).

Solutions and drugs

The composition of the Krebs solution used in the mechanical and electrophysiological experiments was as follows (in mM): 10.10 glucose, 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO₃, 4.61 KCl, 1.14 NaH₂PO₄, 2.50 CaCl₂ and 1.16 MgSO₄, bubbled with a mixture of 5% CO₂:95% O₂ (pH 7.4). The following drugs were used: nifedipine, N ω -nitro-L-arginine (L-NNA), phentolamine, atropine sulphate, propranolol, adenosine 5'-[β -thio] diphosphate trilitium salt (ADP β S) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), byciclo [3.1.0] hexane-1-methanol dihydrogen phosphate ester tetraammonium salt (MRS2500), 2'-deoxy-N⁶-methyl adenosine 3',5'-diphosphate tetraammonium salt (MRS2179), (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium chloride carbamate (Cch) (Tocris, Bristol, UK), BPTU (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Stock solutions were made by dissolving drugs in distilled water, except for nifedipine, which was dissolved in ethanol (96%) (<0.001% v/v), BPTU, which was dissolved in DMSO and L-NNA which required sonication to be dissolved in Krebs solution.

Data analysis and statistics

ADP concentration-response curves in Ca^{2+} imaging was fitted to the data by logistic (Hill equation), nonlinear regression analysis and EC_{50} and maximum values calculated. EC_{50} values for BPTU, MRS2500 and MRS2179 on EFS-induced inhibition of spontaneous motility in pig ileum and colon were derived in the same way. Responses to drugs and EFS in mechanical experiments were expressed as a percentage of the basal AUC of contractions. As only one concentration of ADP and BPTU were applied to each coverslip of cells, Student's paired t test was used to evaluate the differences in the rise in intracellular Ca^{2+} induced by ADP in the absence and presence of BPTU. The effect of drugs on IJP and EFS or drug induced inhibition of spontaneous motility was evaluated by One way ANOVA followed by a Bonferroni's post hoc test. Data are expressed as mean \pm SEM and considered significantly different when $P < 0.05$. n values indicate the number of samples from different cell cultures or pig or human tissues. Statistical analysis and curve fit were performed with GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effect of BPTU on ADP-induced Ca^{2+} release

tSA201 cells, a modified Human Embryonic Kidney 293 cell line that expresses native P2Y_1 receptors, were used to determine the actions of BPTU at human P2Y_1 receptors. ADP evoked a concentration-dependent rise in intracellular Ca^{2+} , with an EC_{50} of 2.1 μM (1.5-2.9 μM 95% confidence limits) (n=4). Initial experiments with BPTU indicated that it is a non-competitive and irreversible antagonist, therefore, its actions were determined against three concentrations of ADP that were towards the bottom (1 μM), middle (3 μM) and the top (10 μM) of the quasi-linear portion of the ADP concentration-response curves. Preincubation with BPTU 100 nM had no effect *per se* on intracellular Ca^{2+} levels, but significantly decreased the responses to 1 μM ADP by $91.3 \pm 5.3\%$, to 3 μM ADP by $76.6 \pm 3.2\%$ and 10 μM ADP by $53.1 \pm 1.9\%$ (Figure 1A) ($P < 0.001$ each). A ten-fold higher concentration of BPTU, 1 μM , also had no effect of its own on intracellular Ca^{2+} levels, but abolished the response to ADP 1 μM and further reduced the responses to 3 and 10 μM by $90.0 \pm 6.5\%$

($P < 0.001$) and $74.3 \pm 4.5\%$ ($P < 0.0001$), respectively (Figure 1B). There was no reversal of the inhibition by both concentrations of BPTU, even after up to 30 min washing with drug-free buffer (Figure 1C).

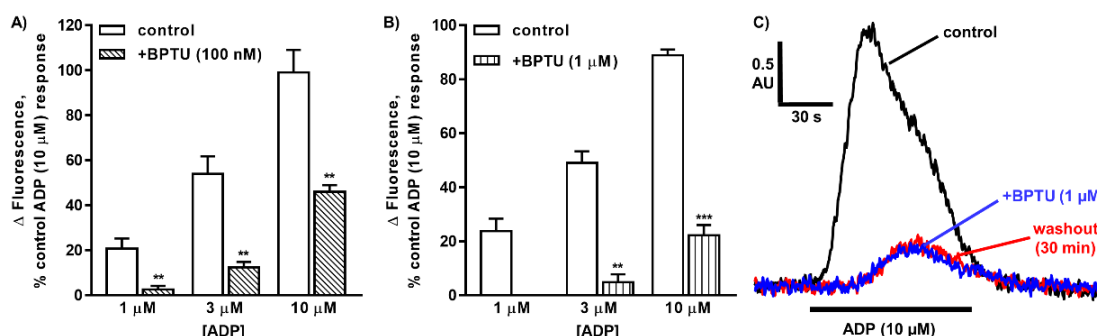


Figure 1. BPTU inhibits human P2Y₁ signalling tSA201 cells. (A-B) Peak amplitude of responses evoked by ADP (1, 3, 10 μM) in the absence and presence of BPTU 100 nM and 1 μM, respectively (n=5). (C) Superimposed traces showing changes in Cal-520 fluorescence evoked by superfusion of cells with ADP 10 μM, as indicated by the horizontal bar, before (black), during (blue) and after (red) incubation with BPTU 10 μM. All are from the same population of cells. The data are expressed as a percentage of the response to ADP 10 μM obtained at the start of the experiment. Paired Student's t test, ** $P < 0.001$ and *** $P < 0.0001$ for responses in the presence of BPTU compared to in its absence on the same coverslip of cells. Histograms represent mean \pm SEM.

Effect of BPTU on EFS-induced relaxation

In order to record constant spontaneous contractions, tissues were incubated with Cch (1 μM). In pig ileum and colonic strips, EFS caused a cessation of spontaneous contractions (Figure 2A,E,F) that was partially reversed by L-NNA (1 mM) (by $38.7 \pm 14.9\%$ -ileum and $32.8 \pm 8.5\%$ -colon) (Figure 2B,E,F). When increasing concentrations of BPTU (1, 10 and 30 μM) were then added in the continued presence of L-NNA, it caused a further, concentration-dependent reduction in the inhibitory responses elicited by EFS (Figure 2C,E,F). However, subsequent addition of MRS2500 (1 μM) was required to achieve complete reversal of the EFS-induced relaxation (Figure 2D,E,F). The EC₅₀ for BPTU was higher in the pig colon compared with the ileum ($P < 0.05$), being 35 μM and 6 μM, respectively (Table 1). Since the concentration of BPTU needed to block the inhibition of spontaneous contractions in pig tissues was higher compared to the results previously obtained in rodents¹³,

the effect of BPTU was also determined in the mouse colon. Using the same protocol as described above, BPTU reversed the EFS response at lower concentrations than those used in pig tissues (Figure 2G, Table 1).

Table 1. Pharmacological data of the blockade of purinergic response. EC₅₀ of MRS2179, MRS2500 and BPTU in preparations from mouse, rat, pig and human.

Species/Tissue	MRS2179 (EC₅₀)	MRS2500 (EC₅₀)	BPTU (EC₅₀)
Mouse colon	-----	0.025 μM^{13}	0.3 μM^{13} (present work)
Rat colon	3.5 μM^{19}	0.016 μM^{19}	0.5 μM^{13}
Pig Colon	0.15 μM	0.054 μM	35 μM
Pig Small Intestine	0.7 μM^3	0.06 μM	6 μM
Human Colon	0.87 μM^2	0.088 μM^8	-----

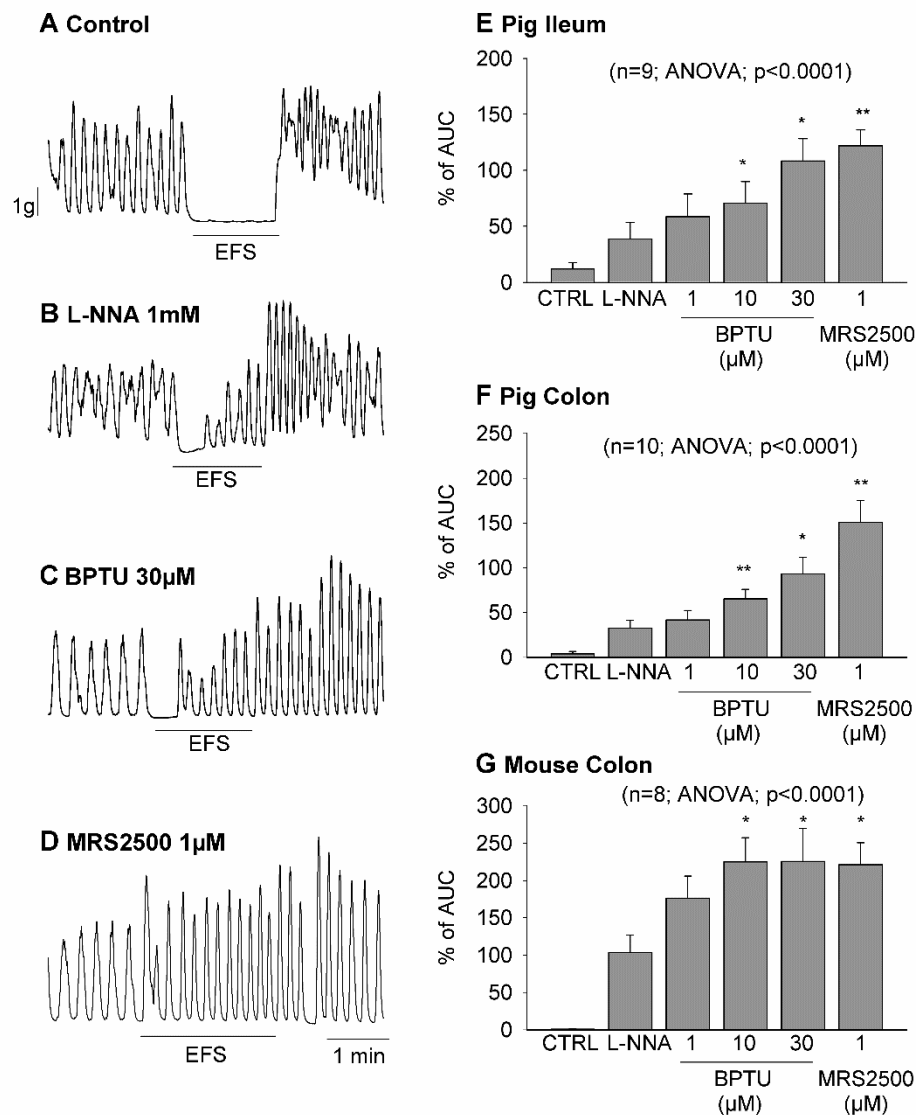


Figure 2. BPTU effect on the inhibition of spontaneous motility induced by EFS in pig and mouse tissue. (left; A-D) Recordings of colonic pig preparations. (right; E-G) Histograms of pig ileum, pig colon and mouse colon tissues showing the effect of P2Y₁ blockers in 2 min EFS (5 Hz, 50 V and a pulse duration of 0.4 ms) response in control conditions and in the presence of L-NNA, BPTU 1, 10 and 30 μM and MRS2500 1 μM. Data were compared to basal AUC. One way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test, *P<0.05 and **P<0.01 for responses in the presence of different concentrations of BPTU compared to in its absence. Histogram represent mean ± SEM. n value are shown at the top of the graph.

Next, the potencies of MRS2500 and MRS2179, another orthosteric P2Y₁ antagonist, were determined in pig tissues following the same protocol. Both blocked EFS-induced responses in a concentration-dependent manner, though

higher concentrations of MRS2179 were needed compared with MRS2500 (pig ileum $P < 0.0001$, pig colon $P < 0.05$) (Figure 3, Table 1).

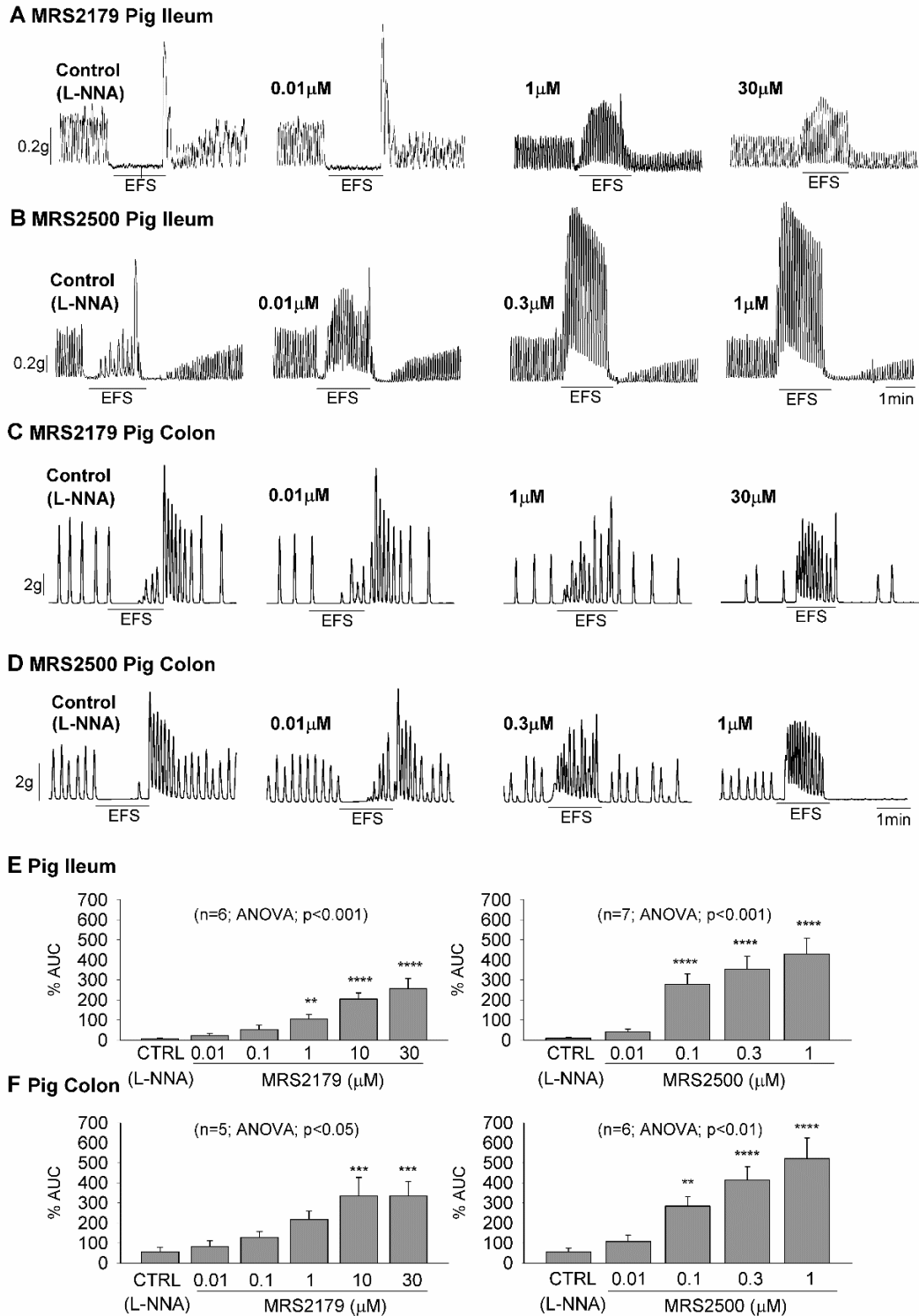


Figure 3. Comparison of the potency of MRS2179 and MRS2500 in the pig ileum and colon. (A-D) Recordings of ileum pig preparations (A, B) and pig colonic strips (C, D) showing the effect of MRS2179 and MRS2500. (E-

F) Histograms showing a higher potency of MRS2500 compared to MRS2179. Data were compared to basal AUC. One way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test, * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ for responses in the presence of different concentrations of MRS2179 and MRS2500 compared to in its absence. Histogram represent mean \pm SEM. n value are shown at the top of the graph.

In human colon, L-NNA (1 mM) also produced a partial reduction of the EFS-induced relaxation (34.7 ± 10.4 %). In contrast with the results obtained in pig tissues, BPTU (0.01-100 μ M) did not significantly reverse EFS-induced inhibitory responses ($P > 0.05$), but subsequent addition of MRS2500 (1 μ M) produced complete reversal ($P < 0.0001$) (Figure 4), consistent with our previously published results ⁸ (Table 1).

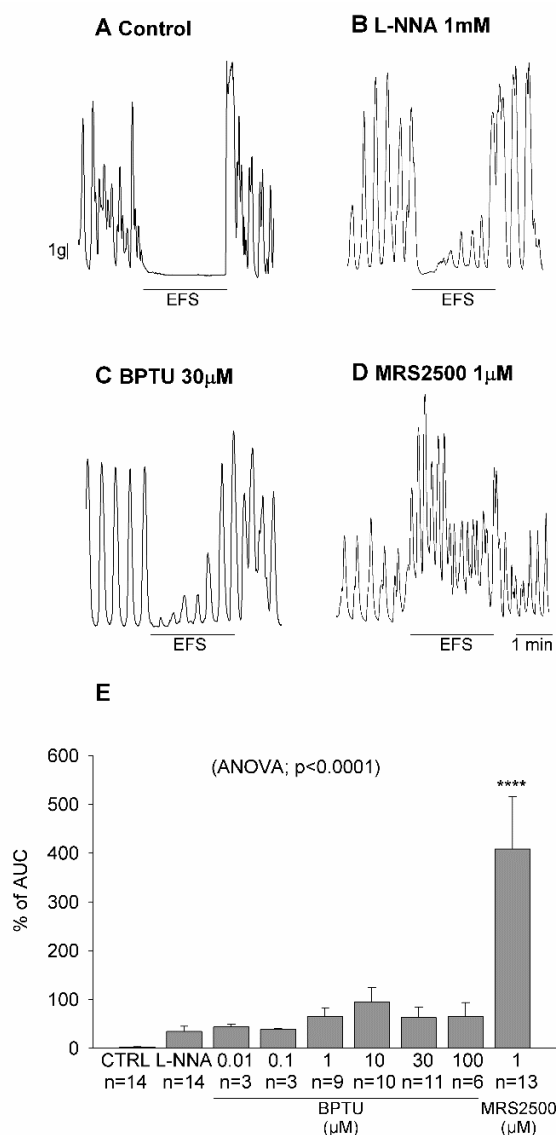


Figure 4. BPTU effect on purinergic relaxation in human colon. (top; A-D) Mechanical recordings and (E) histogram showing 2 min EFS (5Hz, 50V and a pulse duration of 0.4 ms) in the presence of L-NNA 1 mM (B),

BPTU 30 μ M (C) and MRS2500 1 μ M (D). Only MRS2500 1 μ M blocked the EFS-induced inhibitory response. Data were compared to basal AUC. One way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test, $P>0.05$ for responses in the presence of different concentrations of BPTU and **** $P<0.0001$ for MRS2500 1 μ M compared to in its absence. Histogram represent mean \pm SEM. n for each group value are shown at the bottom of the graph.

Effect of BPTU on IJPf

In previous experiments we showed that the IJPf was reduced by BPTU in a concentration-dependent manner in colonic tissues¹³. Accordingly, we determined the effect of BPTU on the IJPf in pig small intestine. Slow waves (SW) had an amplitude of 8.0 ± 1.5 mV and a frequency of 9.8 ± 0.3 contractions per min and the RMP was -62.1 ± 1.3 mV. However, SW and RMP were not affected by BPTU. In the presence of L-NNA (1 mM), EFS with a single pulse at supramaximal voltages elicited a prominent IJPf that reached a mean peak amplitude of 12.8 ± 2.0 mV (Figure 5A,D). At the lowest concentrations tested, (1 and 10 μ M), BPTU did not significantly modify the amplitude of the IJPf ($P>0.05$), but increasing the concentration of BPTU to 30 μ M, significantly reduced the IJPf amplitude to 2.7 ± 1.1 mV ($P<0.0001$) (Figure 5B,D). Subsequent coadministration of MRS2500 (1 μ M) produced complete blockade of the response ($P<0.0001$) (Figure 5C). These results showed that a higher concentration of BPTU was needed to block purinergic responses compared to MRS2500.

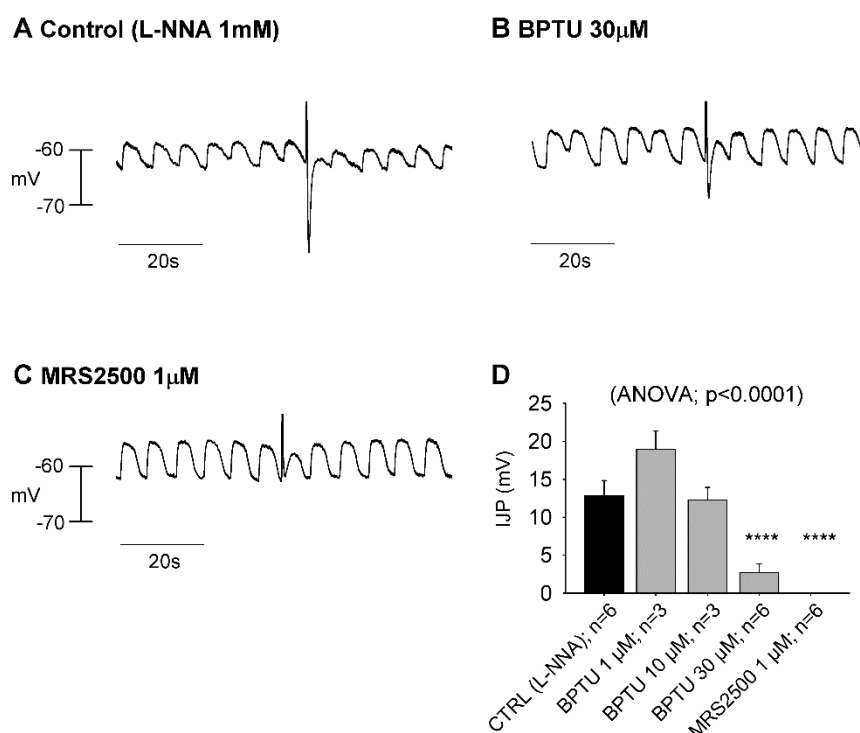


Figure 5. Effect of BPTU on IJPF in the pig ileum. (A-C) Pig ileum recordings showing EFS in control conditions (A), in the presence of BPTU 30µM (B) and after MRS2500 1 µM addition (C). (D) Histogram showing the effect of 1, 10 and 30 µM BPTU on IJPF. Notice a reduction of the amplitude of the IJPF after adding BPTU 30 µM. One way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test, $P>0.05$ for responses in the presence of BPTU 1 and 10 µM and $***P<0.001$ for BPTU 30 µM compared to its absence. Histogram represent mean \pm SEM. n value is shown at the top of the graph.

Effect of BPTU on agonists targeting the P2Y₁ receptor

Finally, the effects of BPTU on relaxations induced by P2Y₁ receptor agonists were determined. In the presence of L-NNA (1 mM), ADPβS (10 µM) significantly reduced spontaneous contractions of pig ileum (Figure 6A,D) and colon (Figure 6B,E) to $17.4 \pm 8.5\%$ ($P<0.0001$) and $25.5 \pm 9.8\%$ ($P<0.001$) of control, respectively. A similar reduction was also observed in human colon ($24.6 \pm 9.1\%$ of control) (Figure 6C,F). BPTU (30 µM), partially reversed the ADPβS response in pig ileum ($P<0.01$; $68.3 \pm 11.1\%$ of control) and colon ($P<0.05$; $70.1 \pm 12.4\%$ of control), but had no effect in human colon, ($P>0.05$; $29.7 \pm 10.9\%$ of control) (Figure 6).

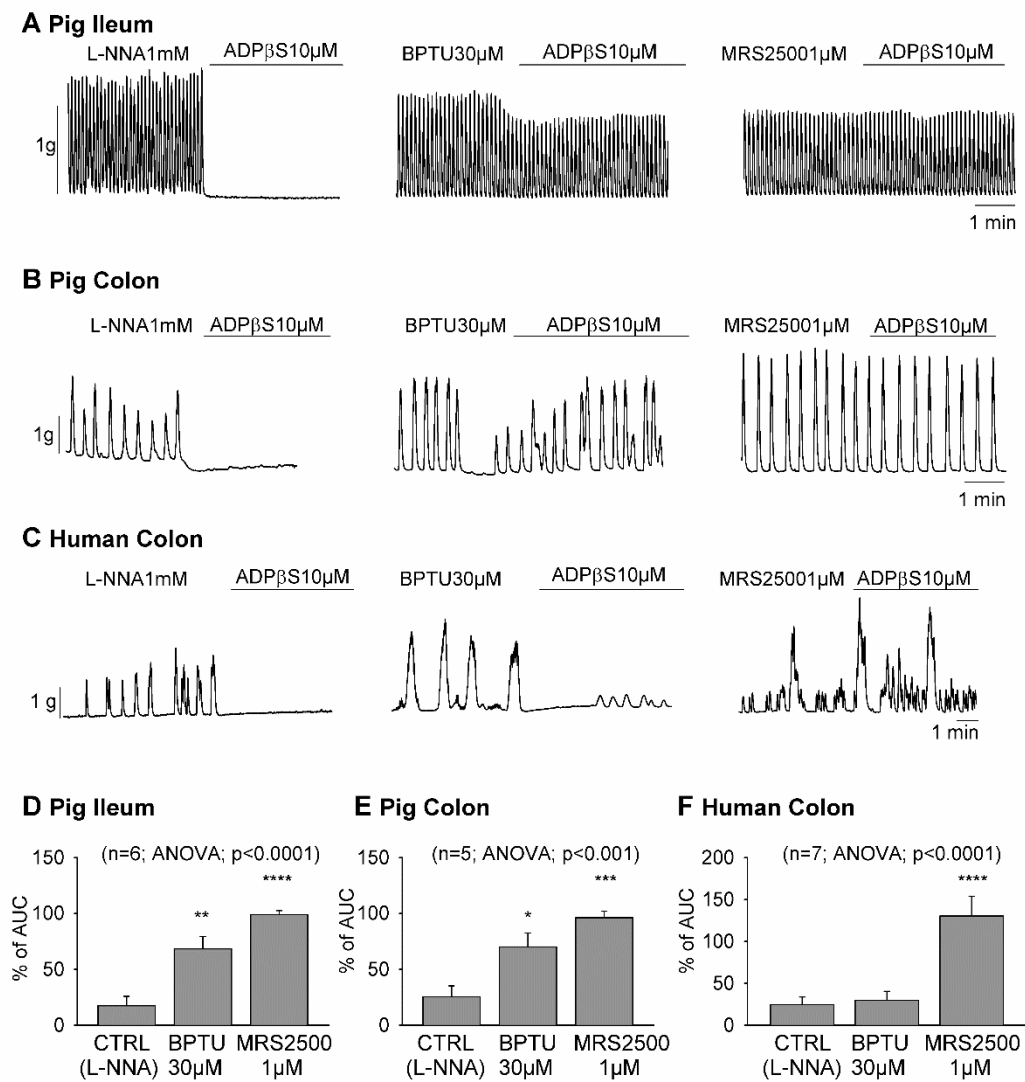


Figure 6. Effect of ADPβS in pig and human preparations. (top; A-C) Mechanical recordings and (bottom; D-F) histograms showing the effect of ADPβS 10 μM in control conditions and in the presence of BPTU 30 μM and MRS2500 1 μM. Notice the inhibitory effect of ADPβS 10 μM compared to basal contractility. BPTU 30 μM only reduced the inhibitory effect of ADPβS in pig tissues and the response was completely blocked by MRS2500 1 μM in all the preparations. Data were compared to basal AUC. One way ANOVA test followed by Bonferroni's post hoc test, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001 for responses in the presence of BPTU 30 μM and MRS2500 1μM compared to in its absence. Histogram represent mean ± SEM. n value is shown at the top of the graph.

Discussion

It is well established that NO and ATP or a related purine, act as cotransmitters and in a complementary manner, via GC and P2Y₁ receptors respectively, to produce nerve-mediated muscle IJPs and relaxation in the GI tract. The rapid IJPf evoked by P2Y₁ receptor stimulation is transient during continuous stimulation, whereas NO-mediated slow IJPs summate. These lead to a time-dependent, transient purinergic relaxation followed by a sustained nitrergic relaxation. In this study, we showed that BPTU inhibits the purinergic responses in the mouse and pig intestine and also that it is much more potent in the former. Interestingly, although BPTU strongly reduces purine-mediated responses in human cells that express the P2Y₁ receptor, BPTU had no effect on responses mediated by P2Y₁ receptors in human colonic muscle. Thus, the actions of BPTU in the GI tract appear to vary with the species studied.

In the present study we showed that 30 μM BPTU reduced the IJPf in the pig small intestine by about 60-70%, whereas MRS2500 totally blocked the IJPf at 1 μM . However, a lower concentration of BPTU was needed to reduce the IJPf, both in mice ($\text{EC}_{50} = 0.06 \mu\text{M}$) and as we previously reported, rats ($\text{EC}_{50} = 0.3 \mu\text{M}$)¹³. We also found that under the same experimental conditions BPTU blocked the purinergic relaxation, but the concentration needed to reduce the response by 50% was higher in pig tissue compared to the values previously reported in rodents (see table 1)¹³. Due to these differences, we repeated the experiments with mouse tissue and we obtained similar results to those previously reported¹³. All together these experiments demonstrate that sub-micomolar concentrations of BPTU block both electrophysiological and mechanical responses in rodents, but concentrations in the micromolar range are needed to block responses in pig intestinal tissue.

Next, we determined the effect of BPTU on human colonic tissue. Consistent with the electrophysiological profile, L-NNA only partially reduced the neurogenic inhibition of spontaneous motility. Due to rundown of the IJPf during continuous stimulation, the purinergic component of relaxation was larger at the beginning compared to the end of the stimulus (see figure 4B). Unexpectedly, even at high

concentrations, BPTU did not block this response, whereas subsequent addition of MRS2500 1 μ M abolished it (see Figure 4D). Higher concentrations of BPTU could not be used since the vehicle, DMSO, strongly reduced spontaneous motility. Moreover, the time of incubation usually achieved in this experiment is about 20 min for each concentration. In some experiments, we increased it to about 45 min, but the result was the same (not shown). In order to confirm that BPTU does act as an antagonist at human P2Y₁ receptors¹², we investigated the ability of BPTU to block P2Y₁ receptor-mediated release of Ca²⁺ in human tSA201 cells. As expected BPTU (100nM and 1 μ M) reduced the Ca²⁺ release induced by ADP (1 to 10 μ M).

In this study ADP β S strongly inhibited spontaneous contractions in all tissues tested and the response was blocked in all cases by MRS2500, as reported previously¹⁷. However, BPTU 30 μ M only partially reduced the response in pig tissues and had no effect in human tissue. These data suggest that BPTU is able to reduce P2Y₁ responses in pig, but not human tissues. MRS2500 and ADP β S were, however, effective in all tissues. One possible explanation is that whilst MRS2500 and ADP β S are water-soluble nucleotides, BPTU is a hydrophobic non-nucleotide and it may be more difficult for it to penetrate thicker (pig or human) than thinner (rodents) tissues, which would be consistent with its relative potency between the tissues studied. BPTU binds to the receptor in a shallow binding pocket on the external interface of TM1–TM3, within the lipid bilayer, which accommodates the ligand mainly through hydrophobic interactions¹⁸. Efforts to design less hydrophobic analogues of BPTU resulted in a decrease in the binding affinity¹⁸. It will be important to bear the lipophilicity and reduced activity of BPTU as potential limitations for future studies on human tissues. In conclusion, in this study we show that BPTU is a P2Y₁ antagonist that reduces purinergic responses in GI tissues from mice and pigs and in a human cell line. However, in colonic human tissue BPTU was ineffective. Accordingly, BPTU is an excellent pharmacological tool to better characterize pharmacological blockade of receptors expressed in cell cultures or in isolated tissues where diffusion of the drug is not an issue, but there are limitations to its capacity to block purinergic responses in thicker tissues or possibly even in individuals.

Supplementary table 1. Age, sex and tissue localization of the patients.

Age	Sex	Tissue localization
76 years	Woman	Descending (left) colon
89 years	Woman	Ascending (right) colon
57 years	Men	Ascending (right) colon
62 years	Men	Transverse colon
73 years	Woman	Sigmoid colon
82 years	Men	Sigmoid colon
59 years	Men	Ascending (right) colon
78 years	Men	Ascending (right) colon
74 years	Woman	Sigmoid colon
57 years	Woman	Ascending (right) colon

Bibliography

1. Canals M, Poole DP, Veldhuis NA, Schmidt BL, Bunnett NW. G-Protein–Coupled Receptors Are Dynamic Regulators of Digestion and Targets for Digestive Diseases. *Gastroenterology*. 2019;156(6):1600-1616. doi:10.1053/j.gastro.2019.01.266.
2. Gallego D, Hernández P, Clavé P, Jiménez M. P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(4):G584-G594. doi:10.1152/ajpgi.00474.2005.
3. Gallego D, Gil V, Aleu J, Aulí M, Clavé P, Jiménez M. Purinergic and nitrergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(3):G522-G533. doi:10.1152/ajpgi.00510.2007.
4. Gallego D, Gil V, Martínez-Cutillas M, Mañé N, Martín MT, Jiménez M. Purinergic neuromuscular transmission is absent in the colon of P2Y1 knocked out mice. *J Physiol*. 2012;590(8):1943-1956. doi:10.1113/jphysiol.2011.224345.
5. Gil V, Martínez-Cutillas M, Mañé N, Martín MT, Jiménez M, Gallego D. P2Y1 knockout mice lack purinergic neuromuscular transmission in the antrum and cecum. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25(3):e170-e182. doi:10.1111/nmo.12060.
6. Hwang SJ, Blair PJ, Durnin L, Mutafova-Yambolieva V, Sanders KM, Ward SM. P2Y1 purinoreceptors are fundamental to inhibitory motor control of murine colonic excitability and transit. *J Physiol*. 2012;590(8):1957-1972. doi:10.1113/jphysiol.2011.224634.
7. Gallego D, Malagelada C, Accarino A, et al. Nitrergic and purinergic mechanisms evoke inhibitory neuromuscular transmission in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26(3):419-429. doi:10.1111/nmo.12293.
8. Gallego D, Gil V, Aleu J, Martínez-Cutillas M, Clavé P, Jiménez M. Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23(8):792-e338. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01725.x.

9. Zhang D, Gao ZG, Zhang K, Kiselev E, et al. Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y1 receptor. *Nature*. 2015;520(7547):317-321. doi:10.1038/nature14287.
10. Yuan S, Chan HC, Vogel H, Filipek S, Stevens RC, Palczewski K. The Molecular Mechanism of P2Y1 Receptor Activation. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016;55(35):10331-10335. doi:10.1002/anie.201605147.
11. Ciancetta A, O'Connor RD, Paoletta S, Jacobson KA. Demystifying P2Y1 Receptor Ligand Recognition through Docking and Molecular Dynamics Analyses. *J Chem Inf Model*. 2017;57(12):3104-3123. doi:10.1021/acs.jcim.7b00528.
12. Gao ZG, Jacobson KA. Distinct signaling patterns of allosteric antagonism at the P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol*. 2017;92(5):613-626. doi:10.1124/mol.117.109660.
13. Mañé N, Jiménez-Sábado V, Jiménez M. BPTU, an allosteric antagonist of P2Y1 receptor, blocks nerve mediated inhibitory neuromuscular responses in the gastrointestinal tract of rodents. *Neuropharmacology*. 2016;110(Pt A):376-385. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.07.033.
14. Paquola A, Mañé N, Giron MC, Jimenez M. Diadenosine tetraphosphate activates P2Y1 receptors that cause smooth muscle relaxation in the mouse colon. *Eur J Pharmacol*. 2019;855:160-166. doi:10.1016/j.ejphar.2019.05.013.
15. Shrestha SS, Parmar M, Kennedy C, Bushell TJ. Two-pore potassium ion channels are inhibited by both G(q/11)- and G(i)-coupled P2Y receptors. *Mol Cell Neurosci*. 2010;43(4):363-369. doi:10.1016/j.mcn.2010.01.003.
16. Muoboghare MO, Drummond RM, Kennedy C. Characterisation of P2Y2 receptors in human vascular endothelial cells using AR-C118925XX, a competitive and selective P2Y2 antagonist. *Br J Pharmacol*. 2019;176(16):2894-2904. doi:10.1111/bph.14715.
17. Martínez-Cutillas M, Gil V, Gallego D, et al. α,β -meATP mimics the effects of the purinergic neurotransmitter in the human and rat colon. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:442-454. doi:10.1016/j.ejphar.2014.06.048.

18. Jacobson KA, Delicado EG, Gachet C, et al. Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *Br J Pharmacol.* 2020;177(11):2413-2433. doi:10.1111/bph.15005.
19. Grasa L, Gil V, Gallego D, Martín MT, Jiménez M. P2Y(1) receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *Br J Pharmacol.* 2009; 158(6):1641-1652. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00454.x.

CAPÍTOL 2

Characterization of neurosecretory and neuromuscular mechanisms in the pig colon and its impairment after an acute *E. coli* infection.

Abstract

Background: The ENS responds to various pathological factors, including bacterial infections. Therefore, the present study aims to assess the integrity of the colonic barrier and the possible activation of neural pathways associated with secretion and motility in the pig colon induced by an ETEC challenge.

Methods: 50 Danbred male piglets were used for this study. 16 were challenged with a single oral dose of the ETEC strain F4+ 1.5×10^9 colony-forming unit (CFU). 4- and 9-days post-challenge colonic samples were studied using both a muscle bath and Ussing chamber. Colonic MCs were stained with methylene blue.

Key results: At day 4 post-challenge, a permeability increase was observed, and electrogenic ion transport increased until day 9 post-challenge. I_{sc} decreased by TTX ($1\mu\text{M}$) and atropine (10^{-4}M) in infected animals. In control animals, EFS induced neurosecretory responses that were abolished by TTX and reduced by the combination of atropine (10^{-4}M) and α -chymotrypsin (α -cmt) (10U/mL). Exogenous addition of Cch, VIP, forskolin, 5-HT, nicotine, and histamine produced epithelial Cl^- secretion. EFS produced frequency-dependent contractile responses that were abolished with TTX ($1\mu\text{M}$) and atropine ($1\mu\text{M}$). EFS and Cch responses were not modified in ETEC animals. An increase in MCs stained with methylene blue was observed in the mucosa and submucosa but not in the muscle layer at day 9 post-challenge.

Conclusions: ETEC induced secretory diarrhoea and an impairment of the colonic barrier that was restored on day 9 post-challenge but did not modify neuromuscular function. Immune mediators are possibly involved in intrinsic secretory reflexes.

Key words: ETEC, neurosecretion, ENS, colon, pig.

Introduction

The ENS is organized in two major ganglionated plexuses, the MP and the SMP, which interconnect and regulate motor and sensory neural input, respectively ^{1 2}. Furthermore, enteric neurons located within the intestinal wall respond to various pathological factors, including inflammatory processes, bacterial infections and toxins ³. The anatomical organization of the ENS appears to be more complex in larger animals than in small laboratory animals. For this reason, and because of the physiological similarity between the porcine and the human GI system, the pig has been considered as a suitable model for studying neural mechanisms related to GI functions ^{4 5 6}.

Ex vivo techniques are used to assess intestinal mechanisms that can be affected by bacterial toxins, such as an increase in the mucosal ion transport, a leaky intestinal barrier or an impaired contractility. Furthermore, EFS stimulates enteric neurons, thus evaluating the contribution of the ENS on gut responses. In innervated muscular preparations, both selective pharmacological conditions and stimulation parameters must be applied to isolate a concrete neuronal response ⁷. EFS of intestinal preparations containing submucosal neurons are used to study nerve-mediated changes in mucosal ion transport ⁸. However, submucosal neural-mediated responses have been mainly evaluated in laboratory animals while less is known in large mammals ⁹. In this context, this study characterizes, for the first time, EFS evoked neurosecretory responses in the pig colon.

Nowadays, ETEC infection is still a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in low-income countries. Moreover, in pig production it also results in economic losses in the preweaning and the postweaning period ¹⁰. Toxins produced by ETEC can directly act on enterocytes but also interfere with the ENS, thus resulting in moderate-to-severe watery diarrhoea, both in humans and animals ^{11 12 13}.

Therefore, the aims of the present study were to assess the neural mechanisms associated with GI secretory and motor functions in the pig colon and to evaluate functional disruptions induced by an ETEC challenge in the post-weaning period.

Materials and Methods

Animals

A total of 50 Danbred male piglets of non-vaccinated against *E. coli* mothers (weaned at 21 d of age; BW 5.0 ± 0.35 Kg) were acquired; 18 animals were used to characterize colonic neuromuscular and neurosecretory mechanisms and 32 animals were used to study the impairment of the colonic functionality after an ETEC challenge. After weaning, animals were allowed an adaptation period of at least 7 days in the farm facility of the UAB. Piglets were group-housed under conventional conditions in a light (13-h:11-h light/dark cycle) and temperature-controlled (28 ± 2 °C) room. To maintain an optimal temperature, partial floor heating with the addition of a heat lamp was provided in the pen. Commercial feed and drinking water were provided *ad libitum*. Euthanasia was performed under intramuscular sedation with Xylazine (2.2 mg kg^{-1} BW; Rompun, Bayer) and Zolazepam - Tiletamine (8 mg kg^{-1} BW; Zoletil 100, Virbac) and carried out by means of intravenous sodium pentobarbital (200 mg kg^{-1} BW; Dolethal, Vetoquinol S.A.). For functional studies, tissue was collected and transported to the laboratory in ice-cold carbogenated Krebs solution. For histological studies, colonic samples were collected and fixed in Methacarn (MeOH 60 mL, CHCl₃ 30 mL, HAc 10 mL). The experimental protocol was reviewed and authorised by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. ETEC experimental procedures were approved under the following code, no. CEEAH: 4026.

E. coli infection

After 7 days adaptation period, 16 piglets were challenged with a single oral dose of 6 mL of the ETEC strain F4+ (1.5×10^9 CFU) following the protocol described by López-Colom et al., 2019¹⁴. Briefly, the oral inocula of the ETEC strain F4+ (positive for virulence factors F4ab, F4ac, LT, STb, and negative for EAST1 and F6, F18,

F41, STa, VT1, VT2, and EAE) provided by the Diseases Laboratory of UAB (ref. 30/14-3) was prepared by overnight incubation at 37 °C with shaking at 250 rpm in brain heart infusion medium (BHI, Laboratorios Conda S.A.). To confirm inoculum concentrations, serial dilutions were cultured in Luria agar and incubated overnight at 37 °C. The final inoculum obtained was 2.5×10^8 CFU mL⁻¹. Functional studies were performed on days 4 and 9 post-challenge (N = 4 and N = 12, respectively). Age- and time-matched piglets were used as controls (N = 4 on day 4 and N = 12 on day 9 post-infection). During this time, animals were regularly monitored for clinical signs and body weight changes. The normal course of the infection was confirmed by a minor decrease of body weight and a mild diarrhoea after ETEC infection compared with controls.

Solutions and drugs

The composition of the Krebs solution was as follows (in mM): 10.10 glucose, 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO₃, 4.61 KCl, 1.14 NaH₂PO₄, 2.50 CaCl₂ and 1.16 MgSO₄ bubbled with a mixture of 5% CO₂:95% O₂ (pH 7.4). A chloride free Krebs solution was also used in secretion experiments (in mM) with the following composition: 10.10 glucose, C₆H₁₁NaO₇ 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO₃, 4.61 C₆H₁₁KO₇, 1.14 NaH₂PO₄, 2.50 C₁₂H₂₂CaO₁₄ x H₂O and 1.16 MgSO₄ bubbled with a mixture of 5% CO₂:95% O₂ (pH 7.4).

The following drugs were used: N ω -nitro- L-arginine (L-NNA), atropine sulphate, 2-(4-Imidazolyl)ethylamine dihydrochloride (Histamine dihydrochloride), N-[2-[[[5-[(Dimethylamino)methyl]-2-furanyl]methyl]thio]ethyl]-N'-methyl-2-nitro-1,1-ethanediamine hydrochloride (Ranitidine hydrochloride), Nicotine, α -chymotrypsin, 3-(2-Aminoethyl)-5-hydroxyindole, 5-HT, 5-hydroxytryptamine (serotonin) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), (1R,2S,4S,5S)-4-[2-Iodo-6-(methylamino)-9H-purin-9-yl]-2 (phosphonoxy) bicyclo [3.1.0] hexane-1-methanol dihydrogen phosphate ester tetraammonium salt (MRS2500), (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium chloride carbamate (Cch), VIP, Tetodotoxin (TTX), Forskolin and 1,2,3,9-Tetrahydro-9-methyl-3-[(2-methyl-1H-imidazol-1-

yl)methyl]-4H-carbazol-4-one hydrochloride (Ondansetron hydrochloride) (Tocris, Bristol, UK). Stock solutions were made by dissolving drugs in distilled water except for Forskolin, which was dissolved in ethanol (96%) and L-NNA, which required sonication to be dissolved in Krebs solution.

Measurement of electrophysiological parameters

Colon mucosa was stripped from the muscle layers and myenteric plexus, opened along the mesenteric border and divided into 1.5 cm² flat segments, excluding Peyer's patches. The pieces were mounted in Ussing chambers (World Precision Instruments, Aston, UK) and were allowed to stabilize for 30 - 40 min before baseline values of PD, I_{sc} and G were recorded. Strips were bilaterally bathed with 5 mL of carbogenated (95% O₂ and 5% CO₂) and warmed (37 ± 1 °C) Krebs buffer. The chambers, with an exposed window surface area of 0.67 cm², contained two voltage sensitive electrodes (EKV; World Precision Instruments) to monitor the PD across the tissue and two Ag-AgCl current passing electrodes (EKC; World Precision Instruments) to inject the required I_{sc} to maintain a PD of zero. A voltage step of 1 mV was applied every 30 min and the change in I_{sc} was used to calculate tissue G and its reciprocal, TEER, by Ohm's law. In order to study neurosecretory mechanisms, EFS was applied through two electrodes placed in both sides of the tissue and attached to the output of a stimulator (Grass S48, Grass Instruments, Quincy, MA). EFS had a total duration of 30 s (pulse duration of 0.5 ms, 5 mA and frequencies of 0.5, 1, 5, 10 and 20 Hz). Data was registered via an automated voltage/current clamp (DVC-1000; World Precision Instruments) and digitized with an analog-to-digital converter (MP150; Biopac Systems, Goleta, USA). Measurements were recorded and analysed with Acqknowledge computer software (version 3.8.1; Biopac Systems). I_{sc} and G data were normalized for the mucosal surface area.

Assessment of epithelial permeability

Paracellular permeability was assessed on day 4 (N = 4) and day 9 (N = 4) post-challenge. Mucosal to basolateral flux of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled

dextran (FD) with a molecular weight of 4kDa (FD4; TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden) was measured over 60 min experimental time. After tissue stabilization, FD4 was added to the mucosal reservoir to a final concentration of $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Basolateral samples (250 μL , replaced by 250 μL of Krebs buffer) were taken at 30 min intervals. 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 (25 nm band width), against a standard curve. Readings are expressed as a percentage (%) of the total amount of FD4 added to the mucosal reservoir and the slope of the FD4 permeability curve was calculated for each experimental group.

Mechanical experiments

Colonic circularly oriented muscle strips were used to characterize neuromuscular mechanisms, whereas circularly and longitudinally oriented strips were used to study the effect of the ETEC challenge. In both cases, strips were mounted in a 10 mL organ bath filled with Krebs solution at $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. A tension of 1 g was applied, and tissue was allowed to equilibrate for 1 h until SPC were recorded. An isometric force transducer (Harvard VF-1) connected to an amplifier was used to record the mechanical activity. Data were digitalized (25 Hz) using DATAWIN1 software (Panlab, Barcelona, Spain) coupled to an ISC-16 analog-to-digital card installed in a PC. EFS was applied through two platinum electrodes placed on the support holding the tissue and connected to the output of an electronic stimulator (Grass S88, Grass Instruments, Quincy, MA).

The AUC (g min^{-1}) of contractions from the baseline was measured to estimate mechanical activity before and after drug addition. In order to normalize mechanical data, responses to drugs were expressed as a percentage of the basal AUC using the following formula: $1 - (\text{AUC after drug incubation} / \text{AUC previous to drug addition})$, being 0% a complete cessation of spontaneous motility and 100% a mechanical recording with the same AUC as in the basal activity.

To study the effect of the ETEC challenge on excitatory neuromuscular transmission, NNNP conditions were used in circularly and longitudinally oriented colonic strips and EFS was applied at 30 V (train 300 ms, pulse duration 0.4 ms) and increasing frequencies (10, 20, 30, 40 and 50Hz). The response was analysed by measuring the amplitude of the EFS. In another subset of experiments, Cch dose-response was studied and compared between experimental groups. In this case, the response was analysed by measuring the AUC of contractions and expressed as g min^{-1} .

MCs staining and counting

Colonic slides were stained with methylene blue staining. Mucosal, submucosal and muscular and serosal MCs were counted in 10 random fields per subject following a blinded fashion evaluation. Counts were performed on day-9 post-ETEC challenge, N=7 and control animals, N=8.

Data analysis and statistics

4 to 8 colonic strips per animal were used to characterize colonic neurosecretory and neuromuscular mechanisms. A different experimental protocol was used for each of the strips of the same animal and data are expressed as n values that represent the total number of strips analysed from different animals (n). For the ETEC challenge study, a range from 2 to 4 strips per animal was used and data are expressed as the total number of animals used in each experimental group (N). In all cases, results were considered statistically significant when $P < 0.05$. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test was used to analyse basal electrophysiological parameters, FD4 permeability slope, the effect of neural blockade on I_{sc} and the secretory and muscular effect of Cch, VIP, forskolin, nicotine and 5-HT. Comparison of fits after Nonlinear regression curve was used to analyse histamine effect. FD4 permeability over time, neurosecretory EFS-induced response, motor responses to excitatory EFS and Cch were compared using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Intestinal MCs assessment and the effect of neural blockade on I_{sc} were compared through a t-test.

Results

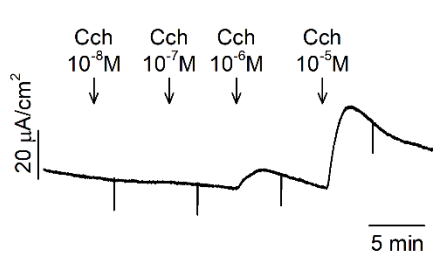
Effect of Cch on colonic secretion and motility

Cholinergic pathway was assessed in both Ussing chambers and muscle bath preparations. Serosal addition of Cch (10^{-8} - 10^{-5} M) caused an immediate and concentration-dependent increase in I_{sc} with an EC_{50} of 19.86 μ M and reaching $40.37 \pm 3.95 \mu A/cm^2 \Delta I_{sc}$ at the highest concentration tested. Pre-treatment with TTX 10^{-6} M did not modify the Cch response, whereas atropine 10^{-4} M and the Cl^- free Krebs solution totally blocked the Cch 10^{-5} M induced response (Figure 1A).

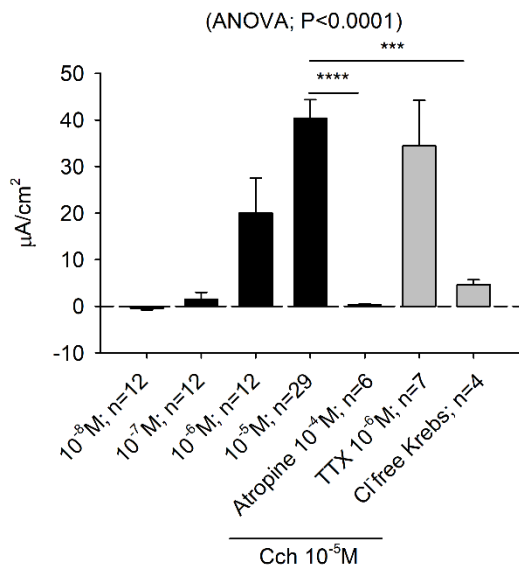
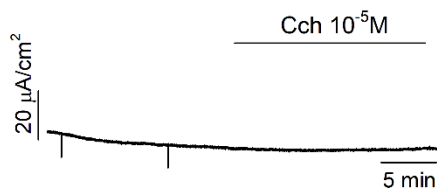
Organ bath experiments showed that the increase of colonic contractions induced by Cch was also concentration dependent (10^{-8} - 10^{-5} M), with an EC_{50} of 1.24 μ M. Prior incubation with TTX 10^{-6} M did not modify the Cch 10^{-5} M induced response but it was abolished with atropine 10^{-6} M (Figure 1B).

A Carbachol and colonic secretion

Krebs solution

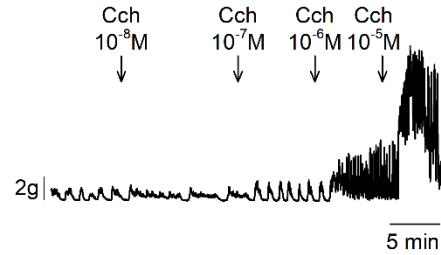


Krebs solution with Atropine 10⁻⁴M



B Carbachol and colonic motility

Krebs solution



Krebs solution with Atropine 10⁻⁶M

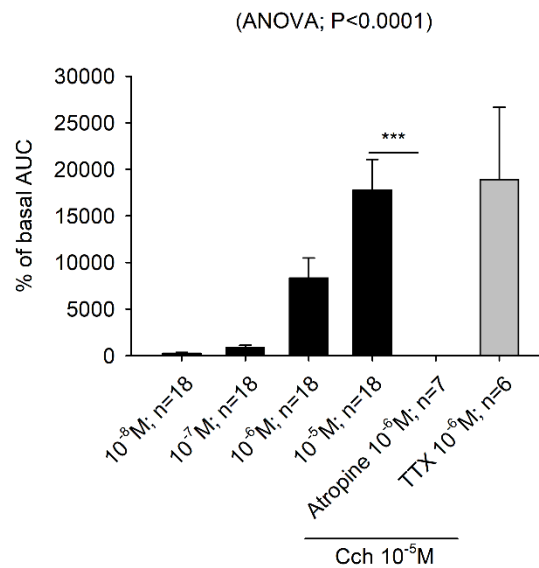
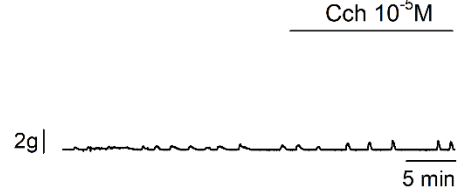


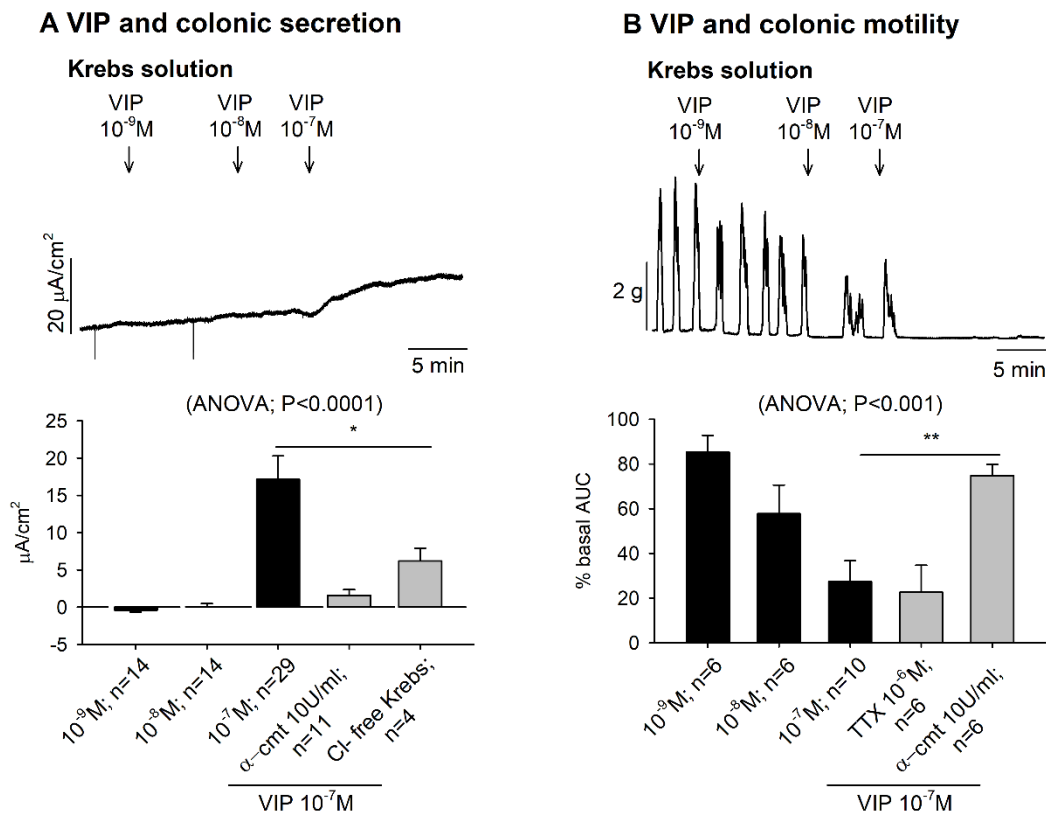
Figure 1. Effect of carbachol (Cch) on colonic secretion and motility. (A) Mucosal recordings in control conditions and with the incubation of atropine 10⁻⁴ M (top) and histogram (bottom) showing the effect of Cch on colonic secretion. (B) Muscular recordings in control conditions and with atropine 10⁻⁶ M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of Cch on colonic motility. Post Hoc test after ANOVA. ***, P<0.001; ****, P<0.0001. Data are expressed as mean ± SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Effect of VIP and forskolin on colonic secretion and motility

VIP concentration-dependen increased the I_{sc} (10⁻⁹ – 10⁻⁷ M) and a significant response was detected at the highest concentration (17.15 ± 3.15 μA/cm² ΔI_{sc}).

Thereafter, VIP 10^{-7} M was tested with the prior incubation of α -cmt 10U/mL and with a Cl⁻ free Krebs solution which both produced a reduction of the response (Figure 2A). Forskolin response was concentration-dependent (10^{-8} – 10^{-5} M), reaching the highest concentration $52.96 \pm 11.61 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \Delta I_{\text{sc}}$. The response was TTX insensitive, but it was strongly reduced when the preparation was incubated with a Cl⁻ free Krebs solution (Figure 2C).

In the colonic muscle layer, both VIP (10^{-9} – 10^{-7} M) and forskolin (10^{-8} – 10^{-5} M) produced a concentration-dependent decrease of the contractions with an EC₅₀ of 0.022 μM and 0.12 μM , respectively. Both responses were TTX insensitive. Nevertheless, VIP response could be blocked with the pre-treatment of α -cmt 10U/mL (Figure 2B,D).



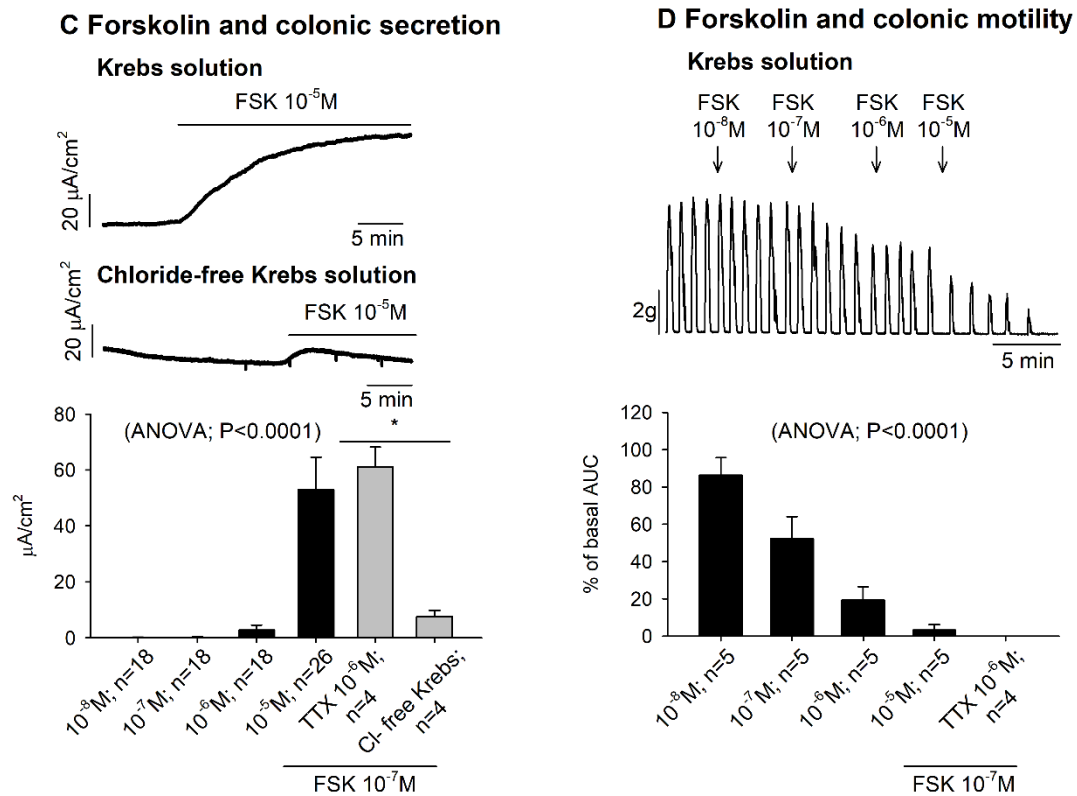


Figure 2. Effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) and forskolin on colonic secretion and motility. (A) Mucosal recordings (top) and histogram (bottom) showing the effect of VIP on colonic secretion. (B) Muscular recordings (top) and histogram (bottom) showing the effect of VIP on colonic motility. (C) Mucosal recordings in control conditions (Krebs solution) and in a Cl⁻ free buffer (Cl⁻ free Krebs solution) (top) and histogram (bottom) showing the effect of Forskolin (FSK) on colonic secretion. (D) Muscular recordings (top) and histogram (bottom) showing the effect of FSK on colonic motility. Post Hoc test after ANOVA. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Data are expressed as mean \pm SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Effect of nicotine on colonic secretion and motility

Nicotine 10^{-4} M produced $42.67 \pm 8.66 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \Delta I_{sc}$ in control conditions while a strong reduction of the response was observed when tissue was incubated with TTX 10^{-6} M, atropine 10^{-4} M and a Cl⁻ free Krebs solution (Figure 3A).

Mechanical experiments were used to assess the presence of nicotinic receptors in enteric excitatory and inhibitory motor neurons using colonic strips incubated with L-NNA 1mM or atropine 10^{-5} M, respectively. In the presence of L-NNA 1mM, an increase in colonic contractions was observed after nicotine 10^{-4} M addition. In

contrast, prior incubation with atropine 10^{-5} M produced a substantial reduction of the colonic contractions (Figure 3B).

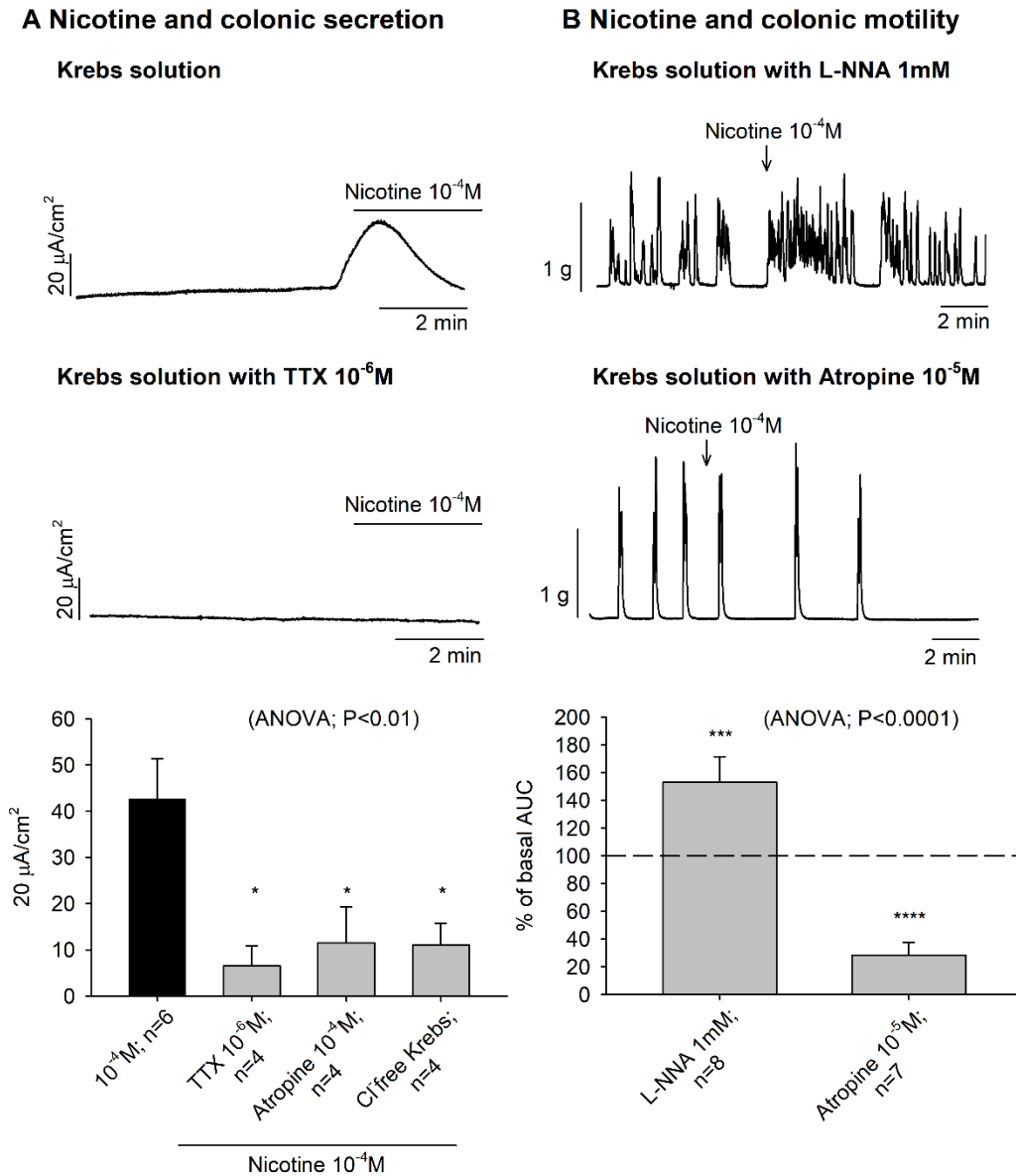


Figure 3. Effect of nicotine on colonic secretion and motility. (A) Mucosal recordings in control conditions (Krebs solution) and after TTX 10^{-6} M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of nicotine 10^{-4} M on colonic secretion. (B) Muscular recordings with L-NNA 1mM and atropine 10^{-5} M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of nicotine 10^{-4} M on colonic motility. Post Hoc test after ANOVA. *, P<0.05; ***, P<0.001; ****, P< 0.0001. Data are expressed as mean \pm SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Effect of serotonin on colonic secretion and motility

To study the role of 5-HT in the gut function, 5-HT 10^{-4} M was added to mucosal colonic preparations and $13.19 \pm 1.30 \mu\text{A}/\text{cm}^2 \Delta I_{\text{sc}}$ was reached under control conditions. Subsequently, 5-HT 10^{-4} M was added in the presence of the 5-HT₃ antagonist, ondansetron 10^{-4} M, TTX 10^{-6} M or a Cl⁻ free medium. In all cases, a reduction of the ionic secretion was observed (Figure 4A).

In the muscular layer 5-HT 10^{-4} M produced a biphasic response consisting of a first phase of relaxation, with a mean time duration of 3.85 ± 0.33 min followed by a second phase of contraction. However, when ondansetron 10^{-4} M was incubated in advance, the first inhibition phase was less pronounced and significantly shorter, with a mean time duration of 2.26 ± 0.36 min (t-test, $P < 0.01$). Moreover, the AUC of the second phase increased reaching a mean AUC of 447.1 ± 141.6 % of basal AUC. Thereafter, 5-HT was also studied in NNNP and TTX 10^{-6} M conditions. In both cases, the response consisted of only a phase of contraction (Figure 4B).

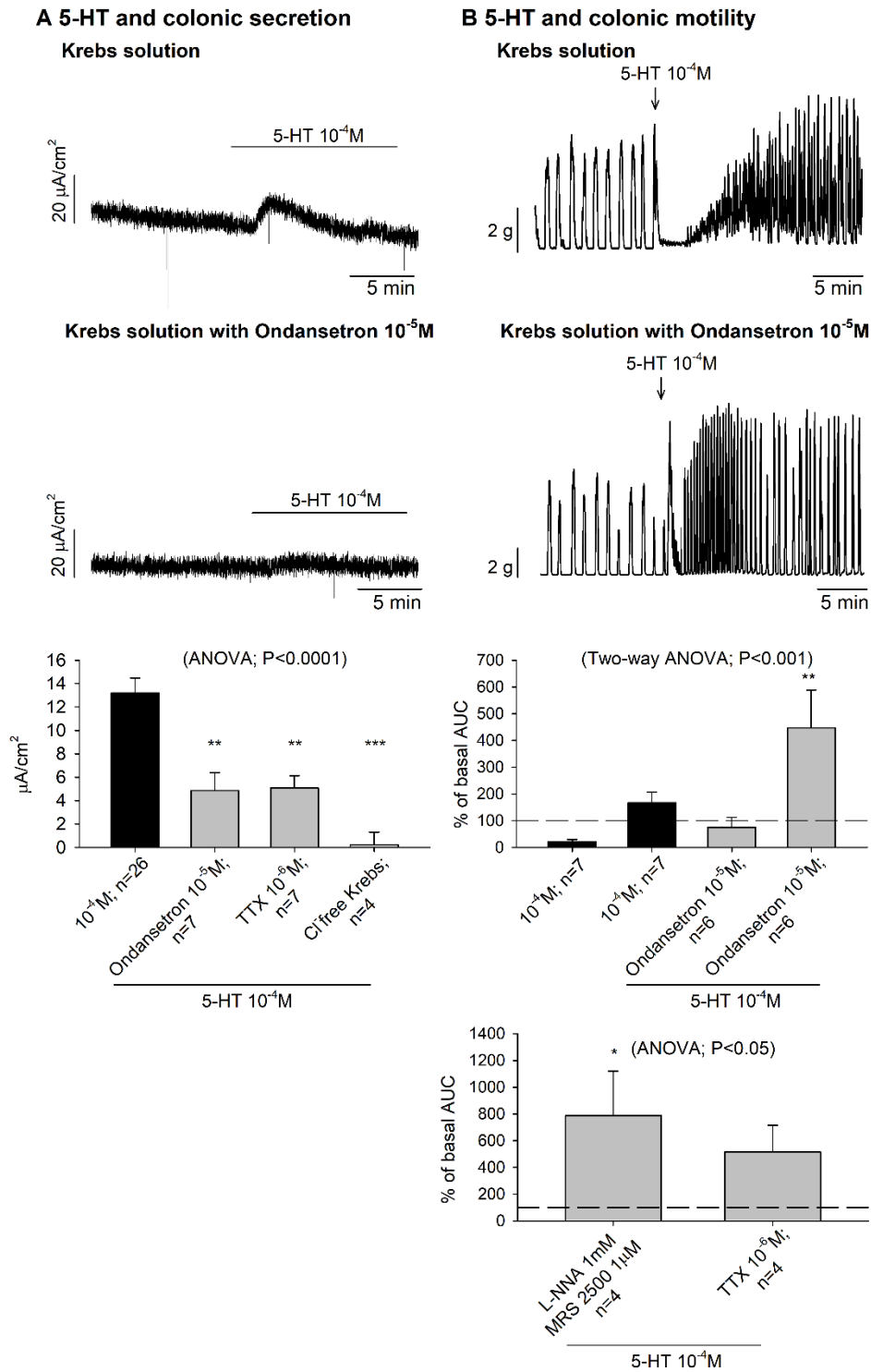


Figure 4. Effect of serotonin (5-HT) on colonic secretion and motility. (A) Mucosal recordings in control conditions (Krebs solution) and with ondansetron 10⁻⁵ M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of 5-HT 10⁻⁴ M on colonic secretion. (B) Muscular recordings in control conditions (Krebs solution) and with ondansetron 10⁻⁵ M incubation (top) and histograms (bottom) showing the effect of 5-HT 10⁻⁴ M on colonic motility. Post Hoc test after ANOVA and Two-way ANOVA. **, P< 0.01; ***, P<0.001. Data are expressed as mean ± SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Effect of histamine on colonic secretion and motility

Histamine was incubated in mucosal specimens in a concentration range of 10^{-6} - 3×10^{-5} M. The same concentration curve was conducted with prior incubation of the H_2 antagonist, ranitidine 10^{-4} M. Histamine had an EC_{50} of 3.72 μ M and when the H_2 antagonist was incubated in advance, the EC_{50} was 4.93 μ M (comparison of nonlinear fits, $P=0.039$). Histamine 10^{-5} M was also incubated with a Cl^- free medium ($n=4$) and, in this case, the secretory-induced response was almost abolished, with $6.12 \pm 1.95 \mu A/cm^2 \Delta I_{sc}$ (t-test, $P=0.01$) (Figure 5A).

In organ bath experiments, histamine increased the colonic contractions following a concentration-dependent pattern (10^{-8} - 3×10^{-5} M) with an EC_{50} of 0.32 μ M. After ranitidine 10^{-4} M and TTX 10^{-6} M incubation, the EC_{50} was 3.37 μ M and 4.74 μ M, respectively although statistical differences were not observed in the E_{max} value (Figure 5B).

A Histamine and colon secretion

B Histamine and colon motility

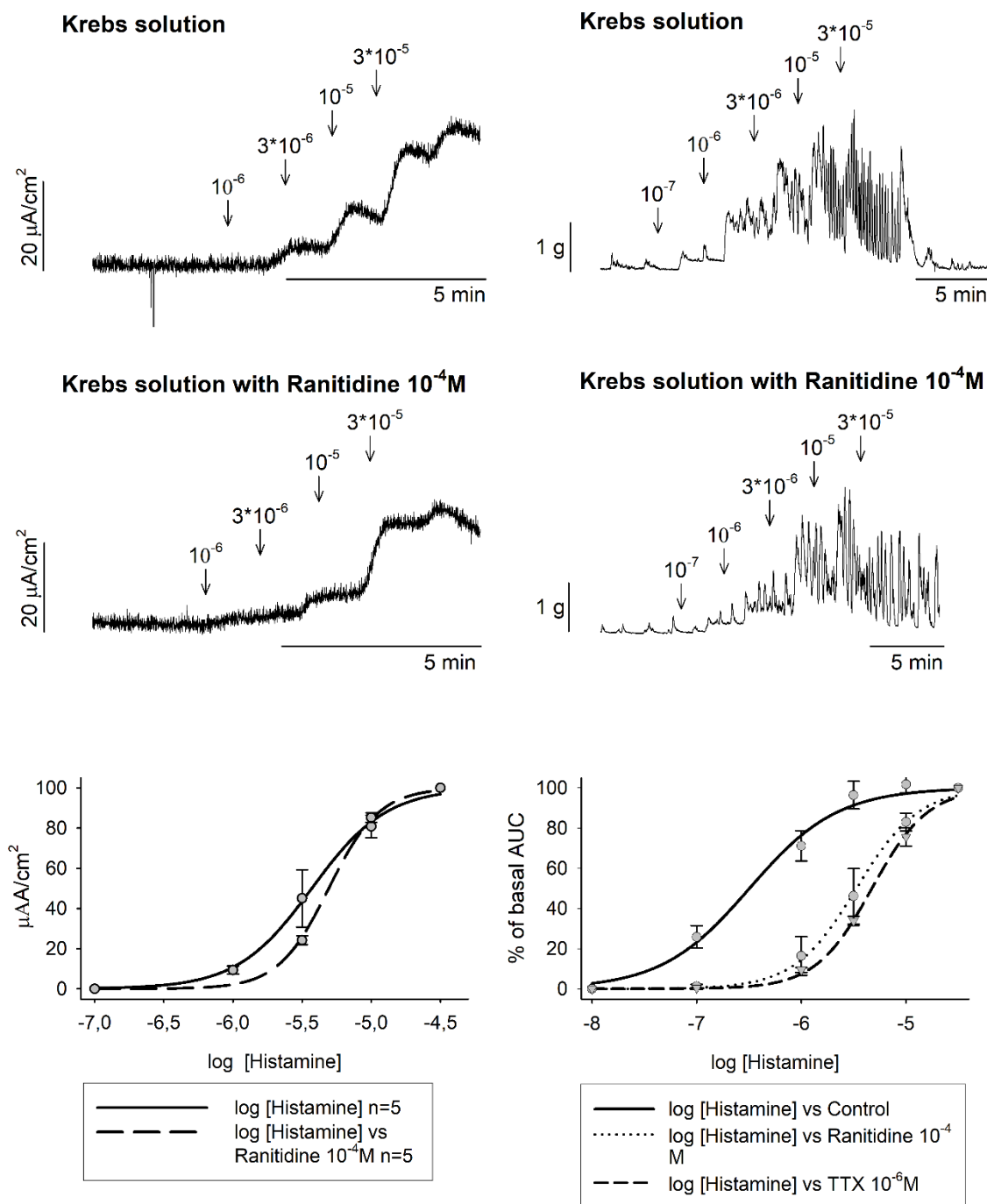


Figure 5. Effect of histamine on colonic secretion and motility. (A) Mucosal recordings in control conditions (Krebs solutions) and with ranitidine 10^{-4} M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of histamine in a concentration range of 10^{-6} - 3×10^{-5} M in control conditions and after the H_2 antagonist incubation, ranitidine 10^{-4} M. (B) Muscular recording in control conditions (Krebs solution) and with ranitidine 10^{-4} M incubation (top) and histogram (bottom) showing the effect of histamine in a concentration range of 10^{-7} - 3×10^{-5} M in control conditions and with the incubation of TTX 10^{-6} M and ranitidine 10^{-4} M. Nonlinear regression curve. Data are expressed as mean \pm SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Neural evoked mucosal chloride secretion

Neurosecretory transmission was evaluated by EFS. Transmural EFS (0.5 - 20 Hz) evoked a frequency-dependent increase of the I_{sc} area from $3139.90 \pm 976.73 \mu\text{A}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ at 0.5 Hz to $12738.06 \pm 3804.25 \mu\text{A}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ at 20 Hz (Figure 6A,C). I_{sc} -EFS was significantly reduced when the same electrical stimulation protocol was carried out with the pre-treatment of TTX 10^{-6} M (Figure 6B,C), indicating that the response was TTX-sensitive.

Subsequently, 10 Hz EFS was used for further experiments to characterize the neural evoked response. Three consecutive 10 Hz EFS were reproducible, thus evoking similar I_{sc} responses (Figure 6F). Ion replacement experiments incubating colonic strips ($n=4$) with a Cl^- free Krebs solution significantly reduced 10 Hz EFS response (Ctrl: 1.00 ± 0.24 normalized area, Cl^- free Krebs solution: 0.31 ± 0.05 normalized area). Thereafter, tissue was incubated with atropine 10^{-4} M and α -chymotrypsin (α -cmt) 10 U/mL (Neurosecretion protocol 1) or vice-versa (Neurosecretion protocol 2), and a cumulative reduction of the EFS-induced response was observed (Figure 6D,E,G,H). At the end of the experiment, TTX 10^{-6} M was incubated in both Neurosecretion protocols and almost a complete blockade of the EFS response was achieved (0.08 ± 0.01 normalized area and 0.13 ± 0.03 normalized area, respectively).

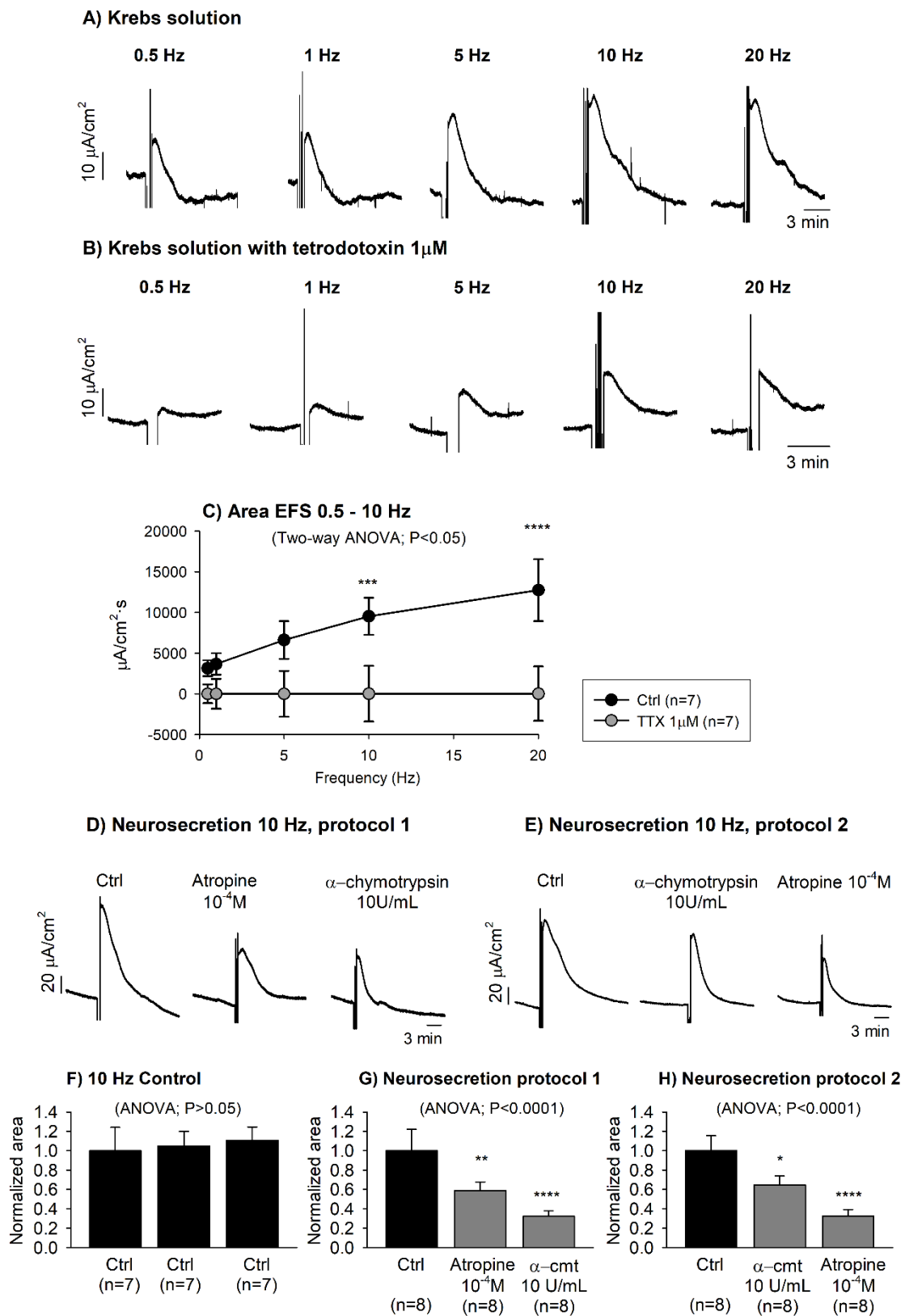


Figure 6. Neural evoked mucosal chloride secretion. (A-B) Mucosal recordings and (C) histogram showing the effect of EFS (0.5 to 10 Hz) on I_{sc} in control conditions and after TTX 10^{-6} M incubation. (D-E) Recording from mucosal colonic strips showing the effect of atropine 10^{-4} M and α -cmt 10U/mL on 10Hz EFS and (F-H)

histograms showing 10Hz EFS in control conditions (F), after the incubation of atropine 10^{-4} M and α -cmt 10U/mL (G) and vice-versa (H). Post Hoc test after ANOVA and Two-way ANOVA. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$; ****, $P<0.0001$. Data are expressed as mean \pm SEM. n values are shown at the bottom of each graph.

Effect of ETEC infection on electrophysiological parameters and epithelial permeability

ETEC infection evoked an increase in the colonic active ion transport and consequently, higher basal I_{sc} were observed in 4 and 9 days challenged animals compared to their respective controls (Figure 7A). PD values were also higher in both 4 and 9 days challenged animals, but significant differences were only observed at 9 days post-infection (Figure 7B). TEER was measured as a colonic integrity indicator. In this case, a TEER reduction was observed at 4 but not at 9 days after the ETEC challenge (Figure 7C). In concordance, mucosal to basolateral passage of FD4 across colonic segments significantly increased in 4 but not in 9 days challenged animals. At day 4 post-challenge, ETEC produced an increase in the time course of the FD4 permeability compared with non-challenged animals, the kinetic of FD4 permeability reached statistical significance after 45 min of the incubation with FD4 (Figure 7D). Finally, the slope of the FD4 permeability also revealed a remarkable increase in the FD4 flux 4 days after the ETEC challenge (Figure 7E).

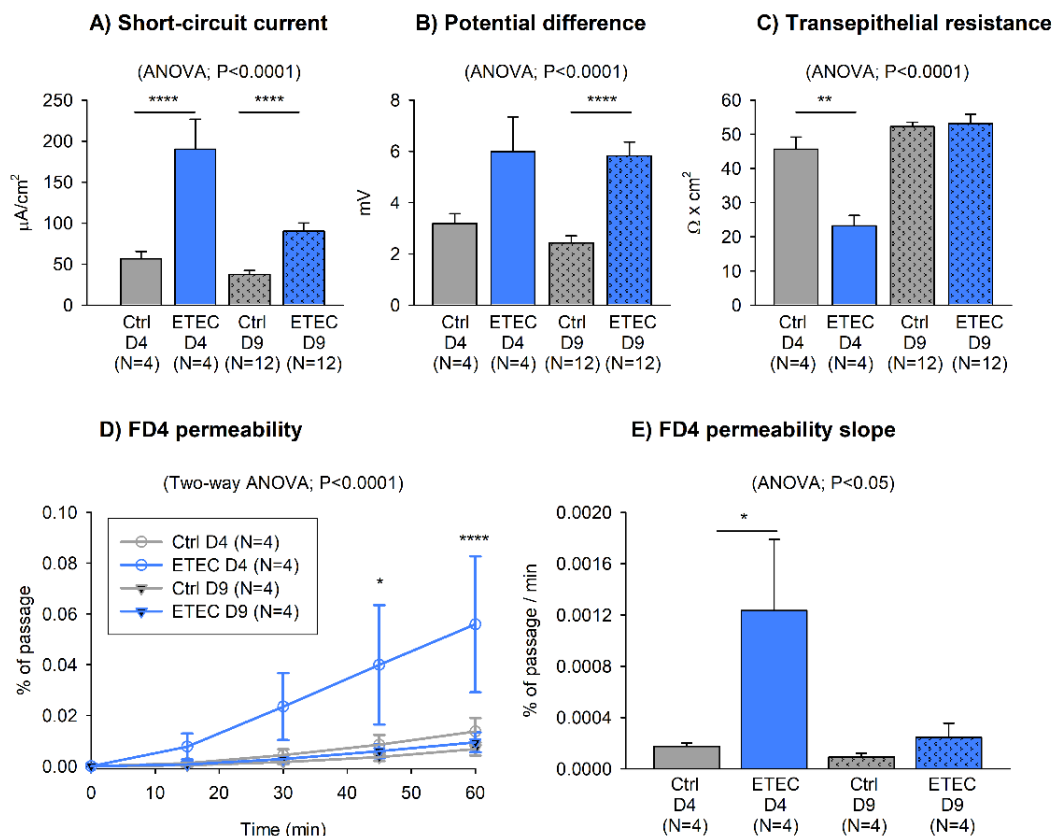


Figure 7. Effect of ETEC infection on electrophysiological parameters and epithelial barrier function. (A-C) Histograms showing basal I_{sc} , PD and TEER values 4- and 9-days of the ETEC challenge, (D) Mucosal to basolateral passage of FITC-dextran (FD4) over 60 min concerning the amount added to the mucosal reservoir and (E) FD4 flux to the basolateral compartment expressed as % of passage /min. Post Hoc test after ANOVA and Two-way ANOVA. *, P<0.05; **, P<0.01; ****, P<0.0001. Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at each graph.

Effect of neural blockade on I_{sc}

ETEC produced an increase in the mucosal colonic electrolyte transport. Thus, colonic strips were incubated with the neural blocker, TTX 10^{-6} M, and the muscarinic antagonist, atropine 10^{-4} M to assess the role of neural activity in the basal ion transport. TTX 10^{-6} M and atropine 10^{-4} M produced a significant drop in the I_{sc} of ETEC challenged strips (Figure 8B,D,E). In contrast, no significant reduction was observed in the I_{sc} of control animals after drug incubation (Figure 8A,C,E). The incubation with both atropine 10^{-4} M and TTX 10^{-6} M produced a similar reduction of the I_{sc} . Therefore, the I_{sc} value after the neural blockade with TTX 10^{-6}

M and atropine 10^{-4} M were grouped and compared between ETEC and control animals. ETEC animals showed a higher I_{sc} after neural blockade compared to control animals (Figure 8E, right). These results show that the increased electrogenic ion transport reported in ETEC animals was not only due to a neurosecretory effect but also due to a direct epithelial effect of the ETEC.

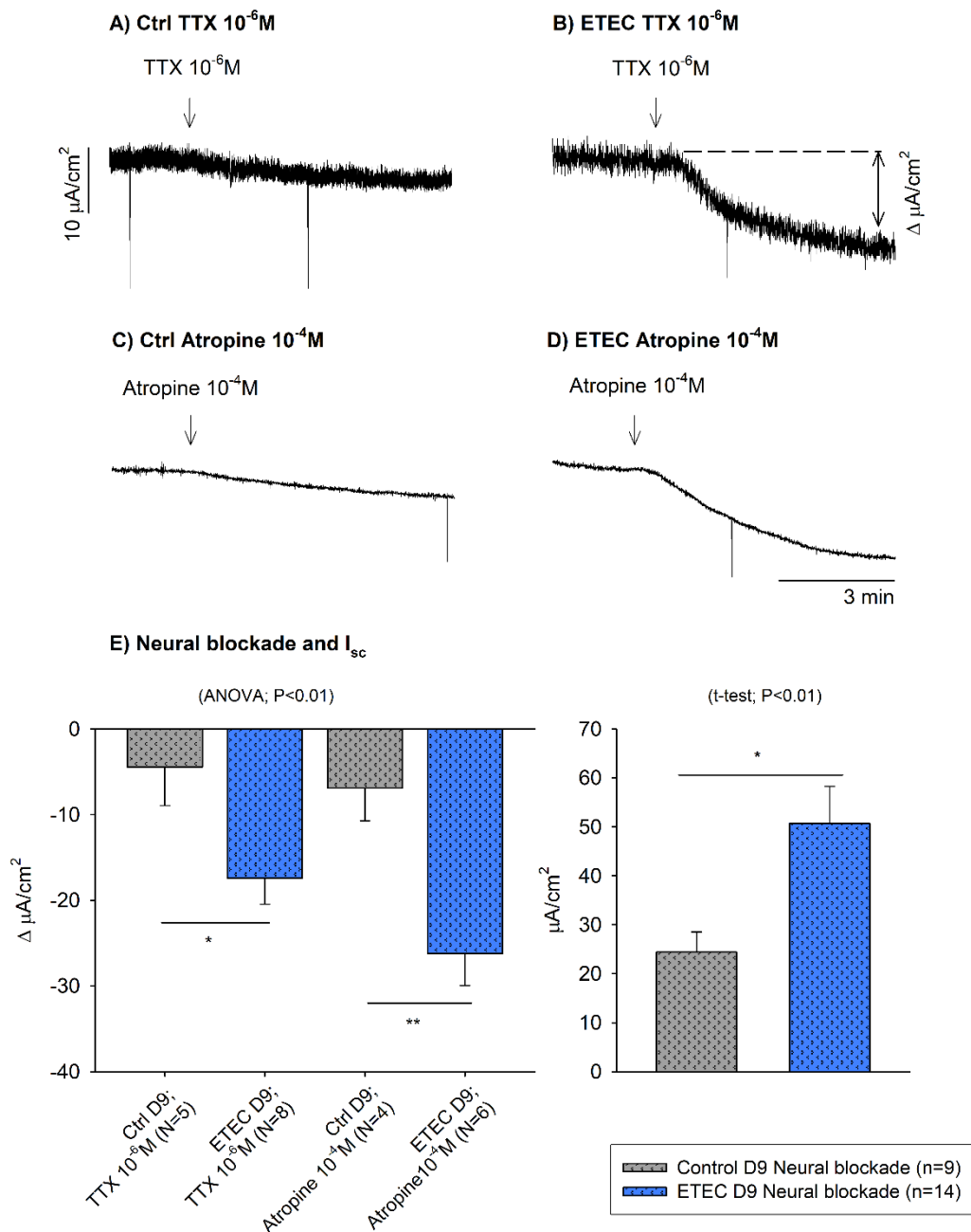


Figure 8. Effect of TTX 10^{-6} M and atropine 10^{-4} M on I_{sc} . (A-D) Mucosal recordings showing the effect of TTX 10^{-6} M (top) and atropine 10^{-4} M (bottom) in control conditions (left) and 9-days post ETEC challenge (right) and (E) histogram showing the effect of both drugs on the reduction of I_{sc} (left) and histogram showing the I_{sc} value

in control and ETEC animals after neural blockade with both drugs (right). Post Hoc test after ANOVA. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$. Data are expressed as mean \pm SEM. n values are shown at the bottom of the graph.

Effect of ETEC infection on muscular excitatory pathway

In order to eliminate neural inhibitory inputs, colonic tissue was incubated in Krebs solution using NNNP conditions. As expected, NNNP conditions increased spontaneous motility due to the presence of an inhibitory neural tone that was higher in both groups in the circular compared to the longitudinal muscle¹⁵. However, a similar increase of spontaneous motility between experimental groups was observed in both strip orientations ($P > 0.05$).

NNNP conditions were used to stimulate excitatory motor neurons that might be associated to contractile responses. Therefore, EFS was applied at increasing frequencies (10 – 50 Hz), which produced a frequency-dependent increase of the amplitude of neural colonic contractions. The response in both groups was TTX 1 μ M and atropine 1 μ M sensitive suggesting selective activation of excitatory motor neurons. No differences were observed between experimental groups in each colonic strip orientation (circular strips $P = 0.8095$, longitudinal strips $P = 0.1132$). In control animals, the highest frequency (50Hz) produced a mean amplitude of 4.3 ± 0.8 g and 4.5 ± 0.7 g in circular and longitudinal strips, respectively whereas ETEC challenged animals reached a mean amplitude of 4.3 ± 0.6 g in circular strips and of 3.5 ± 0.5 g in longitudinal strips (Figure 9A,B,C). Moreover, atropine-sensitive concentration-response curves were obtained with the muscarinic agonist Cch (10^{-8} - 10^{-5} M), although no differences were observed between groups in either of the two colonic strips orientations (circularly oriented strips Two-way ANOVA, $P = 0.0532$; longitudinally oriented strips Two-way ANOVA, $P = 0.1073$) (Figure 9D,E,F).

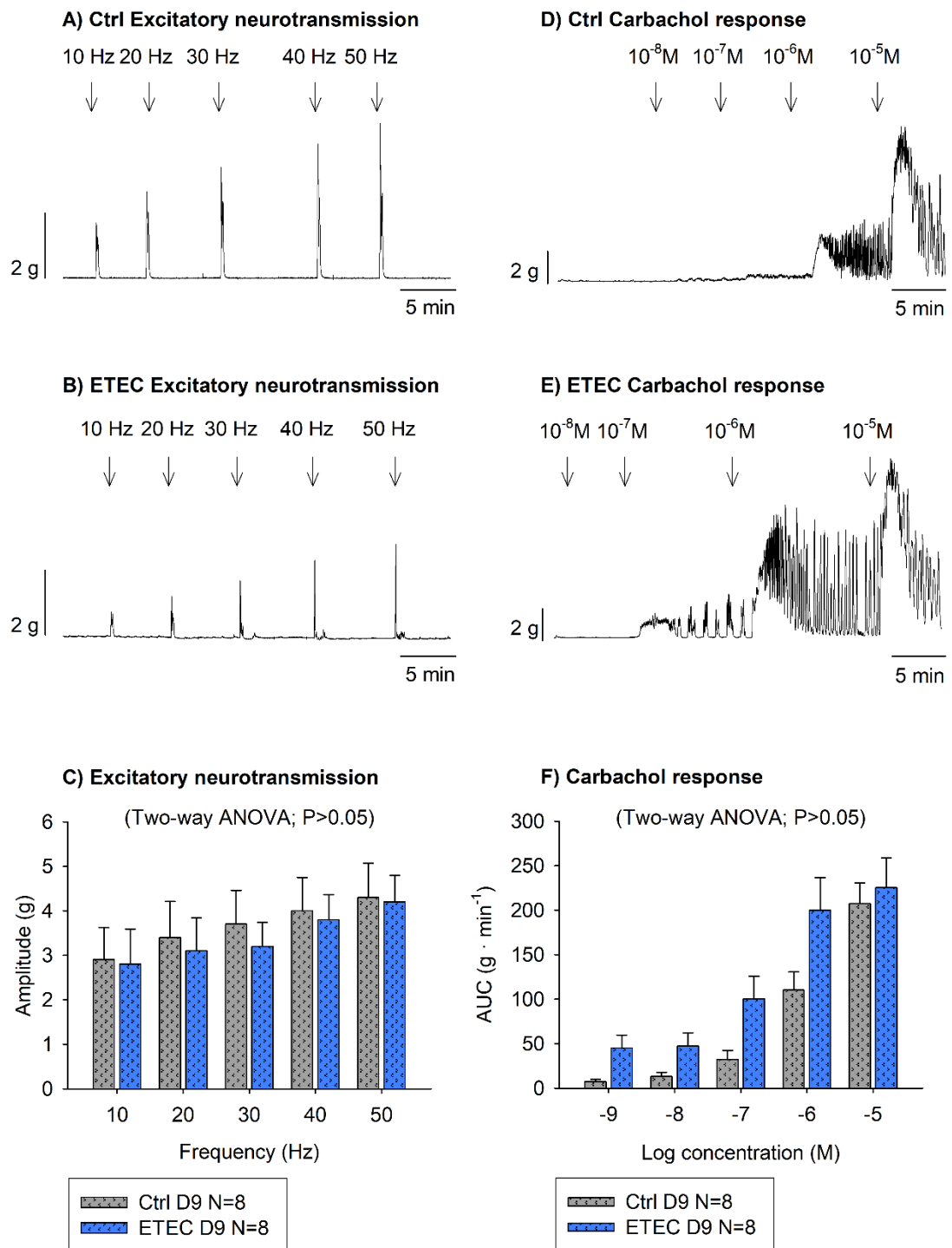


Figure 9. Effect of ETEC infection on muscular excitatory pathway. (A-B) Mechanical recordings from circularly oriented colonic strips and histogram (C) showing the effect of EFS (10 to 50 Hz) in 9-days post ETEC challenged animals and in control animals. (D-E) Mechanical recordings from circularly oriented colonic strips, and (F) histogram showing the effect of Cch (10^{-8} - 10^{-6} M) in control animals and in 9-days post ETEC challenged animals. Two-way ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at the bottom of each graph.

Effect of ETEC infection on colonic MCs

MCs regulate epithelial function and integrity. Accordingly, the presence of MCs was evaluated at three different colonic regions: the mucosa, the submucosa and the muscular and serosa coats. MCs were present in all the colonic coats, being predominantly in the submucosa and the mucosa in both experimental groups. However, differences were observed in the number of MCs per field between experimental groups at day 9 post-challenge. ETEC infected animals presented a higher number of mucosal and submucosal MCs compared with their respective controls (Figure 10A,B,D,E,G,H) but non-significant differences were observed between groups in the muscular and serosa layers (Figure 10C,F,I).

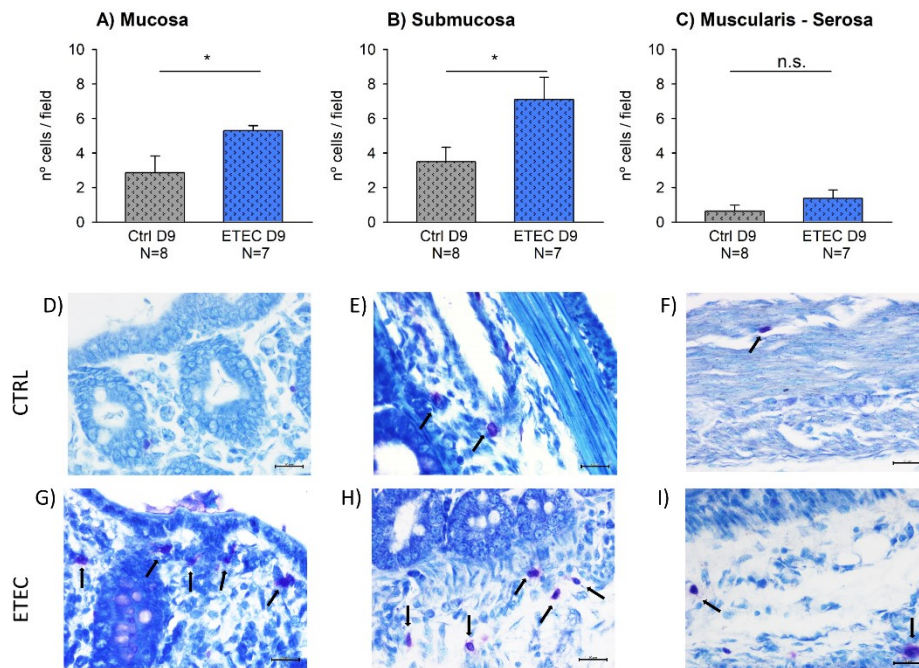


Figure 10. Effect of ETEC infection on the number of colonic MCs. (A-C) Histograms showing the number of MCs per field in (A) the mucosa, (B) the submucosa and (C) the muscularis and serosa layers in control animals and in 9-days post ETEC challenged animals. (D-E-F) Photos from the mucosa, submucosa and muscularis and serosa layers, respectively from control animals and (G-H-I) from 9-days post ETEC challenged animals. Counts and photos were obtained at 40x. Scale bar 20 μ M. T-test. *, $P < 0.05$. Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at the bottom of each graph.

Discussion

Intestinal absorption of water and electrolytes and formation and propulsion of faeces toward the rectum involve epithelial and motor functions that are regulated by the ENS^{16 17}. In this study, we examined in parallel the neural mechanisms associated with secretion and motility with the aim of assessing their possible involvement in ETEC infected animals.

As expected, both Cch and VIP elicited TTX-resistant Cl⁻ secretion which was blocked respectively by the muscarinic antagonist atropine and α -cmt¹⁸, thus suggesting a direct effect on the enterocytes. However, these two neurotransmitters had opposite functions in the contractile experiments, since Cch elicited contractions and VIP relaxations^{19 20}. These results showed that ACh and VIP could be neurotransmitters released by secretory neurons, while ACh could be released by excitatory motor neurons and VIP by inhibitory motor neurons. These neurotransmitters could act directly at the effector level. Like the response elicited by VIP, forskolin evoked epithelial secretion and smooth muscle relaxation. Both effects are direct in the enterocytes and the smooth muscle layers, insensitive to TTX, and therefore, possibly due to an increase in cAMP in both effector cells thus mimicking the mechanism of action of enterotoxins^{21 22 23}.

To assess the role of these neurotransmitters in neurosecretory and neuromuscular mechanisms, EFS was used to release neurotransmitters from intrinsic neurons in the intestinal wall. Mucosal EFS caused a transient increase of the I_{sc} that was strongly reduced by TTX and the combination of atropine and α -cmt showing that ACh and VIP participate in neurosecretion. Therefore, this study elucidates for the first time, as previously reported in laboratory animals, that cholinergic and VIP-producing neurons are responsible for the EFS-evoked secretory responses in the pig colon^{24 25}. The NOS inhibitor L-NNA was without effect (not shown) suggesting that in this model, neurosecretion is probably not due to NO, unlike the human colon²⁶. Regarding neuromuscular mechanisms, non-selective stimulation of intrinsic motor neurons causes virtually simultaneous activation of excitatory and inhibitory

neurons. This produces responses that are difficult to interpret since there is a succession of so-called “on and off” responses ⁷. To properly evaluate neuromuscular transmission, selective stimulation of excitatory and inhibitory neurons should be accomplished. Hundreds of papers have evaluated the identities of the inhibitory neurotransmitters using classical NANC conditions. We have been able to identify two major pathways, NO and purines acting on P2Y₁ receptors as major inhibitory mediators in the porcine colon ²⁷. It is important to notice that despite the clear inhibitory effect of VIP, its role as an inhibitory neurotransmitter is difficult to demonstrate since IJP and corresponding relaxations are blocked with combinations of NOS inhibitors and P2Y₁ blockers ²⁷. A functional role of VIP has been reported in the internal anal sphincter of the mouse ²⁸. In our study, we propose to use NNNP pharmacological conditions to isolate the excitatory component of neurotransmission. Under these experimental conditions, the contractile response was blocked with TTX and atropine. These results should be interpreted as a rather selective activation of excitatory motor neurons that might be responsible for colonic propagated contractions.

Another way to stimulate intrinsic neurons is through the activation of nicotinic receptors. In this sense, nicotine binds to the receptor located on intramural neurons and produces an inward current that depolarizes them. This generates an action potential that releases the neurotransmitter at the synaptic level. In this study, we demonstrated the presence of nicotinic receptors in enteric neurons responsible for neurosecretion since the nicotinic response was reduced by TTX and atropine. Excitatory and inhibitory motor neurons responsible for contraction and relaxation also responded to nicotine since it produced contraction when the tissue was incubated with L-NNA and relaxation when it was incubated with atropine. Similar responses have been found in the human colon where nicotine produces activation of inhibitory neurons ²⁹. Together these results suggest the presence of nicotinic receptors in neurons responsible for motility and secretion.

Mechanical and chemical stimulation of the mucosa and wall distension triggers intrinsic reflexes due to the release of 5-HT that stimulates IPANs that contact with interneurons, secretory neurons and motor neurons ³⁰. In this study, we demonstrated that the secretory response due to 5-HT was blocked by TTX and ondansetron suggesting the presence of 5-HT₃ receptors in enteric neurons responsible for the neurosecretory circuit. 5-HT₃ receptors are also involved in the control of motility since the inhibitory response was strongly reduced by ondansetron.

The present study shows that under physiological conditions there is a baseline active ion transport in colonic strips of post weaned pigs, similar to results previously reported ³¹. However, electrophysiological parameters are dynamic and processes such as the postnatal development, environmental stressors or enterotoxins cause ongoing intestinal electrophysiological changes ^{31 32 33}. It is known that ETEC, once bounded, elaborates STa, STb and LT enterotoxins that stimulate different epithelial secretory signalling pathways that result in anion secretion and fluid loss ¹¹. In addition, the activation of the innate immune system in response to bacterial infection produces the release of MC-derived mediators, such as histamine, prostaglandins, 5-HT and proteases to fight the infection ^{34 1}. In this context, our study shows that animals' exposure to ETEC diminished the integrity of the colonic barrier within the first days after the infectious challenge although epithelial Cl⁻ secretion as well as the recruitment of MCs within the colon remained heightened for a longer period. These electrophysiological features were clinically manifested with diarrhoea to flush the intestine of invading micro-organisms.

The movement of electrolytes over the epithelium is mainly mediated by luminal Cl⁻ secretion via a number of apical Cl⁻ channels, mostly by the CFTR channel ¹. As we show in this study, this process is regulated by neurotransmitters and other non-neural mediators that act on receptors expressed on epithelial cells thus activating the second-messenger system ³⁵. Therefore, the enterotoxins released by ETEC activated secretomotor reflexes that were blocked by TTX and atropine, indicating

that cholinergic secretomotor neurons are the main neural component that regulates basal colonic secretion in ETEC challenged piglets ³⁶.

It has been also postulated that STb can increase intestinal peristalsis acting on the ENS to contract the smooth muscle ^{11 1}. The increase in peristaltic activity may be due to two causes, an increase in motor activity due to neuromuscular contraction or due to a disinhibition mechanism, i.e. reduction of tonic inhibitory activity leading to contraction. Our experimental results showed no differences between groups in either of the two mechanisms since the excitatory neuromuscular activity in each of the two muscle layers did not differ and the presence of an inhibitory tone was similar between groups.

Luminal antigenic stimulation also produces MCs degranulation of inflammatory mediators, such as histamine ³⁷. However, segmental differences in the histamine receptor subtypes sensibility have been described in the intestinal epithelium and smooth muscle ^{38 39}. In our experiments, histamine induced fluid secretion partly by their direct action on H₂ receptors, as previously reported in the pig proximal colon ³⁸. In the smooth muscle histamine induced contraction, which was decreased by the H₂ antagonist, ranitidine, and TTX. Therefore, these data suggest that H₂ receptors are involved in the contractile response induced by histamine in the pig distal colon and that there is a histamine-sensitive neural component that contributes to the contractile response. However, other receptor subtypes might be involved in the response.

In conclusion, in this study we have characterised in parallel the nerve pathways responsible for neurosecretion and contractility in the pig colon. We have shown that neurosecretion in the pig is due to ACh and VIP. 5-HT₃ and nicotine receptors are probably involved in the neural pathways associated with motility and secretion. ETEC infected animals showed transient alterations of the barrier and activation of neural mechanisms associated with increased secretion. Immunological mechanisms may also be involved in their activation, as mastocytosis was observed

at the mucosal and submucosal level. In contrast to neurosecretory mechanisms, neuromuscular mechanisms associated with contraction and relaxation were not altered. This suggests that colonic motility should not be impaired in this type of infection and that diarrhoea is primarily a secretory defence mechanism in which the ENS is actively involved. However, it cannot be ruled out that the increase in distension induced by the diarrhoea may end up producing a greater stimulus on motor phenomena which, as we can see in the present work, are totally conserved.

Bibliography

1. Moeser AJ, Blikslager AT. Mechanisms of porcine diarrheal disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2007;231(1):56-67. doi:10.2460/javma.231.1.56
2. Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC GD. Gastrointestinal Physiology and Function. In: *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2017:251-263. doi:10.1007/164
3. Vasina V, Barbara G, Talamonti L, et al. Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci.* 2006;126-127:264-272. doi:10.1016/j.autneu.2006.02.025
4. Hens J, Schrödl F, Brehmer A, et al. Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *J Comp Neurol.* 2000;421(3):429-436.
5. Brown DR, Timmermans JP. Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil.* 2004;16 Suppl 1:50-54. doi:10.1111/j.1743-3150.2004.00475.x
6. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Porcine models of digestive disease: The future of large animal translational research. *Transl Res.* 2015;166(1):12-27. doi:10.1016/j.trsl.2015.01.004
7. Mañé N, Martínez-Cutillas M, Gallego D, Jimenez M. Enteric motor pattern generators involve both myogenic and neurogenic mechanisms in the human colon. *Front Physiol.* 2015;6:205. doi:10.3389/fphys.2015.00205
8. Keast JR, Furness JB, Costa M. Investigations of nerve populations influencing ion transport that can be stimulated electrically, by serotonin and by a nicotinic agonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1985;331(2-3):260-266. doi:10.1007/BF00634247
9. Timmermans JP, Hens J, Adriaensen D. Outer submucous plexus: An intrinsic nerve network involved in both secretory and motility processes in the intestine of large mammals and humans. *Anat Rec.* 2001;262(1):71-78. doi:10.1002/1097-0185(20010101)262:1<71::AID-AR1012>3.0.CO;2-A
10. Moeser AJ, Ryan KA, Nighot PK, Blikslager AT. Gastrointestinal dysfunction

- induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(2):G413-G421. doi:10.1152/ajpgi.00304.2006
11. Dubreuil JD. The Whole Shebang: The Gastrointestinal Tract, Escherichia coli Enterotoxins and Secretion. *Curr Issues Mol Biol.* 2012;14(2):71-82.
 12. Thiagarajah JR, Donowitz M, Verkman AS. Secretory diarrhoea: Mechanisms and emerging therapies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(8):446-457. doi:10.1038/nrgastro.2015.111
 13. Zhu C, Ye JL, Yang J, et al. Differential expression of intestinal ion transporters and water channel aquaporins in young piglets challenged with enterotoxigenic Escherichia coli K88. *J Anim Sci.* 2017;95(12):5240-5252. doi:10.2527/jas2017.1806
 14. López-Colom P, Castillejos L, Rod Ríguez-Sorrento A, Puyalto M, Mallo JJ, Martín-Orúe SM. Efficacy of medium-chain fatty acid salts distilled from coconut oil against two enteric pathogen challenges in weanling piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2019;10:89. doi:10.1186/s40104-019-0393-y
 15. Traserra S, Villarte S, Traini C, et al. The asymmetric innervation of the circular and longitudinal muscle of the mouse colon differently modulates myogenic slow phasic contractions. *Neurogastroenterol Motil.* 2020;32(4):e13778. doi:10.1111/nmo.13778
 16. Wood JD. Enteric neuroimmunophysiology and pathophysiology. *Gastroenterology.* 2004;127(2):635-657. doi:10.1053/j.gastro.2004.02.017
 17. Sharkey KA, Savidge TC. Role of enteric neurotransmission in host defense and protection of the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci.* 2014;181:94-106. doi:10.1016/j.autneu.2014.03.004
 18. Traynor TR, Brown DR, O'Grady SM. Regulation of ion transport in porcine distal colon: Effects of putative neurotransmitters. *Gastroenterology.* 1991;100(3):703-710. doi:10.1016/0016-5085(91)80014-Z
 19. Kondo T, Nakajima M, Teraoka H, et al. Muscarinic receptor subtypes

- involved in regulation of colonic motility in mice: Functional studies using muscarinic receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol.* 2011;670(1):236-243. doi:10.1016/j.ejphar.2011.08.034
20. Sanders KM. Enteric Inhibitory Neurotransmission, Starting Down Under. *Adv Exp Med Biol.* 2016;891:21-29. doi:10.1007/978-3-319-27592-5
 21. Krueger D, Michel K, Allam S, et al. Effect of hyoscine butylbromide (Buscopan®) on cholinergic pathways in the human intestine. *Neurogastroenterol Motil.* 2013;25(8):e530-e539. doi:10.1111/nmo.12156
 22. Schulzke JD, Andres S, Amasheh M, Fromm A, Günzel D. Anti-diarrheal mechanism of the traditional remedy uzara via reduction of active chloride secretion. *PLoS One.* 2011;6(3):e18107. doi:10.1371/journal.pone.0018107
 23. Muller MJ, Baer HP. Relaxant Effects of Forskolin in Smooth Muscle. Role of Cyclic AMP. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1983;322(1):78-82. doi:10.1007/BF00649356
 24. Kuwahara A, Radowicz-cooke HJ. Epithelial transport in guinea-pig proximal colon: influence of enteric neurones. *J Physiol.* 1988;395:271-284. doi:https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016918
 25. McCulloch CR, Kuwahara A, Condon CD, Cooke HJ. Neuropeptide modification of chloride secretion in guinea pig distal colon. *Regul Pept.* 1987;19(1-2):35-43.
 26. Krueger D, Michel K, Zeller F, et al. Neural influences on human intestinal epithelium in vitro. *J Physiol.* 2016;594(2):357-372. doi:10.1113/JP271493
 27. Traserra S, Barber C, MacInnes J, et al. Different responses of the blockade of the P2Y1 receptor with BPTU in human and porcine intestinal tissues and in cell cultures. *Neurogastroenterol Motil.* 2021:e1410. doi:10.1111/nmo.14101
 28. Keef KD, Saxton SN, Mcdowall RA, Kaminski RE, Duffy AM, Cobine CA. Functional role of vasoactive intestinal polypeptide in inhibitory motor innervation in the mouse internal anal sphincter. *J Physiol.* 2013;591(6):1489-

1506. doi:10.1113/jphysiol.2012.247684
29. Aulí M, Martínez E, Gallego D, et al. Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol.* 2008;155(7):1043-1055. doi:10.1038/bjp.2008.332
30. Camilleri M, Nullens S, Nelsen T. Enteroendocrine and neuronal mechanisms in pathophysiology of acute infectious diarrhea. *Dig Dis Sci.* 2012;57(1):19-27. doi:10.1007/s10620-011-1939-9
31. Boudry G, Péron V, Le Huërou-Luron I, Lallès JP, Sève B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J Nutr.* 2004;134(9):2256-2262. doi:10.1093/jn/134.9.2256
32. Bach TA, Carey H V. Developmental Changes in Neurally Mediated Ion Transport in Piglet Distal Colon. *Pediatr Res.* 1994;36(2):144-151.
33. Moeser AJ, Klok C V, Ryan KA, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(1):G173–G181. doi:10.1152/ajpgi.00197.2006
34. Wesolowski J, Paumet F. The impact of bacterial infection on mast cell degranulation. *Immunol Res.* 2011;51(2-3):215-226. doi:10.1007/s12026-011-8250-x
35. Xue J, Askwith C, Javed NH, Cooke HJ. Autonomic nervous system and secretion across the intestinal mucosal surface. *Auton Neurosci.* 2007;133(1):55-63. doi:10.1016/j.autneu.2007.02.001
36. Schröder B, Hoppe S, Breves G. Evidence for down-regulation of neurogenic secretion in small intestinal epithelium from weaned piglets suffering from diarrhea. *Livest Sci.* 2010;133(1-3):218-221. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.068
37. Thorbøll JE, Skadhauge E. The effect of histamine on ion transport in porcine jejunum. *Comp Biochem Physiol A Physiol.* 1997;118(2):301-304. doi:10.1016/S0300-9629(96)00309-X
38. Ahrens F, Gäbel G, Garz B, Aschenbach JR. Histamine-induced chloride

- secretion is mediated via H₂-receptors in the pig proximal colon. *Inflamm Res.* 2003;52(2):79-85. doi:10.1007/s000110300005
39. Wood J. Histamine, mast cells, and the enteric nervous system in the irritable bowel syndrome, enteritis, and food allergies. *Gut.* 2006;55(4):445-447. doi:10.1136/gut.2005.079046

CAPÍTOL 3

Effect of early socialization and environmental enrichment of lactating piglets on colonic functionality.

Part of these results are included in *Scientific Reports* 11:6113 (2021)

Abstract

Background: Weaning involves immunological, social and environmental stressors that can threaten the digestive and immune system leading to intestinal barrier disturbances that can result in a higher susceptibility to enteric pathogens in the post-weaning period.

The aim of this study was to assess an etiologic management in the pre-weaning period as a strategy to decrease the negative intestinal impacts associated with the weaning process in the post-weaning period.

Methods: 34 Danbred male piglets were used for this study. 14 were studied in the pre-weaning period and the other 20 in the early post-weaning period. Colonic samples were studied using both a muscle bath and Ussing chamber. Colonic MCs were stained with methylene blue and goblet cells with AB-PAS staining.

Key results: electrogenic ion transport (I_{sc} and PD values) increased in the control group. No disturbances in the paracellular pathway, the neuromuscular excitatory response or in the number of intestinal MCs and goblets cells were observed between groups 3-days after weaning.

Conclusions and inferences: Weaning is a critical period for porcine production. Therefore, applying effective measures to reduce GI alterations could be a strategy to diminish post-weaning diarrhoeal processes. The etiological management applied in the present study improves the adaptability of the animals to the weaning process.

Key words: weaning, stress, post-weaning diarrhoea, colon, pig.

Introduction

Weaning is a critical period which involves multifactorial stressors ¹. In the pig intensive farming, animals are usually removed from their mothers and mixed with new pen mates at around 3 weeks of age. The regrouping routines lead inevitably to the establishment of new hierarchies that generally evolve with aggressions or abnormal behaviours ².

Environmental and nutritional challenges also arise from weaning due to the abrupt change to a solid diet and the exposition to a new microbiological environment ³. In this context, weaning can threaten the digestive and immune system development and adaptation ⁴. Intestinal barrier disturbances can result in luminal bacterial, toxins and antigens translocations and consequently, to a higher susceptibility to enteric pathogens in the post-weaning period ^{5 6}. Over the last decades, diarrhoea related to weaning processes have been frequently managed with preventive antibiotics and metals administration, such as zinc or copper ⁴. Therefore, new approaches are needed due to bacterial resistances and environmental considerations. Until now, most of the research has focused on the post-weaning period and consequently, new management approaches intended for the pre-weaning period (gestation and lactation) should be assessed for an optimal development of the gut and the immune system during the weaning and the post-weaning periods ⁷.

The CRF mammalian family members include the CRF and related peptides such as Ucn 1, 2, and 3 which mediate their effects via two GPCR receptor subtypes, CRFR₁ and CRFR₂. It is established that Ucn 1 binds with higher affinity to both CRF receptors subtypes, whereas CRF exhibits higher affinity to CRF₁ than CRF₂ receptors. Ucn 2 and 3 are thought to express specific affinity to CRF₂ receptors ⁸. CRF is released in the hypothalamus and recognized as a major regulator of pituitary adrenocorticotropin that stimulates the release of ACTH. In addition to central roles, different studies have demonstrated profound peripheral functions for CRF family members. Both CRFR₁ and CRFR₂ are found in the GI tract and CRF have been implicated as one of the most important mediators coordinating stress-

related alterations of GI functions that are part of the underlying mechanisms in the pathophysiology of IBS related to stressful life events^{9 10}. It is also thought that CRF activates MCs, which in turn release chemical mediators that may have a direct impact on intestinal permeability, especially when weaning occurs in early stages. However, the exact mechanism of interaction between MCs and the CRF pathway is not fully understood^{5 11 12}.

In this context, the present study aimed to assess an etiologic management in the pre-weaning period as a strategy to decrease the negative intestinal impacts associated with the weaning process that are mainly observed in the early post-weaning period. Accordingly, secretory and mechanical colonic responses, as well as the integrity of the colonic barrier were assessed *ex vivo*.

Materials and Methods

Experimental groups

Twenty-two sows from a commercial farm were randomly allotted into two groups with similar parity (11 sows per group, 4 primiparous and 7 multiparous) and their litters, a total of 34 medium-weighted male piglets per pen (17 piglets per group), were selected randomly and used for the study. A differential management was carried out between groups, including a control treatment (CTR), with the usual management applied in commercial production, and an enriched treatment (ENR) in which two adjacent farrowing pens were opened to piglet socialization 14 days after delivery by removing the separation fences. Moreover, three different types of enrichment objects (a hearty chew dog toy, a squid-shaped toy and a natural rope) were placed around the farrowing pens in the ENR groups since parturition. Piglets were weaned on average at 25 days of age and randomly mixed into different post-weaning pens, keeping the experimental groups. The same management conditions were applied to all piglets after weaning. The housing, management, husbandry and slaughtering conditions of this experiment conformed to the European Union Guidelines (Directive 2010/63/EU).

All experimental procedures used in this study were approved beforehand by the Animal and Human Experimental Ethical Committee of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB; permit code CEEAH 1406).

Intestinal sampling

Two intestinal samplings were performed in the farm throughout the study, two days before weaning (-2 day), and three days after weaning (+3 day), in order to obtain samples for histological studies (N=7 CTR, N=7 ENR each sampling day). For that, one medium-weighted male piglet per pen was selected randomly from seven different pens of each group and each sampling day. The piglets were sedated with Xylazine (2.2 mg kg⁻¹ BW; Rompun, Bayer) and Zolazepam - Tiletamine (8 mg kg⁻¹ BW; Zoletil 100, Virbac) given intramuscularly, and humanely euthanized with an overdose of pentobarbital (Euthasol, Esteve, Barcelona). Thereafter, samples from the jejunum and the colon were collected and fixed in Methacarn (MeOH60 mL, CHCl₃330 mL, HAc10 mL) to perform histological studies.

Colonic tissue for functional studies

For functional studies, 10 animals per group (N=10 CTR, N=10 ENR) were selected following the same criteria as described above and transported to UAB farm facilities 2 days after weaning (+2 day). Transport was carried out under sedation by means of Xylazine (2.2 mg kg⁻¹ BW; Rompun, Bayer) and Zolazepam - Tiletamine (8 mg kg⁻¹ BW; Zoletil 100, Virbac) given intramuscularly. Once in the UAB, piglets were group-housed until next day (+3 day), when functional studies of the intestine were performed. At day 3 post weaning (+3 day), euthanasia was performed as previously described and colonic samples were collected and placed in carbogenated Krebs buffer until functional experiments were performed. Jejunal and colonic samples (N=10 CTR, N=10 ENR) were also obtained and fixed in Methacarn for histological studies.

Drugs and solutions

The composition of the Krebs solution was as follows (in mM): 10.10 glucose, 115.48 NaCl, 21.90 NaHCO₃, 4.61 KCl, 1.14 NaH₂PO₄, 2.50 CaCl₂ and 1.16 MgSO₄ bubbled with a mixture of 5% CO₂:95% O₂ (pH 7.4).

The following drugs were used: N^ω-nitro- L-arginine (L-NNA), atropine sulphate (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), (1R,2S,4S,5S)-4-[2-Iodo-6-(methylamino)-9H-purin-9-yl]-2 (phosphonoxy) bicyclo [3.1.0] hexane-1-methanol dihydrogen phosphate ester tetraammonium salt (MRS2500), (2-Hydroxyethyl)trimethylammonium chloride carbamate (Cch) and Tetrodotoxin (Tocris, Bristol, UK).

Measurement of electrophysiological parameters

Colon mucosa was stripped from the muscle layers and myenteric plexus, opened along the mesenteric border and divided into 1.5 cm² 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 cm². Strips were bilaterally bathed with 5 mL of carbogenated (95% O₂ and 5% CO₂) and warmed (37±1 °C) Krebs buffer. The chambers contained two voltage sensitive electrodes (EKV; World Precision Instruments) to monitor the PD across the tissue and two Ag-AgCl current passing electrodes (EKC; World Precision Instruments) to inject the required I_{sc} to maintain a potential difference of zero. A voltage step of 1 mV was applied every 30 min and the change in I_{sc} was used to calculate tissue G and its reciprocal, TEER, by Ohm's law. Tissues were allowed to stabilize for 30 - 40 min before baseline values of PD, I_{sc} and G were recorded. The secretory effect of drugs was measured as the change in I_{sc}. Data was registered via an automated voltage/current clamp (DVC-1000; World Precision Instruments) and digitized with an analog-to-digital converter (MP150; Biopac Systems, Goleta, USA). Measurements were recorded and analyzed with Acqknowledge computer software (version 3.8.1; Biopac Systems). I_{sc} and G data were normalized for the mucosal surface area.

Assessment of epithelial permeability

Paracellular permeability was assessed by measuring mucosal to basolateral flux of FD4 (TdB Consultancy AB, Uppsala, Sweden). After stabilization, FD4 was added to the mucosal reservoir to a final concentration of 2.5×10^{-4} mol L⁻¹. Basolateral samples (250 μ L, replaced by 250 μ L of Krebs buffer) were taken at 30 min intervals during the following 120 min experimental time. 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 (25 nm band width), against a standard curve. Readings are expressed as a percentage (%) of the total amount of FD4 added to the mucosal reservoir.

Mechanical experiments

Colonic circularly oriented muscle strips were mounted in a 10 mL organ bath filled with Krebs solution at 37 ± 1 °C. A tension of 1 g was applied, and tissue was allowed to equilibrate for 1 h until SPC were recorded. An isometric force transducer (Harvard VF-1) connected to an amplifier was used to record the mechanical activity. Data were digitalized (25 Hz) using DATAWIN1 software (Panlab, Barcelona, Spain) coupled to an ISC-16 analog-to-digital card installed in a PC. EFS was applied through two platinum electrodes placed on the support holding the tissue and connected to the output of an electronic stimulator (Grass S88, Grass Instruments, Quincy, MA).

In order to assess the release of excitatory neurotransmitters, NNNP conditions were used in colonic samples of CTR and ENR animals. Subsequently, EFS was applied to assess excitatory responses at 30 V (train 300 ms, pulse duration 0.4 ms) and increasing frequencies (10, 20, 30, 40 and 50Hz) of stimulation every 15 minutes. EFS responses were analysed measuring the amplitude of the contractions. In order to normalize mechanical data, responses to drugs were expressed as a percentage of the basal AUC using the following formula: $1 - (\text{AUC after drug incubation} / \text{AUC previous to drug addition})$, being 0% a complete

cessation of spontaneous motility and 100% a mechanical recording with the same AUC than in the basal activity.

Histological studies

Slides from the jejunum and the colon of pre-weaned (-2 day) and post-weaned (+3 day) animals were stained with methylene blue in order to evaluate intestinal MCs, N=7 CTR and N=7 ENR animals. Additionally, jejunal and colonic slides from animals selected to perform functional studies were processed with methylene blue staining in order to evaluate intestinal MCs, N=10 CTR and N=10 ENR animals. Alcian Blue-PAS (AB-PAS) staining was used in colonic slides in order to assess the number of goblet cells within the colon, N=4 CTR and N=4 ENR animals. In both cases, evaluation was performed in 10 random fields per subject and in a blinded fashion.

Data analysis

For functional secretory and mechanical experiments, 2 to 4 colonic strips per animal were studied and the mean of each animal was calculated (N). Electrophysiological parameters, FD4 slope, the basal inhibitory neural tone and MCs counts from animals used for functional studies were analysed through a t-test (Mann-Whitney test). The effect of Ucn on the SPC and the I_{sc} was assessed using a one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Finally, FD4 kinetics, excitatory EFS, the effect of Cch on the I_{sc} and MCs and goblet cells counts were compared using a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Data are expressed as mean \pm SEM. Data were considered significant when $P < 0.05$. N values represent different experimental animals and n values represent the total number of strips assessed. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effect of early socialization and environmental enrichment on Transepithelial Ion Transport and Paracellular Permeability to Fluorescent Tracers

Different assays with Ussing chambers were performed to evaluate the possible impact of the experimental treatments in intestinal physiology. Accordingly, Figure 1 shows the assessment of the electrolyte transport across the intestinal epithelium as well as of the barrier integrity in both experimental groups.

At day 3 post weaning (+3 day), an increase in the basal colonic I_{sc} and PD was observed in the CTR group compared to the ENR one (Figure 1A and 1B), suggesting a higher level of ion transport across the colonic tissue of CTR animals. Basal colonic TEER was not significantly different between groups (Figure 1C).

Regarding changes in the paracellular permeability to fluorescent tracers, mucosal to basolateral passage of FD4 across the colon was measured every 30 min. Fluorescent tracer passage was time dependent in both groups (Figure 1D). However, non-significant differences were observed in the kinetic of FD4 permeability during the 120 experimental min (Figure 1D). In the same line, both groups had a similar slope of the FD4 linear regression (Figure 1E). In order to have another measurement of the colonic barrier integrity, TEER was also measured every 30 min, with almost negligible changes between experimental time and groups. At the last time point assessed, 120 min, TEER was around $43 \Omega \cdot \text{cm}^2$ in both groups (Figure 1F).

Subsequently, Ucn $1 \mu\text{M}$ was incubated, which produced a transitory I_{sc} increase (CTR: $8.12 \pm 2.140 \Delta I_{sc} \mu\text{A}/\text{cm}^2$; ENR: $4.27 \pm 1.932 \Delta I_{sc} \mu\text{A}/\text{cm}^2$) ($P > 0.05$), with a time duration of 2 to 4 min but without significant differences between experimental groups. Nevertheless, not all the colonic strips responded to Ucn $1 \mu\text{M}$ (CTR tissues 60%; ENR tissues 25%). At the end of the protocol, Cch $10 \mu\text{M}$ was applied in all colonic strips to assess tissue viability, which produced a consistent I_{sc} increase but

without significant differences between either treatments (vehicle / Ucn 1 μ M) or experimental groups (CTR / ENR) (CTR, vehicle: $119.59 \pm 17.183 \Delta I_{sc} \mu A/cm^2$; CTR, Ucn 1 μ M: $121.65 \pm 17.813 \Delta I_{sc} \mu A/cm^2$; ENR, vehicle: $92.18 \pm 8.456 \Delta I_{sc} \mu A/cm^2$; ENR, Ucn 1 μ M: $100.17 \pm 9.130 \Delta I_{sc} \mu A/cm^2$).

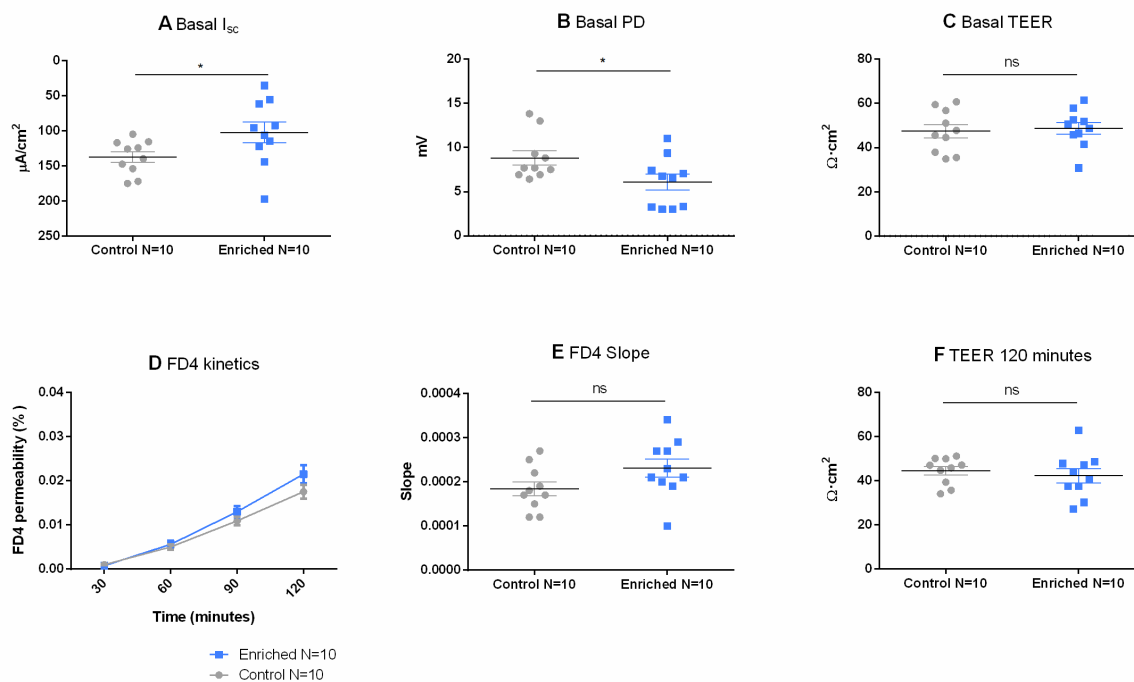


Figure 1. Effect of early socialization and environmental enrichment on Transepithelial Ion Transport and Paracellular Permeability. (A-B-C) Histograms showing basal I_{sc}, PD and TEER values, respectively. (D) Mucosal to basolateral passage of FITC-dextran (FD4) over 120 min concerning the amount added to the mucosal reservoir, (E) FD4 flux to the basolateral compartment expressed as %/min and (F) TEER values at the end of 120 min experimental time. *, P<0.05 t-test (Mann-Whitney test). Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at the bottom of each graph.

Effect of early socialization and environmental enrichment on mechanical activity

Excitatory responses were studied under NNNP pharmacological conditions. Incubation of L-NNA 1mM and MRS2500 1 μ M produced a sustained frequency and amplitude increase that was assessed by means of AUC (CTR 70.20 ± 23.450 % of basal AUC; ENR 148.70 ± 46.150 % of basal AUC). No significant differences were observed between groups despite the response being greater in ENR animals.

Thereafter, excitatory responses were assessed with EFS at 30 V (train 300 ms, pulse duration 0.4 ms) and increasing frequencies (10, 20, 30, 40 and 50Hz) of stimulation at intervals of 15 minutes. EFS produced transient contractions in a frequency dependent pattern (Figure 2A,C) that were totally blocked with the incubation of atropine 1 μ M (Figure 2B,C). In the CTR group, the highest frequency produced a mean amplitude of 2.1 ± 0.78 g, whereas in the ENR group, the mean amplitude achieved at 50Hz was of 1.6 ± 0.39 g (Figure 2D,E,F).

Lastly, incubation of Ucn 1 μ M in muscle colonic strips produced a transitory relaxation of the SPC, being -67.64 ± 7.525 % of basal AUC in the CTR group and -64.95 ± 9.827 % of basal AUC in the ENR group ($P > 0.05$). The relaxation range time was of 2.4 to 2.7 min after drug incubation. Subsequently, Ucn 1 μ M was also assessed in EFS (10-50 Hz) responses in both experimental groups, without finding significant differences compared with a prior EFS control train (10-50 Hz) ($P > 0.05$).

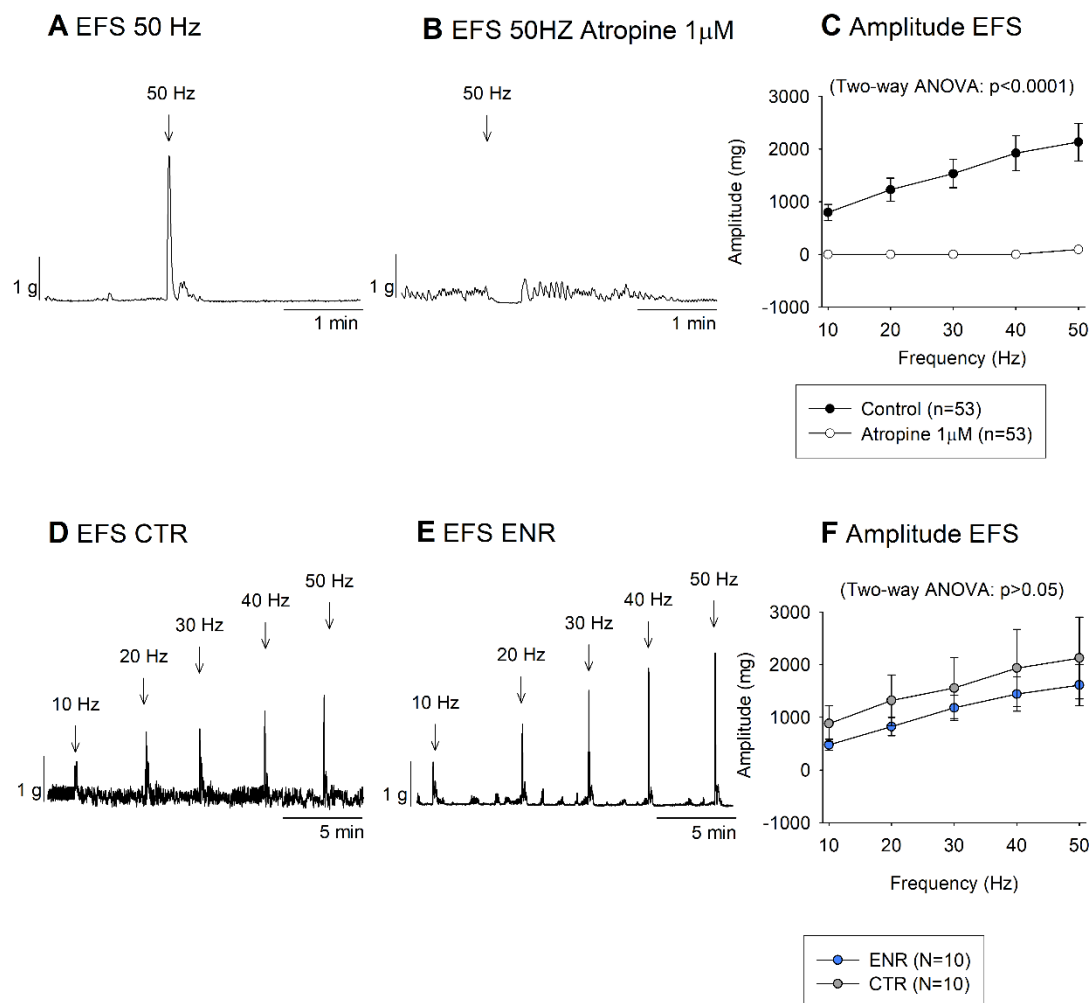


Figure 2. Effect of early socialization and environmental enrichment on mechanical activity. (A-B) Mechanical recordings from circularly oriented strips showing the effect of 50 Hz EFS in control conditions and with the prior incubation of atropine 1 μ M, respectively and (C) histogram showing the effect of 10-50 Hz EFS with and without atropine 1 μ M incubation. (D-E) Mechanical recordings from circularly oriented strips and (F) histogram showing the effect of early socialization and environmental enrichment on cholinergic neurotransmission. Two-way ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM. N or n values are shown at the bottom of each graph.

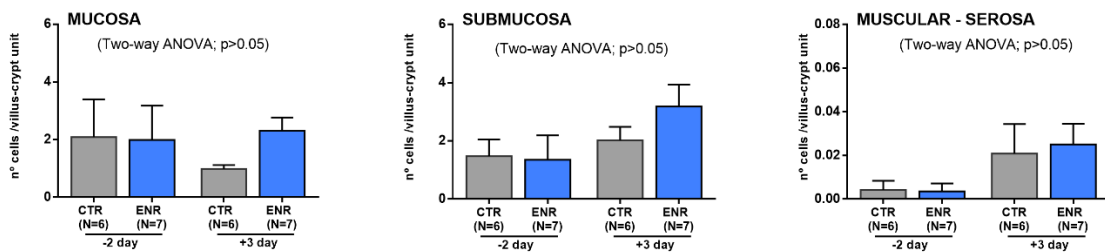
Effect of early socialization and environmental enrichment on intestinal MCs

The number of MCs was significantly higher in the colon compared with the jejunum in both experimental groups, except for the muscular and serosa coats of the CTR group, in which the number of MCs was similar between intestinal segments (Figure 3A,B). Furthermore, in both intestinal segments, MCs were mainly located in the mucosa and submucosa coats and a low rate was observed in the muscle and the serosa coats (Figure 3C,D,E,F). After weaning, a slight but not significant increase

in the number of jejunal and colonic MCs was observed in both experimental groups, except for the jejunal mucosa of the CTR group.

Finally, MCs were also assessed in jejunal and colonic samples from the animals used for functional studies (+ 3 day) (N=10 CTR and N=10 ENR). In this case, MCs followed the same distribution as described above and no significant differences were observed between groups in each of the colonic coats.

A Number of MCs in the jejunum



B Number of MCs in the colon

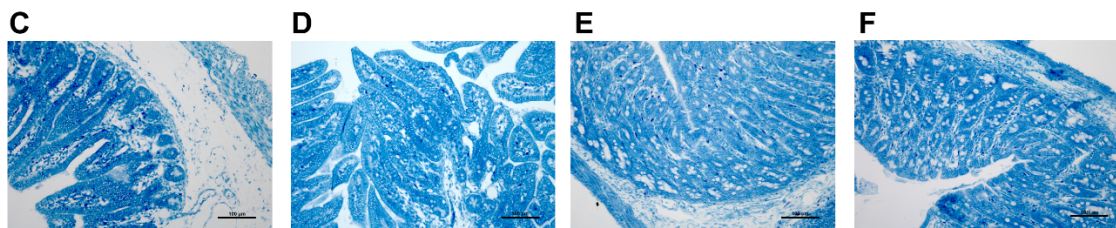
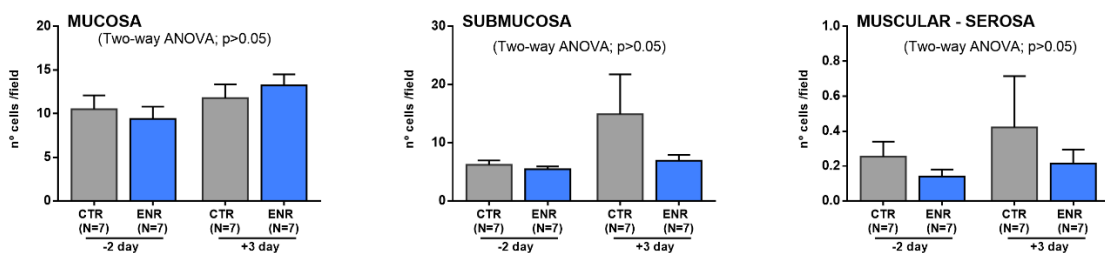


Figure 3. Effect of early socialization and environmental enrichment on intestinal MCs. (A) Histogram and (C-D) pictures showing the number of MCs in the jejunum of CTR and ENR animals. (B) Histogram and (E-F) pictures showing the number of MCs in the colon of CTR and ENR animals. Two-way ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at the bottom of each graph. Scale bar 100 μ m.

Effect of early socialization and environmental enrichment on colonic goblet cells

Goblet cells, with a blue-purple colour after AB-PAS staining, were distributed in the mucosa and through the epithelium including the crypts (Figure 4B,C). In the pre-weaning period, -2 day, goblet cells count ranged between 90-340 goblet cells / field and 110-260 goblet cells / field in the CTR and ENR group, respectively. In the post-weaning period, +3 day, goblet cells count ranged between 199-290 goblet cells / field in the CTR group whereas in the ENR group 146-250 goblet cells / field were counted (Figure 4A).

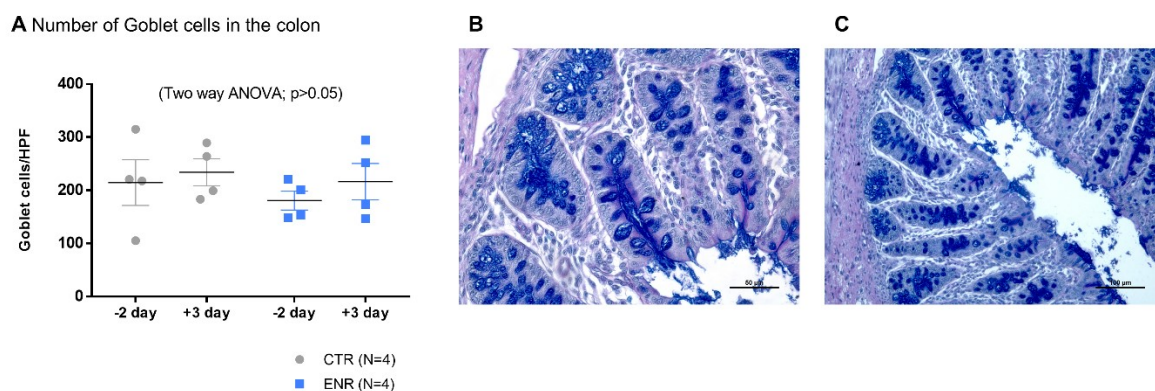


Figure 4. Effect of early socialization and environmental enrichment on colonic goblet cells. (A) Histogram and (B-C) pictures showing the number of goblet cells in the colon of CTR and ENR animals. Two-way ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM. N values are shown at the bottom of each graph.

Discussion

This work was part of a larger project in which behavioural observations, aggression-associated skin lesions, ear-biting lesions, and salivary stress biomarkers responses ¹³, as well as, changes in the microbiota colonization process and the animal's metabolic response ¹⁴ were also assessed. In this context, the present study aimed to determine the possible impact of early socialization and environmental enrichment during lactation in intestinal functionality to improve the adaptation of piglets to weaning.

Previous studies based on the same etiological management applied in this project have shown behavioural differences during lactation. Ko et al., reported that ENR piglets spent more time exploring in the pre-weaning period compared to CTR animals. Additionally, in the post-weaning period, ENR treatment diminished negative social behaviours, skin lesions and long-term reciprocal fights ¹³. Regarding physical adaptation, ENR piglets had a better performance during the first 5 days after weaning as well as a lower energy demand compared to CTR animals ^{13 14}. Furthermore, these positive consequences were still seen later in time since ENR piglets had a lower slaughter age than the CTR piglets ¹³.

Stress from the weaning process has been postulated to regulate the response of the HPA axis and consequently, the social and physical adaptation of animals to weaning. In this context, it has been reported that serum concentration of cortisol and CRF increased 24 hours post-weaning in both, early and late swine weaning approaches ¹⁵. In agreement with this finding, Ko et al., showed that salivary stress markers increased in both experimental groups after weaning. However, in CTR animals, cortisol concentration still increased 48 hours post-weaning, while ENR piglets had already recovered from weaning stress ¹³. Therefore, these results suggest that although the weaning processes induce an inevitable stress response, ENR animals are able to develop a better adaptation to the new situation.

In the present study, the impact of the socialization of litters during lactation on intestinal functionality was assessed 3 days post-weaning. Previous studies have reported that weaning stress induces intestinal functionality consequences that are more noticeable at day 1-2 post-weaning ¹⁶. Our study shows that neonatal enrichment (ENR group) had a positive effect on the net electrogenic ion transport, which is a marker of secretory diarrhoea. Salardigas-García et al's., results also indicated a downregulation of TLR2 expression in ENR animals after weaning. It has been reported that TLR2 expression is activated to protect weaning piglets against various harmful microorganisms, toxins, or antigens that reside within the lumen of the intestine ^{17 18}. Thus, our results would suggest that the enhanced electrogenic ion transport observed in the CTR group could be stimulated by enteric pathogens and in turn, could act as a natural strategy to flush the harmful contents from the lumen. Other studies have reported that the enhanced colonic I_{sc} observed in the post-weaning is TTX-sensitive and therefore, is partly due to the activation of a neural secretory tone ¹⁶. However, in our study the participation of the ENS in the active electrogenic ion transport has not been assessed.

In the gut, CRF-like peptides have been reported to cause MCs degranulation and functional consequences, such as a disruption of the intestinal barrier and stimulation of ion secretion ⁷. In this study, the neonatal enrichment (ENR group) did not induce alterations in the integrity of the colon barrier 3 days post-weaning compared with the CTR group, since colonic FD4 permeability and electrophysiological parameters (TEER) were not altered. Moreover, Salardigas-García et al's., results also reported that this etiological management (ENR group) did not induce differences in the small intestine barrier, since jejunal OCLN, ZO-1, CLDN -1,-4,-15 gene expression were either altered compared to the CTR group ¹⁴. These results are in agreement with previous works in which no disturbances were observed in the colonic permeability of animals that undergo a late weaning approach (28 days of age) ^{5 19 20}, coinciding also with a decrease in serum CRF and CRFR₁ protein expression in the intestine ¹⁶. Similarly, in our model, no differences in the number of intestinal MCs were observed between groups, although a slight but not significant increase was noted due to the weaning process

itself in both managements. By contrast, other studies with an early weaning approach model (< 21 days age), have demonstrated that CRF mediates its effects via MCs activation since the CRFR₁ receptor expression and the tryptase levels in the gut are much more prominent compared with animals weaned at 28 days of age⁵ and also that the number of intestinal MCs is increased^{6, 16}. In rodent stress models, similar findings have been demonstrated, in that psychological (water avoidance stress) and physical (cold restraint stress) stressors stimulated increases in intestinal permeability and I_{sc} via cholinergic and adrenergic nerves and MCs²¹, which were abolished with an intraperitoneal injection of α -helical CRF²².

In this study, Ucn was also assessed in isolated mucosa to evaluate the contribution of the peripheral CRF in colonic functionality. Previous studies have reported that CRF added to isolated mucosa on Ussing chambers mimics early weaning-induced mucosal barrier dysfunction and hypersecretion via MC-dependent pathways,⁶ that are prevented by the nerve blocker TTX, thus demonstrating that the ENS is a critical element in the CRF-mediated intestinal barrier dysfunction¹¹. In contrast, our results showed that the addition of Ucn 1 μ M in the colonic epithelium produced a transient increase in the I_{sc}, in both experimental groups (CTR/ENR), respectively, but did not induce disturbances in the paracellular permeability. Moreover, the increase in the I_{sc} was not consistent in all the strips assessed, therefore, it was not possible to assess the involvement of MCs and the ENS in the pathway. In isolated muscle strips, Ucn induced a transitory inhibition of the SPC of 2.4 - 2.7 min. This result has been previously reported in the rat ileum, where Ucn inhibited phasic contractions by activating CRFR₂ receptors²³. However, in our study we were not able to block the Ucn response with the antagonist Astressin 1-3 μ M. Moreover, preliminary data from our laboratory also showed that the ENS was not involved in the response, since TTX did not block the SPC inhibition.

Regarding the neuromuscular excitatory response, two major neurotransmitters, ACh and tachykinins, released by enteric excitatory neurons might be responsible for colonic propagated contractions²⁴. Therefore, inhibitory neural inputs were

eliminated applying NNNP conditions to isolate excitatory responses ²⁵. In our study, as expected, NNNP conditions produced an increase in spontaneous motility due to the presence of an inhibitory neural tone that was similar between experimental groups. Thereafter, EFS was applied and elicited colonic contractions due to the activation of cholinergic motor neurons since the response was TTX and atropine sensitive. However, no differences were observed between groups suggesting that the weaning process did not imply a colonic neuromuscular impairment in any of the etiological managements.

In conclusion, the enriched environment, and the early socialization program in the pre-weaning period allows a better adaptation of animals to weaning as shown in the diminished social and physical stress responses in the ENR group. In the intestine, the decreased active electrogenic ion movement observed in the ENR group compared to the CTR group could be due to a better stress adaptation response of the animals. Therefore, effective stress management could produce a reduction in the active electrogenic ion movement in ENR piglets and lower secretory diarrhoeal indexes after weaning. In this context, further investigation is required regarding the direct role of the central HPA axis response in weaning-induced intestinal dysfunction.

Bibliography

1. Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J. The biological stress of early weaned piglets. *J Anim Sci Biotechnol.* 2013;4(1):19. doi:10.1186/2049-1891-4-19
2. Fels M, Hartung J, Hoy S. Social hierarchy formation in piglets mixed in different group compositions after weaning. *Appl Anim Behav Sci.* 2014;152:17-22. doi:10.1016/j.applanim.2014.01.003
3. Lallès JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR. Weaning - A challenge to gut physiologists. *Livest Sci.* 2007;108:82-93. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.091
4. Lallès J-P, Boudry G, Favier C, et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 2004;53(4):301-316. doi:10.1051/animres:2004018
5. Moeser AJ, Ryan KA, Nighot PK, Bliklager AT. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(2):G413-G421. doi:10.1152/ajpgi.00304.2006
6. Smith F, Clark JE, Overman BL, et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(3):G352-G363. doi:10.1152/ajpgi.00081.2009
7. Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: Animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;309(12):G927-G941. doi:10.1152/ajpgi.00206.2015
8. Porcher C, Juhem A, Peinnequin A, Sinniger V, Bonaz B. Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(5):G1091-G1103. doi:10.1152/ajpgi.00302.2004
9. Taché Y, Kiank C, Stengel A. A role for corticotropin-releasing factor in functional gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep.* 2009;11(4):270-

277. doi:10.1007/s11894-009-0040-4
10. Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:525-557. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410
 11. Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α . *PLoS One.* 2012;7(6):e39935. doi:10.1371/journal.pone.0039935
 12. Zhang L, Song J, Hou X. Mast cells and irritable bowel syndrome: From the bench to the bedside. *J Neurogastroenterol Motil.* 2016;22(2):181-192. doi:10.5056/jnm15137
 13. Ko HL, Chong Q, Escribano D, Camerlink I, Manteca X, Llonch P. Pre-weaning socialization and environmental enrichment affect life-long response to regrouping in commercially-reared pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 2020;229. doi:10.1016/j.applanim.2020.105044
 14. Saladrigas-García M, D'Angelo M, Ko HL, et al. Early socialization and environmental enrichment of lactating piglets affects the caecal microbiota and metabolomic response after weaning. *Sci Rep.* 2021;11(1):6113. doi:10.1038/s41598-021-85460-7
 15. Moeser AJ, Ryan KA, Nighot PK, Blikslager AT. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(2):G413-G421. doi:10.1152/ajpgi.00304.2006
 16. Moeser AJ, Klok C V, Ryan KA, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;292(1):G173–G181. doi:10.1152/ajpgi.00197.2006
 17. Liu Y, Song M, Che TM, et al. Dietary plant extracts modulate gene expression profiles in ileal mucosa of weaned pigs after an *Escherichia coli* infection. *J Anim Sci.* 2014;92(5):2050-2062. doi:10.2527/jas.2013-6422
 18. Tao X, Xu Z, Wan J. Intestinal microbiota diversity and expression of pattern

- recognition receptors in newly weaned piglets. *Anaerobe*. 2015;32:51-56. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.12.005
19. Boudry G, Péron V, Le Huërou-Luron I, Lallès JP, Sève B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J Nutr*. 2004;134(9):2256-2262. doi:10.1093/jn/134.9.2256
 20. Pohl C, Medland J, Mackey E, et al. Early Weaning Stress Induces Chronic Functional Diarrhea, Intestinal Barrier Defects, and Increased Mast Cell Activity in a Porcine Model of Early Life Adversity. *Neurogastroenterol Motil*. 2017;29(11). doi:10.1111/nmo.13118.Early
 21. Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, et al. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol*. 1999;277(2):G391-G399. doi:10.1152/ajpgi.1999.277.2.g391
 22. Saunders PR, Santos J, Hanssen NPM, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci*. 2002;47(1):208-215. doi:10.1023/A:1013204612762
 23. Porcher C, Juhem A, Peinnequin A, Sinniger V, Bonaz B. Expression and effects of metabotropic CRF1 and CRF2 receptors in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G1091-G1103. doi:10.1152/ajpgi.00302.2004
 24. Brierley SM, Nichols K, Grasby DJ, Waterman SA. Neural mechanisms underlying migrating motor complex formation in mouse isolated colon. *Br J Pharmacol*. 2001;132(2):507-517. doi:10.1038/sj.bjp.0703814
 25. Mañé N, Martínez-Cutillas M, Gallego D, Jimenez M. Enteric motor pattern generators involve both myogenic and neurogenic mechanisms in the human colon. *Front Physiol*. 2015;6:205. doi:10.3389/fphys.2015.00205

DISCUSSIÓ GENERAL

La discussió general d'aquest treball està organitzada per tal de donar una visió integradora dels diferents mecanismes caracteritzats i discutir els canvis observats en els dos models experimentals estudiats, un model d'infecció experimental per ETEC en el post-deslletament i un model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental durant l'etapa de lactació.

Estudi selectiu de la transmissió neuromuscular

La transmissió neuromuscular es pot avaluar mitjançant EFS o protocols farmacològics. Habitualment, l'EFS es fa servir per activar les motoneurons i obtenir respostes neuromusculars o neurosecretores. Aquest procediment permet caracteritzar els neurotransmissors i receptors que relacionen les motoneurons amb les cèl·lules efectores. El problema, des d'un punt de vista experimental, és que una estimulació que podríem anomenar "pan-neuronal" estimula alhora motoneurons excitatòries i inhibidores i, per tant, és important buscar maneres d'estimular, selectivament, un grup neuronal i no l'altre (Mañé et al., 2015). En el nostre estudi, la transmissió neuromuscular s'ha avaluat a partir de dos protocols específics (Taula 1). L'aplicació d'aquests protocols ens ha permès avaluar l'efecte d'agonistes/antagonistes involucrats en la resposta, així com determinar la possible alteració de la transmissió neuromuscular en els models experimentals estudiats. Altres estudis no fan servir aquestes condicions experimentals i aleshores les respostes són complexes, ja que consisteixen de relaxacions durant l'estímul (*on-relaxations*) seguides de contraccions durant o després de l'estímul (*off-contractions*) (Kannan et al., 1985; Gallego et al., 2010; Krueger et al., 2013), que sovint són difícils d'interpretar.

Taula 1. Protocols utilitzats per a l'estudi de la transmissió neuromuscular inhibidòria i excitatòria.

EFS	Farmacologia	Objectiu
30 V, 0.4 ms, 5 Hz i 2 minuts	NANC	Caracteritzar la transmissió neuromuscular inhibidòria
30V (tren 300 ms, duració pols 0.4 ms) i freqüències creixents, de 10 a 50Hz	NNNP	Caracteritzar la transmissió neuromuscular excitatòria

NANC= atropina 1 μ M, propranolol 1 μ M, fentolamina 1 μ M

NNNP= L-NNA 1mM, MRS2500 1 μ M

Una segona manera d'activar les neurones és mitjançant la incubació del teixit amb nicotina. La nicotina s'uneix a receptors nicotínics, que es troben en les neurones, i causa la seva despolarització. Aquesta despolarització provoca un potencial d'acció que allibera neurotransmissors al terminal que estimulen o inhibeixen els efectors. Estudis previs mostren que la nicotina indueix la relaxació del múscul circular en rosegadors (Mañé et al., 2016) i en el còlon humà (Aulí et al., 2008), suggerint la presència de receptors nicotínics principalment en neurones inhibidòries (Taula 2). En el nostre treball hem vist que l'aplicació de nicotina provoca un efecte inhibidor i contràctil sobre la musculatura circular degut a la presència de receptors nicotínics en motoneurones inhibidòries i excitatòries, respectivament. Així doncs, demostrem que en el còlon del porc, els receptors nicotínics no estan presents únicament en neurones inhibidòries, sinó que també en neurones excitatòries i que, per tant, la nicotina pot ser un protocol farmacològic útil per avaluar la relaxació i la contracció neuro-mediada en l'espècie porcina. Cal destacar que la nicotina també serveix per estimular motoneurones secretores, tal i com es comentarà més endavant (veure estudi del transport actiu electrogènic). Una limitació d'aquest protocol d'estimulació neuronal és la presència de receptors de nicotina en elements efectors. Així, per exemple, en algunes espècies s'ha postulat la

presència de receptors nicotínic a nivell epitelial i, en aquest cas, l'activació del receptor nicotínic seria directament sobre la cèl·lula efectora i no sobre la neurona (Lottig et al., 2019).

Estudi de la transmissió neuromuscular inhibidòria

Antagonista al·lostèric, BPTU, del receptor P2Y₁

La modulació al·lostèrica del receptor P2Y₁ té un potencial destacat pel disseny de fàrmacs P2Y₁ selectius. Per aquest motiu, en aquest treball hem avaluat, per primera vegada, l'efecte de l'antagonista al·lostèric, BPTU, en el tracte GI del porc i en el còlon humà.

Estudis previs en rosegadors han demostrat que el BPTU és capaç d'inhibir la transmissió neuromuscular inhibidòria (IJP i la relaxació) induïda per EFS (Taula 3), per nicotina (Taula 2) i per diversos agonistes del receptor P2Y₁ (MRS2365, ADPβS, α,β-meATP i A_{p4A}) (Taula 2) (Mañé et al., 2016; Paquola et al., 2019). Tot i així, la selectivitat o potència dels antagonistes pot variar entre espècies i, per aquest motiu, hem considerat important incloure en la nostra investigació estudis translacionals amb mostres humanes per poder validar els resultats obtinguts en models animals.

Taula 2. Potència expressada en μM de l'antagonista purinèrgic, BPTU, en la relaxació mecànica induïda per diferents agonistes P2Y i per nicotina.

Agonistes P2	Fàrmac	Espècie, segment intestinal	Reversió BPTU	
			μM	% reversió
P2Y ₁	A _{p4A} 100 μM	Ratolí, còlon	3	100 ¹
no selectiu	α,β-meATP 10 μM	Ratolí / Rata, còlon	3	100 ²
P2Y ₁ selectiu	MRS2365 5 μM	Ratolí, còlon	3	93 ²

Agonistes P2	Fàrmac	Espècie, segment intestinal	Reversió BPTU	
			µM	% reversió
P2Y preferencial	ADPβS 10 µM	Ratolí, còlon	3	83 ²
	ADPβS 10 µM	Rata, còlon	3	93 ²
	ADPβS 10 µM	Porc, ili	30	68³
	ADPβS 10 µM	Porc, còlon	30	70³
	ADPβS 10 µM	Humà, còlon	100	no reversió³
Resposta neuro- mediada	Fàrmac	Espècie, segment intestinal	Reversió BPTU	
			µM	% reversió
	Nicotina 100 µM	Ratolí, còlon	3	73% ²
	Nicotina 100 µM	Rata, còlon	3	104% ²

¹ (Paquola et al., 2019), ² (Mañé et al., 2016), ³ **Les dades obtingudes en aquest treball estan en negreta.**

Taula 3. Potència (EC₅₀) expressada en µM dels antagonistes purinèrgics, BPTU, MRS2500 i MRS2179, en l'IJP i en la relaxació mecànica induïda per EFS en el tracte GI de diferents espècies.

Espècie, segment intestinal	IJPf, EC ₅₀		
	BPTU	MRS2500	MRS2179
Ratolí, còlon	0.06 ¹	0.03 ¹	10 µM: ~80% ^{2 *}
Rata, còlon	0.3 ¹	0.016 ¹	13.1 ³
Porc, intestí prim	30 µM:90%^{4*}	1 µM:100%^{4*}	0.7 ⁵
Humà, còlon	ND	0.07 ⁶	1.23 ⁷

Espècie, segment intestinal	Relaxació, EC ₅₀		
	BPTU	MRS2500	MRS2179
Ratolí, còlon	0.3 ⁴	0.025 ¹	ND
Rata, còlon	0.5 ¹	0.16 ³	3.5 ³
Porc, intestí prim	6 ⁴	0.06 ⁴	0.80 ⁴
Porc, còlon	35 ⁴	0.05 ⁴	0.15 ⁴
Humà, còlon	No efecte ⁴	0.09 ⁶	0.87 ⁷

¹ (Mañé et al., 2016), ² (Y. Zhang et al., 2010), ³ (Grasa et al., 2009), ⁴ **Les dades obtingudes en aquest treball estan en negreta**, ⁵ (Gallego et al., 2008), ⁶ (Gallego et al., 2011), ⁷ (Gallego et al., 2006). * % inhibició a una concentració única. ND: no dades.

De manera general, en el cas dels rosegadors, el BPTU actua sobre l'estimulació elèctrica en concentracions sub- μM . En canvi, en el porc les concentracions necessàries per inhibir la resposta són més grans i en el còlon humà no vàrem aconseguir inhibir de manera eficaç la resposta inhib tòria (Taula 3). El mateix s'observa quan fem servir agonistes de receptors de purines. Estudis previs demostren que el BPTU (3 μM) és capaç d'inhibir, de manera efectiva, la relaxació induïda per diversos agonistes com són l' $\text{A}_{\text{P}4\text{A}}$, α, β -meATP, ADP βS , o fins i tot, de l'agonista selectiu P2Y₁, MRS2365. En tots aquests casos, el BPTU 3 μM bloca entre un 80 i un 100% de la relaxació induïda pels agonistes. A més a més, el BPTU (3 μM) també és capaç de revertir la resposta inhib tòria de la nicotina que, tal i com s'ha comentat prèviament, és deguda a l'activació de neurones inhib tòries. En canvi, en els experiments realitzats en aquest treball hem hagut de fer servir concentracions 10 vegades més grans (30 μM) per obtenir una inhibició del 70% de la resposta induïda per l'agonista ADP βS en el porc (Taula 2).

En l'espècie humana, el BPTU no va ser efectiu ni amb EFS ni amb ADP βS . Per intentar validar l'antagonista BPTU en l'humà, vam col·laborar amb el Dr. Kennedy de la Universitat de Strathclyde. Arrel de la seva col·laboració, vam veure que en cultius cel·lulars de cèl·lules tSA201, que expressen el receptor P2Y₁ humà, el BPTU té la capacitat de bloquejar les respostes purinèrgiques induïdes per ADP.

Davant d'aquestes dades, podem concloure que la falta d'activitat del BPTU en el còlon humà no és deguda a una menor expressió del receptor P2Y₁, ja que l'agonista ADPβS i l'antagonista MRS2500 sí que són efectius. A més a més, altres estudis també han demostrat l'eficàcia dels antagonistes MRS2179 i MRS2279, així com de l'agonista selectiu P2Y₁, MRS2365, en el tracte GI humà (Gallego et al., 2011; Gallego et al., 2014). Una possible explicació de la falta d'activitat del BPTU que mostra aquest treball en el còlon humà es basa en la naturalesa del fàrmac. El lloc d'unió al·lostèric del BPTU es troba en una zona de la proteïna que està en contacte amb la bicapa lipídica. Per tant, el BPTU ha de ser extremadament hidròfob, el que probablement dificulta la seva unió al receptor quan les cèl·lules estan en el teixit però no quan es troben aïllades. Aquesta propietat explicaria també que en teixits el rang de potència del BPTU variï en funció del gruix de les preparacions. Per confirmar aquesta hipòtesi, una aproximació experimental interessant a utilitzar en un futur seria a partir de mostres de còlon humà de reseccions realitzades en cirurgies pediàtriques (teixits més prims) que permetrien comprovar els resultats obtinguts en el nostre treball.

Altres neurotransmissors inhibitoris NNNP

A nivell intestinal s'han descrit altres neurotransmissors inhibitoris NNNP. Un d'ells és el VIP (Keef et al., 1994) que senyalitza per la via del cAMP, de la mateixa manera que altres mediadors no neurals que es comentaran més endavant (veure mecanismes no neurals d'inhibició). Els resultats del nostre treball demostren que el VIP produeix la relaxació de la motilitat intestinal en el còlon del porc. Tot i així, no hem pogut demostrar el seu paper funcional com a neurotransmissor inhibitori, ja que els IJP i les corresponents relaxacions es bloquegen amb la combinació d'un inhibidor de la nNOS i d'un antagonista del receptor P2Y₁. En el còlon humà, s'han descrit resultats similars (Gallego et al., 2006). En canvi, en altres teixits, com és l'esfínter anal intern, sí que s'ha demostrat l'alliberació de VIP a altes freqüències d'estimulació (Keef et al., 2013). Caldria veure si el que s'ha demostrat a nivell de l'esfínter anal intern del ratolí també passa en altres espècies com el porc, o fins i tot, en la espècie humana. De fet, en l'espècie porcina, s'ha demostrat que el

mecanisme de relaxació es degut a NO i purines a través de receptors P2Y₁ (Opazo et al., 2009).

To neural inhibitori

El to neural inhibitori redueix l'activitat contràctil del còlon degut a l'alliberació "espontània" de neurotransmissors inhibitoris. De fet, el que probablement passa és que les neurones inhibitoris s'activen de manera independent a qualsevol estímul. És per això que, quan el teixit s'incuba amb un blocador de canals de sodi, com per exemple la TTX, s'observa un increment de l'activitat contràctil (Gil et al., 2010). Tal i com es mostra en la Taula 4, el mecanisme s'ha descrit en el còlon de diferents espècies: ratolí (Spencer et al., 1998; Traserra et al., 2020), rata (Middleton et al., 1993; Mulè et al., 1999; Gil et al., 2010) i l'humà (Dinning et al., 2006; Aulí et al., 2008), entre altres. En el nostre estudi, hem reportat la presència d'un to inhibitori basal en el còlon distal porcí. A més a més, els resultats de la Taula 4 mostren que aquest mecanisme es duu a terme d'una manera més prominent en la capa circular, comparat amb la longitudinal.

En el nostre treball, el to neural inhibitori l'hem valorat després d'incubar, de manera conjunta, un antagonista de la nNOS i un antagonista del receptor P2Y₁ per tal de proporcionar una condició farmacològica NNNP. Tot i així, l'augment de la freqüència i de l'amplitud de les contraccions observat creiem que és degut únicament al bloqueig del NO perquè probablement, tal i com s'ha descrit prèviament en rosegadors, el MRS2500 no incrementa la motilitat espontània i, per tant, els receptors P2Y₁ no participen en el to inhibitori (Gil et al., 2010; Drumm et al., 2019).

Taula 4. Presència de to basal inhibitori en el còlon de diferents espècies.

Espècie	Còlon circular		Còlon longitudinal	
Ratolí ¹	Proximal:	+++, 201%	Proximal:	-, 96%
	Mig:	+++, 227%	Mig:	-, 118%
	Distal:	-, 98%	Distal:	-, 59%
Rata ²	Mig:	+++, 199%	ND	
Porc ³	Distal:	++ , 178%	Distal:	+ , 122%
Humà ⁴	Sigmoide:	+, ~125%	ND	

¹ (Traserra et al., 2020), ² (Gil et al., 2010), ³ **Les dades obtingudes en aquest treball estan en negreta**, ⁴ (Aulí et al., 2008). To inhibitori de menys a més marcat: + < ++ < +++, absència de to inhibitori: – i no dades: ND. % canvi AUC després de l'addició de L-NNA respecte AUC basal (100%). En el ratolí, en la rata i en l'humà el to basal inhibitori es valora després de l'addició de L-NNA 1 mM. En el porc, el protocol utilitzat inclou l'addició conjunta de L-NNA 1 mM i MRS2500 1 µM.

En els dos models experimentals estudiats, l'AUC de la motilitat basal va ser similar a la observada en el grup control corresponent. A més a més, la incubació del teixit amb L-NNA, que inhibeix tant l'enzim de la nNOS constitutiva com de la iNOS induïble, va produir un augment de la motilitat colònica per igual en els dos grups experimentals. A partir dels resultats d'aquest treball podem concloure que els dos models estudiats no presenten alteracions en el to inhibitori basal atribuïbles a la producció de NO per part de la nNOS ni de la iNOS. Aquest fet té correlació amb els resultats histològics obtinguts, ja que en cap dels dos models estudiats s'ha observat la infiltració de cèl·lules inflamatòries a les capes musculars (Taula 7). En canvi, en models de colitis i en pacients amb UC, sí que s'ha reportat un estat d'hipomotilitat induït per la iNOS, que s'expressa per la inducció de certes citocines, bacteries i productes bacterians (Porrás et al., 2006; Porrás et al., 2008).

Altres mecanismes no neurals d'inhibició

A més a més dels mecanismes neurals mencionats anteriorment, els nostres resultats confirmen l'existència d'altres mecanismes no neurals que incrementen els nivells intracel·lulars de cAMP. En el nostre estudi, demostrem que el forskolin és un protocol farmacològic útil per estudiar l'efecte del cAMP en la motilitat intestinal del porc, ja que produeix la relaxació del còlon amb una concentració menor que la prèviament descrita en l'intestí prim del conill i en el còlon del cobai (Muller & Baer, 1983). A més a més, l'efecte del forskolin es continua observant si incubem el teixit amb TTX i, per tant, es pot deduir que el seu efecte és sobre la cèl·lula muscular o bé sobre la cèl·lula epitelial, tal i com veurem més endavant.

Per altra banda, les prostaglandines també indueixen la relaxació del còlon. En el nostre estudi, hem observat que la PGE₂ produeix la relaxació del còlon porcí de manera concentració dependent (EC₅₀ de 0.026 µM) i que la combinació d'un antagonista del receptor EP₂ (PF-04418948 0.1 µM) i d'un antagonista del receptor EP₄ (L-161,982 10 µM) disminueix el seu efecte (EC₅₀ de 4.7 µM) (dades no mostrades), obtenint resultats similars als prèviament reportats en rosegadors (Martinez-Cutillas et al., 2014). En aquest context, els resultats obtinguts permeten hipotetitzar que els moduladors dels receptors de la PGE₂ podrien ser una eina terapèutica d'interès per tractar alteracions de la motilitat intestinal, especialment si cursen amb processos inflamatoris intestinals.

Estudi de la transmissió neuromuscular excitatòria

L'estudi selectiu de la transmissió neuromuscular excitatòria ens ha permès caracteritzar la resposta i, posteriorment, avaluar l'estat d'aquest mecanisme en els dos models experimentals estudiats (Taula 1). En aquest estudi hem descrit, per primera vegada, que la resposta neuromuscular excitatòria en el còlon distal del porc s'inhibeix totalment per l'atropina (antagonista muscarínic) i que, per tant, és majoritàriament colinèrgica (Figura 1). L'atropina és un antagonista muscarínic no selectiu i, per tant, no sabem el subtipus de receptor muscarínic implicat en la

resposta. De totes maneres, almenys en la espècie humana, els receptors M_2 i M_3 són els candidats ha participar en el fenomen contràctil (L. Zhang et al., 2016). En altres espècies, s'ha reportat la participació de les taquinines en la resposta excitatòria a EFS (Onori et al., 2005). Concretament, en el còlon longitudinal del ratolí, s'ha descrit que la resposta excitatòria està formada per dues fases, una primera fase majoritària que és colinèrgica, i una segona fase residual possiblement relacionada amb l'activació de receptors NK2 (Traserra et al., 2020) (Figura 1).

Per altra banda, les dades obtingudes en el nostre treball confirmen que els dos models estudiats no indueixen canvis en la transmissió neuromuscular excitatòria del còlon. Aquests resultats, juntament amb els observats en referència amb la transmissió neuromuscular inhibitòria (veure apartat to neural inhibitori), ens permeten concloure que la infecció experimental per ETEC i el model etològic estudiat modulen, com veurem més endavant, el transport actiu electrogènic i / o la permeabilitat paracel·lular, però no modifiquen els mecanismes neuromusculars del còlon (Taula 7).

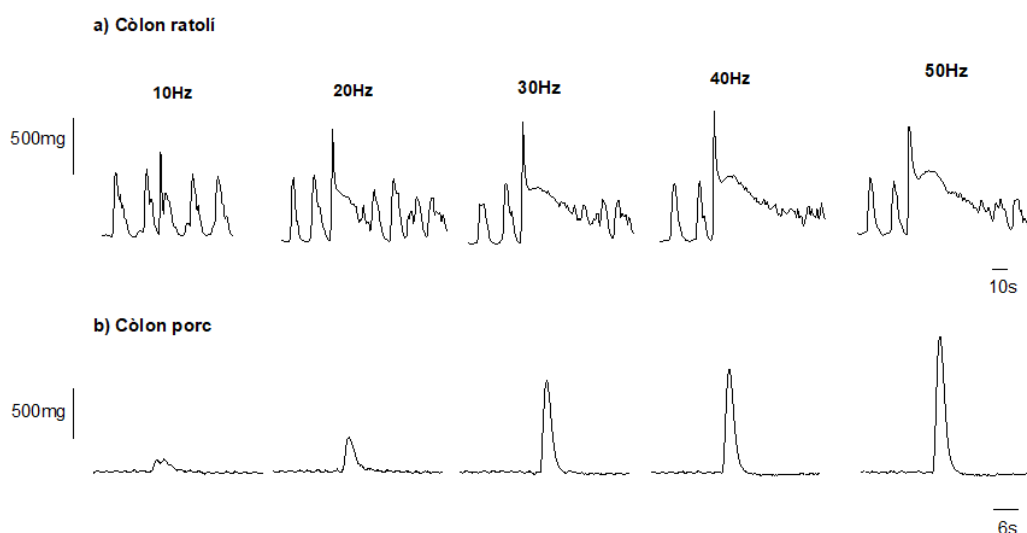


Figura 1. Estimulació de les neurones excitatòries del còlon de ratolí i del porc. a) Registre del còlon longitudinal de ratolí. La resposta excitatòria en el còlon de ratolí consta de dues fases, una primera fase que és sensible a un antagonista muscarínic (atropina) i una segona fase sensible a un antagonista del receptor NK2 (GR159897). b) Registre del còlon circular de porc. La resposta excitatòria en el còlon del porc consta d'una fase sensible a atropina.

Altres mecanismes contràctils

En aquest treball hem valorat l'efecte de la histamina i del 5-HT que són mediadors, en principi, no neurals que modulen l'activitat motora. Hem pogut observar que la histamina produeix una resposta contràctil que es veu reduïda per TTX i per l'antagonista H₂, ranitidina. Aquests resultats demostren que part de l'acció de la histamina pot ser directa sobre el múscul i part pot ser deguda a l'activació de motoneurons excitatòries. La histamina s'ha descrit que és un mediador mastocitari rellevant en els processos post-infecció (Scheffer et al., 1985; Aschenbach et al., 2003; Krämer et al., 2008). En aquest context, s'ha hipotetitzat que una hipermastocitosi post-infecció podria modular la resposta motora que, segons les nostres dades experimentals, seria d'acció directa sobre el múscul i a través de l'activació de motoneurons excitatòries. De totes maneres, cal esmentar que la desgranulació mastocitària provoca possiblement l'alliberació d'altres mediadors, com són les proteases i, per tant, la seva desgranulació també s'ha associat a fenòmens inhibitoris com els que s'observen en l'ili paralític (Rychter et al., 2015). Tot i així, en cap dels nostres models s'ha observat un increment de MCs a nivell de les capes musculars.

El 5-HT és una molècula de senyalització molt important a nivell del tracte GI. Una de les possibles fonts de 5-HT són les ECL que, quan alliberen 5-HT, desencadenen una sèrie de mecanismes reflex a nivell intestinal (Osaka et al., 1975; Nilsson et al., 1983; Bearcroft et al., 1996). El mecanisme reflex pot ser motor o secretor (veure estudi del transport actiu electrogènic). En el nostre treball hem observat que el 5-HT, a nivell motor, provoca un efecte bifàsic. Primer s'observa una inhibició que es redueix per L-NNA i després un efecte contràctil. Cal esmentar que la primera resposta inhibidora també es redueix per l'antagonista 5-HT₃, ondansetron. Per tant, la nostra hipòtesi és que el 5-HT activaria receptors 5-HT₃ localitzats en neurones inhibidores provocant relaxació i, alhora, activaria també neurones excitatòries produint una resposta contràctil. Tot i així, no podem descartar també un efecte directe sobre el múscul (Bennett & Whitney, 1966; Ng et al., 1991). Una altra possibilitat seria que els receptors 5-HT₃ localitzats en IPANs contactessin amb interneurons i motoneurons, inhibidores i excitatòries, i que

conseqüentment aquestes alliberessin neurotransmissors inhibitoris i excitatoris en el terminal. Tot i així, en el nostre treball no hem pogut valorar aquest reflex motor ja que les preparacions utilitzades no contenen l'epiteli i, per tant, la integritat entre l'epiteli i les IPANs podria estar malmesa.

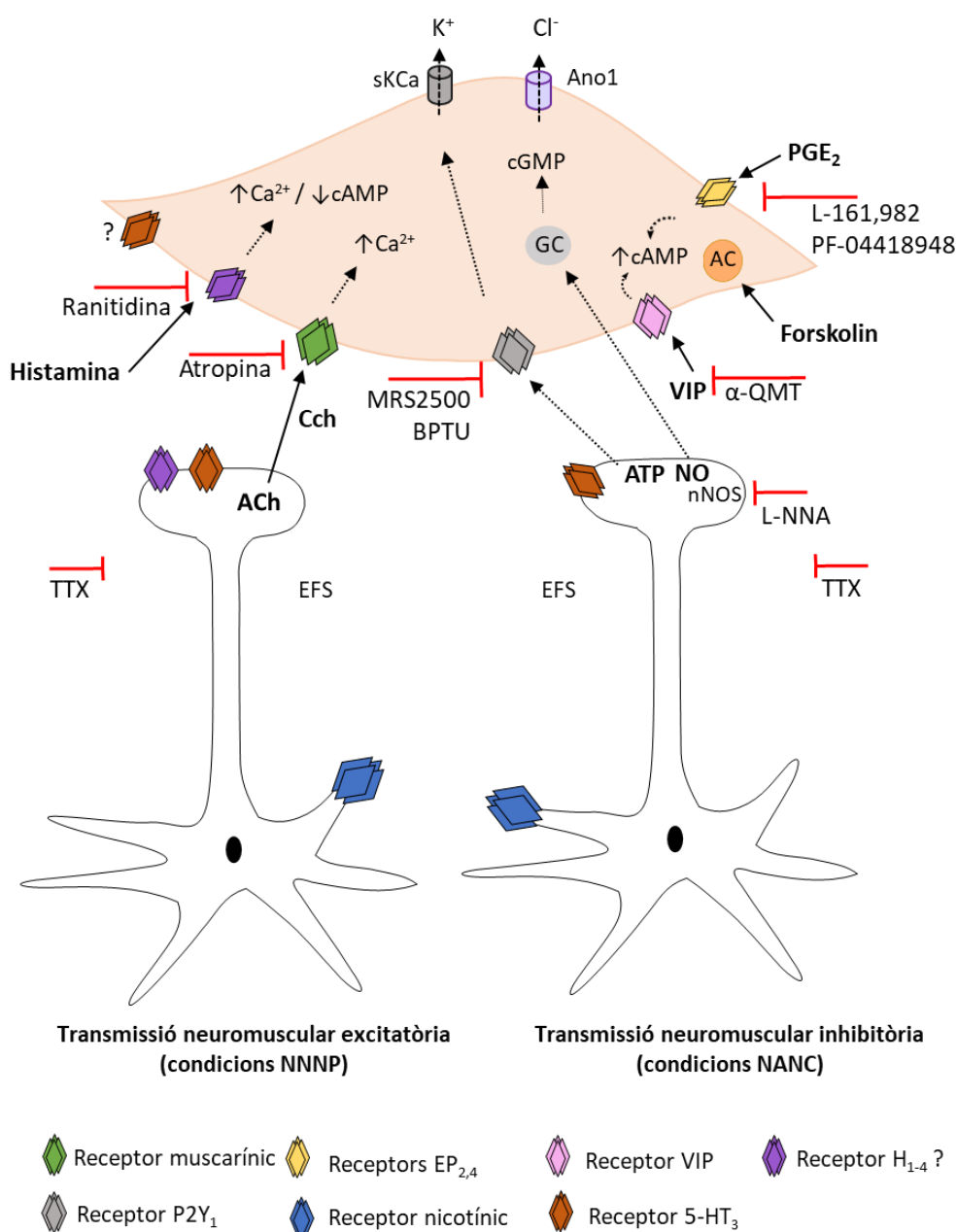


Figura 2. Mecanismes neurals i no neurals involucrats en el resposta motora del còlon distal del porc. La nostra hipòtesi és que utilitzant protocols d'EFS específics es poden estimular les neurones inhibitoris o excitatòries, selectivament. Segons les dades que hem obtingut amb EFS, les neurones inhibitoris alliberarien NO, que actuaria sobre el GC, i ATP, o una purina relacionada, que actuaria en el receptor P2Y₁ produint la relaxació neuro-mediada del còlon. A més a més, les neurones inhibitoris es podrien activar de manera

independent a qualsevol estímul produint l'alliberació de NO i generant un estat inhibitori basal. En canvi, l'estimulació de les neurones excitatòries produiria l'alliberació d'ACh, principalment, que actuaria en els receptors muscarínics, produint una resposta contràctil neuro-mediada, sensible a atropina. La transmissió neuromuscular es pot estudiar també amb l'addició de nicotina, que actuaria sobre receptors nicotínics presents en les neurones inhibitories i excitatòries. Per últim, l'addició exògena de Cch, VIP i forskolin modificarien la motilitat espontània actuant directament sobre el múscul, en canvi, el 5-HT i la histamina actuarien sobre les motoneurones i sobre el múscul.

Caracterització de la resposta neurosecretora

La resposta neurosecretora es pot avaluar mitjançant EFS, que permet activar les motoneurones, aquestes alliberen neurotransmissors en el terminal i estimulen la cèl·lula epitelial per generar una resposta secretora. Els resultats de la Taula 5 mostren que, en animals de laboratori (cobai, ratolí i rata), l'EFS indueix l'alliberació d'ACh, principalment, tot i que altres neurotransmissors, com el VIP, podrien participar en la resposta (McCulloch et al., 1987; Kuwahara & Radowicz-cooke, 1988; Buresi et al., 2005). En el nostre estudi, hem pogut observar que en el porc, l'EFS indueix una resposta neurosecretora similar a la descrita en animals de laboratori, ja que els principals neurotransmissors involucrats en l'alliberació luminal de Cl⁻ són l'ACh i el VIP. En canvi, en l'espècie humana, s'han reportat diferències regionals pel que fa als neurotransmissors involucrats en la resposta. Mentre que a nivell de l'intestí prim s'ha descrit que l'ACh és el principal neurotransmissor implicat en la resposta secretora, a nivell de l'intestí gruixut es creu que la resposta està mediada per NO i VIP (Krueger et al., 2016). De totes maneres, cal tenir en consideració que en aquest treball s'ha utilitzat el L-NAME com a blocador de la síntesi de la nNOS, que també podria tenir propietats anti-muscaríniques (Kuwahara et al., 1998). Per tant, en un futur seria interessant confirmar aquests resultats utilitzant un altre blocador del NO, com el L-NNA, per comprovar si l'efecte és degut al NO o a un efecte colinèrgic indirecte. Aquesta aproximació ens permetria corroborar si els neurotransmissors implicats en la resposta neurosecretora del còlon del porc i de l'humà són els mateixos, VIP i ACh, o si pel contrari, en la resposta neurosecretora del còlon humà hi participa el NO.

Pel que fa al perfil de la resposta neurosecretora, hem observat que la durada de la resposta varia en funció de l'espècie, sent menor en animals de laboratori (cobai, ratolí i rata), comparat amb el porc i l'humà, que és el que presenta la resposta secretora més duradora (Taula 5). A més a més, la secreció luminal en l'espècie humana s'ha descrit que es deu a l'alliberació luminal de HCO_3^- i Cl^- , en canvi, en animals de laboratori i en el porc el principal ió alliberat és el Cl^- .

Per altra banda, l'humà presenta un to neural secretor que podria ser degut a una activació basal de les neurones secretores, ja que l'adició de TTX redueix la I_{sc} basal (Krueger et al., 2016). En canvi, en el nostre treball no hem pogut demostrar la presència d'aquest to basal neurosecretor en el còlon del porc. Tot i així, com veurem més endavant (veure estudi del transport actiu electrogènic), aquest mecanisme sí que l'hem observat en la infecció experimental per ETEC, ja que l'addició de TTX i atropina disminueix el transport actiu electrogènic dels animals infectats.

La nicotina, a més a més d'activar motoneurones inhibidores i excitatòries i generar una resposta inhibitoria o contràctil en el múscul, respectivament, també s'uneix als receptors nicotínics presents a les motoneurones secretores i les estimula per generar una resposta secretora a nivell epitelial. En el nostre estudi, hem observat que la incubació amb nicotina indueix una resposta secretora sensible a TTX i atropina. En aquest sentit, la nostra hipòtesi és que la nicotina estimula l'alliberació d'ACh al terminal i inicia una resposta neurosecretora a nivell epitelial.

Taula 5. Característiques de la resposta neurosecretora en diverses espècies.

Espècie	Protocol EFS	NT	Perfil resposta	Ions secretats
Cobai	5 mA, 2 i 10 Hz, 0.5 ms pols, 60 s estímul ⁷	ACh ⁷	4.1 min ¹	Cl ⁻ ⁷
Ratolí	50 V, 10 Hz, 500 µs pols, 5 s estímul ²	ACh ²³	2.5 min ¹	Cl ⁻ ²³
Rata	5 mA, 10 Hz, 0.5 ms pols, 30 s estímul ⁴	ACh, VIP ⁴	5.8 min ⁴	Cl ⁻ ⁴
Humà	20 V, 10 Hz, 1 ms pols, 10 s estímul ⁶	i.p.: ACh i.g.: VIP, NO ¹	9.1 min ¹	Cl ⁻ HCO ₃ ⁻ ¹
Porc	5 mA, 10 Hz, 0.5 ms pols, 30 s estímul ⁵	ACh, VIP ⁵	7.5 min ⁵	Cl⁻ ⁵

¹ (Krueger et al., 2016), ² (Buresi et al., 2005), ³ (Kawahara & Radowicz-cooke, 1988), ⁴ Dades del nostre laboratori no publicades, ⁵ **Les dades obtingudes en aquest treball estan en negreta**, ⁶ (Krueger et al., 2013) ⁷ (McCulloch et al., 1987). NT: neurotransmissors, i.p.: intestí prim, i.g.: intestí gruixut.

Estudi del transport actiu electrògenic

El deslletament i l'edat dels animals són factors que influeixen en el transport actiu electrògenic (Boudry et al., 2004). Si comparem les dades dels animals controls dels dos models experimentals, hem pogut comprovar que el transport actiu electrogènic és més elevat els primers dies posteriors al deslletament i com més joves són els animals (Taula 6). En canvi, la TEER colònica és manté estable amb l'edat (Taula 6). Aquests resultats demostren que, a nivell del còlon, la integritat de la barrera és independent de l'edat però que existeix un increment del transport actiu electrogènic en animals post-deslletats. Encara que no sabem la causa d'aquests canvis, una possible hipòtesi és que el moment del deslletament és un

moment crític, degut al canvi d'alimentació i a l'anorèxia post-deslletament. En aquest sentit, encara que la barrera es manté intacte, podria existir un cert grau subclínic d'insult que faria que els animals acabats de deslletar desencadenessin mecanismes defensius i, en aquesta situació, l'epiteli incrementaria l'activitat secretora amb l'objectiu de diluir l'insult fins adaptar-se a la nova dieta. Per comprovar aquesta hipòtesi, caldria dissenyar experiments apropiats que valoressin els canvis en la resposta secretora abans i després dels deslletament a diferents edats.

Taula 6. Comparació de valors elèctrics basals (I_{sc} , PD, TEER) dels animals control del model d'infecció experimental per ETEC i dels animals control del model de socialització primerenca d'enriquiment ambiental.

		Animals control model d'infecció experimental per ETEC		Animals control model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental	
		dies edat	dies p.d.	dies edat	dies p.d.
		32 / 37	11 / 16	28	3
I_{sc}	($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	56.6 \pm 9.03 / 37.5 \pm 4.63		137.4 \pm 7.65	
PD	(mV)	3.2 \pm 0.39 / 2.4 \pm 0.28		8.8 \pm 0.82	
TEER	($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	45.7 \pm 3.52 / 52.2 \pm 1.29		47.42 \pm 3.02	

En el model d'infecció experimental per ETEC, hem utilitzat una soca positiva pels factors de virulència ST_b i LT. La resposta secretora induïda per les enterotoxines ST_b i LT s'ha relacionat amb un efecte directe sobre l'epiteli, així com per un efecte indirecte sobre la síntesi de la PGE_2 i l'alliberació de 5-HT (Dreyfus et al., 1993; Peterson & Whipp, 1995; Fujii et al., 1995; Fujii et al., 1997). En relació amb els resultats obtinguts en el nostre treball, la nostra hipòtesi és que les enterotoxines de l'ETEC podrien induir l'alliberació de 5-HT per part de les cèl·lules ECL, que a la vegada estimularien a les IPANs i iniciarien un reflex secretor (Figura 3). D'acord amb aquesta hipòtesis, els nostres resultats mostren que l' I_{sc} basal es redueix amb

TTX i amb atropina en els animals infectats, demostrant l'activació del fenomen neurosecretor després de la infecció experimental però no en condicions control. Tot i així, no podem descartar també un efecte epitelial directe de les enterotoxines. Per altra banda, el model estudiat també va cursar amb un augment el nombre de MCs a nivell de la mucosa i de la submucosa dels animals infectats, que podria haver contribuït en la resposta secretora mitjançant l'alliberació de mediadors mastocitaris, com és la histamina. D'acord amb aquest hipòtesi, hem observat que la histamina activa el mecanisme secretor (Figura 3).

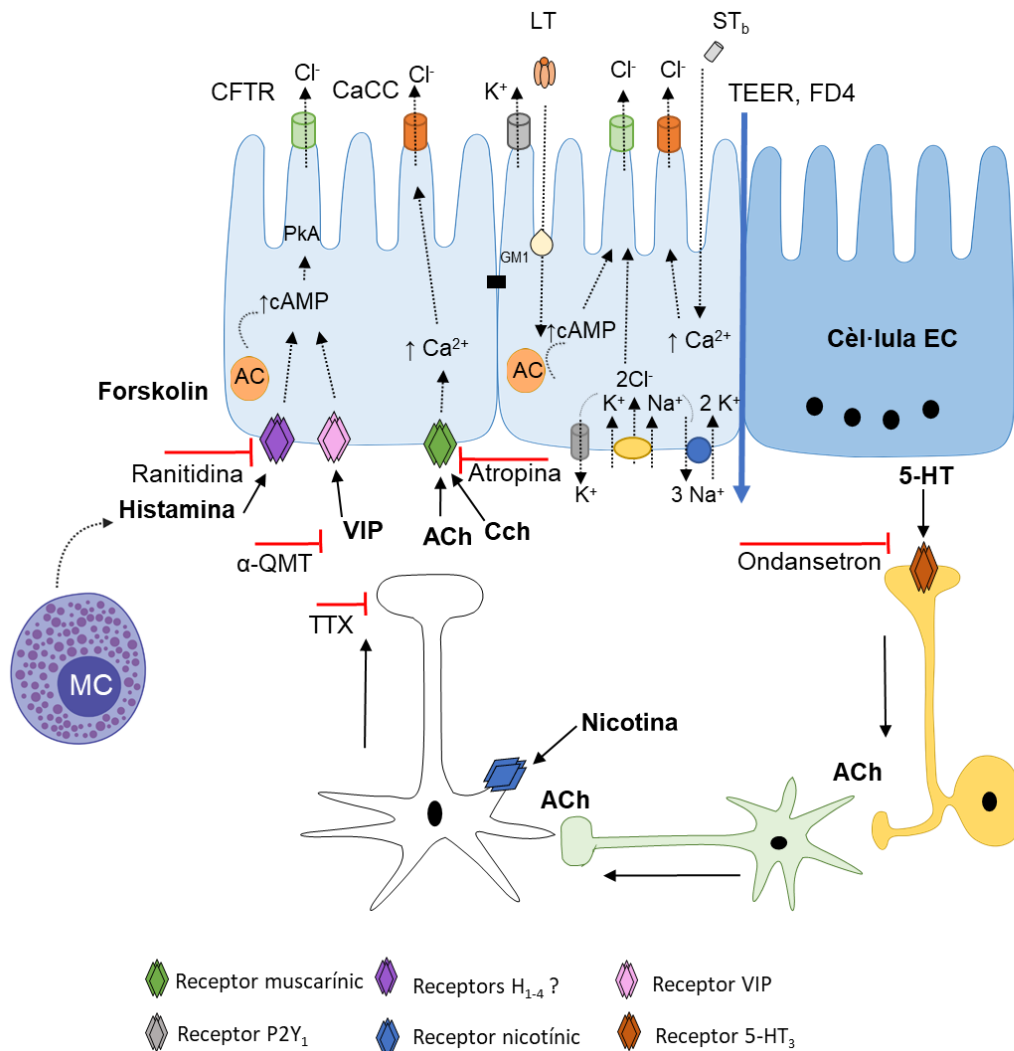


Figura 3. Reflex secretor en el còlon distal del porc. La nostra hipòtesi és que la cèl·lula ECL allibera 5-HT que actua en receptors 5-HT₃ localitzats en IPANs (neurona groga). Aquestes IPANs contactarien amb interneurons (neurona verda) i motoneurons (neurona blanca) que segons les dades obtingudes amb l'EFS

alliberarien ACh i VIP, produint la secreció epitelial de Cl⁻. A més a més, l'aplicació exògena de Cch, VIP, nicotina, 5-HT, forskolin i histamina produeix un augment de la secreció de Cl⁻ mesurat a partir de l'increment de la I_{sc} (ΔI_{sc}). En la cèl·lula epitelial de la dreta es mostra l'efecte directe de les enterotoxines de l'ETEC, LT i ST_b, sobre l'epiteli.

A més a més de l'ETEC, hi ha altres patògens entèrics que indueixen una resposta neurosecretora com a part del seu mecanisme d'acció. Un exemple és la *Salmonella Typhimurium*, que a més a més de generar una resposta inflamatòria, activa un mecanisme neurosecretor sensible a l'alliberació de prostaglandines (Giannella, 1979; Brunsson, 1987). Per altra banda, el rotavirus es caracteritza per l'atrofia de les vellositat de l'intestí però també per l'activació d'un mecanisme neurosecretor (Lundgren et al., 2000) que depèn de 5-HT i VIP (Kordasti et al., 2004).

Diversos estudis han relacionat l'estrès del deslletament amb un augment de la susceptibilitat a patògens entèrics (Shimizu et al., 1978; Moon et al., 1979; Jones et al., 2001). A més a més, també s'ha observat que l'hormona adrenocorticotropa i la norepinefrina faciliten l'adhesió de patògens entèrics a l'epiteli (Schreiber & Brown, 2005; Chen et al., 2006). Aquesta observació és important ja que en el nostre estudi hem descrit que l'aplicació de mesures etològiques durant l'etapa de lactació modula el transport hidroelectrolític i els nivells de cortisol en saliva després del deslletament, comparat amb animals que seguien les condicions pròpies del cicle productiu porcí. La nostra hipòtesi és que les mesures etològiques i d'enriquiment permeten modular la resposta d'estrès induïda pel deslletament i que, a nivell intestinal, aquesta modulació de la resposta d'estrès podria disminuir la susceptibilitat dels animals a infeccions entèriques en el post-deslletament.

Estudi de la funció barrera

La translocació de l'ETEC i l'alliberació luminal d'enterotoxines, com la ST_b i la LT, a més a més de modular el transport actiu electrogènic, també pot alterar l'estructura i la integritat de la barrera epitelial (Kreisberg et al., 2011; Ngendahayo

Mukiza & Dubreuil, 2013; Yang et al., 2014). Concretament, l'ETEC K88 s'ha descrit que disminueix l'expressió de les proteïnes CLDN-1, OCLN i ZO-1 en cèl·lules IPEC-J2 i que activa els MCs intestinal que també contribueixen en el defecte de barrera (Xu et al., 2020). Els resultats obtinguts en el nostre treball ens permeten hipotetitzar que la colonització epitelial del patogen i la producció d'enterotoxines podrien haver generat el defecte de barrera, tot i així, al ser un defecte transitori no s'haurien produït conseqüències més greus com serien l'atrofia de l'epiteli intestinal i la proliferació extraintestinal de l'ETEC.

En el model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental, en canvi, no hem observat canvis en la funció barrera ni un augment significatiu dels MCs intestinals 3 dies posteriors al deslletament, obtenint resultats similars als reportats per Boudry et al., 2004. Cal tenir en consideració, que en el nostre estudi el deslletament s'ha realitzat als 25 dies d'edat. En canvi, altres estudis en els que el deslletament es duu a terme de manera més primerenca (15-21 dies d'edat), sí que s'han descrit alteracions a nivell de la funció barrera (Pohl et al., 2017), així com l'activació dels MCs intestinals 24 hores després del deslletament (Moeser et al., 2007), i una hiperplàsia dels MCs que es manté fins a dos mesos posteriors al deslletament (Smith et al., 2010). En rosegadors, també s'ha demostrat que les experiències adverses en neonats, com per exemple la separació materna, poden induir alteracions en la mucosa intestinal quan els animals arriben a l'edat adulta, podent desenvolupar trastorns similars a l'IBS humà (Söderholm et al., 2002; Barreau et al., 2004; Barreau et al., 2008). Aquest model, s'ha associat amb la translocació de bacteries en els limfonodes mesentèrics, el fetge i la melsa que, a la vegada, desencadena una resposta immunitària exacerbada (Barreau et al., 2004), així com amb canvis neuroendocrins que alteren la permeabilitat paracel·lular, a través del CRFR₁ i dels MCs (Barreau et al., 2007). Tan mateix, també s'ha observat que aquests animals, en l'edat adulta, presenten una major vulnerabilitat a processos d'estrès aguts (Söderholm et al., 2002) i a la colitis experimental induïda per TNBS (Barreau et al., 2004).

Si comparem els dos models experimentals estudiats en aquest treball (Taula7) podem concloure que no hem observat canvis motors (excitatoris o inhibitoris) aparents en cap dels dos models experimentals. Cal esmentar que tampoc s'observen canvis en la població de MCs a nivell de les capes musculars. A nivell epitelial, en canvi, en el model d'infecció experimental per ETEC hem observat un increment de la permeabilitat paracel·lular mesurat a partir de la TEER i de la permeabilitat a FD4 que no l'hem observat en el model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental. Pel que fa al transport hidroelectrolític, s'ha vist incrementat en el model d'infecció experimental per ETEC, probablement per un efecte directe sobre l'epiteli i per un efecte neurosecretor. En aquest model també existeix un increment de MCs a nivell epitelial, de manera que els mediadors mastocitaris podrien participar també en el fenomen neurosecretor. No podem descartar, però, que en aquest model l'increment de l'activitat secretora hagi incrementat la distensió i hiperestimulat, de manera indirecta, la motilitat colònica. Pel que fa al model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental, no hem observat diferències significatives en la població de MCs intestinals però sí que hem pogut observar un increment del transport actiu electrogènic que en el nostre estudi no hem pogut discriminar si era degut a un efecte epitelial directe o a un efecte neurosecretor.

Taula 7. Resum dels resultats obtinguts en els dos models experimentals estudiats.

	Model d'infecció experimental per ETEC	Model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental
Transmissió neuromuscular inhibidora	No canvis	No canvis
Transmissió neuromuscular excitatòria	No canvis	No canvis
Transport paracel·lular (TEER i permeabilitat a FD4)	↑ dia 4 PI	No canvis
Transport hidroelectrolític	↑ dia 4 i 9 PI	↑ grup CTR
To basal neurosecretor	dia 9 PI	-
Número de MCs	↑ mucosa i submucosa a dia 4 PI	No canvis
Número GCs	-	No canvis

Referències

- Aschenbach, J. R., Seidler, T., Ahrens, F., Schrödl, W., Buchholz, I., Garz, B., Krüger, M., & Gäbel, G. (2003). Luminal salmonella endotoxin affects epithelial and mast cell function in the proximal colon of pigs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(7), 719–726. <https://doi.org/10.1080/00365520310003129>
- Aulí, M., Martínez, E., Gallego, D., Opazo, A., Espín, F., Martí-Gallostra, M., Jiménez, M., & Clavé, P. (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *British Journal of Pharmacology*, 155(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.332>
- Barreau, F., Cartier, C., Leveque, M., Ferrier, L., Moriez, R., Laroute, V., Rosztoczy, A., Fioramonti, J., & 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. *Journal of Physiology*, 580(Pt 1), 347–356. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.120907>
- Barreau, F., Ferrier, L., Fioramonti, J., & Bueno, L. (2004). Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats. *Gut*, 53(4), 501–506. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.024174>
- Barreau, F., Salvador-Cartier, C., Houdeau, E., Bueno, L., & Fioramonti, J. (2008). Long-term alterations of colonic nerve-mast cell interactions induced by neonatal maternal deprivation in rats. *Gut*, 57(5), 582–590. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.126680>
- Bearcroft, C. P., Perrett, D., & Farthing, M. J. (1996). 5-Hydroxytryptamine release into human jejunum by cholera toxin. *Gut*, 39(4), 528–531. <https://doi.org/10.1136/gut.39.4.528>
- Bennett, A., & Whitney, B. (1966). A pharmacological study of the motility of the human gastrointestinal tract. *Gut*, 7(4), 307–316. <https://doi.org/10.1136/gut.7.4.307>

- Boudry, G., Péron, V., Le Huërou-Luron, I., Lallès, J. P., & Sève, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, *134*(9), 2256–2262. <https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2256>
- Brunsson, I. (1987). Enteric nerves mediate the fluid secretory response due to *Salmonella typhimurium* R5 infection in the rat small intestine. *Acta Physiologica Scandinavica*, *131*(4), 609–617. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1987.tb08282.x>
- Buresi, M. C., Vergnolle, N., Sharkey, K. A., Keenan, C. M., Andrade-Gordon, P., Cirino, G., Cirillo, D., Hollenberg, M. D., & MacNaughton, W. K. (2005). Activation of proteinase-activated receptor-1 inhibits neurally evoked chloride secretion in the mouse colon in vitro. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *288*(2), G337–G345. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00112.2004>
- Chen, C., Lyte, M., Stevens, M. P., Vulchanova, L., & Brown, D. R. (2006). Mucosally-directed adrenergic nerves and sympathomimetic drugs enhance non-intimate adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to porcine cecum and colon. *European Journal of Pharmacology*, *539*(1–2), 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.03.081>. Mucosally-directed
- Dinning, P. G., Szczesniak, M., & Cook, I. J. (2006). Removal of tonic nitrergic inhibition is a potent stimulus for human proximal colonic propagating sequences. *Neurogastroenterology and Motility*, *18*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2005.00724.x>
- Dreyfus, L. A., Harville, B., Howard, D. E., Shaban, R., Beatty, D. M., & Morris, S. J. (1993). Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(8), 3202–3206. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3202>
- Drumm, B. T., Rembetski, B. E., Baker, S. A., & Sanders, K. M. (2019). Tonic inhibition of murine proximal colon is due to nitrergic suppression of Ca²⁺ signaling in interstitial cells of Cajal. *Scientific Reports*, *9*(1), 4402. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39729-7>

- Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H., & Okamoto, K. (1995). Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *FEMS Microbiology Letters*, *130*(2–3), 259–265. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01904.x>
- Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H., & Okamoto, K. (1997). Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiology and Immunology*, *41*(8), 633–636. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01904.x>
- Gallego, D., Aulí, M., Aleu, J., Martínez, E., Rofes, L., Martí-Ragué, J., Jiménez, M., & Clavé, P. (2010). Effect of otilonium bromide on contractile patterns in the human sigmoid colon. *Neurogastroenterology and Motility*, *22*(6), e180–e191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01495.x>
- Gallego, D., Gil, V., Aleu, J., Martínez-Cutillas, M., Clavé, P., & Jiménez, M. (2011). Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterology and Motility*, *23*(8), 792–e338. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01725.x>
- Gallego, D., Hernández, P., Clavé, P., & Jiménez, M. (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *291*(4), G584–G594. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00474.2005>
- Gallego, D., Malagelada, C., Accarino, A., De Giorgio, R., Malagelada, J. R., Azpiroz, F., & Jimenez, M. (2014). Nitrergic and purinergic mechanisms evoke inhibitory neuromuscular transmission in the human small intestine. *Neurogastroenterology and Motility*, *26*(3), 419–429. <https://doi.org/10.1111/nmo.12293>
- Gallego, D., Vanden Berghe, P., Farré, R., Tack, J., & Jiménez, M. (2008). P2Y1 receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission and enteric neuronal activation in small intestine. *Neurogastroenterology and Motility*, *20*(2), 159–168. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.01004.x>
- Giannella, R. A. (1979). Importance of the intestinal inflammatory reaction in

- salmonella-mediated intestinal secretion. *Infection and Immunity*, 23(1), 140–145. <https://doi.org/10.1128/iai.23.1.140-145.1979>
- Gil, V., Gallego, D., Grasa, L., Martín, M. T., & Jiménez, M. (2010). Purinergic and nitrergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(1), G158–G169. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00448.2009>
- Grasa, L., Gil, V., Gallego, D., Martín, M. T., & Jiménez, M. (2009). P2Y(1) receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *British Journal of Pharmacology*, 158(6), 1641–1652. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00454.x>
- Jones, P. H., Roe, J. M., & Miller, B. G. (2001). Effects of stressors on immune parameters and on the faecal shedding of enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets following experimental inoculation. *Research in Veterinary Science*, 70(1), 9–17. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2000.0436>
- Kannan, M. S., Jager, L. P., & Daniel, E. E. (1985). Electrical properties of smooth muscle cell membrane of opossum esophagus. *The American Journal of Physiology*, 248(3 Pt 1), G342–G346. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1985.248.3.g342>
- Keef, K. D., Saxton, S. N., Mcdowall, R. A., Kaminski, R. E., Duffy, A. M., & Cobine, C. A. (2013). Functional role of vasoactive intestinal polypeptide in inhibitory motor innervation in the mouse internal anal sphincter. *The Journal of Physiology*, 591(6), 1489–1506. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.247684>
- Keef, K. D., Shuttleworth, C. W., Xue, C., Bayguinov, O., Publicover, N. G., & Sanders, K. M. (1994). Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacology*, 33(11), 1303–1314. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0028-3908(94)90030-2)
- Kordasti, S., Sjövall, H., Lundgren, O., & Svensson, L. (2004). Serotonin and vasoactive intestinal peptide antagonists attenuate rotavirus diarrhoea. *Gut*, 53(7), 952–957. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.033563>

- Krämer, S., Sellge, G., Lorentz, A., Krueger, D., Schemann, M., Feilhauer, K., Gunzer, F., & Bischoff, S. C. (2008). Selective Activation of Human Intestinal Mast Cells by Escherichia coli Hemolysin. *Journal of Immunology*, *181*(2), 1438–1445. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.2.1438>
- Kreisberg, R. B., Harper, J., Strauman, M. C., Marohn, M., Clements, J. D., & Nataro, J. P. (2011). Induction of increased permeability of polarized enterocyte monolayers by enterotoxigenic Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(3), 451–455. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0445>
- Krueger, D., Michel, K., Allam, S., Weiser, T., Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Zeller, F., & Schemann, M. (2013). Effect of hyoscine butylbromide (Buscopan®) on cholinergic pathways in the human intestine. *Neurogastroenterology and Motility*, *25*(8), e530–e539. <https://doi.org/10.1111/nmo.12156>
- Krueger, D., Michel, K., Zeller, F., Demir, I. E., Ceyhan, G. O., Slotta-Huspenina, J., & Schemann, M. (2016). Neural influences on human intestinal epithelium in vitro. *The Journal of Physiology*, *594*(2), 357–372. <https://doi.org/10.1113/JP271493>
- Kuwahara, A., Kuramoto, H., & Kadowaki, M. (1998). 5-HT activates nitric oxide-generating neurons to stimulate chloride secretion in guinea pig distal colon. *The American Journal of Physiology*, *275*(4), G829–G834. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1998.275.4.g829>
- Kuwahara, A., & Radowicz-cooke, H. J. (1988). Epithelial transport in guinea-pig proximal colon: influence of enteric neurones. *The Journal of Physiology*, *395*, 271–284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1113/jphysiol.1988.sp016918>
- Lottig, L., Bader, S., Jimenez, M., & Diener, M. (2019). Evidence for metabotropic function of epithelial nicotinic cholinergic receptors in rat colon. *British Journal of Pharmacology*, *176*(9), 1328–1340. <https://doi.org/10.1111/bph.14638>
- Lundgren, O., Peregrin, A. T., Persson, K., Kordasti, S., Uhnö, I., & Svensson, L. (2000). Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5452), 491–495.

<https://doi.org/10.1126/science.287.5452.491>

Mañé, N., Jiménez-Sábado, V., & Jiménez, M. (2016). BPTU, an allosteric antagonist of P2Y1 receptor, blocks nerve mediated inhibitory neuromuscular responses in the gastrointestinal tract of rodents. *Neuropharmacology*, *110*(Pt A), 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.033>

Mañé, N., Martínez-Cutillas, M., Gallego, D., & Jimenez, M. (2015). Enteric motor pattern generators involve both myogenic and neurogenic mechanisms in the human colon. *Frontiers in Physiology*, *6*, 205. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00205>

Martinez-Cutillas, M., Mañé, N., Gallego, D., Jimenez, M., & Martin, M. T. (2014). EP2 and EP4 receptors mediate PGE2 induced relaxation in murine colonic circular muscle: Pharmacological characterization. *Pharmacological Research*, *90*, 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.10.001>

McCulloch, C. R., Kuwahara, A., Condon, C. D., & Cooke, H. J. (1987). Neuropeptide modification of chloride secretion in guinea pig distal colon. *Regulatory Peptides*, *19*(1–2), 35–43.

Middleton, S. J., Cuthbert, A. W., Shorthouse, M., & Hunter, J. O. (1993). Nitric oxide affects mammalian distal colonic smooth muscle by tonic neural inhibition. *British Journal of Pharmacology*, *108*(4), 974–979. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13494.x>

Moeser, A. J., Ryan, K. A., Nighot, P. K., & Blikslager, A. T. (2007). Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *293*(2), G413–G421. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00304.2006>

Moon, H. W., Fung, P. Y., Isaacson, R. E., & Booth, G. D. (1979). Effects of age, ambient temperature, and heat-stable Escherichia coli enterotoxin on intestinal transit in infant mice. *Infection and Immunity*, *25*(1), 127–132. <https://doi.org/10.1128/iai.25.1.127-132.1979>

Mulè, F., D'Angelo, S., & Serio, R. (1999). Tonic inhibitory action by nitric oxide on

- spontaneous mechanical activity in rat proximal colon: involvement of cyclic GMP and apamin-sensitive K⁺ channels. *British Journal of Pharmacology*, 127(2), 514–520. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.bjpp.0702537>
- Muller, M. J., & Baer, H. P. (1983). Relaxant Effects of Forskolin in Smooth Muscle. Role of Cyclic AMP. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 322(1), 78–82. <https://doi.org/10.1007/BF00649356>
- Ng, W. W., Jing, J., Hyman, P. E., & Snape, W. J. (1991). Effect of 5-hydroxytryptamine and its antagonists on colonic smooth muscle of the rabbit. *Digestive Diseases and Sciences*, 36(2), 168–173. <https://doi.org/10.1007/BF01300751>
- Ngendahayo Mukiza, C., & Dubreuil, J. D. (2013). Escherichia coli heat-stable toxin b impairs intestinal epithelial barrier function by altering tight junction proteins. *Infection and Immunity*, 81(8), 2819–2827. <https://doi.org/10.1128/IAI.00455-13>
- Nilsson, O., Cassuto, J., Larsson, P. A., Jodal, M., Lidberg, P., Ahlman, H., Dahlström, A., & Lundgren, O. (1983). 5-Hydroxytryptamine and cholera secretion: A histochemical and physiological study in cats. *Gut*, 24(6), 542–548. <https://doi.org/10.1136/gut.24.6.542>
- Onori, L., Aggio, A., D'Alo', S., Muzi, P., Cifone, M. G., Mellillo, G., Ciccocioppo, R., Taddei, G., Frieri, G., & Latella, G. (2005). Role of nitric oxide in the impairment of circular muscle contractility of distended, uninflamed mid-colon in TNBS-induced acute distal colitis in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11(36), 5677–5684. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i36.5677>
- Opazo, A., Lecea, B., Admella, C., Fantova, M. J., Jiménez, M., Martí-Ragué, J., & Clavé, P. (2009). A comparative study of structure and function of the longitudinal muscle of the anal canal and the internal anal sphincter in pigs. *Diseases of the Colon and Rectum*, 52(11), 1902–1911. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181b160be>
- Osaka, M., Fujita, T., & Yanatori, Y. (1975). On the possible role of intestinal hormones as the diarrhoeagenic messenger in cholera. *Virchows Archiv B Cell*

- Pathology*, 18(4), 287–296. <https://doi.org/10.1007/BF02889255>
- Paquola, A., Mañé, N., Giron, M. C., & Jimenez, M. (2019). Diadenosine tetraphosphate activates P2Y1 receptors that cause smooth muscle relaxation in the mouse colon. *European Journal of Pharmacology*, 855, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.05.013>
- Peterson, J. W., & Whipp, S. C. (1995). Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 63(4), 1452–1461. <https://doi.org/10.1128/iai.63.4.1452-1461.1995>
- Pohl, C., Medland, J., Mackey, E., Edwards, L., Bagley, K., DeWilde, M., Williams, K., & Moeser, A. (2017). Early Weaning Stress Induces Chronic Functional Diarrhea, Intestinal Barrier Defects, and Increased Mast Cell Activity in a Porcine Model of Early Life Adversity. *Neurogastroenterology and Motility*, 29(11). <https://doi.org/10.1111/nmo.13118>.Early
- Porras, M., Martín, M. T., Terán, E., Mourelle, M., & Vergara, P. (2008). The nitric oxide donor LA-419 [S-(6-nitro-oxi-hexahydrofuro[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. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.129189>
- Porras, M., Martín, M. T., Torres, R., & Vergara, P. (2006). Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(3), G423–G430. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00323.2005>
- Rychter, J., Ortega, O., Berdun, S., Arenas, C., Lopez, I., Espin, F., Vergara, P., & Clavé, P. (2015). Mast cell degranulation inhibits motor patterns of human ileum and sigmoid colon in vitro: Relevance for postoperative ileus. *Neurogastroenterology and Motility*, 27(8), 1098–1109. <https://doi.org/10.1111/nmo.12589>
- Scheffer, J., König, W., Hacker, J., & Goebel, W. (1985). Bacterial adherence and

- hemolysin production from *Escherichia coli* induces histamine and leukotriene release from various cells. *Infection and Immunity*, 50(1), 271–278. <https://doi.org/10.1128/iai.50.1.271-278.1985>
- Schreiber, K. L., & Brown, D. R. (2005). Adrenocorticotrophic hormone modulates *Escherichia coli* O157:H7 adherence to porcine colonic mucosa. *Stress*, 8(3), 185–190. <https://doi.org/10.1080/10253890500188732>
- Shimizu, M., Shimizu, Y., & Kodama, Y. (1978). Effects of ambient temperatures on induction of transmissible gastroenteritis in feeder pigs. *Infection and Immunity*, 21(3), 747–752. <https://doi.org/10.1128/iai.21.3.747-752.1978>
- Smith, F., Clark, J. E., Overman, B. L., Tozel, C. C., Huang, J. H., Rivier, J. E., Blisklager, A. T., & Moeser, A. J. (2010). Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298(3), G352–G363. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00081.2009>
- Söderholm, J. D., Yates, D. A., Gareau, M. G., Yang, P. C., MacQueen, G., & Perdue, M. H. (2002). Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(6), G1257–G1263. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00314.2002>
- Spencer, N. J., Bywater, R. A., Holman, M. E., & Taylor, G. S. (1998). Inhibitory neurotransmission in the circular muscle layer of mouse colon. *Journal of the Autonomic Nervous System*, 70(1–2), 10–14. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(98\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(98)00045-9)
- Traserra, S., Villarte, S., Traini, C., Palacin, S., Vergara, P., Vannucchi, M. G., & Jimenez, M. (2020). The asymmetric innervation of the circular and longitudinal muscle of the mouse colon differently modulates myogenic slow phasic contractions. *Neurogastroenterology and Motility*, 32(4), e13778. <https://doi.org/10.1111/nmo.13778>
- Xu, C., Yan, S., Guo, Y., Qiao, L., Ma, L., Dou, X., & Zhang, B. (2020). *Lactobacillus casei* ATCC 393 alleviates Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88-induced

intestinal barrier dysfunction via TLRs/mast cells pathway. *Life Sciences*, 244(117281). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117281>

Yang, K. M., Jiang, Z. Y., Zheng, C. T., Wang, L., & Yang, X. F. (2014). Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Journal of Animal Science*, 92(4), 1496–1503. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6619>

Zhang, L., Song, J., Bai, T., Lu, X., Yang, G., Qian, W., Wang, R., & Hou, X. (2016). Effects of Buscopan on human gastrointestinal smooth muscle activity in an ex vivo model: Are there any differences for various sections? *European Journal of Pharmacology*, 780, 180–187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.047>

Zhang, Y., Lomax, A. E., & Paterson, W. G. (2010). P2Y1 receptors mediate apamin-sensitive and -insensitive inhibitory junction potentials in murine colonic circular smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(2), 602–611. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160978>

CONCLUSIONS

- 1) La caracterització dels mecanismes neuromusculars de contracció i relaxació, així com dels mecanismes de neurosecreció és fonamental per entendre els canvis associats al desenvolupament i a la infecció per *E. coli*.
- 2) L'antagonista al·lostèric, BPTU, bloqueja les respostes inhibidores mediades pel receptor P2Y₁ en el tracte gastrointestinal de rosegadors i del porc. L'antagonista al·lostèric és comparativament menys potent que l'ortostèric, MRS2500, però suposa un nou mecanisme farmacològic d'inhibició.
- 3) El BPTU també és efectiu en cultius cel·lulars que expressen el receptor P2Y₁ humà però, en canvi, no és efectiu en teixit de còlon humà. Una possible limitació del fàrmac és que el seu lloc d'unió està en contacte directe amb la bicapa lipídica i, per tant, el BPTU ha de ser hidròfob i això podria dificultar la seva capacitat de difusió i unió al receptor.
- 4) El còlon distal del porc presenta un to neural inhibitori, probablement degut a l'alliberació espontània d'òxid nítric. El to inhibitori és més gran en la capa circular que en la longitudinal. Ni la infecció experimental per *E. coli* ni el model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental durant la lactació modifiquen la transmissió neuromuscular inhibitoria.
- 5) La transmissió neuromuscular excitatòria del còlon del porc és deguda, principalment, a l'activació de neurones colinèrgiques. L'acetilcolina actua sobre receptors muscarínics que provoquen la contracció de la musculatura llisa.
- 6) La relació neuromuscular excitatòria no es veu alterada després de la infecció experimental per *E. coli* ni aplicant un model de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental durant la lactació.

7) En aquest treball hem caracteritzat per primera vegada, en l'espècie porcina, el mecanisme neurosecretor en el còlon. Segons les nostres dades experimentals les motoneurons secretores alliberen acetilcolina i VIP que provoquen la secreció de Cl⁻ a la llum intestinal.

8) En condicions basals, no s'observa la presència d'un to neural secretor en el còlon del porc.

9) La infecció per *E. coli* i l'alliberació d'enterotoxines van:

-9.1 Alterar la funció barrera implicant mecanismes paracel·lulars i probablement també transcel·lulars,

-9.2 Produir un augment del transport actiu electrogènic, degut en part a un efecte neurosecretor que va implicar la participació de motoneurons colinèrgiques,

-9.3 Crear una hipermastocitosi a nivell epitelial però no a nivell de les capes musculars. La desgranulació dels mastòcits epitelials, a la vegada, també podria haver contribuït en el mecanisme secretor.

10) L'aplicació de mesures de socialització primerenca i d'enriquiment ambiental durant la lactació, disminueix el transport actiu electrogènic a nivell intestinal en el post-deslletament. Una possible explicació d'aquesta observació és que el model etològic permet una millor adaptació dels animals a la resposta d'estrès induïda pel deslletament.

