

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LOS OXIDANTES EN EL COLON DISTAL
DE LA RATA: ALTERACIONES FUNCIONALES Y
MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

María Yolanda Adame Navarrete

Bajo la dirección de los Doctores:

Jesús Álvarez Fernández-Represa
Julio Mayol Martínez

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2598-8

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**EFEECTO DE LOS OXIDANTES EN EL COLON DISTAL DE LA
RATA: ALTERACIONES FUNCIONALES Y MECANISMOS DE
DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Tesis Doctoral

Dirigida por el Prof. Jesús Álvarez Fernández-Represa y el Dr. Julio Mayol Martínez
Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo I
Hospital Clínico San Carlos
Madrid

M^a Yolanda Adame Navarrete

Madrid, 2004

En primer lugar, mi agradecimiento al Prof. Jesús Álvarez Fernández-Represa por darme la oportunidad de trabajar en el Servicio de Cirugía I del Hospital Clínico San Carlos, junto a grandes profesionales. Del mismo modo agradecer al Dr. Julio Mayol Martínez por permitirme realizar esta tesis doctoral, formarme en el duro campo de la investigación y enseñarme a luchar por un objetivo hasta alcanzarlo.

Al Dr. Luis Ortega Medina, por ayudarme de manera desinteresada a desarrollar una parte importante de esta tesis doctoral.

A todos mis compañeros de trabajo, que tanto me han aportado a nivel profesional como a nivel personal. Por los buenos momentos vividos y los que aún nos quedan por compartir. Gracias a todos ellos.

A toda mi familia, por confiar en mi, ayudarme y animarme a seguir en los momentos de flaqueza.

A mis sobrinos, Gema y Jorge, por toda la alegría e ilusión que desprenden y que impide que pierda la niña que llevo dentro.

Por último y más importante de todos a Juanse, por todos los años compartidos, por su paciencia en los momentos malos y por sus risas en los buenos, que me ayudan día a día. Gracias por estar siempre a mi lado.

*Nunca vayas por el camino trazado,
porque conduce hacia donde otros han ido ya.*

Alexandre Graham Bell

*A mis padres, a mis sobrinos y en general a toda la
gente que me rodea y que ha hecho posible esta tesis,
pero en especial a mi marido Juanse.*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LOS OXIDANTES EN EL COLON DISTAL
DE LA RATA: ALTERACIONES FUNCIONALES Y
MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

TESIS DOCTORAL

M^a YOLANDA ADAME NAVARRETE

Madrid, 2004

	<u>Nº Página</u>
INTRODUCCIÓN	1
1.Aspectos generales.....	1
2.El intestino grueso.....	2
2.1 Microestructura del intestino grueso.....	2
2.2 Funciones intestinales.....	6
2.2.1 Propiedades generales de transporte.....	6
2.2.2 Función absorptiva del epitelio cólico.....	7
2.2.3 Función secretora del epitelio cólico	8
2.2.4 Función de barrera del epitelio	14
2.3 Oxidantes y radicales libres en el intestino.....	17
3.Papel de los oxidantes en enfermedades como la EII y la isquemia/reperfusión.....	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
MATERIAL Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	38
1. Validación del método.....	38
2. Efecto de los oxidantes sobre la secreción basal.....	40
3. Efecto de los oxidantes sobre la función de barrera intestinal.....	51
4. Participación de las enzimas antioxidantes.....	65
DISCUSIÓN	83
1. Modelo experimental	83
2. Validación del método.....	87
3. Efecto del H ₂ O ₂ en la secreción.....	89
4. Efecto del H ₂ O ₂ en la función de barrera.....	94
5. Implicación de las enzimas endógenas antioxidantes.....	100
CONCLUSIONES	110
BIBLIOGRAFÍA	111

INTRODUCCIÓN

1. ASPECTOS GENERALES

El intestino desempeña dos funciones fundamentales para la vida: la absorción e intercambio de nutrientes y la constitución de una barrera defensiva que impide la entrada de sustancias potencialmente tóxicas o antígenos al interior del organismo. Ambas funciones, aparentemente contradictorias, las desarrolla gracias a la anatomía peculiar que presenta el epitelio intestinal y a su complejo funcionamiento. Múltiples patologías se caracterizan por presentar alteraciones en dichas funciones intestinales:

1. El hábitat intestinal en cada individuo contiene entre 300 y 500 especies diferentes de bacterias (1). El estómago y el intestino delgado tan sólo contiene unas pocas especies bacterianas adheridas al epitelio y algunas otras bacterias en el tránsito (2). Sin embargo, el intestino grueso alberga un ecosistema microbiano complejo y dinámico, con una elevada densidad bacteriana. La concentración está por encima de 10^{11} o 10^{12} células/gramo de contenido luminal (1). Las bacterias residentes son una línea crucial de resistencia, que evita la colonización de microbios exógenos, siendo muy relevante en la prevención de la invasión de patógenos en los tejidos (2). La modificación del mecanismo de defensa permite un aumento de la población bacteriana patogénica, que conduce a la alteración funcional intestinal (3). Las infecciones por *Vibrio cholerae*, *E coli*, *Shiga toxin* o *Clostridium difficile* cursan con diarreas muy severas (3) e incluso algunas toxinas, como la toxina A del *Clostridium difficile*, alteran la estructura del citoesqueleto y con ello la barrera intestinal cólica (4). Las infecciones bacterianas cursan con inflamación y sobreproducción de metabolitos reactivos del oxígeno (MORs) y del nitrógeno (MNRs) (5-7) que contribuirían a su vez en la alteración de las funciones intestinales (8-11).
2. La enfermedad de Crohn, una de las formas de enfermedad inflamatoria intestinal (EII), se caracteriza por inflamación difusa de la mucosa del intestino grueso, principalmente del colon y del recto (12). Las disfunciones características de esta patología son la diarrea (13, 14) y el aumento de la permeabilidad intestinal (15, 16). Se ha sugerido que tanto el daño tisular como la alteración funcional se debe a

una excesiva liberación de MORs, que se acumulan en el intersticio cólico, afectando a las funciones intestinales (17).

3. La isquemia intestinal puede suceder, entre otros, por oclusión de las arterias mesentéricas o como consecuencia de un descenso en el rendimiento cardiaco (18). El posterior reestablecimiento del flujo sanguíneo, también conocido como reperfusión, se consigue generalmente a través de la cirugía, siendo éste esencial para prevenir la muerte celular por anoxia. Sin embargo, durante este periodo se originan lesiones celulares severas adicionales debido a una síntesis elevada de MORs que están implicados en la patogénesis del daño originado en la isquemia/reperfusión (I/R) intestinal (19-21). El sistema de xantina/xantina oxidasa (X/XO) aparece como el productor de MORs más importante (22, 21). Estos agentes tienen capacidad para ejercer un efecto oxidante directo sobre los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos y los lípidos. Pero a su vez, ocasionan un efecto indirecto a través de la activación de neutrófilos que se adhieren a las células endoteliales liberando más MORs, prostaglandinas (PGs) y otras enzimas como mieloperoxidasa, elastasa, que contribuyen entre otras a las alteraciones funcionales y a la lesión tisular (22-25).

2. EL INTESTINO GRUESO EN LOS MAMÍFEROS

El intestino grueso comprende sucesivamente el ciego, el colon y el recto, para finalizar en el canal anal. El colon está dividido en 4 partes: ascendente, transversa, descendente y sigmoideo.

2.1 MICROESTRUCTURA DEL INTESTINO GRUESO

Como en otras partes del tubo gastrointestinal, la pared del intestino grueso está constituida por 4 capas concéntricas: la serosa, la muscular, la submucosa y la mucosa. De todas ellas, la mucosa es la más importante en relación con las funciones digestivas y absorbivas.

Mucosa

Constituida por el epitelio, la lámina propia y la muscular de la mucosa.

Epitelio

La superficie libre de la mucosa está cubierta por un epitelio cilíndrico simple, en el cual se distinguen 3 tipos de células: transportadoras, caliciformes y enteroendocrinas (enterocromafines).

- Células transportadoras: Se trata del tipo celular más abundante dentro de la mucosa intestinal. Son las células responsables del intercambio iónico y la reabsorción de agua (26). Presentan microvellosidades en la membrana apical, algo más cortas e irregulares que los enterocitos del intestino delgado, pero con una organización estructural similar. Muchas de estas células contienen gránulos secretores en su citoplasma apical. Todas las células presentan unos complejos de unión intercelular, que separan el lumen del interior de la pared intestinal (27, 28).
- Células caliciformes: Están distribuidas irregularmente entre las células transportadoras. Se trata de glándulas unicelulares que secretan moco con el objetivo de lubricar y proteger la superficie del epitelio (29).
- Células enterocromafines (células enteroendocrinas): Se localizan principalmente en la base de las criptas de Lieberkühn. Se trata de células endocrinas que liberan su secreción (hormonas, neuropéptidos y serotonina) hacia el interior de la lámina propia en respuesta a estímulos luminales, que resulta en una alteración del transporte iónico epitelial (30).

La mucosa del intestino grueso presenta una superficie lisa debido a la ausencia de vellosidades. A pequeño aumento se pueden ver las aberturas de las incontables glándulas tubulares que reciben el nombre de criptas de Lieberkühn. La mitad superior de la pared de las criptas está tapizada por un epitelio cilíndrico que contiene células transportadoras, células caliciformes y unas pocas células de gránulos basales. En la mitad inferior de las criptas, existe un alto número de células indiferenciadas, que se

dividen continuamente generando células nuevas (transportadoras, caliciformes y enteroendocrinas) que se mueven hacia arriba lentamente y que van a sustituir a las que se desprenden en la superficie de la mucosa (31).

Lámina propia

Está compuesta por tejido conectivo que soporta al epitelio, ocupando los espacios que quedan entre las criptas de Lieberkühn. En la lámina propia se encuentran linfocitos, células plasmáticas, eosinófilos y macrófagos en gran cantidad. Los más numerosos son los linfocitos, que constituyen una reserva de células inmunocompetentes, muchas de las cuales son capaces de diferenciarse a células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Además de la gran población de linfocitos emigrantes, la lámina propia contiene muchos nódulos linfoides solitarios, que son más abundantes en el ciego, en el apéndice y en el recto, aunque se encuentran presentes a lo largo de todo el intestino grueso (32).

Muscular de la mucosa

Representa el límite entre la mucosa y la submucosa. Está formada por dos capas de músculo liso, una interna circular y una externa longitudinal.

Submucosa

Está constituida por tejido conjuntivo moderadamente denso, rico en fibras elásticas. También contiene grupos ocasionales de células adiposas. Dentro del tejido conjuntivo de la submucosa existe una red de ganglios y de haces nerviosos interconectados, conocido como plexo submucoso o plexo de Meissner, que regula el flujo sanguíneo, la secreción y la absorción en la mucosa cólica (33, 34). Sus fibras inervan la muscular de la mucosa, pero también forman un plexo mucoso situado en la lámina propia que envía fibras en torno a las glándulas intestinales.

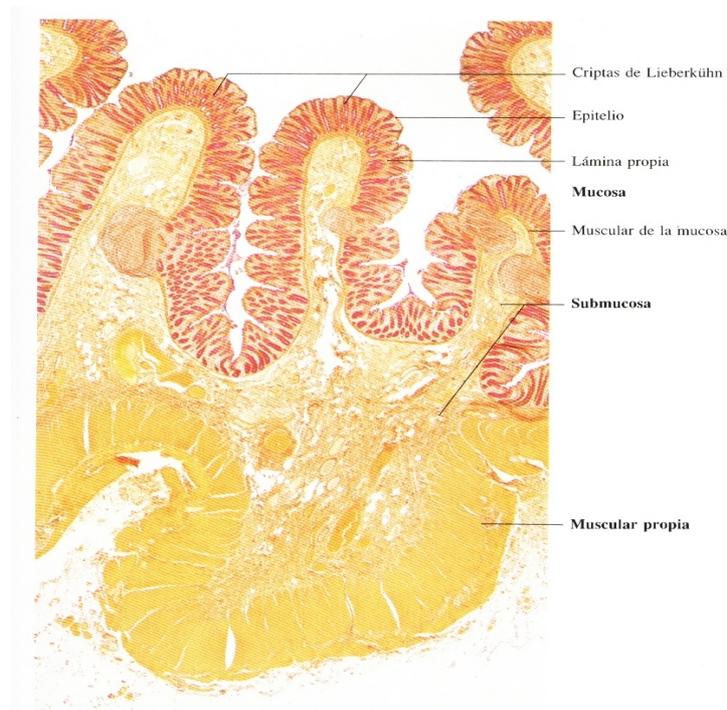
Muscular

Compuesta por 2 capas de músculo liso, una interna circular y otra externa longitudinal. Las fibras longitudinales están agrupadas en tres bandas longitudinales equidistantes, llamadas las tenias del colon. Entre las tenias, las fibras musculares longitudinales forman una capa extraordinariamente fina y con frecuencia discontinua.

Los plexos entéricos más desarrollados se encuentran entre las capas musculares longitudinal y circular. El plexo mientérico o plexo de Auerbach, que igualmente regula el flujo de sangre y el transporte electrolítico (33, 34), está constituido por ganglios que contienen de tres a cincuenta o más cuerpos neuronales y por haces de axones amielínicos que unen entre sí los ganglios, formando así una red continua.

Serosa

La capa más externa de la pared intestinal, llamada serosa, está constituida por una lámina continua de células epiteliales planas, el mesotelio, separada de la muscular subyacente por una capa de tejido conjuntivo laxo. La serosa del colon tiene de particular la presencia de acúmulos locales de células adiposas situados por debajo del mesotelio, que forman unas protuberancias colgantes llamadas apéndices epípicos.



Sección transversal de la pared del colon humano (figura modificada del Atlas Color de Histología; Finn Geneser)

2.2 FUNCIONES INTESTINALES

2.2.1 PROPIEDADES GENERALES DE TRANSPORTE

La capa epitelial, que recubre la superficie de la mucosa intestinal, en contacto con la luz, está compuesta por células con actividad transportadora electrolítica. Se encargan del movimiento de grandes cantidades de sales y agua desde la luz hacia el torrente circulatorio y viceversa. Dichas células epiteliales están equipadas con canales iónicos, transportadores y bombas, localizados en la membrana apical o basolateral, que participan en el movimiento de los electrolitos (26).

Inicialmente se pensaba que las células epiteliales presentes en las criptas de Lieberkühn eran las encargadas de la función secretora y las células localizadas en la superficie epitelial tan sólo tenían actividad absorbente. Sin embargo, en estudios posteriores se ha visto que tanto la secreción como la absorción tienen lugar en el

epitelio de superficie y en las criptas (35). El transporte neto es el resultado del balance entre absorción y secreción.

Las células epiteliales del colon son altamente conductivas, con una elevada densidad de canales iónicos en la membrana luminal. Las principales tareas del epitelio cólico son la absorción electrogénica y electroneutra de NaCl y la absorción activa de K^+ . Además de la absorción neta de NaCl, KCl y agua, tiene una gran relevancia la secreción de NaCl y de KCl, de igual modo que la secreción de HCO_3^- y moco, ambos importantes por su papel protector (26).

2.2.2 FUNCIÓN ABSORTIVA DEL EPITELIO CÓLICO

El transporte de NaCl en el epitelio cólico se debe principalmente a la absorción electroneutra que se lleva a cabo a través de los transportadores luminales de Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- . El resto de la absorción es electrogénica y tiene lugar gracias a la actividad tanto de canales de Na^+ luminales (ENaC) como a la absorción de Cl^- a través de las vías transcelular y paracelular (26).

En el colon, existe una heterogeneidad segmentaria con respecto a la absorción. En el colon ascendente o proximal el transporte de Na^+ es electroneutral principalmente, mientras que en la parte distal la absorción tiene lugar a través de canales de Na^+ (36, 37).

Para la absorción electroneutra de NaCl se requiere la presencia paralela de los intercambiadores Na^+/H^+ y Cl^-/HCO_3^- en la membrana luminal de las células epiteliales. A su vez, es necesaria la actividad de la bomba $Na^+-K^+-ATPasa$ localizada en la membrana basolateral de la célula epitelial (38). El transporte de Na^+ y Cl^- está acoplado a cambios intracelulares tanto de pH como de concentración de Cl^- (39, 40).

Existen 3 tipos de intercambiadores de Na^+/H^+ (NHE). El más abundante es el NHE1, que se expresa en la membrana basolateral. El NHE2 y el NHE3 se expresan en el lado luminal de las células epiteliales cólicas. Además de estos tres transportadores, se ha descrito un cuarto tipo dependiente de Cl^- , localizado también en la membrana luminal de las células de las criptas en el colon de la rata (40).

En la membrana apical de las células epiteliales cólicas existen dos tipos diferentes de intercambiadores de Cl^- , mientras que en la membrana basolateral se expresa un tercer tipo de transportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (41).

Además de la absorción electroneutra, las células epiteliales del colon distal poseen un mecanismo de absorción electrogénica de Na^+ . El ENaC es el responsable de la absorción y se localiza en la membrana luminal de la célula. La absorción de Na^+ viene acompañada por el transporte de Cl^- a través de canales especializados. El receptor transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) es el canal de Cl^- predominante en el epitelio cólico (42). El Na^+ que entra en la célula sale a través de la bomba $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ situada en la membrana basolateral y el Cl^- abandona la misma a través de canales de Cl^- o transportadores de $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ basolaterales (43-45). El movimiento de agua sigue varias vías, que incluyen el flujo paracelular y el flujo transcelular a través de canales de agua llamados acuaporinas, localizados en ambas membranas, apical y basolateral (46, 47).

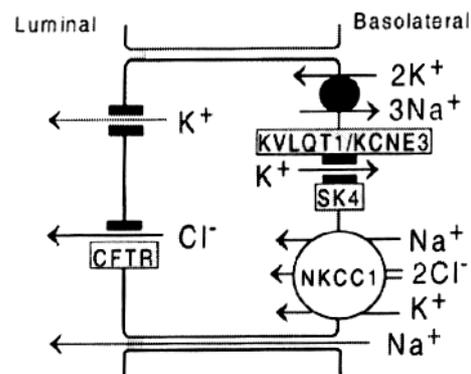
El colon de los mamíferos contribuye a la regulación de la homeostasis del K^+ , mediante secreción y absorción del mismo (48). La absorción activa de K^+ está restringida al colon distal de la rata, del conejo y de la cobaya (49-51). Está mediado a través de dos $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATPasas}$ que se expresan en las células de la superficie y en las criptas (49).

2.2.3 FUNCIÓN SECRETORA DEL EPITELIO CÓLICO

Otra función crítica en el colon es la secreción de electrolitos, que se encuentra en equilibrio con la absorción. Ésta debe facilitar el transporte de moco fuera de las criptas y mantener la hidratación correcta tanto del moco secretado como del epitelio intestinal (26). Además se trata de un mecanismo de defensa encargado de la eliminación de toxinas y patógenos (52).

Las células secretoras intestinales contienen canales de Cl^- y K^+ en sus membranas lumbales, que permiten la secreción de KCl . Además, la estimulación secretora y la inhibición de la absorción facilita el transporte de Na^+ por vía paracelular.

La conductancia apical de Cl^- principalmente tiene lugar a través del CFTR, canal que desempeña una función primordial en el transporte iónico cólico (53). La actividad de una enzima de membrana, la bomba Na-K-ATPasa, permite el intercambio de 2 iones K^+ , que pasan a formar parte del contenido intracelular, por 3 iones Na^+ que abandonan el interior de la célula. Esto genera un gradiente de membrana que promueve la activación del cotransportador $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$. El exceso de K^+ intracelular se libera a través de los canales basolaterales de K^+ permitiendo el reciclado del ión. Esto genera la hiperpolarización de la célula, favoreciendo la apertura de los canales apicales de Cl^- para la salida del mismo a favor de gradiente (26).



Modelo celular de secreción según Kunzelmann et al, 2002.

Un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo demuestra la existencia de un locus en la membrana apical, tanto en colon humano como de rata, que participa en la regulación de la secreción de Cl^- (54). La incubación apical con NH_4^+ , Ba^{2+} o 293B cromanol, bloqueantes de canales de K^+ (55-57), inhibieron la secreción de Cl^- estimulada por un agonista de la vía del AMPc.

El transporte de agua se lleva a cabo tanto a través de las acuaporinas como osmóticamente, a través de la vía paracelular (26).

A. Vías de activación de la secreción de Cl⁻

Existen dos vías diferentes de activación de la secreción hidroelectrolítica en el epitelio intestinal: una mediada por nucleótidos cíclicos AMPc-GMPc y la otra por Ca²⁺ intracelular (58); (59).

- **Nucleótidos cíclicos (AMPc-GMPc)**

La enzima de membrana adenilato ciclasa (AC), activada por proteínas G estimuladoras (Gs), genera AMPc a partir de ATP. El AMPc activa la proteína kinasa A (PKA) (60), que fosforila al canal de Cl⁻ CFTR. A su vez, la PKA modula la actividad del cotransportador Na⁺-K⁺-2Cl⁻ mediante la modificación de su estado fosforilativo (61). Se favorece así el movimiento transcelular de Cl⁻ desde la vertiente basolateral hasta la luz intestinal. Existen estudios que demuestran que la PKA puede activar directamente el CFTR (62).

De forma paralela a la activación del CFTR, existe una coestimulación de canales basolaterales de K⁺ (K_vLQT1) y probablemente canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (63, 42). Además, la activación del CFTR hace que se inhiba la absorción electrogénica y probablemente la absorción electroneutra de Na⁺ debido al bloqueo de ENaC y del intercambiador luminal de Na⁺/H⁺ (64-66).

Otro nucleótido cíclico es el guanosín monofosfato cíclico (GMPc), generado por la enzima guanilato ciclasa (GC). Éste activa a la PKA, promoviendo la misma vía de señalización que el AMPc (67).

- **Vía del Ca²⁺**

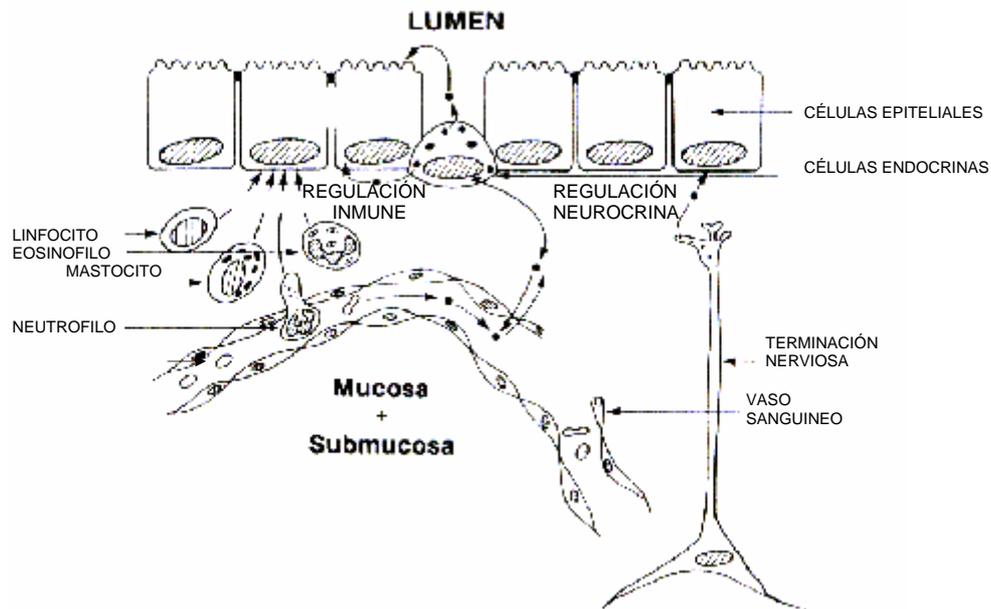
Una segunda vía de señalización celular viene determinada por la movilización del Ca²⁺ intracelular como por ejemplo la activada por acetilcolina (ACh). El receptor se encuentra acoplado a una proteína G (68) que activa a la enzima fosfolipasa C (PLC) mediante interacción proteína-proteína. La reacción que cataliza la enzima genera dos productos a partir de fosfoinositol bifosfato (PIP₂): inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG).

El IP_3 produce la apertura de canales Ca^{2+} localizados en el retículo endoplásmico, permitiendo la salida del catión al citoplasma. Además, el IP_3 se fosforila generando IP_4 , que activa canales de Ca^{2+} ubicados en la membrana celular. La entrada del catión al citoplasma contribuye al aumento de la concentración intracelular del mismo. El incremento de Ca^{2+} intracelular promueve la activación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , generando así la hiperpolarización de la célula y con ello la apertura de los canales apicales de Cl^- (42, 69).

Por otra parte, el DAG activa a la proteína kinasa C (PKC), que se trasloca desde el citoplasma hasta la membrana, donde actúa fosforilando proteínas (70). Se ha visto que la PKC, junto con la PKA, es capaz de promover la secreción de Cl^- a través de la activación del CFTR (71). Sin embargo, se conoce que una de las isoformas de la PKC, la isoforma ϵ , regula negativamente la secreción de Cl^- , debido a que promueve la endocitosis de la membrana basolateral, disminuyendo la expresión tanto del cotransportador NKCC como de los canales de K^+ . La célula pierde así el mecanismo regulador de la secreción.

B. Regulación de la secreción de Cl^-

La secreción y la absorción se controlan a través de estímulos endocrinos, paracrinos, autocrinos, inmunológicos y neuronales. El mayor impacto neuronal se debe al plexo de Auerbach y al plexo submucoso de Meissner. Ambos plexos inervan tanto las células epiteliales como las células musculares vasculares, controlando el flujo sanguíneo intestinal, la secreción y la absorción de la mucosa cólica (33, 34). Los componentes localizados en el lumen intestinal, derivados de los nutrientes, los ácidos biliares y las toxinas bacterianas, también pueden modular la absorción o bien inducir la liberación de secretagogos, causando hipersecreción (30, 72-74). La secreción electrolítica está mediada por una amplia variedad de secretagogos como la acetilcolina (ACh), el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la prostaglandina E_2 (PGE_2), los leucotrienos, la bradikinina y varias hormonas.



Regulación inmune y neurohumoral del epitelio intestinal (figura modificada de Tadataka Yamada; 3ª edición).

Neurotransmisores:

El VIP interacciona con receptores específicos localizados en la membrana basolateral, que activan a la AC, estimulando la secreción vía AMPc (30).

La ACh interacciona con los receptores muscarínicos M_3 , situados en la membrana basolateral, aumentando los niveles de Ca^{2+} intracelular que activan canales de Cl^- (30).

Existen evidencias que apuntan a que la sustancia P participa en la activación de la secreción de Cl^- , a través de interacciones directas del neuropéptido con las células secretoras. Se cree que la sustancia P activa algunos tipos celulares secundarios, que incluyen terminaciones nerviosas y mastocitos (75-77).

Mediadores inmunes

La histamina, liberada por los mastocitos en respuesta a la estimulación provocada por un antígeno o un activador mastocítico no inmunológico, se une a receptores H_1 localizados en la membrana basolateral de las células secretoras para provocar la liberación de Cl^- a través de la vía del Ca^{2+} (78). La histamina también tiene efectos sobre la secreción a través de una vía indirecta, que incluye la activación de las terminaciones nerviosas vía receptores H_2 y la producción de PGs por parte de los miofibroblastos subepiteliales (79, 80).

La adenosina, liberada por los mastocitos activados, se une a los receptores A_{2b} apicales y basolaterales, que activan el CFTR vía AMPc (81-83). Algunos estudios sugieren que el ácido araquidónico (AA) se libera en respuesta a determinadas concentraciones de adenosina, estimulando la secreción de Cl^- por activación directa de canales de K^+ basolaterales (84, 85).

Mediadores paracrinos

Entre los mediadores paracrinos más importantes están los prostanoideos. Las prostaglandinas, especialmente las de la serie E, son potentes estimuladores de la secreción de Cl^- en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas (86). Siguen un mecanismo que produce la elevación de la concentración intracelular de AMPc.

Otro mediador importante es la 5-hidroxitriptamina (5-HT), liberado por las células enterocromafines, que se encarga de promover la secreción de Cl^- a través de la vía del Ca^{2+} .

La guanilina la sintetizan principalmente las células enteroendocrinas (87). Sus receptores se localizan solamente en el polo apical de la célula (67, 87). La respuesta a guanilina no depende de la vía clásica dependiente de AMPc o Ca^{2+} . En su lugar, el receptor de guanilina está unido a la enzima de membrana GC, resultando en un aumento de los niveles de GMPc intracelulares (67, 87).

De manera similar, el péptido renal uroguanilina activa el receptor de guanilina produciendo la estimulación de la secreción de Cl^- (88).

2.2.4 FUNCIÓN DE BARRERA EPITELIAL

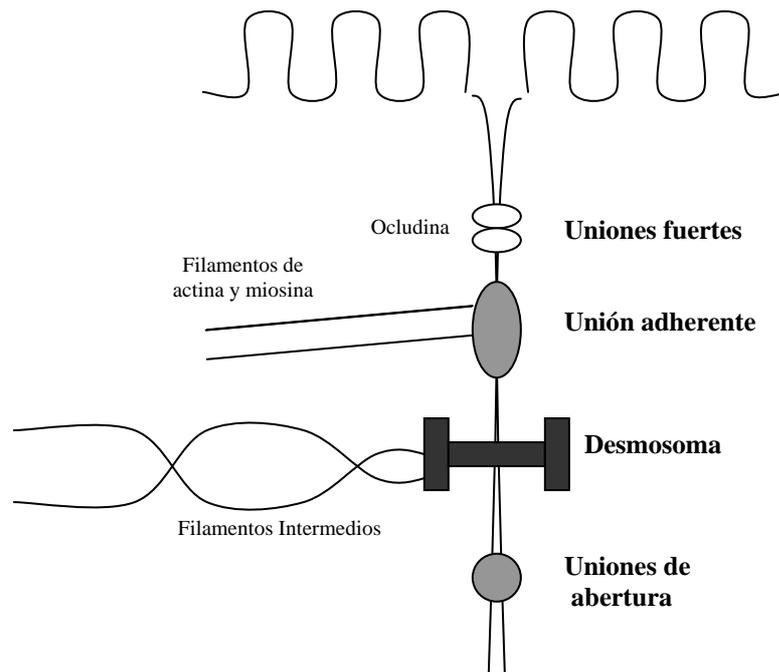
La barrera gastrointestinal está constituida por un sistema complejo de elementos mucosos y epiteliales, además de la flora intestinal que desempeña una función de protección importante (2).

A. Moco

La capa gelatinosa de moco es delgada y adherente, constituida por un 95 % de agua. Su organización viene determinada por la interacción de moléculas de glicoproteína. La secreción de moco se activa tras un incremento en los niveles intracelulares de AMPc en paralelo con la secreción hidroelectrolítica (89).

B. Uniones intercelulares

Las células que conforman el epitelio están conectadas entre sí a través de interacciones responsables del mantenimiento de la estructura celular. Su disposición es tal que impiden el paso de sustancias tóxicas a través de la vía paracelular.



Complejos de unión de las células epiteliales (dibujo modificado de Denker et al, 1998).

La barrera existente entre la luz intestinal y la sangre depende de la integridad de las uniones intercelulares y de las propiedades de las membranas plasmáticas. Existen diferentes tipos de uniones (27, 28):

- Uniones de abertura (gap junctions): Permiten la comunicación intercelular. Están constituidas, casi en su totalidad, por una proteína integral de membrana denominada conexina, que se agrupa para formar un complejo, el conexón, que rodea completamente a la membrana. Este último se compone de 6 subunidades de conexina dispuestas hexagonalmente formando tubos cilíndricos que conectan las células adyacentes, permitiendo así la comunicación célula-célula.
- Uniones adherentes (zonula adherens): Se trata de interacciones célula-célula localizadas próximas a la superficie apical. Rodean completamente a las células. Están constituidas por proteínas integrales de membrana llamadas cadherinas. A través del dominio extracelular una cadherina conecta con la situada en la célula vecina mediante uniones dependientes de Ca^{2+} . A su vez, el dominio intracelular

sirve de conexión con el complejo B- α catenina, que está unido a los microfilamentos de actina que conforman el citoesqueleto.

- Desmosomas (maculae adherens): Uniones adherentes discoidales localizadas próximas a la membrana basolateral. La región entre las células se conoce como desmoglea, constituido por un material viscoso que sirve como “pegamento” de unión. Las células interactúan entre sí a través de localizaciones puntuales específicas. Se localizan principalmente en epitelios estratificados expuestos a un estrés mecánico fuerte.
- Uniones fuertes (tight junctions): son uniones limitantes (zónula ocluyente). Se localizan próximas a la membrana apical de las células epiteliales, rodeándolas y uniéndolas entre sí estrechamente. Cierran completamente el espacio intercelular, proporcionando una barrera continua impermeable. Permiten el desarrollo de gradientes osmóticos entre la luz y el espacio intersticial. Las proteínas principales que constituyen las tight junction (TJ) son la ocludina, la ZO-1 y la ZO-2.

La ocludina es una proteína transmembrana. Su región externa se dispone formando dos bucles que interactúan con los de la proteína vecina. El dominio citoplasmático se une a las proteínas “zonula ocludens” (ZO-1, ZO-2):

Las TJ se regulan mediante procesos de fosforilación/defosforilación en los que participa la PKC (90). La fosforilación de los residuos de tirosina provoca cambios en la permeabilidad paracelular (91-95).

C. Flora intestinal

El intestino grueso contiene un ecosistema microbiano dinámico y muy complejo, constituido por una alta densidad de bacterias que actúan como línea de resistencia frente a la colonización de microbios exógenos altamente nocivos. El equilibrio entre las bacterias residentes proporciona estabilidad en la población microbiana del individuo. La alteración del mismo permite el sobrecrecimiento de especies potencialmente nocivas como el *Clostridium difficile*, asociado con la colitis pseudomembranosa (96).

La flora intestinal proporciona un efecto de barrera a través de diversos mecanismos. Se ha demostrado, *in vitro*, que las bacterias compiten por los sitios de unión en el borde en cepillo de las células epiteliales intestinales y, que las bacterias no patogénicas previenen la unión y la entrada de las patogénicas a las células (97). Además, las bacterias compiten por los nutrientes, manteniendo el hábitat colectivo mediante la administración y el consumo del material disponible. El huésped proporciona a las bacterias el alimento necesario en la justa medida que lo demandan, de este modo se evita una sobreproducción de nutriente, que podría favorecer la intrusión de competidores microbianos patogénicos para el huésped. Por último, las bacterias tienen capacidad para inhibir el crecimiento de sus competidores patogénicos gracias a la producción de sustancias antimicrobianas llamadas bacteriocinas (98, 99).

2.3 OXIDANTES Y RADICALES LIBRES EN EL INTESTINO

Determinados estados fisiopatológicos vienen acompañados por anomalías en las funciones intestinales. Enfermedades como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, dos de las formas más comunes de enfermedades EII, y la isquemia mesentérica, se caracterizan por un incremento en la permeabilidad mucosa y en la secreción electrolítica junto con un daño celular elevado. La alteración tisular y la disfunción característica de estas enfermedades se debe en parte a la liberación de MORs que se acumulan dentro del intersticio intestinal y cólico en situación de enfermedad (17).

A. Generación de radicales libres

1. La mitocondria es la principal fuente de radicales libres. Este fenómeno se verifica a nivel de la cadena de transporte de electrones, última etapa de la producción de protones de alta energía que, al pasar a través de la membrana interna mitocondrial, genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP. En este proceso de fosforilación oxidativa el O₂ actúa como receptor final de electrones.

En la mitocondria se estima que del oxígeno consumido durante el transporte de electrones el 2-4% no se reduce a agua sino que se forma el anión semiquinona.

Éste puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la consiguiente formación del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$).

El $O_2^{\cdot -}$ se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). A su vez, el H_2O_2 puede reaccionar con el Fe^{2+} de determinados complejos de bajo peso molecular, como el citrato Fe^{2+} o la $ATPFe^{2+}$, generando el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) como producto final y quedando el hierro en su estado oxidado (Fe^{3+}). El reciclaje del Fe^{3+} tiene lugar a través de la generación de O_2 a partir de $O_2^{\cdot -}$. El proceso neto de producción de OH^{\cdot} a partir de $O_2^{\cdot -}$ y de H_2O_2 es la reacción Haber-Weiss en la cual los iones metálicos actúan como catalizadores (100, 101).



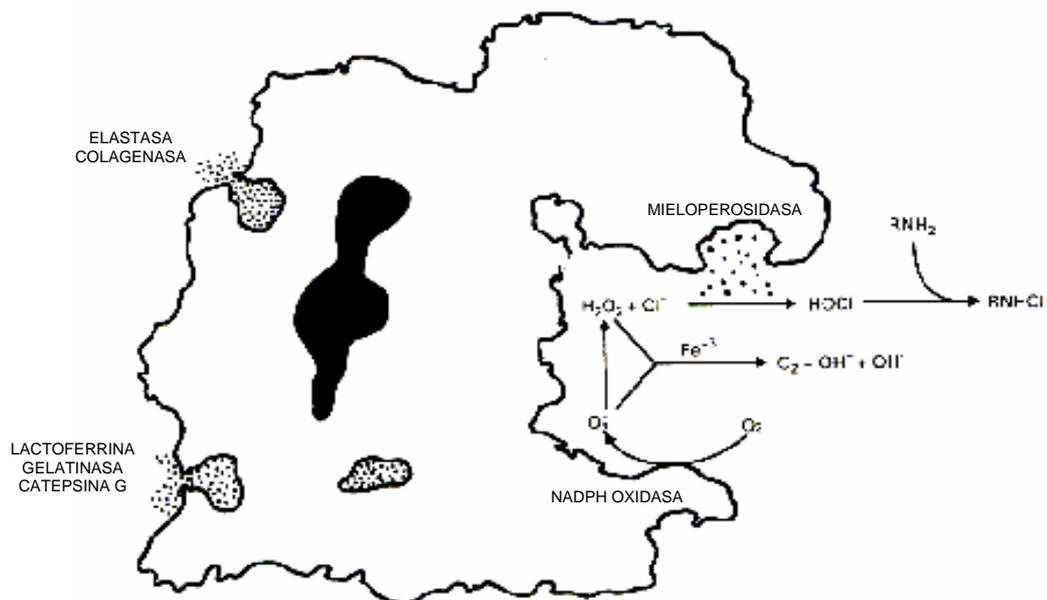
Otras fuentes de $O_2^{\cdot -}$ y de H_2O_2 son las enzimas oxidativas, como la xantina oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas, la acil CoA oxidasa, los citocromos P-450 y pequeñas moléculas autooxidables como las catecolaminas y las quinonas (101, 102).

2. Los peroxisomas son orgánulos citoplasmáticos que contienen una elevada cantidad de peroxidasas. Catalizan reacciones como la hidrólisis de lípidos, en los que el principal subproducto de reacción es el H_2O_2 .

3. En la pared intestinal residen una gran cantidad de fagocitos (incluyendo macrófagos, neutrófilos y eosinófilos) y por tanto una tasa elevada de NADPH oxidasa y mieloperoxidasa. La función principal de los leucocitos es su actividad microbicida que se debe, en gran medida, a la capacidad que tienen para producir radicales libres.

El intestino a su vez es un tejido muy activo metabólicamente, con una elevada producción de ATP. Todo esto indica que el potencial para producir MORs, en condiciones normales, es muy elevado (103).

Durante el transcurso de la migración de neutrófilos, estos fagocitos pueden interactuar con una amplia variedad de agentes proinflamatorios como el LTB₄, PAF, complejos del sistema inmune... resultando en la activación de la NADPH oxidasa [(104)]. La activación de esta flavoproteína supone la producción y liberación de grandes cantidades de O₂⁻ y H₂O₂, también como de oxidantes derivados de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), como son el ácido hipocloroso (HOCl) y las N-cloraminas (RNHCl).



Activación metabólica del neutrófilo para la producción de metabolitos reactivos del oxígeno
(modificada de Conner et al, 1996).

Además de los MORs, los fagocitos activados producen grandes cantidades del radical libre óxido nítrico (NO). Se trata de un metabolito reactivo del nitrógeno (MNR) que puede autooxidarse y reaccionar con O₂, generando otras variedades de óxidos nitrogenados: dióxido de nitrógeno (NO₂), trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) y nitrito (NO₂⁻). El NO₂ y el N₂O₃ son potentes agentes oxidantes y N-nitrosantes.

4. La enzima xantina deshidrogenasa, predominante en los endotelios, normalmente depura las xantinas formando ácido úrico. Cuando pasa a la forma oxidasa en situación de isquemia, por estimulación por Ca^{2+} , etc, se generan elevadas cantidades de O_2^- y H_2O_2 .

5. El hábitat intestinal de un individuo contiene entre 300 y 500 especies bacterianas diferentes (1). Las bacterias anaerobias exceden en número, de 100 a 1000 veces, con respecto a las bacterias aeróbicas (1). Los géneros bacteroides, bifidobacterium, eubacterium, clostridium, peptococcus, peptostreptococcus y ruminococcus son los más abundantes, mientras que aerobios como escherichia, enterobacter, enterococcus, klebsiella, lactobacillus, proteus, etc, son el género menos predominante (2). Aunque las bacterias aeróbicas están en menor proporción, se ha demostrado que algunas contribuyen a la producción de oxidantes en la luz intestinal. El *Enterococcus faecalis* tiene capacidad para producir radicales como O_2^- , H_2O_2 y OH^- (105, 106). Otro tipo bacteriano que contribuye a la formación de MORs es el *Lactobacillus*, que genera H_2O_2 (107).

B. Citotoxicidad de los oxidantes

Los MORs originan lesión tisular por múltiples mecanismos (8). El OH^- oxida grupos sulfhidrilos (-SH) de enzimas esenciales o proteínas transportadoras, lo que supone la inactivación de las mismas. Este radical provoca mutaciones y roturas de cadenas de ADN. La peroxidación lipídica es otra de las alteraciones biológicas causadas por el OH^- . Los ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico, son los más susceptibles de ser atacados por este oxidante. En este momento comienza una reacción en cadena que supone la producción de hidroperóxidos lipídicos que perpetúan el proceso y que a su vez confieren una alteración de la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares (103). El OH^- produce la despolimerización de la mucina que recubre el tracto gastrointestinal, degradando la capa de moco protectora necesaria para el mantenimiento de la función de barrera intestinal (108).

El HClO es un agente oxidante inespecífico con un efecto tóxico de 100 a 1000 veces superior al del O_2^- o el H_2O_2 . La citotoxicidad asociada al HClO se debe a la oxidación de grupos sulfhidriilo, la inactivación de hemoproteínas y citocromos, la

clorinación de las bases púricas de ADN y la degradación tanto de aminoácidos como de proteínas (8).

Los MORs también pueden ser liberados al espacio extracelular donde causan lesiones tisulares por mecanismos diferentes, pudiendo producir la degradación de la matriz extracelular.

De igual modo, se ha demostrado que el NO y las especies derivadas del mismo median daño celular y que originan un incremento en la secreción de Cl⁻ y de H₂O (109).

C. Mecanismos biológicos de defensa

Capa de moco

El carácter hidrofóbico del moco gastrointestinal parece ser un factor crítico en la defensa de la mucosa gastroduodenal (110, 111). La hidrofobicidad de la superficie es atribuible a la capa de moco, constituida por lípidos que recubren todo el epitelio intestinal (112, 113). El papel primordial es la protección frente a múltiples poblaciones bacterianas con alto contenido en toxinas.

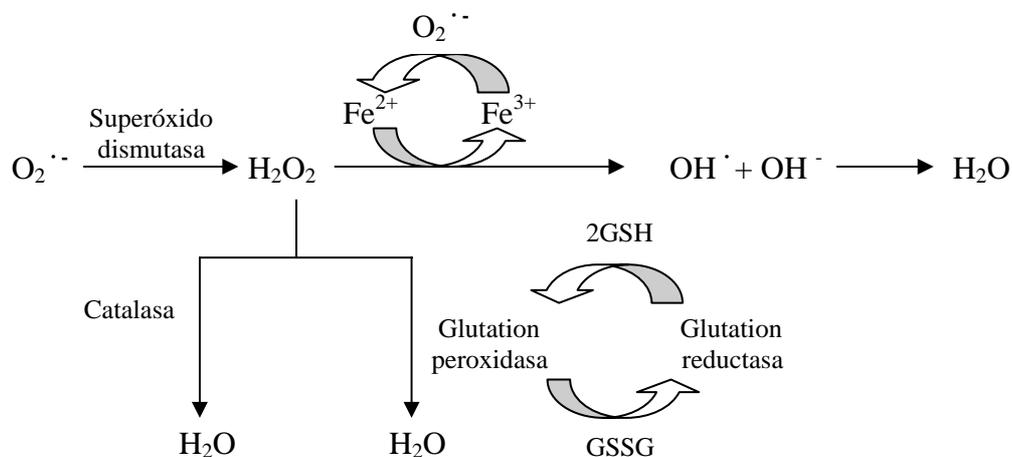
Secreción

El fluido isotónico secretado por las células epiteliales es necesario para favorecer tanto la digestión como la correcta hidratación del epitelio intestinal. A su vez se trata de un mecanismo de defensa, cuyo objetivo es la eliminación de sustancias tóxicas capaces de producir alteraciones estructurales y funcionales. La secreción de Cl⁻ desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis epitelial. Algunos autores proponen que la secreción intestinal y la diarrea, mediada por los MORs, tienen un papel protector, como mecanismo de lavado de la luz intestinal, eliminando así los microorganismos y antígenos allí presentes que favorecen el daño tisular (52).

Defensas específicas

Para prevenir la lesión celular y tisular mediada por los MORs, existe un mecanismo protector intrínseco, constituido por diferentes líneas de defensa antioxidante:

- La primera línea de defensa frente a los MORs está constituida por la acción de enzimas específicas. La superóxido dismutasa (SOD), citosólica (cobre-zinc-dependiente) y mitocondrial (manganeso-dependiente), es responsable de la disminución de los niveles de $O_2^{\cdot-}$. El sistema de glutathion peroxidasa (GPx, selenio-dependiente) y el de catalasa (peroxisómica) son importantes en la regulación de los niveles de H_2O_2 . Otras metaloproteínas como la metalotioneina, aunque no actúan como enzimas, son importantes en la regulación del metabolismo del zinc y del cobre y poseen un elevado potencial para eliminar el OH^{\cdot} (114).



Mecanismo enzimático antioxidante (esquema modificado de Robbins; Mc Graw-Hill Interamericana).

- La segunda línea de defensa está constituida por una amplia variedad de sustancias como la vitamina E, la vitamina C, los carotenoides, el glutathion reducido (GSH), la cisteína, el ácido úrico y la metionina. Se trata de agentes capaces de eliminar los MORs directamente (8, 115).

- Un tercer mecanismo de defensa es la eliminación del hierro y del cobre libre, lo que reduce la capacidad de generación del radical hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss (115).

D. Efecto de los oxidantes sobre las funciones secretora y de barrera intestinal

Los oxidantes derivados de los neutrófilos desempeñan un mecanismo de defensa fundamental frente a los agentes extraños que invaden la luz intestinal, pero por su potente efecto lesivo pueden originar, entre otras cosas, alteraciones a nivel de la función de secreción y de la barrera epitelial. Se sabe que determinados MORs como la monocloramina (NH_2Cl), el H_2O_2 y el HOCl producen cambios fisiopatológicos en la mucosa intestinal, que incluye un incremento en la permeabilidad y la modificación del transporte electrolítico (8-10).

Un síntoma común en la EII es la diarrea, debida en parte a la secreción de fluido y electrolitos, como resultado de una alteración del equilibrio normal de absorción / secreción. Múltiples estudios apuntan a los oxidantes como los causantes de este síntoma debido a su capacidad para modificar la función de secreción, como es el caso de la NH_2Cl , el H_2O_2 , el NO y sus derivados (10, 11, 116).

Uno de los oxidantes más estudiado es el H_2O_2 . Se ha demostrado que este MOR estimula la secreción electrogénica de Cl^- debido a la liberación de neurotransmisores en respuesta a un aumento en los niveles de PGs (10, 52).

Sin embargo, este cambio funcional originado por los oxidantes, no es el único, pues tanto los MORs como los MNRs alteran la permeabilidad del epitelio intestinal (9, 94, 117). El estrés oxidativo está asociado con un incremento en la fosforilación de tirosinas de proteínas celulares, que puede desestabilizar la barrera epitelial y producir su alteración (94). La modificación del residuo desestabiliza uniones adherentes y las uniones fuertes (TJ) en tejido epitelial (91-93).

El H_2O_2 es uno de los oxidantes fisiológicos capaz de producir la fosforilación de las proteínas que conforman los complejos de unión intercelular, lo que se traduce en un descenso de la resistencia transepitelial (RT) y un aumento del flujo pasivo de

iones y solutos a través de la vía paracelular (94). La asociación entre la fosforilación de tirosinas y el incremento en la permeabilidad paracelular inducida por el H₂O₂ puede estar mediada por una modificación en los niveles intracelulares de Ca²⁺ y de ATP que afecta a la permeabilidad epitelial (118, 119).

3. PAPEL DE LOS OXIDANTES EN ENFERMEDADES COMO LA EII Y LA ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

Largos periodos de inflamación, la isquemia y la posterior reperfusión, entre otras, son situaciones características de múltiples enfermedades como la EII o la isquemia mesentérica o incluso durante el transcurso de trasplantes intestinales en los que los periodos de anoxia son elevados. Dichas situaciones pueden conducir a un daño tisular, desembocando en la aparición de complicaciones funcionales (120) donde se ha identificado a la producción masiva de MORs como el principal factor causante (103, 120).

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se caracterizan por inflamación del tracto gastrointestinal, tal que la mucosa presenta un infiltrado denso de células inflamatorias, compuestas principalmente por neutrófilos, macrófagos y linfocitos. La gran habilidad de estas células para sobreproducir MORs y MNRs, como mecanismo de protección, son en parte causantes de la lesión de la mucosa intestinal característica en dichas patologías (12, 121).

Por otro lado, las condiciones de isquemia/reperfusión que tienen lugar durante el transcurso del trasplante intestinal o en el desarrollo de la isquemia mesentérica, contribuyen a la formación elevada de oxidantes. Durante el periodo de isquemia, el consumo de ATP es excesivo lo que conduce a la acumulación de hipoxantina y xantina que, con la consiguiente etapa de repercusión, se metabolizan originando cantidades masivas de O₂⁻ y H₂O₂, lo que favorece la lesión tisular por mecanismo oxidativo (122).

Sabiendo que los oxidantes son los causantes de parte de las lesiones características en múltiples enfermedades intestinales, sería interesante investigar las

repercusiones funcionales del tratamiento con H₂O₂ luminal y valorar el nivel de participación de las enzimas antioxidantes endógenas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno están involucradas en multitud de desórdenes y disfunciones intestinales, incluyendo la EII y la isquemia-reperfusión (12, 122). Los monocitos, eosinófilos y macrófagos de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal generan cantidades de oxidantes mucho más elevadas que las células inflamatorias de individuos sanos (123-125).

La concentración de MORs en la luz intestinal alcanza niveles elevados como consecuencia del metabolismo bacteriano o de la migración de neutrófilos durante el desarrollo de enfermedades como la EII (126). Entre los diferentes oxidantes cabe destacar la importancia del H_2O_2 pues desempeña un papel fundamental en la iniciación y propagación del daño inflamatorio epitelial. Por su carácter oxidante actúa sobre lípidos y grupos tiólicos de enzimas clave, inactivándolas (127). Por su larga vida media y su naturaleza lipofílica, el H_2O_2 atraviesa con relativa facilidad las membranas celulares, pudiendo así alcanzar multitud de tejidos y órganos.

El contacto directo y prolongado de los oxidantes con la mucosa produce cambios en las funciones normales. Es suficientemente conocido que el H_2O_2 estimula la secreción de Cl^- a corto plazo (52, 128) y que afecta a la función de barrera epitelial (9, 94).

Sabiendo que la presencia continua de oxidantes en la luz intestinal induce cambios importantes en las funciones intestinales, cabe pensar que éste órgano debe haber desarrollado un mecanismo de defensa fuertemente especializado. Conocer los efectos del H_2O_2 sobre la secreción y la barrera, identificando los mecanismos por los que afecta a dichas funciones, y el papel que ejercen las defensas antioxidantes endógenas permitiría tener nuevas dianas terapéuticas frente a enfermedades que cursan con episodios inflamatorios prolongados. Por tanto, las hipótesis y los objetivos planteados en este trabajo fueron:

Hipótesis #1.- El H₂O₂ luminal y otros oxidantes relacionados estimulan la secreción de Cl⁻ a través de mediadores neuroendocrinos.

Objetivo 1.- Estudiar el efecto del H₂O₂ luminal sobre la secreción basal.

Objetivo 2.- Investigar el mecanismo por el que se modifica el transporte de Cl⁻.

Hipótesis #2.- La exposición prolongada al H₂O₂ luminal y a otros oxidantes relacionados altera la función de barrera epitelial.

Objetivo 1.- Estudiar el efecto del H₂O₂ luminal sobre la función de barrera epitelial.

Objetivo 2.- Investigar el efecto del óxido de fenilarsina (PAO) y de la cloramina T, ambos luminales, sobre la función de barrera.

Hipótesis #3.- El colon distal debe presentar un mecanismo de defensa enzimático muy especializado frente al H₂O₂.

Objetivo 1.- Investigar la implicación de la catalasa endógena frente a la exposición prolongada al H₂O₂ luminal.

Objetivo 2.- Evaluar la participación de la GPx endógena frente al tratamiento luminal con H₂O₂.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho, nacidas y mantenidas en jaulas en el animalario de la Unidad de Investigación: Medicina y Cirugía Experimentales del Hospital Clínico San Carlos, de acuerdo con el protocolo aprobado por la Comisión de Investigación y notificado a la Sección de Protección de Animales de la Dirección General de Agricultura de la Comunidad de Madrid. Las ratas tuvieron libre acceso a agua y a alimento estándar, y fueron mantenidas bajo condiciones de temperatura, humedad y ciclos de luz-oscuridad controlados. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la normativa legal vigente (Directiva Comunitaria 86/609 y REAL DECRETO 223/1988 de 14 de Marzo sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos – BOE).

Obtención de muestras

Las ratas se sacrificaron con exceso de éter etílico. Por una laparotomía media se accedió a la cavidad abdominal, extrayendo la parte distal del colon que inmediatamente se sumergió en solución tampón (115 mmol/l de NaCl, 2.8 mmol/l de KCl, 1.1 mmol/l de CaCl₂, 1.9 mmol/l de K₂HPO₄, 0.5 mmol/l de KH₂PO₄, 25 mmol/l de NaHCO₃, 0.8 mmol/l de MgSO₄ y 5.2 mmol/l de glucosa) fría y gasificada con una mezcla de O₂/CO₂ al 95/5 % respectivamente. El colon distal se abrió longitudinalmente a lo largo del borde mesentérico y se cortó en pequeñas piezas, que se montaron en cámaras de Ussing modificadas de manera pareada. Las muestras de tejido se colocaron estiradas en el interior de la cámara, quedando la superficie mucosa dispuesta hacia uno de los reservorios y la superficie serosa hacia el otro reservorio de la cámara. En ambos, se añadieron 5 ml de solución tamponada a pH = 7.4, temperatura 37° C y gaseada con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 %.

Estas muestras, así tratadas, se utilizaron para los estudios de electrofisiología, de permeabilidad o de histología.



Cámara de Ussing modificada

Electrofisiología

La célula epitelial está equipada con un gran número de canales iónicos, transportadores y bombas que se organizan de una manera polarizada. El movimiento iónico característico de este tipo celular tiene lugar a través de estos transportadores especializados localizados tanto en la membrana apical como basolateral.

Las células epiteliales se disponen formando una monocapa fuertemente unida, que debido al paso electrogénico de iones genera una diferencia de potencial basal entre ambas membranas apical y basolateral. Las lecturas de potencial normales de estas células son típicamente negativas.

La corriente de cortacircuito (short circuit current, I_{sc}) es la corriente requerida para anular el voltaje del tejido y neutralizar el transporte pasivo de iones. Se trata de una medida del movimiento iónico activo a través de las membranas del epitelio. La resistencia transepitelial (R_T) representa la resistencia del epitelio, que se usa como indicador de la permeabilidad, que incluye la permeabilidad transcelular (a través de las membranas apical y basolateral) y paracelular (a través del espacio intercelular) (129).

Mediante electrodos de Ag-AgCl es posible conectar, a un clamp de voltaje-corriente, las soluciones mucosa y serosa del tejido montado en las cámaras de Ussing (EVC-4000, Voltage-current clamp World Precision Instruments Inc. New Haven, Conn., USA). Esto permite determinar el potencial basal, que denominamos E_0 . Posteriormente, el tejido es cortocircuitado mediante la aplicación de un pulso de corriente, de intensidad conocida ($50 \mu\text{A}$) que denominamos E_{50} . Con estos datos y mediante la aplicación de la ley de Ohm, es posible determinar la RT y la Isc del tejido:

$$\mathbf{RT (\Omega \cdot \text{cm}^2) = (E_0 - E_{50}) \cdot \text{Área} / (I_0 - I_{50}) \quad (\text{En valor absoluto})}$$

$$\mathbf{Isc (\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}) = E_0 / \text{RT} \quad (\text{En valor absoluto})}$$

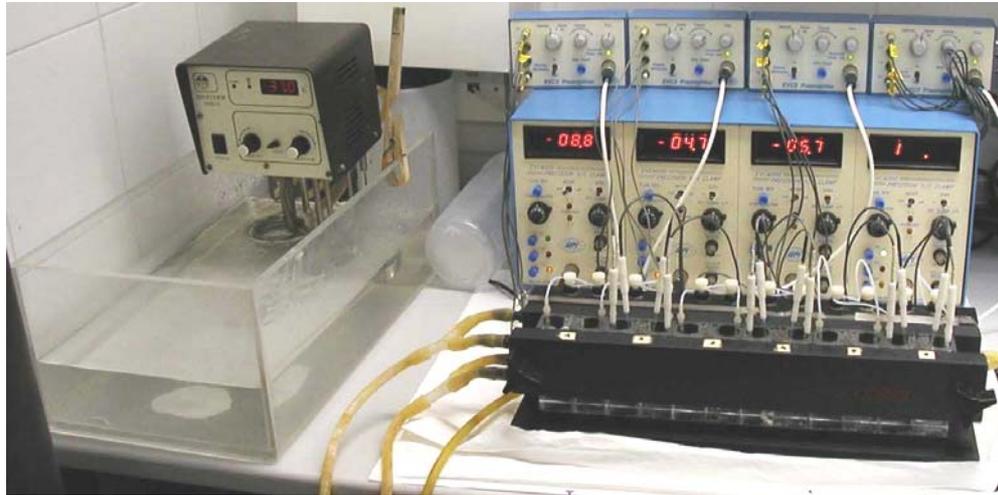
E_0 = Potencial basal

E_{50} = Potencial tras aplicación de una corriente de $50 \mu\text{A}$.

Área = área de tejido expuesto.

I_0 = $0 \mu\text{A}$

I_{50} = $50 \mu\text{A}$



Clamp de voltaje/corriente conectado a las cámaras de Ussing a través de electrodos de Ag-AgCl. El baño mantiene la temperatura a 37°C y la conexión con la bombona de O₂/CO₂ (95%/5%) mantiene las muestras gaseadas.

Tratamiento y estudio del tejido

Las muestras de tejido, montadas en las cámaras de Ussing y mantenidas bajo las condiciones de temperatura y oxigenación óptimas, se manipularon farmacológicamente para estudiar el efecto sobre la RT y/o la I_{sc}. Estas sustancias se añadieron a los reservorios mucoso y/o seroso y se mantuvieron durante el periodo determinado para cada estudio. Durante la incubación se recogieron los valores de E₀ y E₅₀, lo que permitió obtener cinéticas de RT e I_{sc}.

Los agentes utilizados fueron:

Agonistas:

- Forskolina: Activador de la secreción de Cl⁻ a través de la vía del AMPc (130).

Oxidantes

- H_2O_2 : agente oxidante fisiológico.
- Óxido de fenilarsina (PAO): Oxidante de grupos tiólicos e inhibidor de proteínas tirosín fosfatasas (131).
- Cloramina T: Agente oxidante que a pH neutro o ligeramente alcalino oxida residuos de metionina y cisteína (132).

Inhibidores

- Atropina: Bloqueante de los receptores de ACh muscarínicos (133).
- Indometacina: Inhibidor de la síntesis de PGs (134).
- 3-Amino-1,2,4-triazole: Inhibidor específico de la enzima catalasa (135).
- Ácido mercaptosuccínico: Inhibidor de la enzima GPx (136).

Para los estudios de sustitución iónica se utilizó una solución tampón a la que se le sustituyeron las sales de Cl^- (NaCl, KCl, y $CaCl_2$) por cantidades equimoleculares de gluconato de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} .

Estudios de permeabilidad

Los estudios de difusión con moléculas fluorescentes se utilizaron para evaluar el estado de la permeabilidad paracelular del tejido tras diferentes tratamientos. Los marcadores que se utilizaron fueron el isotiocianato de fluoresceína (FITC, de peso molecular = 376.3 Da) y dextrano marcado con fluoresceína (FD4, de peso molecular = 4400 Da) (137).

Tras montar el tejido en las cámaras de Ussing, se añadió el fluoróforo (FITC o FD4, a concentración final 140 μM) al reservorio en contacto con la mucosa. A los 30, 60, 90 y 120 minutos de incubación se recogieron alícuotas de 100 μl de la cámara serosa. Las muestras recogidas se almacenaron en hielo y en oscuridad hasta la determinación de la concentración de fluoróforo. A su vez, se preparó una curva estándar con concentraciones conocidas de FITC o FD4 diluidas en solución tampón que sirvió para correlacionar la medida de fluorescencia con la concentración de

fluoróforo. Las muestras de la curva patrón también se almacenaron en hielo y en oscuridad hasta la lectura de las mismas.

Una vez obtenidas todas las muestras, se cargaron por duplicado en placas de 96 pocillos. La fluorescencia emitida por las muestras se determinó mediante un Lector de Fluorescencia en Microplaca FL600 (BIO-TEK), utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 520 nm. Las medidas de fluorescencia emitida por las muestras de la curva patrón sirvieron para conocer la concentración de fluoróforo de las muestras problema.

La determinación de las concentraciones de FITC o FD4 a los diferentes tiempos de incubación (30, 60 90 y 120 minutos) permitió calcular:

1. El porcentaje de paso del fluoróforo

Este valor nos dio información del porcentaje de fluoróforo que atravesó el tejido respecto de la concentración inicial añadida al reservorio mucoso.

$$\% \text{ paso} = C_b / C_0 \cdot 100$$

C_b = Concentración de fluoróforo en la cámara serosa.

C_0 = Concentración inicial de fluoróforo en la cámara mucosa (140 μ M en nuestro caso).

2. El coeficiente de permeabilidad aparente (Papp)

El valor de Papp nos dio información de la permeabilidad del tejido en un intervalo de tiempo determinado. Su calculo se hizo como se detalla a continuación:

$$\mathbf{Papp} \text{ (cm} \cdot \text{s}^{-1}\text{)} = \text{(dc / dt)} \cdot \mathbf{V} \cdot \mathbf{C}_0^{-1} \cdot \mathbf{A}^{-1}$$

dc/dt = cambio de la concentración serosa de fluoróforo entre el minuto 60 y 120.

V = volumen de la cámara.

C₀ = concentración inicial de fluoróforo en el reservorio mucoso.

A = área de intestino expuesto en la cámara.

Histología

Las muestras de tejido cólico, incubadas en las cámaras de Ussing y tratadas posteriormente, se recogieron y almacenaron en formol al 3.7-4% hasta ser procesadas.

La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera: el tejido se colocó en cassettes para pasarlos a través de un procesador automático de inclusión de tejidos en vacío (Leica ASP 300). Posteriormente, se extrajeron las muestras para incluirlas en bloques de parafina, que permitieron el corte del tejido (con un microtomo Microm HM 325) con un grosor de 5 micras. Los cortes se recogieron en portaobjetos que se pasaron en primer lugar por un montador automático Promounter RCM 2000 (Meisei) y posteriormente por un autoteñidor Tissue Stainer TST 50 (Medite) donde se tiñeron con hematoxilina-eosina.

La valoración de las lesiones originadas por los diferentes tratamientos, realizada por un observador externo (Dr. Luis Ortega Medina), se estandarizó de la siguiente manera:

Extensión de la lesión:

1. Superficial
2. 1/3 de la capa mucosa
3. 2/3 de la capa mucosa
4. toda la capa mucosa

Descamación del epitelio de revestimiento:

1. baja
2. media
3. alta

Inflamación:

1. leve
2. moderada
3. severa

Lesión de las criptas:

1. si
2. no

Determinación de la concentración de H₂O₂

Para determinar la concentración de H₂O₂ final en la cámara de Ussing se siguió el protocolo empleado por el grupo de DuVall y colaboradores (128). Se recogió una alícuota de 500 µl, se diluyó 1:10 y se evaluó. Para ello se tomaron 200 µl de muestra diluida y se mezcló con 800 µl de buffer fosfato potásico a pH 7.0 que contenía 1.5 mM de 4-aminoantipirina, 0.11 M de fenol, 100 µM de alopurinol y 0.005 U/ml de peroxidasa de rábano picante (producto obtenido en Bionova Científica S.L., Madrid). A continuación se midió la absorbancia ($\lambda = 510$ nm) que emitía la muestra utilizando un espectrofotómetro de doble haz Hitachi U-2000. Para correlacionar la medida de absorbancia con la concentración de H₂O₂, se preparó una curva patrón con muestras de H₂O₂ a concentraciones conocidas, que se trataron siguiendo el mismo protocolo empleado para las muestras problema.

Determinación de la concentración de GSH intracelular

Las muestras incubadas en las cámaras de Ussing y tratadas se recogieron, para determinar la concentración intracelular de GSH. Se siguió el protocolo recomendado por el kit comercial de Calbiochem (facilitado por Bionova Científica S.L., Madrid)

para la determinación de GSH. El tejido obtenido se perfundió con NaCl (0.9%) que contenía heparina (0.16 mg/ml). Se lavó con NaCl (0.9%) frío y se secó con un papel absorbente. A continuación se pesó, y se homogeneizó, con un homogenizador de tejidos de vidrio, en ácido metafosfórico al 5% a una concentración final de 5% en peso/volumen. Posteriormente se centrifugó a 4900 rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante donde se determinó la concentración de GSH.

Determinación de la concentración de proteína total (Método de Bradford)

La concentración de proteínas del tejido homogeneizado se determinó en los pellets obtenidos tras la centrifugación, debido a que el medio ácido que proporcionó el ácido metafosfórico hizo que las proteínas precipitaran y no quedaran en el sobrenadante. Por ello se resuspendieron los pellets en 200 µl de NaOH 1N.

Para determinar la concentración de proteína total se diluyeron las muestras 1:100 en NaOH 1 N y se valoraron por el método de Bradford, siguiendo el protocolo de referencia del reactivo de Bradford obtenido en Sigma-Aldrich Química S.A. En una placa de 96 pocillos se añadieron 5 µl de muestra + 150 µl de reactivo de Bradford. Las muestras se cargaron en la placa por duplicado. Tras 15 minutos de incubación (tiempo suficiente para que se estabilizase el color) se midió la absorbancia emitida a $\lambda = 620$ nm en un espectrofotómetro de microplacas Seac Sirio S. Para correlacionar los valores de absorbancias con concentración de proteína, se preparó una curva estándar con seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas. Las muestras de la curva se cargaron igualmente en la placa y se procesaron siguiendo el mismo protocolo que se empleó para las muestras problema.

Determinación de la actividad de catalasa

Las muestras incubadas en las cámaras de Ussing y tratadas, se recogieron para determinar la actividad de catalasa endógena, siguiendo el protocolo detallado por Ellerby y Bredesen (138). El tejido recogido se perfundió con NaCl 0.9% que contenía heparina 0.16mg/ml, se lavó con Tris-HCl 20 mM frío, pH 7.4 y se secó con un papel absorbente, para posteriormente pesarlo. A continuación se homogeneizó, con un

homogenizador de tejidos de vidrio, en Tris-HCl 20 mM frío pH 7.4 a una concentración final de 10% en peso/volumen. Se centrifugó a 3000g, durante 10 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante donde se determinó la actividad de catalasa y la concentración de proteína total por el método de Bradford.

La actividad de los extractos fue monitorizada en función de la desaparición de H₂O₂ a 240 nm. Se preparó una solución stock de tampón fosfato potásico (25 ml tampón fosfato potásico 0.05M pH 7.0 + 85 µl de H₂O₂ 30% (v/v)). La solución del ensayo se preparó en una cubeta donde se mezcló 0.90 ml de tampón fosfato potásico 0.05M pH 7.0 con 0.45 ml de solución stock y 30 µl del extracto crudo. El cambio de absorbancia a 240 nm se monitorizó durante 3 minutos, donde se calculó la actividad de la enzima catalasa asumiendo que 1 unidad de actividad enzimática se correlacionaba con la degradación de 1 µmol/min de H₂O₂ (cantidad determinada a partir de una curva patrón de concentraciones conocidas de H₂O₂). La actividad de catalasa se corrigió respecto de la concentración de proteína total en el sobrenadante (diluido 1:10) por el método de Bradford anteriormente explicado.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados se obtuvieron de Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, excepto algunos suministrados por otros proveedores que se han especificado previamente.

Estadística

Los resultados fueron presentados como la media \pm el error estándar de la media. Las comparaciones estadísticas se hicieron siguiendo el test de la t de Student y el test de ANOVA para muestras repetidas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de p era inferior a 0.05.

RESULTADOS

1. Validación del método

La corriente de cortacircuito (Isc) se considera un indicador de la secreción electrogénica de Cl^- en diferentes modelos experimentales como la línea celular T₈₄ (139), la mucosa/submucosa cólica de rata (10) o el epitelio cólico humano (140). Sin embargo, hasta ahora no existen datos que demuestren esta correlación en nuestro modelo experimental (colon distal de rata intacto), por lo que fue necesario validar el modelo. Para ello, se estudió la evolución de la Isc (basal y estimulada) en un medio en ausencia de Cl^- .

Para evaluar la Isc basal se montaron las piezas de colon distal de rata en las cámaras de Ussing y se dejaron estabilizar durante 10 minutos en solución tampón. Posteriormente se eliminó la solución de ambos reservorios (mucoso y seroso) y se añadió una nueva solución tampón modificada, donde el Cl^- se había sustituido por un ión no transportable (gluconato). La ausencia del anión del medio provocó un descenso muy rápido y acusado de la Isc basal (figura 1a). Tras 5 minutos del cambio de tampón, la Isc disminuyó hasta alcanzar un valor de $22.0 \pm 7.3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) frente al valor de las muestras control (con Cl^-) que permanecía en $60.5 \pm 12.2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$; $p = 0.022$).

El descenso de la Isc fue consecuencia de un aumento importante en el valor de E_{50} (tabla I), lo que supuso un incremento muy acusado de la RT (figura 1b).

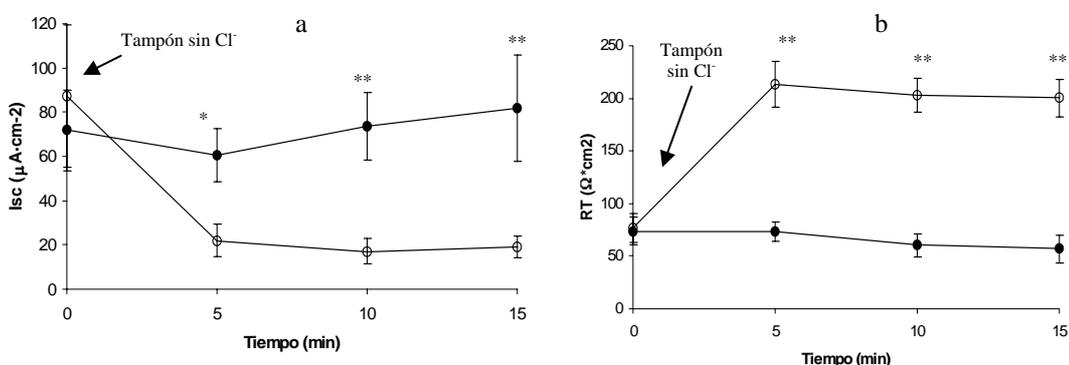


Figura 1.- Valores de Isc (a) y de RT (b) de muestras incubadas apical y basolateralmente en solución tampón sin Cl^- (○) ($n = 6$) o solución tampón normal con Cl^- (●) ($n = 6$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

	Control (n = 6)	Sin Cl ⁻ (n = 6)	p
E₀ (mV)	-4.5 ± 1.3	-4.0 ± 1.4	NS
E₅₀ (mV)	1.2 ± 1.0	12.7 ± 1.9	< 0.001**
Isc (μA·cm⁻²)	60.5 ± 12.2	22.0 ± 7.3	0.022*
RT (Ω·cm²)	73.6 ± 8.9	213.3 ± 21.6	< 0.001**

Tabla I.- Valores de E₀, E₅₀, Isc y RT tras 5 minutos de incubación apical y basolateral con solución tampón sin Cl⁻ frente al control en solución tampón normal con Cl⁻. Los valores corresponden a la media ± SEM (*p < 0.05; **p < 0.01).

A continuación se evaluó el efecto de la ausencia de Cl⁻ en la Isc estimulada por forskolina, un potente activador de la secreción de Cl⁻ a través de la vía del AMPc por acción directa sobre la enzima adenilato ciclasa (AC). Se montaron las muestras de colon distal en las cámaras de Ussing. Tras 10 minutos de estabilización se sustituyó la solución tampón normal, de ambos reservorios, por solución con gluconato, y se mantuvo durante 15 minutos. Finalmente se añadió forskolina al reservorio mucoso a concentración final 10 μM. La adición del activador apenas modificó la Isc, en comparación con el incremento que se observó en las muestras control (incubadas en presencia de Cl⁻) (figura 2). El ΔIsc de las muestras sin Cl⁻ fue de 17.1 ± 2.5 μA·cm⁻² frente a 67.7 ± 13.8 μA·cm⁻² de los controles con Cl⁻ (n = 4; p = 0.011).

La ausencia de Cl⁻ del medio ocasionó, en el colon distal intacto de la rata, un descenso de la Isc basal junto con una respuesta leve a forskolina. El ΔIsc, tras 10 minutos de la adición del agonista a las muestras sin Cl⁻, sólo llegó al 25 ± 4 % respecto de las muestras con Cl⁻, por tanto la respuesta al agonista del AMPc se redujo aproximadamente un 75%. Este resultado sugiere que el valor de Isc refleja mayoritariamente el transporte vectorial de Cl⁻.

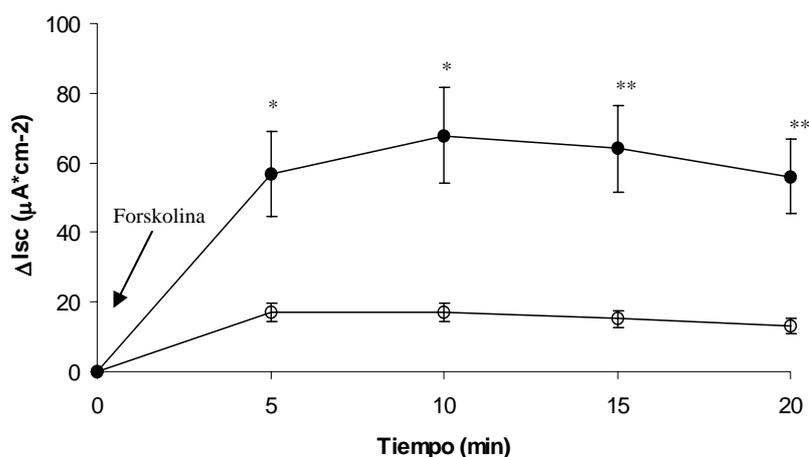


Figura 2.- Incremento de Isc tras la adición de forskolina 10 μM al reservorio mucoso en muestras incubadas apical y basolateralmente en solución tampón sin Cl^- (○) ($n = 4$) frente a muestras control incubadas apical y basolateralmente en solución tampón con Cl^- (●) ($n = 4$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

2. Efecto de los oxidantes sobre la secreción basal.

Tras validar el método procedimos a estudiar el efecto del H_2O_2 sobre la secreción electrogénica de Cl^- en el colon distal intacto de la rata. El tratamiento de la mucosa cólica con el oxidante se efectuaría a través de su vertiente luminal. Seleccionamos una dosis elevada de H_2O_2 (10 mM) para conseguir que en la proximidad de las células epiteliales se alcance una concentración alta de oxidante después de haber atravesado la capa protectora de moco.

Para ello, las muestras de tejido se montaron en las cámaras de Ussing, se dejaron estabilizar en solución tampón durante 10 minutos y se les añadió H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso. Como se puede observar en la figura 3, la adición del oxidante produjo un incremento transitorio de la Isc basal, con un pico máximo a los 5 minutos. El ΔIsc de las muestras tratadas con H_2O_2 fue $33.4 \pm 9.0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 6$) a diferencia del valor de las muestras control (sin H_2O_2) que fue $-6.5 \pm 6.2 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 5$; $p = 0.007$).

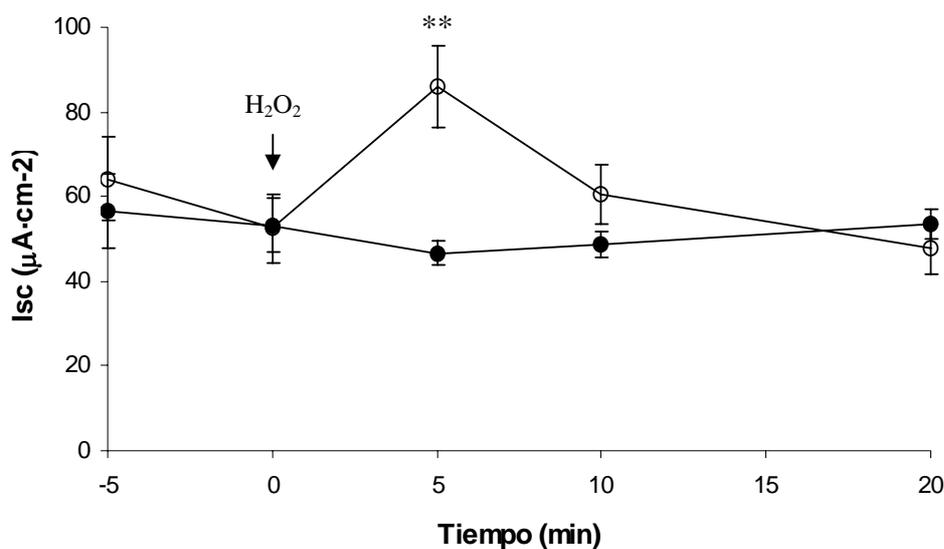


Figura 3.- Isc basal de muestras tratadas apicalmente con H₂O₂ 10 mM (○) (n = 6) frente a muestras control incubadas en solución tampón (●) (n = 5). Los valores corresponden a la media ± SEM (**p < 0.01).

El aumento en el valor de Isc fue consecuencia de un incremento (en valor absoluto) de la E₀. La RT no sufrió cambios significativos con respecto al control (tabla II).

	Control (n = 5)	H ₂ O ₂ (n = 6)	p
ΔE_0 (mV)	0.5 ± 0.2	-2.5 ± 0.9	0.015*
RT ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	100.2 ± 14.9	104.9 ± 14.2	NS

Tabla II.- Valores de E₀ y RT tras 5 minutos de la adición de H₂O₂ 10 mM apical frente a muestras control en solución tampón. Los valores corresponden a la media ± SEM (*p < 0.05).

A continuación evaluamos si el incremento de Isc mediado por el H₂O₂ era consecuencia de la estimulación del transporte de Cl⁻. Para ello se montó tejido cólico en las cámaras de Ussing y se incubó durante 10 minutos en solución tampón.

Posteriormente, se eliminó la solución de ambos reservorios y se sustituyó por solución tampón modificada (sustitución de Cl^- por gluconato). Tras 15 minutos de incubación, se añadió H_2O_2 al reservorio mucoso a concentración final 10 mM. El pico de secreción inducido por el H_2O_2 en las muestras control (con Cl^-) no apareció en las muestras bañadas por solución tampón sin Cl^- (figura 4). El ΔIsc sólo fue un 4.0 ± 2.4 % respecto del control con Cl^- ($n = 6$; $p = 0.001$). La falta de respuesta tras la adición apical del H_2O_2 fue consecuencia de la ausencia de Cl^- en el medio y no debido a la interacción química entre el oxidante y el gluconato de la solución tampón utilizada para el experimento.

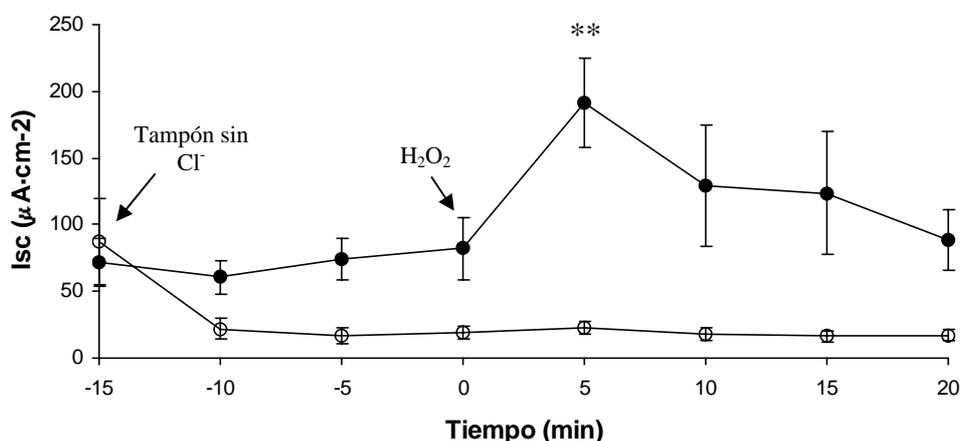


Figura 4.- Isc basal de muestras incubadas en solución tampón normal (●) ($n = 6$) o solución tampón sin Cl^- (○) ($n = 6$) durante 15 minutos. Ambas posteriormente tratadas con H_2O_2 10 mM apical. Los valores corresponden a la media \pm SEM (** $p < 0.01$)

El H_2O_2 luminal estimulaba la secreción de Cl^- en el colon distal intacto de la rata. Para conocer si este efecto era dosis-dependiente se evaluó el comportamiento del tejido tras el tratamiento con diferentes concentraciones de H_2O_2 , manteniendo siempre las mismas condiciones experimentales. Las dosis de H_2O_2 que se utilizaron fueron 5 mM, 7.5 mM, 8.75 mM, 10 mM y 15 mM. El resultado del tratamiento mostró que el tejido respondía ante el H_2O_2 con una magnitud de Isc diferente según la concentración de oxidante utilizada (figura 5). A dosis menores la secreción

incrementaba a medida que aumentábamos la cantidad de H_2O_2 , mientras que a concentraciones mayores, el pico de secreción fue decayendo.

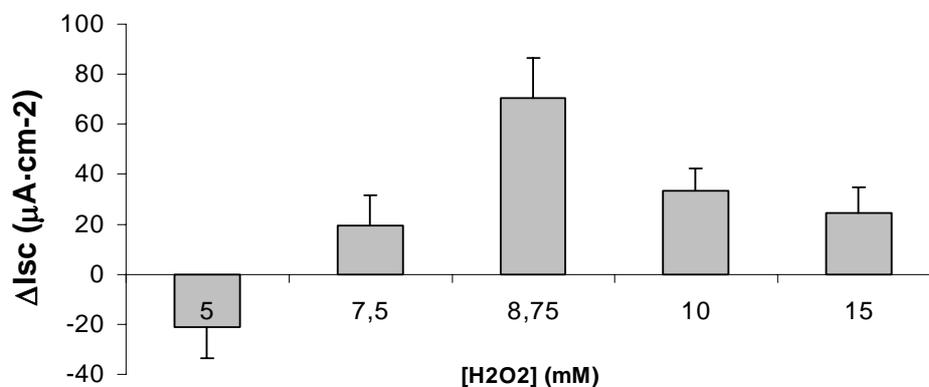


Figura 5.- Valores de ΔIsc a los 5 minutos de la adición apical de diferentes concentraciones de H_2O_2 (valores de $n \geq 3$). Los valores corresponden a la media \pm SEM.

Una vez confirmado que el H_2O_2 , en contacto con la superficie apical de la mucosa cólica, estimulaba la secreción electrogénica de Cl^- , se procedió a estudiar el comportamiento de este tejido frente a otros agentes con actividad oxidante. Para ello se realizaron experimentos similares utilizando PAO y cloramina T (agentes oxidantes no fisiológicos). Existen evidencias de que el PAO oxida residuos de cisteína (141), al igual que el H_2O_2 (142), frente a la cloramina T que oxida inespecíficamente tanto residuos de cisteína como de metionina (132).

Siguiendo el mismo protocolo utilizado para el H_2O_2 , se estudió el efecto del PAO. Las muestras de colon distal de rata se montaron en las cámaras de Ussing y se dejaron durante 10 minutos en solución tampón para su estabilización. Posteriormente, se añadió PAO al reservorio mucoso, alcanzando una concentración final de 0.2 mM. La adición de PAO provocó un aumento transitorio de la Isc basal (figura 6). Tras 5 minutos de la adición del PAO, el ΔIsc fue $58.2 \pm 15.9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ ($n = 10$) frente a $5.3 \pm 3.1 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ del control sin oxidante ($n = 10$; $p = 0.004$).

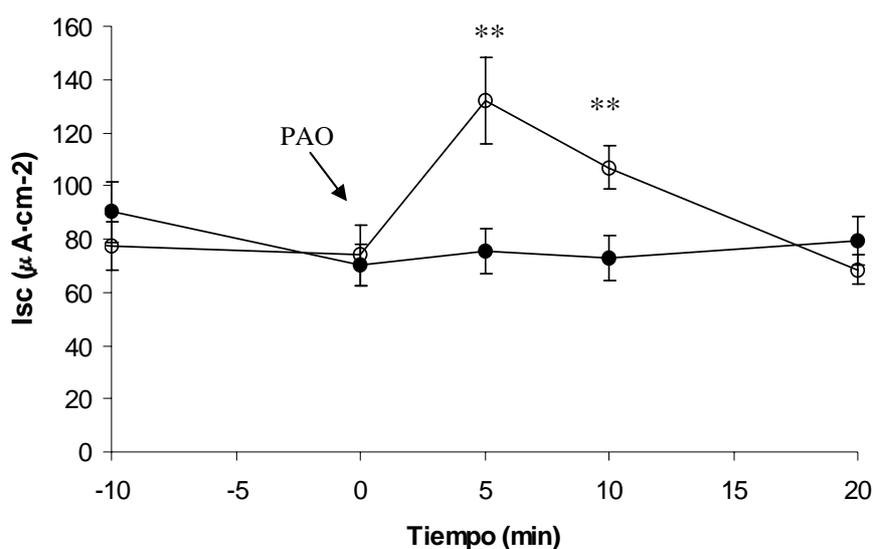


Figura 6. – Isc basal de muestras incubadas apicalmente con PAO 0.2 mM (○) (n = 10) frente a muestras control incubadas apical y basolateralmente en solución tampón (●) (n = 10). Los valores corresponden a la media \pm SEM (**p < 0.01).

El aumento transitorio de la Isc basal fue consecuencia de una modificación significativa del valor de E_0 que se hizo más negativo. La activación de la conductancia de las membranas apical y basolateral se reflejó en un descenso leve de la RT que no alcanzó la significación estadística. El desplazamiento de E_0 y E_{50} hacia valores más negativos, manteniendo la diferencia entre ambos, fue la causa de que la modificación de la RT no llegara a ser significativa (tabla III).

	Control (n = 10)	PAO (n = 10)	p
ΔE_0 (mV)	0.2 ± 0.2	-3.0 ± 0.8	0.001**
ΔE_{50} (mV)	-0.5 ± 0.3	-4.5 ± 1.2	0.005**
ΔRT ($\Omega \cdot \text{cm}^2$)	-9.5 ± 3.3	-19.3 ± 6.6	NS

Tabla III.- Valores de ΔE_0 , ΔE_{50} y ΔRT tras 5 minutos de la adición de PAO 0.2 mM apical frente a muestras control incubadas apical y basolateralmente en solución tampón. Los valores corresponden a la media \pm SEM (**p < 0.01).

De nuevo, siguiendo el mismo protocolo, se estudió el efecto de la cloramina T sobre la Isc basal. Se colocó el tejido en las cámaras, se dejó estabilizar 10 minutos y se añadió cloramina T (5mM) al reservorio mucoso. El tejido respondió con un aumento transitorio de la Isc basal. Tras 5 minutos, el ΔI_{sc} fue $113.6 \pm 29.6 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 4$) frente al control sin cloramina T que fue $6.1 \pm 3.1 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 4$; $p = 0.007^{**}$) (figura 7).

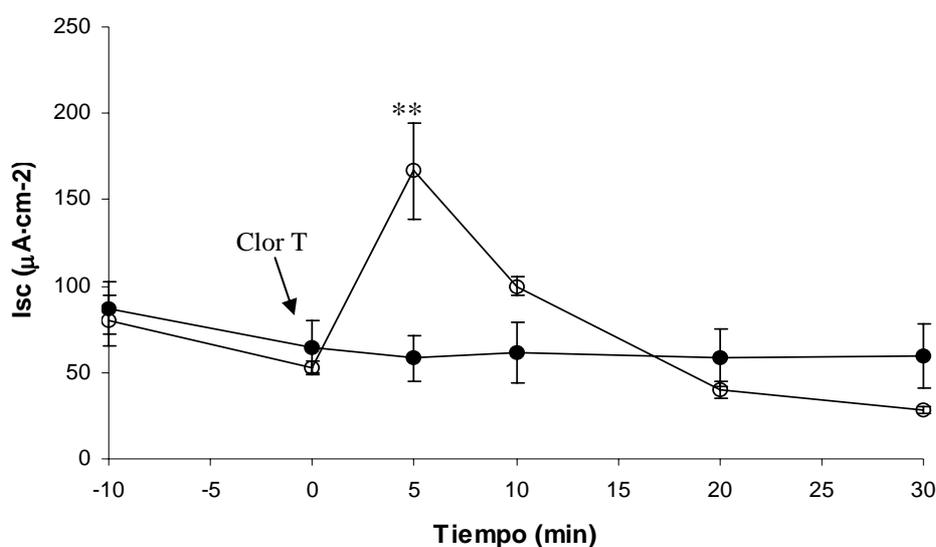


Figura 7.- Isc basal de tejido expuesto apicalmente a cloramina T 5 mM (●) ($n = 4$) frente al control incubado apical y basolateralmente en solución tampón (○) ($n = 4$). Los valores corresponden a la media \pm SEM (** $p < 0.01$).

Una vez conocido el comportamiento del colon distal intacto de la rata, en cuanto a secreción, tras el tratamiento luminal con diferentes agentes oxidantes (H_2O_2 , PAO y cloramina T), estudiamos el mecanismo implicado en el aumento de la Isc observado. Trabajos previos habían demostrado que el H_2O_2 basolateral produce un incremento bifásico de la Isc en mucosa/submucosa de rata como consecuencia de un aumento en la síntesis de PGs y la liberación de neurotransmisores como la ACh (52). Por tanto, nos planteamos evaluar la posible implicación de ambos mediadores (PGs y ACh) en la respuesta observada en nuestro modelo experimental.

Para estudiar si las PGs estaban involucradas en la secreción estimulada por el H_2O_2 en nuestro modelo experimental, utilizamos un inhibidor de la síntesis de las mismas y posteriormente evaluamos la respuesta del tejido al tratamiento con H_2O_2 . El protocolo de trabajo fue el siguiente: se incubaron muestras de colon distal de rata en solución tampón durante 10 minutos, se añadió indometacina ($2 \mu M$) (inhibidor de la enzima encargada de la síntesis de PGs, la ciclooxigenasa (134) a ambos reservorios (mucoso y seroso), se mantuvo durante 10 minutos y finalmente se añadió H_2O_2 ($10mM$) al reservorio mucoso. El resultado del experimento mostró que el tejido tratado con indometacina respondía al H_2O_2 con un incremento de la Isc basal, incluso ligeramente superior al incremento del control no expuesto al inhibidor (figura 8). El ΔI_{sc} de las muestras incubadas con indometacina fue $63.9 \pm 11.0 \mu A \cdot cm^{-2}$ ($n = 9$) frente a $37.4 \pm 9.3 \mu A \cdot cm^{-2}$ de las muestras control sin indometacina ($n = 9$; $p = NS$).

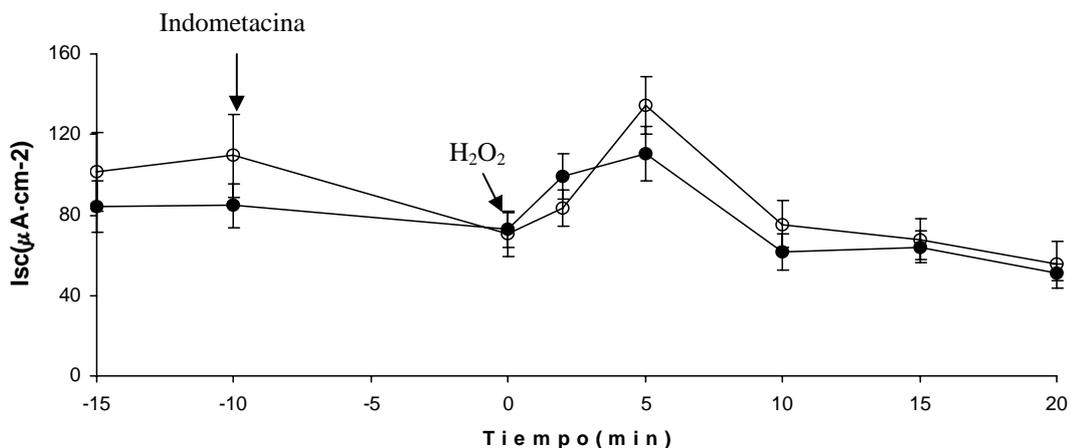


Figura 8.- Isc estimulada por H_2O_2 10 mM apical en muestras preincubadas 10 minutos y mantenidas en presencia de indometacina $2 \mu M$ apical y basolateral (●) ($n = 9$) frente a muestras incubadas apical y basolateralmente en solución tampón (●) ($n = 9$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($p = NS$).

El incremento de la concentración de indometacina ($10 \mu M$) y del tiempo de preincubación con la misma (30 minutos) no impidieron que el tejido cólico respondiera a H_2O_2 con un aumento en la Isc basal (figura 9). La respuesta en la secreción estimulada por el H_2O_2 no sufrió cambios significativos. El incremento de la

Isc de muestras tratadas con indometacina fue de un 90.2 ± 14.5 % respecto del control sin indometacina ($n = 3$; $p = \text{NS}$). Por tanto, estos resultados sugieren que la síntesis de PGs no estaba involucrada en la respuesta al H_2O_2 .

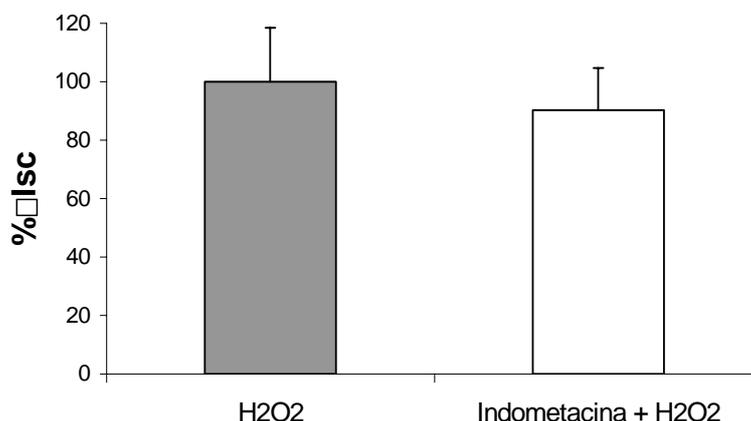


Figura 9.- % Δ Isc estimulado por H_2O_2 10 mM apical de muestras preincubadas durante 30 minutos y mantenidas en presencia de indometacina 10 μM apical y basolateral (\square) ($n = 3$) frente a muestras en solución tampón (\blacksquare) ($n = 3$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($p = \text{NS}$).

A continuación estudiamos la implicación de la ACh en la secreción estimulada por el H_2O_2 . Para evaluar el posible papel de dicho neurotransmisor se utilizó un inhibidor de los receptores de ACh muscarínicos, la atropina (133) y posteriormente se estudió el efecto del H_2O_2 luminal. El protocolo que se siguió fue: se montaron las muestras y se dejaron en solución tampón durante 10 minutos para su estabilización, se añadió atropina a ambos reservorios de la cámara, a concentración final 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y tras 10 minutos de incubación se añadió H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso. Como se muestra en la figura 10, la incubación con atropina inhibió el pico de secreción estimulado por el H_2O_2 . Las muestras tratadas con atropina presentaron un Δ Isc de $-1.3 \pm 8.6 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ en respuesta al H_2O_2 ($n = 6$) frente a $55.2 \pm 13.7 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ en las muestras control sin atropina ($n = 6$; $p = 0.006$).

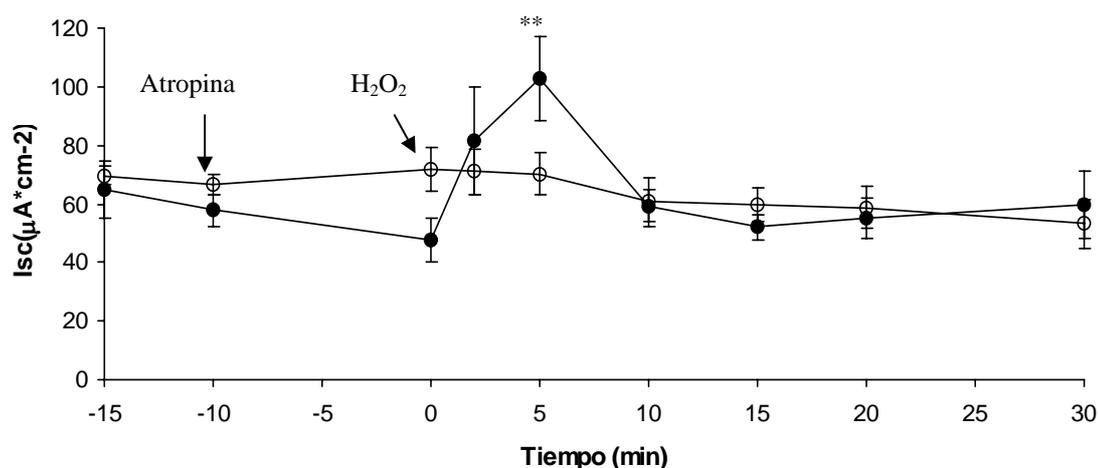


Figura 10.- I_{sc} estimulada por H₂O₂ 10 mM apical en muestras preincubadas, durante 10 minutos, y mantenidas con atropina 1 μg/ml apical y basolateral (○) (n = 6) frente a muestras incubadas con solución tampón (●) (n = 6). Los valores corresponden a la media ± SEM. (**p < 0.01).

La ausencia del pico de secreción característico tras el tratamiento con H₂O₂ luminal podría deberse a una alteración en la barrera intestinal producida por la atropina. Sin embargo el tratamiento con este inhibidor durante los 10 minutos de preincubación no modificó la RT del tejido (tabla IV).

	RT (Ω·cm ²)	n	p
Control	87.3 ± 7.1	6	NS
Atropina	83.7 ± 7.6	6	

Tabla IV.- RT tras 10 minutos de incubación con atropina 1 μg/ml apical + basolateral frente a muestras incubadas apical y basolateralmente en solución tampón. Los valores corresponden a la media ± SEM.

Una vez conocido el papel que desempeñaban las PGs y la ACh en la respuesta mediada por el H₂O₂, evaluamos la implicación de ambos en la secreción estimulada

por los agentes oxidantes no fisiológicos utilizados anteriormente (PAO y cloramina T).

Para analizar la participación de ambos mediadores (PGs y ACh), en el efecto generado por el PAO, se siguió el mismo protocolo que se utilizó en los experimentos con H_2O_2 (incubación previa y mantenimiento de indometacina o atropina y adición de PAO al reservorio mucoso). Al igual que había ocurrido para el H_2O_2 , la secreción estimulada por el PAO sólo se vio afectada por el tratamiento del tejido con atropina (figura 11).

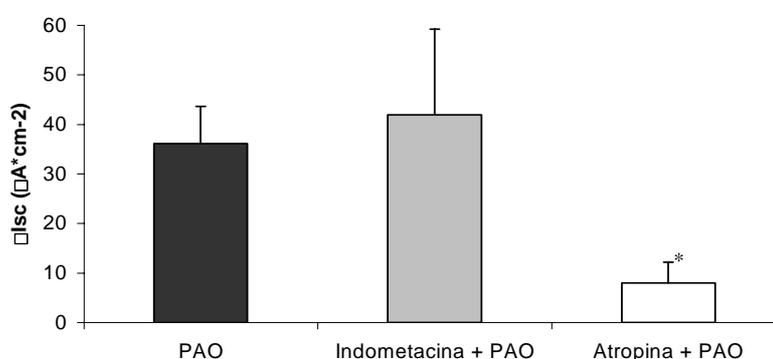


Figura 11.- ΔI_{sc} tras la adición de PAO 0.2 mM apical en muestras preincubadas y mantenidas en presencia de indometacina 1 μ M apical + basolateral o de atropina 1 μ g/ml apical + basolateral frente a muestras control en solución tampón. Los valores corresponden a la media \pm SEM. (* $p < 0.05$ entre muestras tratadas con atropina y muestras control).

Sabiendo que el único mediador implicado en la secreción estimulada por H_2O_2 y PAO era la ACh, se evaluó su papel en la respuesta mediada por la cloramina T. Se siguió el mismo protocolo empleado en el estudio de la implicación de ACh en respuesta al H_2O_2 y al PAO. De nuevo, el bloqueo de los receptores de ACh con atropina inhibió el pico secreción (figura 12). Las muestras tratadas con atropina tuvieron un ΔI_{sc} de $17.5 \pm 4.9 \mu A \cdot cm^{-2}$ en respuesta a cloramina T ($n = 8$) frente a $91.9 \pm 17.0 \mu A \cdot cm^{-2}$ que tuvieron los controles sin atropina ($n = 8$; $p < 0.001$).

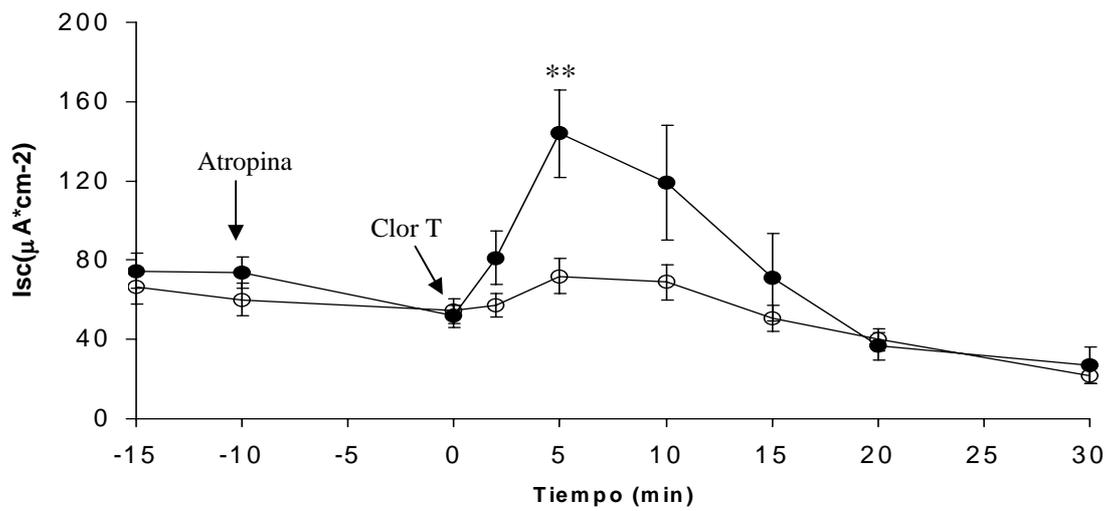


Figura 12.- Isc estimulada por cloramina T 5 mM de muestras preincubadas durante 10 minutos y mantenidas en presencia de atropina 1 μg/ml apical y basolateral (●) (n = 8) frente a muestras en solución tampón (●) (n = 8). Los valores corresponden a la media ± SEM. (**p < 0.01).

3. Efecto de los oxidantes sobre la función de barrera intestinal.

A pesar de la utilización de una concentración elevada de H_2O_2 luminal en los estudios de secreción, no se observó un cambio significativo en la RT del tejido tras los tiempos de incubación utilizados. Se sabe que el H_2O_2 apical a esa dosis genera una alteración en la permeabilidad intestinal tanto en ileon de rata (9) como en línea celular Caco-2 (94). Sin embargo, esta concentración no originó cambios en la RT de nuestro modelo experimental. Quizás, el tiempo de exposición fue demasiado corto como para observar un efecto sobre la función de barrera. Por ello, se aumentó el periodo de incubación hasta 120 minutos y se evaluó la evolución de la RT.

La metodología que empleamos fue la misma que se siguió en los experimentos de secreción, a diferencia del tiempo de incubación con el oxidante: las muestras de tejido se montaron en las cámaras de Ussing, se mantuvieron en solución tampón durante 10 minutos, se añadió H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso y se incubó durante un periodo de 120 minutos. Los valores de RT, descendieron de manera leve durante el tiempo de exposición, sin llegar a alcanzar la significación (figura 13). A los 120 minutos de incubación, la RT tenía un valor del 71.1 ± 9.8 % respecto del control sin H_2O_2 ($n = 8$; $p = NS$). La modificación de la RT fue muy poco notable a pesar de la elevada concentración de H_2O_2 utilizado.

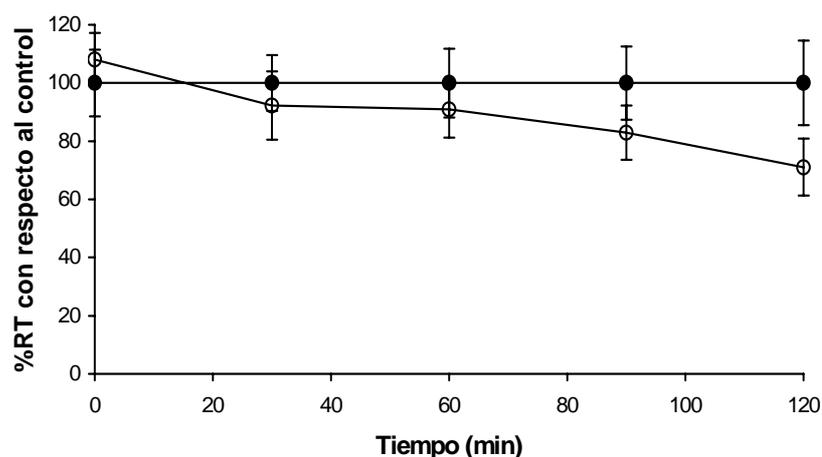


Figura 13.- %RT con respecto al control, en solución tampón (●) ($n = 8$), de muestras incubadas apicalmente con H_2O_2 10mM (○) ($n = 8$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($p = NS$).

Nos servimos de los estudios de difusión de FITC (376.3 Da de peso molecular) con el fin de conocer las modificaciones en la permeabilidad paracelular inducidas por el tratamiento con H_2O_2 . Para ello se montaron las muestras de tejido cólico en las cámaras de Ussing, dejándose estabilizar durante 10 minutos en solución tampón y se añadió FITC (concentración final $140 \mu\text{M}$) y H_2O_2 (concentración final 10mM) ambos al reservorio mucoso. Tras periodos de 30 minutos, se recogieron alícuotas del reservorio seroso y se determinó la concentración de FITC en cada caso. Esto permitió conocer el porcentaje de FITC que atravesó el tejido (% paso FITC) y el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}).

Como se puede observar en la figura 14, el tratamiento apical con H_2O_2 10mM no aumentó la permeabilidad a FITC con respecto al control sin H_2O_2 .

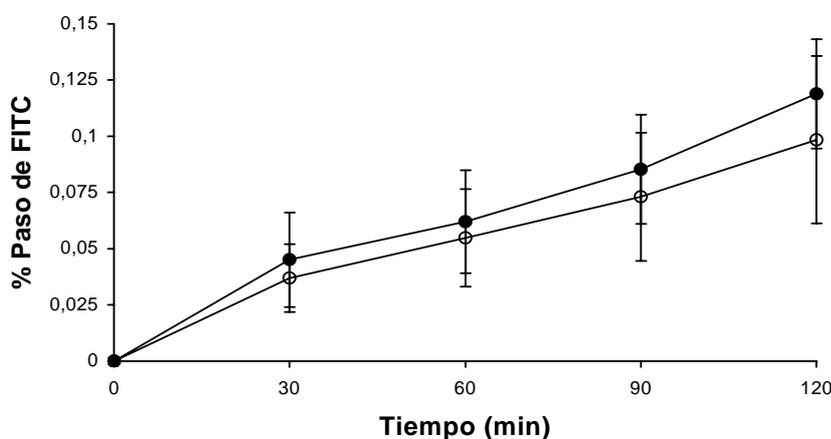


Figura 14.- Porcentaje de la concentración de FITC recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración de FITC añadida inicialmente al reservorio mucoso de muestras en presencia apical de H_2O_2 10mM (○) ($n = 6$) frente a muestras control en presencia de solución tampón (●) ($n = 6$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($p = \text{NS}$).

El valor de Papp no presentó cambios significativos con respecto al control sin H₂O₂ (Tabla V).

	Papp (cm·sg⁻¹)	n	p
Control	$1,24 \cdot 10^{-6} \pm 0,16 \cdot 10^{-6}$	6	NS
H₂O₂ 10 mM	$0,95 \cdot 10^{-6} \pm 0,35 \cdot 10^{-6}$	6	

Tabla V.- Coeficientes de permeabilidad aparente para el paso de FITC desde el reservorio mucoso al seroso. Los valores corresponden a la media \pm SEM.

Tras conocer que el H₂O₂ a esa dosis no producía cambios significativos en la RT y en la permeabilidad paracelular, nos planteamos estudiar, a nivel microscópico, el tejido expuesto apicalmente a H₂O₂ (10 mM) durante 120 minutos y así poder evaluar si existían alteraciones estructurales inducidas por el tratamiento, que no tuvieran traducción funcional.

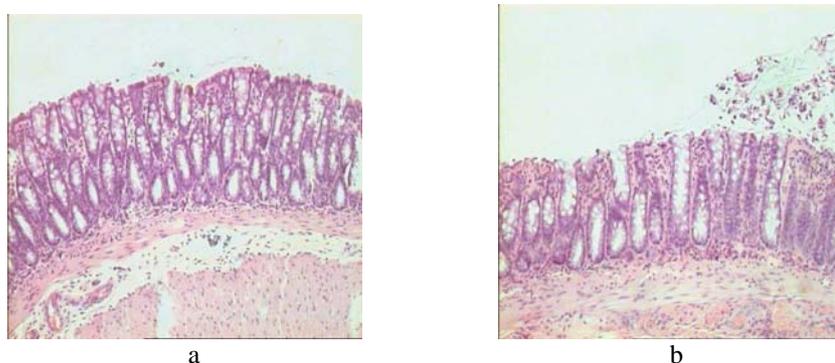


Figura 15.- Muestras de colon distal de rata incubadas durante 120 minutos con: **a)** solución tampón; **b)** H₂O₂ 10 mM apical

Tipo de lesión	superficial
Descamación del epitelio de revestimiento	baja
Inflamación	leve
Lesión de las criptas	no

Tabla VI.- Características de la lesión de las muestras incubadas durante 120 minutos con H₂O₂ 10 mM apical.

El resultado del tratamiento del tejido, con H_2O_2 10 mM apical durante 120 minutos, fue un cambio leve en la estructura del epitelio intestinal, con ligera descamación epitelial, presencia de algunas células inflamatorias superficiales y leve congestión de los vasos sanguíneos (figura 15b; tabla VI). El efecto producido por el H_2O_2 fue mayoritariamente en la superficie.

Una vez sabido que el H_2O_2 , a concentración 10 mM, no generaba alteraciones importantes en la RT, nos planteamos evaluar el efecto de una dosis de oxidante mayor. Para ello se incrementó la concentración de H_2O_2 a 25 mM, manteniendo tanto las condiciones experimentales como el tiempo de exposición.

El resultado del tratamiento con H_2O_2 a concentración 25 mM fue un descenso paulatino de la RT, que se agravó a lo largo del periodo de incubación. Tras 120 minutos, la RT alcanzó un valor del 44.1 ± 2.9 % respecto del control sin H_2O_2 ($n = 6$; $p = 0.002$) (figura 16).

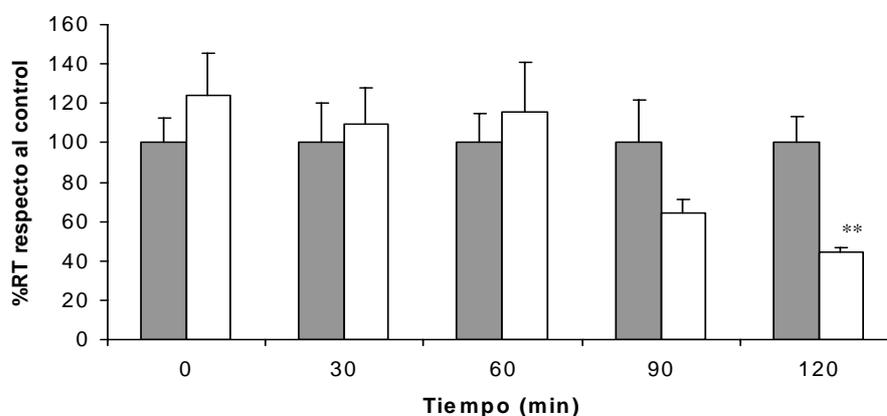


Figura 16.- %RT con respecto al control, en solución tampón (■) ($n = 6$), de muestras incubadas apicalmente con H_2O_2 25mM (□) ($n = 6$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (** $p < 0.01$).

El aumento de la concentración de H_2O_2 , a 25 mM originó un descenso mayor de la RT, lo que sugería un comportamiento dosis-dependiente. Para estudiar más detalladamente el efecto se amplió el rango de concentraciones y se evaluó la

evolución de la RT. El resultado obtenido, tras 120 minutos de incubación, queda reflejado en la figura 17. A dosis menores (1 mM) el descenso de la RT fue nulo. A concentraciones superiores a 25 mM la caída de la RT no se acentuó.

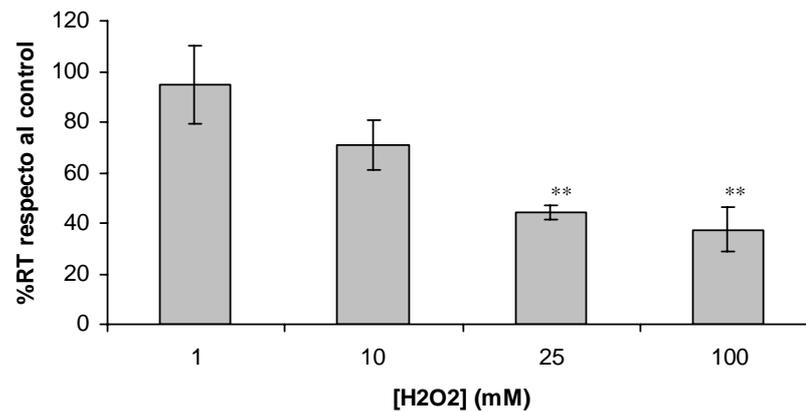


Figura 17.- %RT con respecto al control, en solución tampón, a los 120 minutos de incubación apical con diferentes concentraciones de H₂O₂. Los valores corresponden a la media \pm SEM. (n \geq 6; **p < 0.01).

Con el fin de analizar la repercusión morfológica del tratamiento se eligió el tejido expuesto a la dosis más alta de H₂O₂ (100 mM) para su estudio mediante microscopía óptica. Esto permitió observar los cambios estructurales que sufrieron las muestras tras la oxidación inducida (figura 18 b; tabla VII):

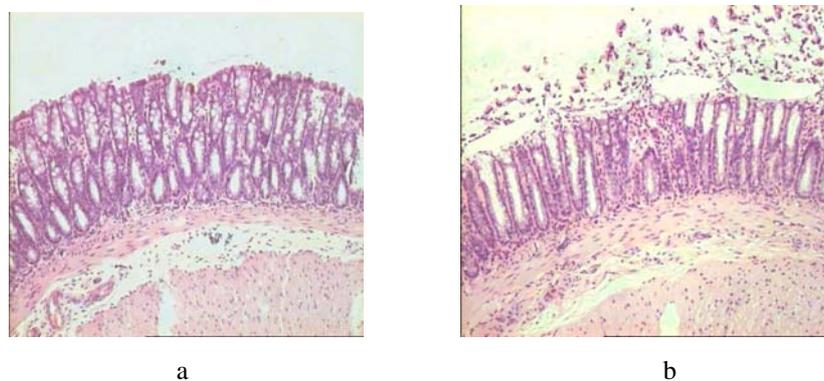


Figura 18.- Muestras de colon distal de rata incubadas durante 120 minutos con: **a)** solución de tampón; **b)** H₂O₂ 100 mM apical.

Tipo de lesión	superficial
Descamación del epitelio de revestimiento	alta
Inflamación	leve
Lesión de las criptas	no

Tabla VII.- Características de la lesión de las muestras incubadas durante 120 minutos con H₂O₂ 100 mM apical.

Las alteraciones ocasionadas por el tratamiento con H₂O₂ (100 mM) fueron algo más intensas respecto de las originadas por una concentración de 10 mM: el epitelio de revestimiento sufrió mayor descamación, el espacio entre las criptas desapareció y la superficie de la mucosa presentó un infiltrado inflamatorio. Sin embargo, aún habiendo expuesto el tejido a una dosis tan elevada de H₂O₂, las alteraciones ocasionadas no fueron excesivamente intensas.

Una vez conocido el efecto del H₂O₂ apical en el colon distal de la rata a nivel de barrera, nos planteamos evaluar el efecto de los oxidantes no fisiológicos (PAO y cloramina T) utilizados anteriormente en los estudios de secreción. Con ello pretendimos conocer si el resultado observado se debía a la oxidación de residuos de aminoácidos específicos.

En primer lugar se valoró el efecto que ejercía el PAO. Para ello se procesaron las muestras siguiendo el mismo protocolo que se utilizó en los experimentos con H₂O₂: se montaron piezas de tejido intacto en las cámaras de Ussing, se mantuvieron durante 10 minutos para su estabilización y se añadió PAO (0.2 mM, concentración que produce cambios significativos en la RT de células Caco-2 (94)) al reservorio mucoso, manteniéndolo durante 120 minutos. El tratamiento ocasionó un descenso importante en la RT que se acentuó a lo largo del periodo de incubación (comportamiento tiempo-dependiente) (figura 19a). A los 120 minutos de incubación con PAO 0.2 mM la RT alcanzó un valor del 34.4 ± 5.4 % (n = 5) respecto del control sin PAO (n = 4; p = 0.009) (figura 19a).

Para saber si el descenso de la RT observado tras el tratamiento con PAO apical variaba en función de la dosis empleada, se valoró el efecto del PAO a diferentes concentraciones, siguiendo siempre el mismo protocolo. El resultado del tratamiento fue una caída de la RT dosis-dependiente (figura 19b).

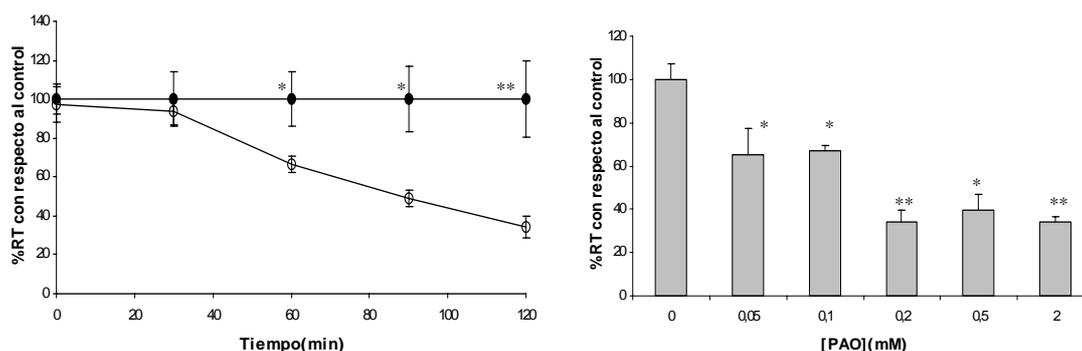


Figura 19.- a) %RT con respecto al control, en solución tampón (●) (n = 4), de muestras incubadas apicalmente con PAO 0.2 mM (○) (n = 5); **b)** %RT con respecto al control, en solución tampón, a los 120 minutos de incubación apical con diferentes concentraciones de PAO. Los valores corresponden a la media \pm SEM. (n \geq 3; *p < 0.05; **p < 0.01).

Los cambios inducidos por el PAO (0.2 mM) apical, en la permeabilidad paracelular, se evaluaron a través del estudio de difusión a macromoléculas. Las muestras de colon se montaron en las cámaras de Ussing y se dejaron durante 10 minutos en solución tampón hasta su estabilización. Se añadió FITC (concentración final 140 μ M) y PAO (concentración final 0.2 mM) ambos al reservorio mucoso y se incubó durante 120 minutos, recogiendo alícuotas del reservorio seroso en intervalos de 30 minutos, pudiendo determinar el % de paso de FITC y el Papp de las muestras.

Como se puede observar en la figura 20, el tratamiento del tejido con PAO 0.2 mM produjo un aumento significativo de la permeabilidad a FITC con respecto al control sin PAO. A los 120 minutos de incubación con PAO, un 0.197 ± 0.010 % del FITC añadido había atravesado el tejido (n = 3), mientras que en las muestras control sin PAO sólo difundió un 0.086 ± 0.016 % (n = 3; p = 0.004).

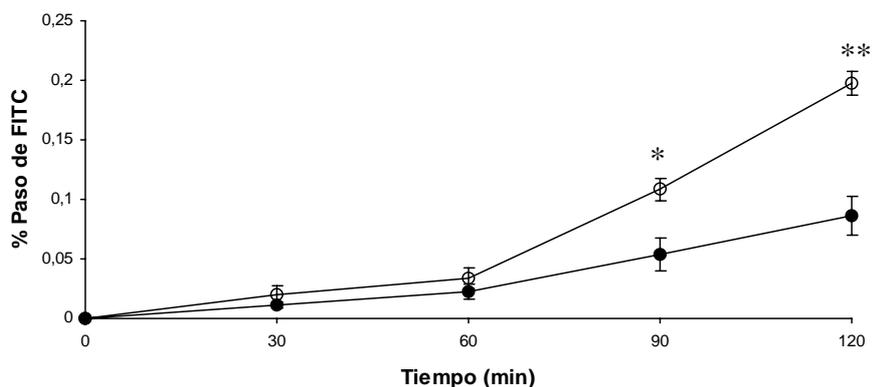


Figura 20.- Porcentaje de la concentración de FITC recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración de FITC añadida inicialmente en el reservorio mucoso para muestras en presencia de PAO 0.2 mM (○) (n = 3) frente a los controles en solución tampón (●) (n = 3). Los valores corresponden a la media \pm SEM (*p < 0.05; **p < 0.01).

El valor de Papp de las muestras expuestas a PAO experimentó un aumento significativo respecto de las muestras control sin PAO (Tabla VIII).

	Papp (cm·sg⁻¹)	n	p
Control	$1.8 \cdot 10^{-6} \pm 0.24 \cdot 10^{-6}$	3	0.007**
PAO	$3.57 \cdot 10^{-6} \pm 0.35 \cdot 10^{-6}$	3	

Tabla VIII.- Coeficientes de permeabilidad para el paso de FITC desde el reservorio mucoso al seroso en muestras tratadas con PAO 0.2 mM frente al control en solución tampón. Los valores corresponden a la media \pm SEM. (**p < 0.01).

Tras estudiar la permeabilidad a FITC, se evaluó la permeabilidad a una molécula de mayor tamaño, el FD4, un marcador de 4400 Da de peso molecular. El protocolo empleado para este estudio fue el mismo que se utilizó en el experimento con FITC. Sin embargo, en este caso el tratamiento con PAO no favoreció la difusión de FD4 a través del tejido (figura 21).

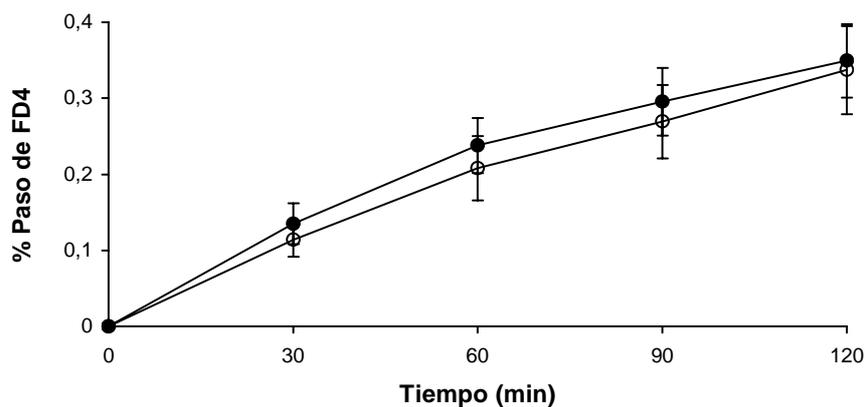


Figura 21.- Porcentaje de la concentración de FD4 recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración de FD4 añadida inicialmente en el reservorio mucoso de muestras en presencia de PAO 0.2 mM (○) (n = 6) frente al control en solución tampón (●) (n = 6). Los valores corresponden a la media \pm SEM.

El valor de Papp de las muestras tratadas con PAO no presentó diferencias significativas respecto a las muestras control sin PAO (Tabla IX).

	Papp (cm·sg⁻¹)	n	p
Control	$2.43 \cdot 10^{-6} \pm 0.48 \cdot 10^{-6}$	6	NS
PAO	$2.82 \cdot 10^{-6} \pm 0.45 \cdot 10^{-6}$	6	

Tabla IX.- Coeficientes de permeabilidad para el paso de FD4 desde el reservorio mucoso al seroso de muestras tratadas con PAO 0.2 mM frente al control en solución tampón. Los valores corresponden a la media \pm SEM.

A continuación se evaluaron a nivel microscópico las muestras expuestas apicalmente a PAO 0.2 mM. Las características que presentaron fueron las siguientes:

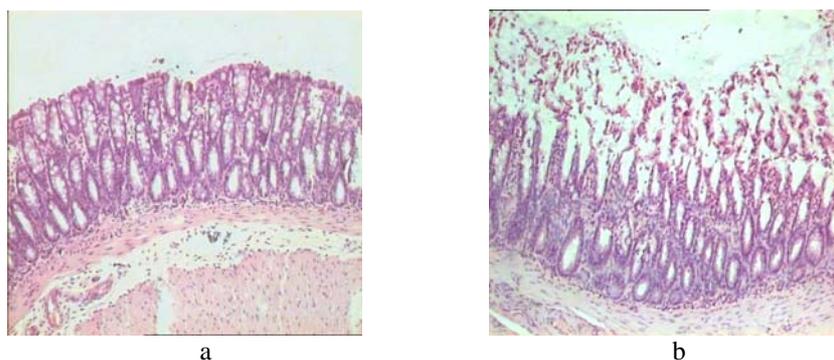


Figura 22.- Muestras de colon distal de rata incubadas durante 120 minutos con: **a)** solución tampón. **b)** PAO 0.2mM apical.

Tipo de lesión	1/3 de la capa mucosa
Descamación del epitelio de revestimiento	alta
Inflamación	moderada
Lesión de las criptas	no

Tabla X.- Características de la lesión de las muestras incubadas durante 120 minutos con PAO 0.2 mM apical.

La capa mucosa presentó alteraciones leves, con descamación del epitelio de revestimiento y la presencia de polimorfonucleares en su superficie, mientras que las criptas Lieberkühn no se vieron afectadas por el tratamiento (figura 22b, tabla X).

Tras conocer el efecto del PAO apical se estudiaron las consecuencias del tratamiento del tejido con cloramina T, también desde la vertiente luminal. Para ello se procesaron las muestras siguiendo el mismo protocolo que se usó anteriormente: se montaron en las cámaras de Ussing, se mantuvieron durante 10 minutos en solución tampón para su estabilización y se añadió cloramina T al reservorio mucoso, a concentración final 5 mM. La presencia continua de una concentración elevada de cloramina T produjo una caída de la RT que se fue agravando a medida que aumentó el

tiempo de exposición (figura 23a). A los 120 minutos de incubación la RT alcanzó un valor del 43.5 ± 6.7 % ($n = 11$) respecto del control sin cloramina T ($n = 8$; $p = 0.019$).

Al igual que se estudió la dependencia de la concentración de H_2O_2 o de PAO en el efecto sobre la RT del colon, se evaluó para la cloramina T. Para ello se sometió al tejido a diferentes dosis de cloramina T y se mantuvo en incubación durante 120 minutos en todos los casos. El resultado mostró una alteración de la RT dosis-dependiente (figura 23b).

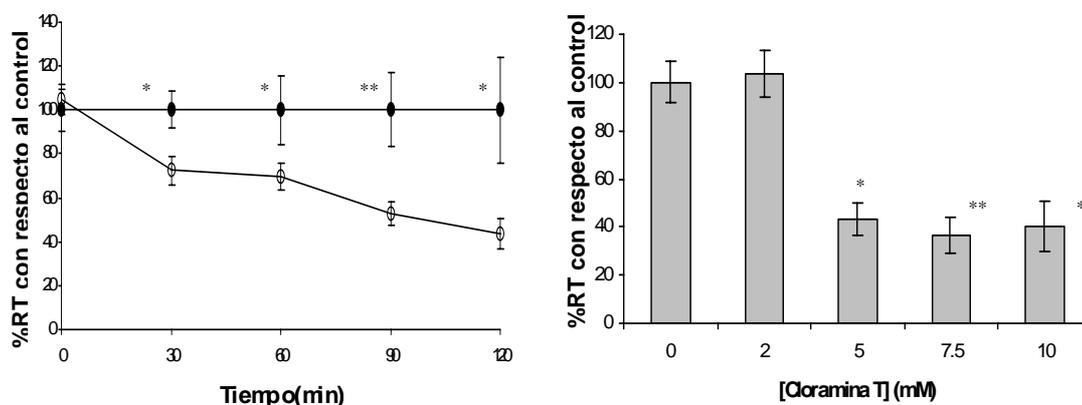


Figura 23.- a) %RT con respecto al control, en solución tampón (●) ($n = 8$), de muestras incubadas apicalmente con cloramina T 5 mM (○) ($n = 11$); **b)** %RT con respecto al control, en solución tampón, a los 120 minutos de incubación apical con diferentes concentraciones de cloramina T. Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($n \geq 3$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Siguiendo con el modelo de estudio, se pretendía evaluar los cambios en la permeabilidad paracelular inducidos por el tratamiento luminal con cloramina T, mediante estudios de difusión de FITC. Sin embargo, este último, en presencia de cloramina T, sufría apagamiento de su fluorescencia. La incubación de ambos durante un periodo de 30 minutos fue tiempo suficiente como para observar apagamiento en la fluorescencia emitida por el FITC. El porcentaje de fluorescencia emitida por la mezcla FITC + cloramina T fue tan sólo del 66.0 ± 0.8 % ($n = 3$) respecto del control sin cloramina T ($n = 3$; $p = 0.036$) (figura 24). Este resultado hizo que se descartara el estudio de permeabilidad usando moléculas con propiedades fluorescentes.

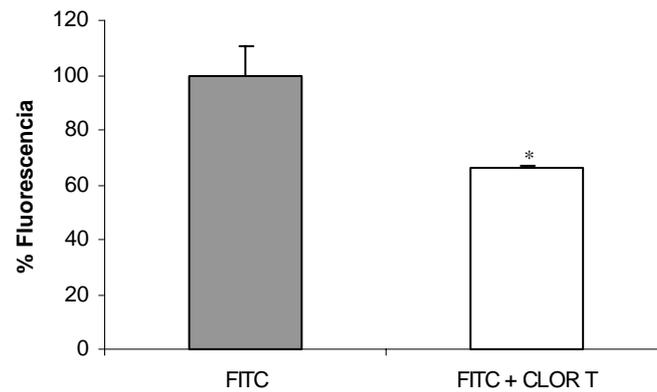


Figura 24.- Porcentaje de la fluorescencia emitida por FITC en presencia de cloramina T (□) respecto del control en solución tampón (■). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (* $p < 0.05$).

Morfológicamente la cloramina T (5 mM), después de 120 minutos de exposición apical, produjo la descamación de la mucosa generando la pérdida de su estructura superficial, mientras que las criptas intestinales se conservaron correctamente. El resto de la capa presentó una ligera inflamación (figura 25b, tabla XI).

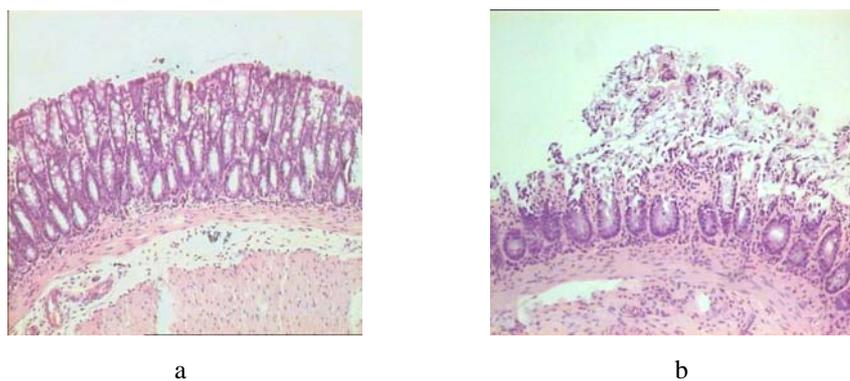


Figura 25.- Muestras de colon distal de rata incubadas durante 120 minutos con: **a)** solución tampón; **b)** Cloramina T 5mM apical.

Tipo de lesión	1/3 de la capa mucosa
Descamación del epitelio de revestimiento	alta
Inflamación	moderada
Lesión de las criptas	no

Tabla XI.- Características de la lesión de las muestras incubadas durante 120 minutos con cloramina T 5 mM apical.

El tratamiento del colon distal de la rata con H₂O₂ apicalmente (10 mM) ocasionó alteraciones microestructurales similares a las ocasionadas por PAO (0.2 mM) y cloramina T (5 mM). Sin embargo, estos 2 oxidantes no fisiológicos originaron cambios importantes en la función de barrera que no se observaron tras la exposición del tejido a H₂O₂ a concentración 10 mM.

Estos resultados nos llevaron a plantear la posibilidad de que la ausencia de efecto podría ser la consecuencia de la desaparición del H₂O₂ añadido a la cubeta, quizás debido a la degradación del mismo. Entre las hipótesis planteadas se barajaba la posibilidad de una degradación del H₂O₂ tras el contacto con el tejido o bien como consecuencia de las propias condiciones experimentales de trabajo. Para comprobarlo se dispusieron las cámaras de Ussing con o sin tejido, se llenaron los reservorios mucoso y seroso con solución tampón, se añadió H₂O₂ a concentración 10 mM, se mantuvo oxigenado, a 37° C, durante 120 minutos, y se determinó la concentración de H₂O₂. Como se puede observar en la figura 26, la incubación durante 120 minutos en presencia de tejido produjo un descenso significativo respecto de la concentración añadida inicialmente (concentración final de H₂O₂ = 7.6 ± 0.2; n = 6; p < 0.001). Sin embargo, el descenso en la cantidad de H₂O₂ no se debió a una degradación mediada por el tejido, sino que fue consecuencia del propio periodo de incubación, pues las cámaras sin tejido también presentaron un descenso en la concentración final de H₂O₂ que no fue significativo con respecto al descenso experimentado en las cámaras con tejido (8.2 ± 0.7 mM; n = 5; p = NS) (figura 26).

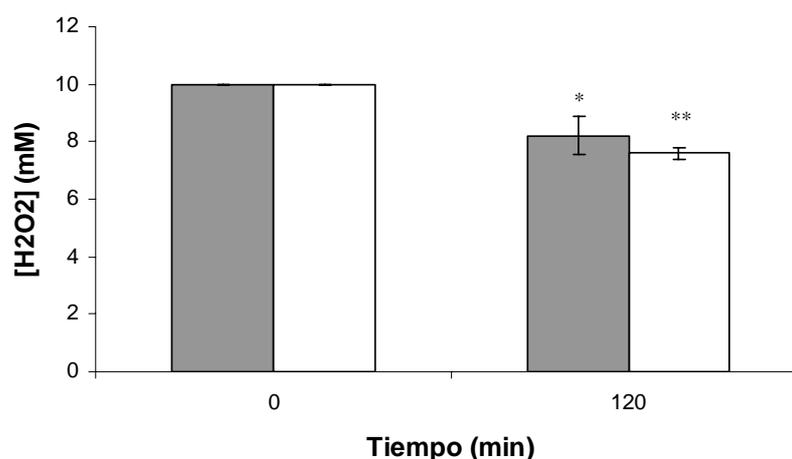


Figura 26.- Concentración de H₂O₂ en la cámara de Ussing a tiempo 0 y tras 120 minutos de incubación en cubetas con tejido (□) (n = 6) frente a cubetas sin tejido (■) (n = 5). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (*p < 0.05 entre tiempo 0 y tiempo 120 minutos para las cubetas sin tejido). (**p < 0.01 entre tiempo 0 y tiempo 120 minutos para las cubetas con tejido).

A pesar de experimentar un descenso en la concentración final de H₂O₂, la dosis remanente permanecía aún elevada. El H₂O₂ es un potente agente oxidante con capacidad para alterar la permeabilidad intestinal incluso a concentraciones más bajas (9, 94).

Se sabe que el intestino es un órgano que genera grandes cantidades de MORs y por ello debe disponer de un mecanismo de defensa antioxidante muy potente y especializado. Es posible que la ausencia de efecto sea la consecuencia de una protección importante desarrollada por este órgano. Por tanto, nos planteamos conocer la función antioxidante del colon distal de la rata, mediante la evaluación del papel que desempeñaban las enzimas antioxidantes endógenas (catalasa y GPx).

4. Participación de las enzimas antioxidantes.

La catalasa y la GPx son dos enzimas endógenas con actividad antioxidante específica que participan como línea de defensa antioxidante degradando el H_2O_2 generado. Por ello, nos planteamos evaluar la implicación de ambas frente al estrés inducido por el tratamiento con H_2O_2 exógeno.

La primera de la enzimas estudiadas fue la catalasa. Para ello se montaron muestras de tejido cólico de rata en las cámaras de Ussing, dejándose estabilizar durante 10 minutos en solución tampón. Posteriormente se añadió aminotriazol (inhibidor específico de catalasa) a ambos reservorios, mucoso y seroso, a concentración final elevada (50 mM), para asegurar la pérdida de la actividad enzimática. Tras 30 minutos de incubación se añadió H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso y se mantuvo durante 120 minutos, lo que produjo un descenso acusado de la RT (figura 27). Tras los 120 minutos de incubación con H_2O_2 , el porcentaje de la RT con respecto al control (sin aminotriazol ni H_2O_2) descendió hasta un valor del $37.8 \pm 14.2 \%$ ($n = 4$; $p = 0.032$). La caída de la RT no se debió a un efecto lesivo del propio inhibidor, pues a esa dosis no causó alteraciones en la RT del tejido (figura 27).

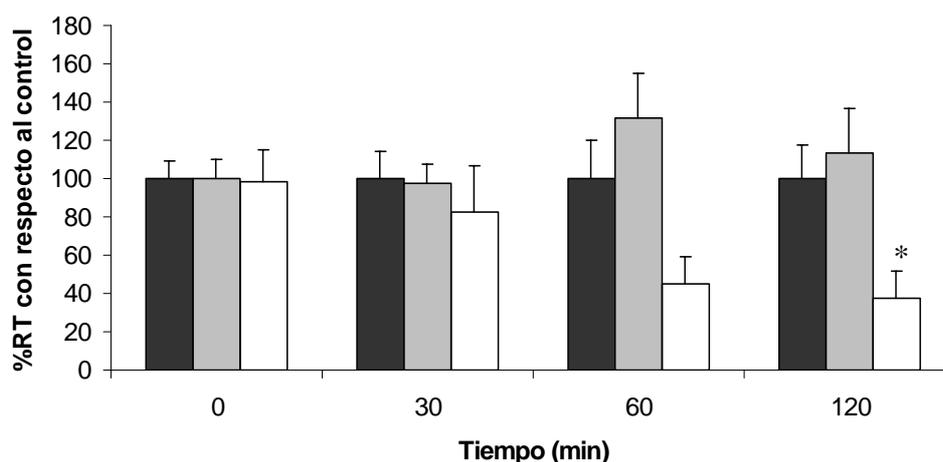


Figura 27.- %RT, con respecto al control en solución tampón (■) ($n = 4$), de muestras incubadas en presencia de aminotriazol 50 mM apical y basolateral (■) ($n = 4$) y en presencia de aminotriazol 50 mM apical y basolateral + H_2O_2 10 mM (□). Los valores corresponden a la media \pm SEM (* $p < 0.05$).

El aminotriazol potenció el efecto del H₂O₂ apical sobre la RT pero no como acción del propio inhibidor. Para conocer si a menores dosis de aminotriazol el descenso de la RT mediado por el H₂O₂ apical era menor, realizamos una curva dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de aminotriazol y manteniendo fija la dosis de H₂O₂ (10 mM). Para ello, seguimos el mismo protocolo que empleamos en el experimento anterior, modificando únicamente la dosis de inhibidor. El resultado del experimento mostró que el descenso en la RT era menor conforme disminuimos la concentración de aminotriazol (figura 28).

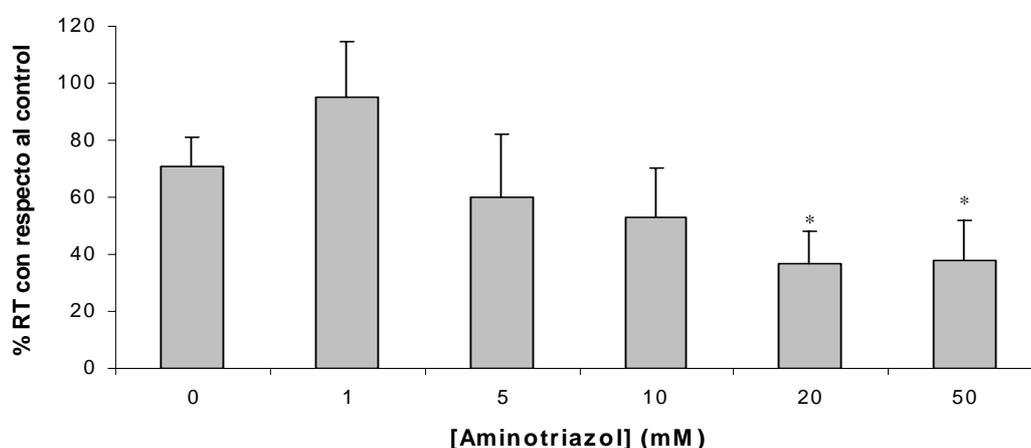


Figura 28.- %RT, respecto del control, de muestras preincubadas durante 30 minutos en solución tampón o con diferentes dosis de aminotriazol apical y basolateral y posteriormente tratadas durante 120 minutos con H₂O₂ 10 mM apical. Los valores corresponden a la media \pm SEM (n \geq 4; * p < 0.05 respecto del control en solución tampón).

El efecto del H₂O₂ apical se ve potenciado a medida que se aumenta la dosis de aminotriazol. Probablemente el aumento en la dosis de aminotriazol proporcione un descenso mayor de la actividad de la enzima y con ello una lesión más acusada. Para comprobarlo se evaluó la actividad de catalasa del tejido expuesto a diferentes dosis de aminotriazol y posteriormente tratado con H₂O₂ (10 mM) apical. El resultado mostró que el colon distal perdía actividad enzimática a medida que se aumentaba la concentración de inhibidor, es decir, el efecto es dosis-dependiente (figura 29).

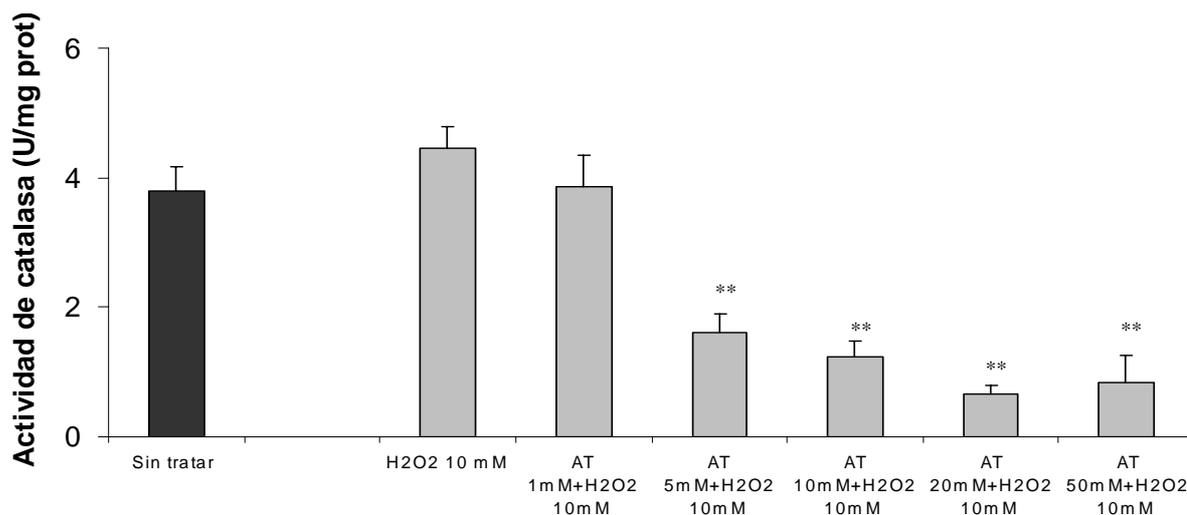


Figura 29.- Actividad de catalasa endógena de 1) muestras homogeneizadas tras la extracción del colon (sin tratar); 2) muestras preincubadas durante 30 minutos en solución tampón o con diferentes dosis de aminotriazol apical y basolateral y posteriormente tratadas durante 120 minutos con H₂O₂ 10 mM apical. Los valores corresponden a la media \pm SEM. (n \geq 4; **p < 0.01 respecto de las muestras control sin tratar).

A medida que aumentábamos la dosis de aminotriazol el tejido perdía actividad de catalasa endógena y simultáneamente se incrementaba la lesión mediada por el H₂O₂. Se comenzaba a ver un descenso significativo de la RT cuando el tejido fue pretratado con una dosis de aminotriazol de 20 mM (figura 28). Así, el tejido necesitaba haber disminuido su actividad de catalasa endógena hasta un valor del 17.3 ± 3.5 % (n = 6) respecto del control sin tratar (n = 10) para conseguir una lesión significativa en la RT (p < 0.001). Por tanto, el colon distal de la rata ofrece un fuerte mecanismo de defensa antioxidante frente al H₂O₂ (10 mM) apical que desaparece al disminuir la actividad de catalasa endógena aproximadamente un 83 %.

Tras conocer que la catalasa evitaba el daño mediado por el H₂O₂ (10 mM) apical y que su inhibición favorecía el descenso de la RT, nos planteamos conocer si el descenso de la actividad enzimática también potenciaba el efecto de dosis mayores de H₂O₂. Para ello evaluamos la RT en muestras preincubadas con igual concentración de aminotriazol (50 mM apical y basolateral) y diferentes dosis de H₂O₂, manteniendo en todos los casos las mismas condiciones experimentales. El resultado que se obtuvo tras

el tratamiento queda reflejado en la figura 30b, que se ha podido comparar con los resultados obtenidos durante el estudio del efecto del H₂O₂ en tejido no tratado con aminotriazol:

- 1) a concentración 1 mM de H₂O₂, la inhibición de catalasa no favoreció el descenso en la RT. El porcentaje de la RT respecto del control sin H₂O₂ fue 94.8 ± 15.3 % para muestras sin aminotriazol (n = 6) frente a 91.4 ± 15.1 para muestras con aminotriazol (n = 5; p = NS).
- 2) a concentración 25 mM de H₂O₂, la inhibición de la catalasa potenció el descenso de la RT mediado por el H₂O₂. El porcentaje de la RT respecto del control sin H₂O₂ fue 44.1 ± 2.9 (n = 8) en las muestras sin aminotriazol frente a 23.8 ± 7.8 en las muestras con aminotriazol (n = 8; p = 0.029*).
- 3) a concentraciones mayores, la inhibición de la enzima no favoreció la lesión. A 100 mM de H₂O₂ el porcentaje de la RT respecto del control sin H₂O₂ fue 37.5 ± 8.76 para muestras con aminotriazol (n = 7) frente a 37.0 ± 12.4 para muestras sin aminotriazol (n = 6; p = NS).

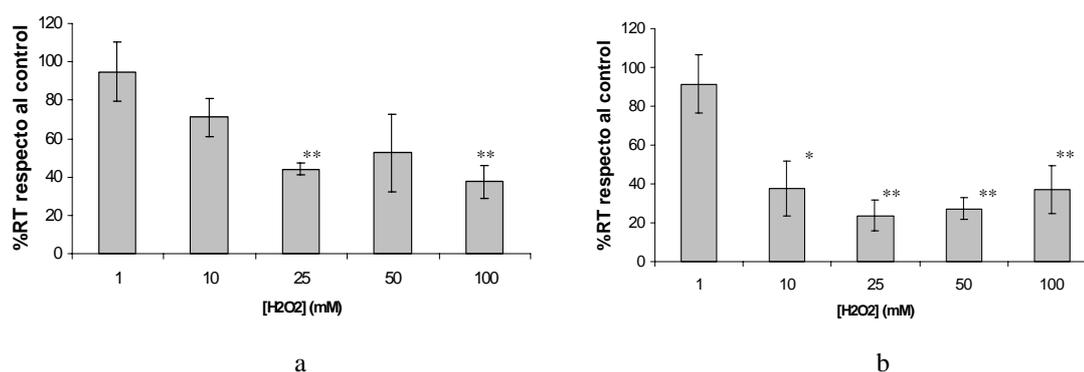


Figura 30.- %RT, respecto del control en solución tampón, tras 120 minutos de incubación con diferentes concentraciones de H₂O₂ en: a) muestras sin aminotriazol; b) muestras preincubadas y mantenidas con aminotriazol 50 mM apical + basolateral. Los valores corresponden a la media \pm SEM (n \geq 4; *p < 0.05; **p < 0.01).

Para estudiar los cambios producidos por el H_2O_2 en la permeabilidad del tejido tratado con aminotriazol, realizamos estudios de difusión de FITC y FD4. Antes de realizar estos experimentos, fue necesario comprobar que la mezcla de H_2O_2 + aminotriazol no producía apagamiento en la fluorescencia emitida por el FITC, pues ésta tornaba a una coloración rojiza. Para ello se incubó FITC ($140 \mu M$) + aminotriazol (50 mM) + H_2O_2 (10 mM) durante 120 minutos y finalmente se determinó la fluorescencia emitida. El resultado mostró que no existía apagamiento, pues el porcentaje de fluorescencia emitida fue de un $102.6 \pm 4.9 \%$ respecto del control sin aminotriazol ni H_2O_2 ($n = 3$; $p = \text{NS}$) (figura 31).

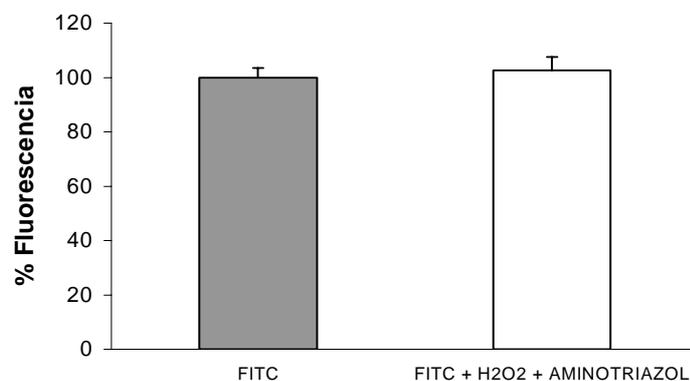


Figura 31.- % fluorescencia emitida por FITC en presencia de H_2O_2 + aminotriazol (\square) ($n = 3$) o en solución tampón (\blacksquare) ($n = 3$). Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($p = \text{NS}$).

Tras comprobar que la fluorescencia se mantenía intacta, se determinó la permeabilidad a FITC. El protocolo empleado fue el siguiente: las muestras de colon distal de rata se montaron en las cámaras de Ussing y se dejaron durante 10 minutos en solución tampón hasta equilibrarse. A continuación se añadió aminotriazol (50 mM) a ambos reservorios de la cámara de Ussing y se incubó durante 30 minutos, momento en el que se añadió H_2O_2 10 mM y FITC $140 \mu M$ ambos al reservorio mucoso. Se mantuvo en incubación durante 120 minutos, recogiendo alícuotas del reservorio seroso en intervalos de 30 minutos. La inhibición de catalasa potenció el efecto ejercido por el H_2O_2 , aumentando significativamente el transporte de FITC (figura 32).

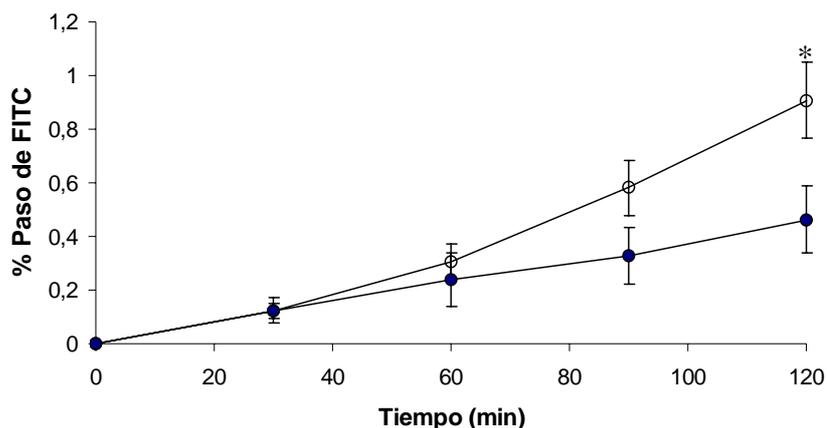


Figura 32.- Porcentaje de la concentración de FITC recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración añadida inicialmente al reservorio mucoso de muestras tratadas con aminotriazol 50 mM apical y basolateral + H₂O₂ 10 mM apical (○) (n = 6) frente al control en solución tampón (●) (n = 6). Los valores corresponden a la media ± SEM (*p < 0.05).

El aminotriazol por sí solo no produjo un aumento significativo en la permeabilidad a FITC (figura 33).

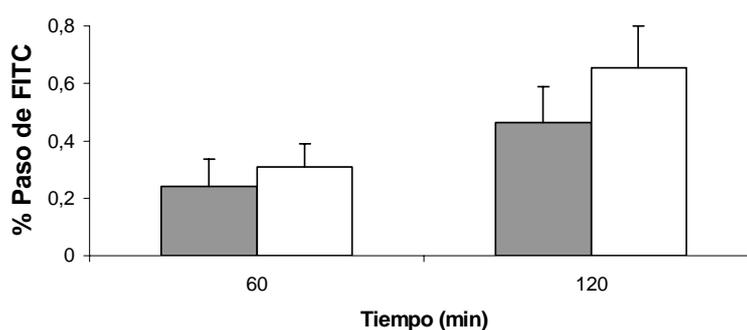


Figura 33.- Porcentaje de la concentración de FITC recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración añadida inicialmente al reservorio mucoso, a tiempo 60 y 120 minutos, de muestras tratadas con aminotriazol 50 mM apical y basolateral (□) (n = 6), frente al control en solución tampón (■) (n = 6) (p = NS). Los valores corresponden a la media ± SEM.

El valor de Papp de las muestras con aminotriazol + H₂O₂ fue 2.7 veces superior al de las muestras control sin ambos agentes (n = 6; p = 0.001) (Tabla XIII). El inhibidor por sí mismo no produjo alteraciones significativas en la permeabilidad paracelular (tabla XII).

	Papp (cm*sg-1)	n
Control	4,90 E-6 ± 0,68 E-6	6
Aminotriazol	7,56 E-6 ± 1,42 E-6	6
Aminotriazol + H₂O₂	13,07 E-6 ± 1,71 E-6 **	6

Tabla XII.- Coeficientes de permeabilidad para el paso de FITC desde el reservorio mucoso al seroso para muestras tratadas con aminotriazol (50 mM apical y basolateral) o aminotriazol (50 mM apical y basolateral) + H₂O₂ (10 mM apical) frente al control en solución tampón. Los valores corresponden a la media ± SEM (**p < 0.01 entre muestras tratadas con aminotriazol + H₂O₂ y muestras control).

A continuación estudiamos la permeabilidad a FD4, siguiendo el mismo protocolo empleado para FITC. En este caso, la inhibición de catalasa no favoreció significativamente el transporte de esta molécula de mayor tamaño (figura 34).

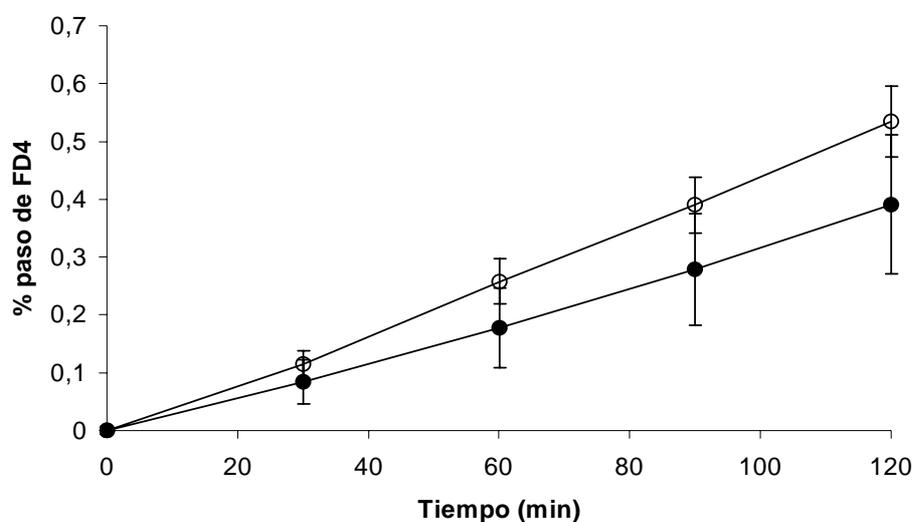


Figura 34.- Porcentaje de la concentración de FD4 recogido en el reservorio seroso respecto de la concentración añadida inicialmente al reservorio mucoso de muestras tratadas con aminotriazol 50 mM apical y basolateral + H₂O₂ 10 mM apical (○) (n = 6) frente al control en solución tampón (●) (n = 6). Los valores corresponden a la media ± SEM. (p = NS).

El valor de Papp presentó un ligero aumento con respecto al control sin H₂O₂ ni aminotriazol, que no alcanzó la significación (tabla XIII).

	Papp (cm*sg-1)	n	p
Control	4.66E-6 ± 1.16E-6	6	NS
Aminotriazol + H₂O₂	6.03E-6 ± 0.66E-6	6	

Tabla XIII.- Coeficientes de permeabilidad para el paso de FD4 desde el reservorio mucoso al seroso de muestras tratadas con aminotriazol (50 mM apical y basolateral) + H₂O₂ (10 mM apical) frente al control. Los valores corresponden a la media ± SEM.

Una vez determinado el efecto funcional del H₂O₂ en tejido tratado con aminotriazol, procedimos a estudiar las alteraciones microestructurales que tuvieron lugar tras los 120 minutos de exposición al oxidante. El estudio microscópico

demostró que la inhibición de catalasa potenciaba la lesión tisular mediada por el H_2O_2 (figura 35c; tabla XIV). Se pudo observar destrucción de las glándulas, inflamación moderada, disminución del número de células caliciformes y alteración de todo el espesor de la mucosa (figura 35c). Los cambios ocurridos en la mucosa intestinal tratada con aminotriazol y expuesta a H_2O_2 fueron más intensos comparados con los observados tras el tratamiento únicamente con H_2O_2 (figura 35a). El aminotriazol por sí mismo produjo una descamación leve del epitelio, pero sin inducir inflamación del tejido ni alteración de la estructura normal de la mucosa (figura 35b).

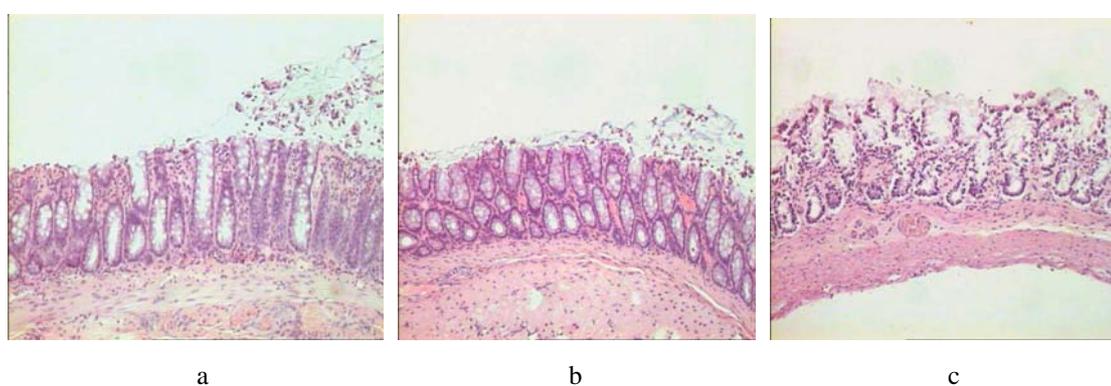


Figura 35.- Colon distal de rata tratado con: **a)** H_2O_2 10 mM apical; **b)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral; **c)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral + H_2O_2 10 mM apical.

	H_2O_2	Aminotriazol	Aminotriazol + H_2O_2
Extensión de la lesión	superficial	superficial	toda la capa mucosa
Descamación del epitelio de revestimiento	baja	baja	alta
Inflamación	leve	leve	moderada
Lesión en las criptas	no	no	si

Tabla XIV.- Características de la lesión de las muestras incubadas con: 1) H_2O_2 10 mM apical; 2) aminotriazol 50 mM apical + basolateral; 3) aminotriazol 50 mM apical + basolateral + H_2O_2 10 mM apical.

Tras estudiar el papel que desempeña la catalasa endógena frente al tratamiento con H_2O_2 , proseguimos estudiando la implicación de la otra enzima encargada de la degradación del H_2O_2 , la GPx. Para ello procedimos de manera similar: se montaron las muestras de tejido en las cámaras de Ussing y se dejaron equilibrar durante 10 minutos. Posteriormente se añadió ácido mercaptosuccínico (inhibidor de GPx) a concentración final 10 mM tanto en el reservorio mucoso como seroso. Tras 30 minutos de incubación finalmente se añadió H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso y se mantuvo durante 120 minutos. En este caso, la inhibición de la enzima no potenció el descenso de la RT sino que incluso produjo un leve aumento de la misma (figura 36). La RT de las muestras sin ácido mercaptosuccínico alcanzó un valor del 69.4 ± 12.1 % respecto del control tras los 120 minutos de incubación con H_2O_2 (10 mM) frente al valor de las muestras tratadas con ácido mercaptosuccínico que llegó al 78.1 ± 9.1 % respecto del control ($n = 6$; $p = NS$) (figura 36).

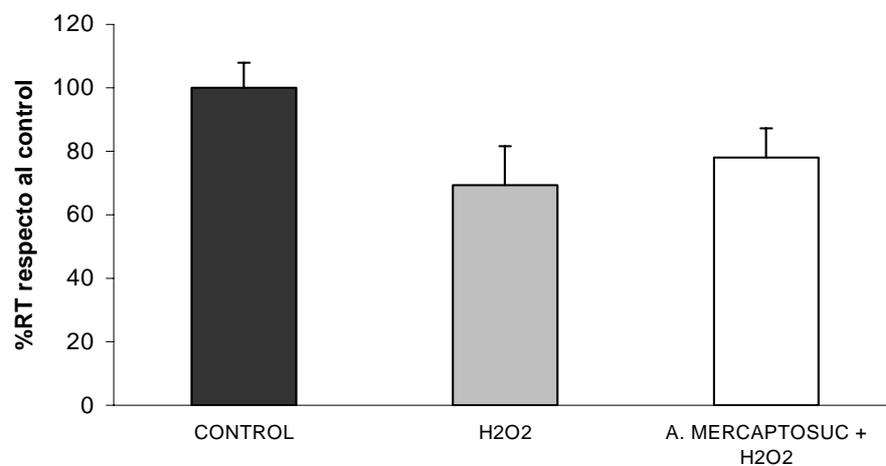


Figura 36.- %RT, respecto al control en solución tampón (■), de muestras incubadas con H_2O_2 10 mM apical (■) y con ácido mercaptosuccínico 10 mM apical y basolateral + H_2O_2 10 mM apical (□), a tiempo 120 minutos. Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($n = 6$ en todos los casos).

Al contrario de lo que ocurría con la catalasa, la inhibición de GPx no favorecía la lesión mediada por el H_2O_2 , sino que parecía aumentar la RT. Este resultado sugería que la inhibición de GPx prevenía el daño oxidante. Sabiendo que la inhibición de catalasa potenciaba las alteraciones ocasionadas por el tratamiento con H_2O_2 apical,

nos planteamos estudiar si la inhibición de GPx podía prevenir dicho daño. Para ello incubamos las muestras durante 10 minutos en solución tampón y añadimos aminotriazol (50 mM) y ácido mercaptosuccínico (10 mM) a los reservorios mucoso y seroso de las cámaras de Ussing para proceder a la doble inhibición enzimática. Incubamos durante 30 minutos y finalmente añadimos H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso, que se mantuvo durante 120 minutos. El resultado obtenido fue:

1. En un primer intervalo de tiempo, el ácido mercaptosuccínico previno la caída de la RT. A los 60 minutos de tratamiento con H_2O_2 , las muestras preincubadas con ambos inhibidores presentaban un %RT respecto al control de 99.1 ± 19.6 % (n = 6) frente a 28.9 ± 12.0 % para las muestras únicamente preincubadas con aminotriazol (n = 6; p = 0.012*).
2. Posteriormente, se produjo el descenso de la RT de las muestras sometidas a la doble inhibición (%RT a los 120 minutos = 51.9 ± 10.4 %; n = 6). Aún así, la RT quedó ligeramente, aunque no significativamente, elevada respecto de las muestras únicamente preincubadas con aminotriazol (%RT a los 120 minutos = 36.9 ± 7.2 %; n = 6; p = NS).

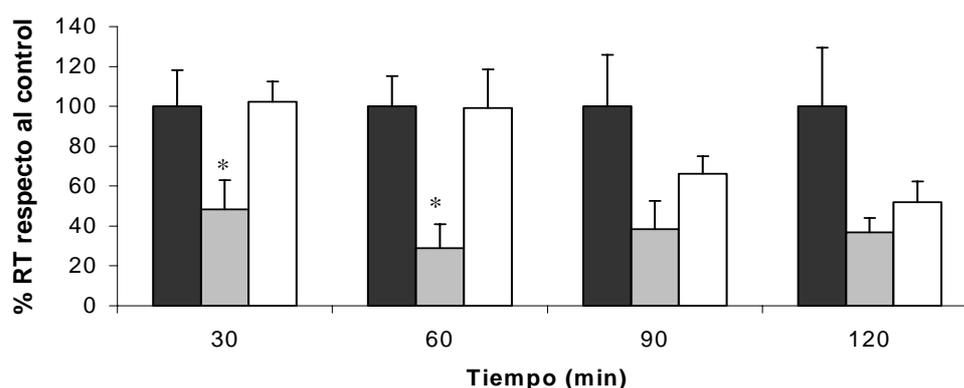


Figura 37.- %RT, respecto al control en solución tampón (■), de muestras incubadas con aminotriazol 50 mM apical y basolateral + H_2O_2 10 mM apical (■) y con ácido mercaptosuccínico 10 mM apical y basolateral + aminotriazol 50 mM apical y basolateral + H_2O_2 10 mM apical (□). Los valores corresponden a la media \pm SEM. (n = 6 en todos los casos; *p < 0.05 entre las muestras tratadas con aminotriazol + H_2O_2 y ácido mercaptosuccínico + aminotriazol + H_2O_2).

Para comprobar el estado del tejido, tanto a los 60 como a los 120 minutos de incubación con H_2O_2 (10 mM), procedimos de la siguiente manera: incubamos las muestras durante 10 minutos en solución tampón, añadimos aminotriazol (50 mM) y ácido mercaptosuccínico (10 mM) a los reservorios mucoso y seroso e incubamos durante 30 minutos. Finalmente añadimos H_2O_2 (10 mM) al reservorio mucoso y lo mantuvimos durante 60 ó 120 minutos. Tras estos periodos de incubación recogimos las muestras que teñimos siguiendo la técnica de la hematoxilina-eosina. Los resultados del tratamiento fueron:

1. A los 60 minutos de tratamiento la lesión de la mucosa mediada por el H_2O_2 , en muestras preincubadas con mercaptosuccínico + aminotriazol, fue muy inferior a la de las muestras únicamente preincubadas con aminotriazol (figuras 38a y 38b; tabla XV). Estas últimas presentaron una mucosa muy alterada, mientras que las muestras sometidas a la doble inhibición sufrieron descamación moderada que afectó a 1/2 de la mucosa, sin alteración de las criptas intestinales.

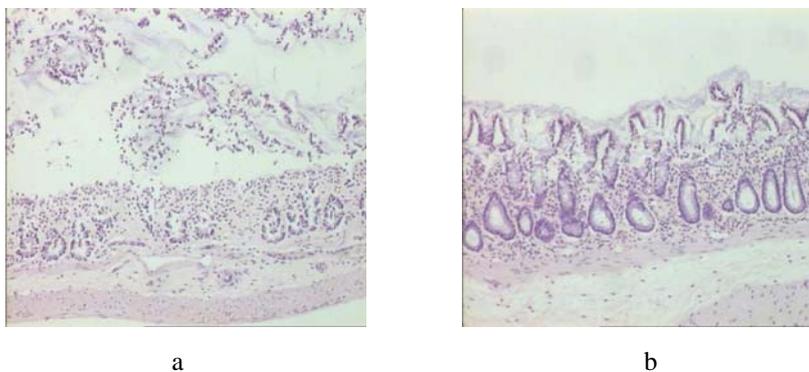


Figura 38.- Colon distal de rata tratado con: **a)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral (30 minutos) + H_2O_2 10 mM apical durante 60 minutos; **b)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral y ácido mercaptosuccínico 10 mM apical + basolateral (30 minutos) + H_2O_2 10 mM apical durante 60 minutos.

	Aminotriazol + H ₂ O ₂	Mercaptosuc + aminotriazol + H ₂ O ₂
Extensión de la lesión	toda la capa mucosa	1/2 de la capa mucosa
Descamación del epitelio de revestimiento	alta	alta
Inflamación	severa	moderada
Lesión en las criptas	si	no

Tabla XV.- Características de la lesión de las muestras incubadas con: 1) aminotriazol 50 mM apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical durante 60 minutos; 2) aminotriazol 50 mM apical + basolateral y ácido mercaptosuccínico apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical 60 minutos.

2. A los 120 minutos de incubación pudimos observar que aunque el daño mediado por el H₂O₂, en las muestras pretratadas con aminotriazol y ácido mercaptosuccínico está bastante extendido, tan sólo afecta a las 2/3 partes del espesor de la mucosa (figura 39b). El fondo de las criptas de Lieberkhün, en contacto con la muscular de la mucosa, mantienen su estructura a diferencia de lo que encontramos en las muestras preincubadas únicamente con aminotriazol (figura 39b).



a



b

Figura 39.- Colon distal de rata tratado con: **a)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical durante 120 minutos; **b)** aminotriazol 50 mM apical + basolateral y ácido mercaptosuccínico 10 mM apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical durante 120 minutos.

	Aminotriazol + H ₂ O ₂	Mercaptosuc + aminotriazol + H ₂ O ₂
Extensión de la lesión	toda la capa mucosa	2/3 de la capa mucosa
Descamación del epitelio de revestimiento	alta	alta
Inflamación	moderada	moderada
Lesión en las criptas	si	no

Tabla XVI.- Características de la lesión de las muestras incubadas con: 1) aminotriazol 50 mM apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical (120 minutos); 2) aminotriazol 50 mM apical + basolateral y ácido mercaptosuccínico apical + basolateral (30 minutos) + H₂O₂ 10 mM apical (120 minutos).

La GPx es una enzima antioxidante que utiliza el GSH como agente reductor. Es suficientemente conocido que el GSH intracelular también desempeña un papel antioxidante importante. Al actuar como cofactor de la GSH, la inhibición de GPx supondría un aumento en los niveles intracelulares de GSH que podrían prevenir la oxidación. Por ello, nos planteamos conocer la concentración de GSH en muestras expuestas 60 minutos y 120 minutos a H₂O₂ (10 mM) posteriormente a la inhibición de catalasa y/o glutatión peroxidasa. Siguiendo el mismo protocolo que utilizamos anteriormente para el estudio microscópico, recogimos las muestras tras 60 ó 120 minutos de incubación con H₂O₂. Para conocer la concentración de GSH del tejido intacto, recogimos muestras de colon distal tras ser extraído de la rata (se trata de las muestras que denominamos sin tratar). Las muestras recogidas se procesaron y se determinó la concentración de GSH en las mismas. El resultado que obtuvimos fue:

1. El primero de los resultados a destacar es que la incubación del tejido en solución tampón en las cámaras de Ussing producía un descenso en la concentración de GSH intracelular, que se mantuvo constante durante 120 minutos (figura 40).
2. En segundo lugar se pudo observar que a los 60 minutos de incubación con H₂O₂, los valores de GSH de las muestras doblemente inhibidas no presentaron diferencias significativas con respecto al control, pero sí con respecto a las muestras inhibidas

únicamente con aminotriazol (concentración de GSH = 1.06 ± 0.13 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo para las muestras preincubadas con aminotriazol + ácido mercaptosuccínico frente a 0.71 ± 0.05 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo para muestras preincubadas sólo con aminotriazol; $n = 8$; $p = 0.025$) (figura 40).

3. Finalmente, a los 120 minutos de incubación con H_2O_2 , los valores de GSH de las muestras doblemente inhibidas habían caído considerablemente con respecto al control. La concentración final estaba más próxima a la de las muestras inhibidas únicamente con aminotriazol, aunque aún ligeramente elevada (concentración de GSH = 0.65 ± 0.12 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo para las muestras preincubadas con aminotriazol + ácido mercaptosuccínico ($n = 8$) frente a 0.35 ± 0.08 $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo para muestras preincubadas sólo con aminotriazol; $n = 7$; $p = 0.053$) (figura 40).

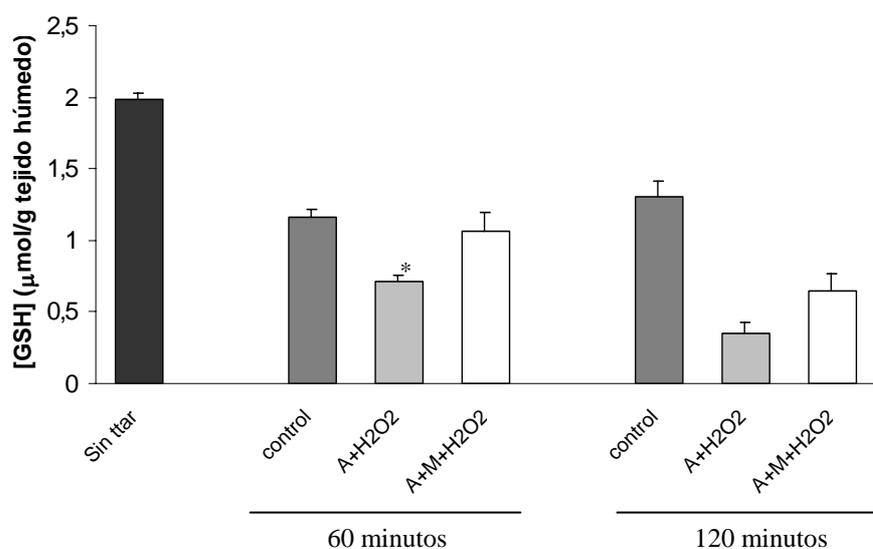


Figura 40.- Concentración de GSH de: 1) muestras homogeneizadas tras la extracción del colon (sin tratar) (■); 2) muestras control incubadas en solución tampón (■); 3) muestras tratadas con aminotriazol 50 mM apical y basolateral (■) o con ácido mercaptosuccínico 10 mM apical y basolateral + aminotriazol 50 mM apical y basolateral (□) y posteriormente tratadas durante 60 o 120 minutos con H_2O_2 10 mM apical. Los valores corresponden a la media \pm SEM. ($n \geq 7$; * $p < 0.05$).

Los resultados sugieren que la preincubación del colon distal de la rata con ácido mercaptosuccínico previene la lesión mediada por el aminotriazol más el H_2O_2

durante un periodo aproximado de 60 minutos debido al mantenimiento de los niveles normales de GSH. Sin embargo, la GPx es una enzima antioxidante fundamental frente al H₂O₂ y pensar que su inhibición proporciona un mecanismo protector importante es muy contradictorio.

Tras revisar los resultados obtenidos durante el estudio de la implicación de GPx, nos planteamos evaluar posibles inconvenientes del método de trabajo empleado. El primer paso consistía en comprobar si se estaba produciendo una interacción química entre el ácido mercaptosuccínico y el H₂O₂ posteriormente añadida. Se sabe que este inhibidor consta de un grupo tiólico, que podría ser fácilmente atacable por el H₂O₂. Una posible interacción entre los dos agentes supondría un descenso en la concentración útil de ambos. Para comprobarlo, mezclamos en el mismo medio ácido mercaptosuccínico y H₂O₂, manteniendo las mismas proporciones que durante los estudios anteriores. El resultado fue un descenso importante de la concentración final de H₂O₂ debido a la interacción con el ácido mercaptosuccínico. El porcentaje final de H₂O₂ era de un 64 ± 1 % respecto de la concentración inicial añadida, $n = 6$, $p < 0.001$).

Por tanto, la unión de ambos agentes supuso un descenso en los niveles de H₂O₂, y probablemente del ácido mercaptosuccínico reducido. Así, el descenso de la concentración de oxidante, con toda probabilidad, fue el causante del mantenimiento de la RT y de los niveles de GSH intracelulares durante un periodo de tiempo mayor y del descenso de lesión del tejido. El ácido mercaptosuccínico actuó como agente protector frente al H₂O₂ debido a su capacidad para degradar exógenamente al oxidante.

El PAO, al igual que el H₂O₂, es un agente con capacidad para oxidar grupos tiólicos libres. Por tanto, es posible pensar que fuera capaz de interaccionar con el ácido mercaptosuccínico y con ello reducir la concentración útil de ambos, lo que impediría la lesión que origina en la RT característica de nuestro modelo experimental. En tal caso, el ácido mercaptosuccínico estaría actuando como quelante del PAO. Para comprobarlo, estudiamos si el inhibidor podía evitar la caída de la RT mediada por el PAO apical. Preincubamos el tejido, apical y basolateralmente, con el ácido durante un periodo de 30 minutos y posteriormente añadimos PAO 0.2 mM al reservorio mucoso

de la cámara de Ussing. El resultado fue la prevención del descenso de la RT, que se prolongó hasta los 120 minutos de incubación con PAO (figura 41). El %RT de las muestras preincubadas con ácido mercaptosuccínico y tratadas durante 120 minutos con PAO 0.2 mM apical sólo descendió hasta un valor de 86.7 ± 18.6 % respecto al control ($n = 6$) frente a las muestras no preincubadas con ácido mercaptosuccínico que cayó hasta el 35.5 ± 4.3 % respecto al control en solución tampón ($n = 6$; $p = 0.023$). Por tanto, el ácido mercaptosuccínico demostró tratarse de un agente con capacidad protectora exógena frente al daño por oxidantes de grupos tiólicos.

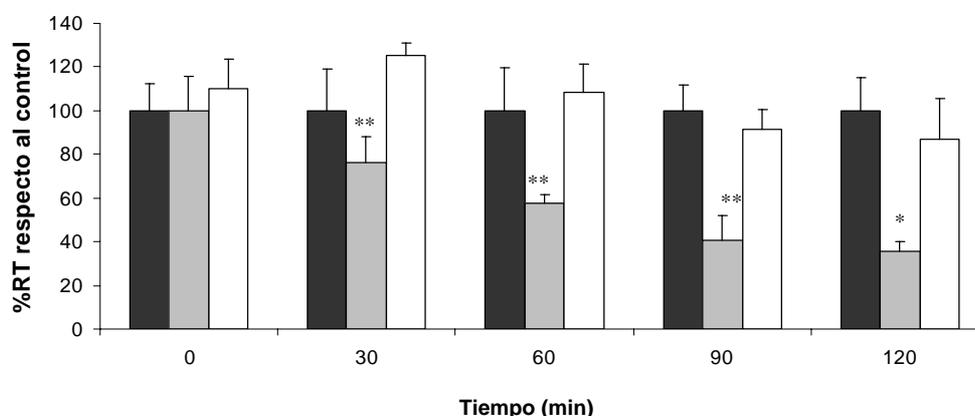


Figura 41.- %RT, respecto al control en solución tampón (■), de muestras incubadas con PAO 0.2 mM apical (■) y con ácido mercaptosuccínico 10 mM apical y basolateral + PAO 0.2 mM apical (□). Los valores corresponden a la media \pm SEM ($n = 6$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; valores de p entre las muestras tratadas con PAO y ácido mercaptosuccínico + PAO).

Podría decirse que el ácido mercaptosuccínico actuó como agente reductor frente al PAO y frente al H_2O_2 . Se sabe que el GSH desempeña una función reductora en la célula. Así que decidimos comprobar si el GSH añadido exógenamente a la cubeta podía desarrollar ese papel reductor frente al PAO. Para ello estudiamos el efecto del GSH exógeno sobre el descenso de la RT mediado por este oxidante. Se preincubó el tejido, apical y basolateralmente, con una concentración de 1 mM de GSH durante 10 minutos y posteriormente se añadió PAO (0.2 mM) al reservorio mucoso. El resultado mostró la prevención del descenso de la RT mediado por el tratamiento apical con PAO. La RT se mantuvo elevada incluso tras los 120 minutos de incubación con el oxidante (RT de las muestras con GSH + PAO = 46.4 ± 8.2

Ω^*cm^{-2} frente $22.7 \pm 4.5 \Omega^*cm^{-2}$ de las muestras expuestas a PAO; $n = 6$ en ambos casos; $p = 0.03$). El GSH exógeno desempeñó la misma función preventiva que el ácido mercaptosuccínico, por tanto, se podría decir que este último evita la pérdida de la RT del tejido debido a su capacidad reductora y no a su función inhibitoria de la GPx.

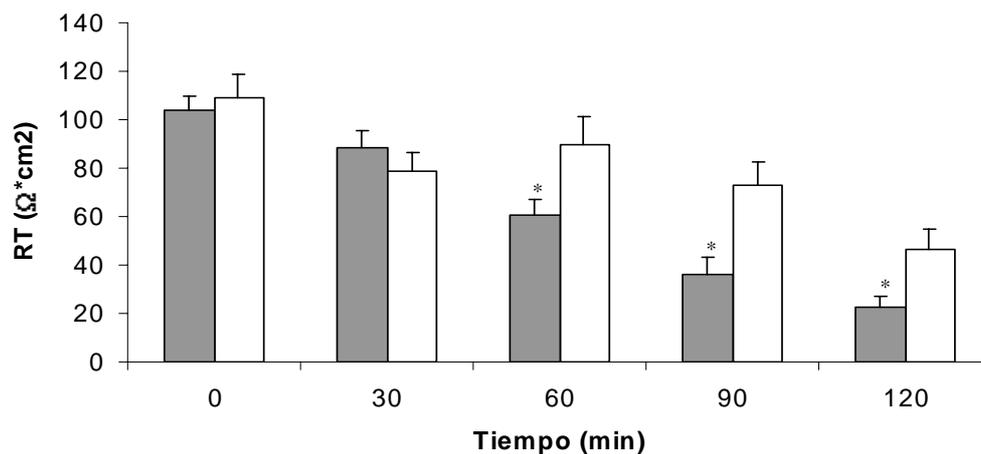


Figura 42.- RT de muestras incubadas con PAO 0.2 mM apical (■) y con GSH 1mM apical + basolateral + PAO 0.2 mM apical (□). Los valores corresponden a la media \pm SEM ($n = 6$; $*p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Una vez estudiados los objetivos planteados en esta tesis doctoral, explicamos la relevancia de la utilización del modelo experimental seleccionado, validamos la metodología de trabajo elegida para el estudio y discutimos los resultados obtenidos en base a cada una de las hipótesis propuestas.

1. Modelo experimental

Uno de los modelos más utilizado para el estudio del transporte vectorial de Cl^- , es la línea celular inmortalizada. Entre las más empleadas se encuentran la línea celular T_{84} y la HT-29 (143). La T_{84} procede de adenocarcinoma humano, derivado de metástasis de pulmón. Sus propiedades le confieren interés para estudios hormonales, de tumorigenidad, de receptores de péptidos y neurotransmisores y de transporte vectorial electrolítico (72). La HT-29 procede de adenocarcinoma humano y puede inducirse su diferenciación para estudiar, entre otras cosas, la secreción (143).

Las características morfológicas de algunas líneas celulares, similares a las de los enterocitos normales, hacen que se trate de un buen modelo experimental para el estudio de la función de barrera. Las células conforman una monocapa continua, que alcanza valores de RT similares al intestino humano, como ocurre en la línea celular Caco-2 (144). Frente a ello, la línea celular T_{84} conforma monocapas de alta resistencia del orden de $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

La ventaja de las líneas celulares, como modelo experimental, es que se conoce con detalle su mecanismo secretor. El transporte vectorial de Cl^- resulta de la función coordinada de diferentes sistemas de transporte, en el que participan activamente las membranas apical y basolateral. La energía requerida para la secreción activa de Cl^- viene proporcionada por la bomba Na-K-ATPasa, localizada en la membrana basolateral. El cotransportador Na-K-2Cl, también ubicado en la membrana basal del epitelio, permite la entrada del ión Cl^- a la célula. Los canales basolaterales de K^+ desempeñan una función primordial en el desarrollo del transporte de Cl^- pues la apertura de los mismos proporciona la hiperpolarización de la célula, promoviendo así la salida de Cl^- a través de los canales específicos localizados en la membrana apical de la célula epitelial (145).

Además, por tratarse de una monocapa de células existen múltiples ventajas que no se consiguen en otros modelos experimentales. Un claro ejemplo es que la ausencia de capas adyacentes permite estudiar la secreción de Cl^- de forma aislada, sin interferencias externas al epitelio. A su vez, la disponibilidad de las membranas apical y basolateral, en igualdad de condiciones, permite caracterizar la funcionalidad y participación de ambas en dicha función.

Sin embargo, las líneas celulares son un modelo experimental muy simple, que refleja parcialmente el funcionamiento de la célula epitelial. Los mamíferos disponen de un mecanismo de secreción de Cl^- regulado mucho más complejo (26). Mientras que el transporte vectorial de Cl^- asume la existencia única de dos tipos de canales de K^+ ubicados en la membrana basolateral, encargados de la regulación de la secreción de Cl^- , recientemente se han caracterizado funcionalmente, tanto en colon humano como en colon de rata, canales de K^+ apicales que participan en la regulación de la secreción de Cl^- (54). Además, cabe destacar el número de canales y transportadores en ambas membranas de la célula epitelial del colon de mamífero, que es muy superior al que presenta la línea celular (26). Entre otros, se podría destacar la presencia de H-K-APTasas (sensibles o insensibles a un inhibidor de la Na-K-ATPasas, la ouabaina) ubicadas en la membrana apical del epitelio cólico de mamíferos, que participan de manera activa en la absorción de K^+ y que podrían regular la secreción de Cl^- (datos en vías de publicación). Por tanto, la línea celular no es un buen modelo experimental para la caracterización de la respuesta integrada del intestino humano a los oxidantes, pues presenta muchas limitaciones.

Un modo más válido de aproximación se consigue utilizando tejido sano procedente de mamíferos. Este modelo se asemeja más al metabolismo del tejido humano que la línea celular, pues esta última está constituida por células tumorales que presentan alteraciones en sus vías de señalización y en su fenotipo funcional. Entre los animales de experimentación más utilizados se encuentra la rata, pues presenta múltiples ventajas como modelo de trabajo. Se trata de un animal de fácil manejo y gran disponibilidad. Está perfectamente caracterizado desde el punto de vista anatómico, fisiológico y genético.

El colon de la rata es un órgano que técnicamente se obtiene con facilidad y se mantiene en condiciones óptimas durante largos periodos de tiempo, lo que permite estudios de 2 a 4 horas de duración (146-148). Se trata de un modelo muy representativo con valores de RT del orden de 100-200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, similares a los del colon humano (datos obtenidos en nuestro laboratorio aún no publicados). Además, los resultados obtenidos en los estudios con colon de rata son fácilmente reproducibles.

Para este trabajo seleccionamos la parte distal del colon porque presenta características que le confieren mayor resistencia transepitelial respecto del colon proximal (149). Es conocido que los parámetros eléctricos, bajo condiciones control, varían a lo largo del eje longitudinal. La conductancia del tejido aumenta continuamente desde el segmento distal hacia el proximal, indicando que éste último posee un epitelio más débil que permite un transporte mayor (150). Esto se explicaría porque las uniones zónula ocludens son más fuertes en la parte distal que en la proximal (149). Esta diferencia morfológica puede ser una de las responsables de que la conductancia paracelular sea superior en la sección proximal del colon. Un estrechamiento de las uniones intercelulares proporciona una permeabilidad menor a través de la vía paracelular. Esto le confiere una función de barrera mejor, lo que le hace más interesante para el estudio de dicha función tras la inducción de estrés oxidativo.

Además de las características morfológicas que hacen que el colon distal sea un buen modelo experimental para el estudio de la función de barrera, este segmento también presenta ventajas que permiten un estudio más amplio de la función de secreción. El colon distal se caracteriza por una elevada actividad eléctrica debida en parte a la producción neuronal espontánea de PGs, como consecuencia de la acción del plexo submucoso o de Meissner (151). El hecho de que este último participe activamente en la regulación de la secreción hidroelectrolítica permite estudiar no sólo la participación de la célula epitelial en dicha función sino también la implicación del plexo submucoso.

Junto a las diferencias funcionales y morfológicas entre ambas secciones cólicas, hay que destacar las diferencias en los mecanismos intracelulares que regulan la inducción de la secreción (149). La activación de la vía del AMPc o del Ca^{2+} tiene

una respuesta mayor en el colon distal. Por el contrario, la activación de la secreción a través de la vía del GMPc es mayor en el colon proximal.

Entre otras características, es necesario señalar la importancia de la flora intestinal en el segmento distal del colon. El intestino contiene un ecosistema microbiano dinámico y complejo con una elevada densidad bacteriana, que se hace más abundante cuanto más distal sea el tramo intestinal (1). Las principales funciones de la flora son controlar la proliferación y diferenciación celular, el desarrollo y la homeostasis del sistema inmune y la protección frente a patógenos (efecto barrera) (2). Por tanto, el segmento distal del colon se encuentra sujeto a una función microbiana mayor que conlleva un papel defensivo superior. Sin embargo, a su vez, la elevada actividad bacteriana viene acompañada de producción de sustancias potencialmente tóxicas, que incluye amoníaco, aminas, fenoles, tioles e indoles, derivadas del metabolismo mediado por la microflora intestinal (2), por lo que probablemente este segmento del colon dispone de una función de barrera superior al resto del intestino.

Las múltiples características que presenta el segmento distal hace que sea la parte del colon más estudiada. Sin embargo, en general, los autores que utilizan el colon distal de la rata como modelo experimental, eliminan la capa muscular y la serosa (10, 52, 137, 146, 152, 153). El objetivo sería estudiar sólo la función de la mucosa, con la contribución de la capa submucosa. Además, la retirada de las capas externas permite un acceso más directo a la vertiente basolateral. Probablemente, la presencia de la muscular y la serosa podrían condicionar la difusión de sustancias de elevado peso molecular, lo que impediría la llegada de las mismas hasta la capa mucosa. Probablemente sería necesario un tiempo de exposición mayor y una concentración más elevada del agente (activador, inhibidor, oxidante, ...) para observar un efecto sobre la membrana basolateral de las células epiteliales.

Técnicamente la capa submucosa no se puede separar de la mucosa sin dañar ésta última. La presencia de la primera no aporta inconvenientes, sino que por el contrario permite evaluar la participación de la misma durante los estudios de secreción, pues las terminaciones nerviosas del plexo de Meissner liberan mediadores, predominantemente ACh y VIP, que participan en la regulación de la secreción de Cl⁻ (30). Sin embargo, la eliminación de la capa muscular supone la pérdida del plexo de

Auerbach, igualmente importante en la regulación de la secreción de Cl^- intestinal (26). Ambos plexos, el submucoso y el mientérico, inervan tanto a las células epiteliales como a las células de músculo liso vasculares, controlando el flujo sanguíneo, la secreción y la absorción en la mucosa cólica (33, 34). La retirada de esta capa limitaría el estudio de la función de secreción.

Evidentemente trabajar con todas las capas que constituyen la pared cólica podría interferir en el estudio de la permeabilidad paracelular. Las macromoléculas utilizadas en experimentos de difusión podrían quedar retenidas en la capa serosa, obteniendo un resultado erróneo. Aún así, autores como Venkatraman y colaboradores, han estudiado la permeabilidad, en colon de rata intacto, mediante técnicas de permeabilidad a macromoléculas, obteniendo resultados representativos (148). Además, la retirada de las capas intestinales supone un tiempo de hipoxia mayor. El periodo desde la extirpación del colon hasta el montaje del mismo en las cámaras de Ussing aumenta considerablemente. A su vez, la manipulación prolongada del tejido podría producir inflamación local y liberación de prostanoïdes que estimularían la secreción de Cl^- (30) e interferirían en los estudios de dicha función.

Por tanto, tras evaluar todos las ventajas del modelo experimental elegido, se consideró necesario mantener todas las capas de la pared intestinal para estudiar de una manera integral la respuesta a los oxidantes. Además, resultaba más relevante para conocer la respuesta protectora endógena del colon al estrés inducido.

2. Validación del método

El estudio del transporte hidroelectrolítico intestinal se lleva a cabo mediante la evaluación de procesos electrogénicos y electroneutros. El transporte no electrogénico se estudia mediante el uso de isótopos radiactivos como el ^{36}Cl , el ^{86}Rb o el ^{125}I (154, 155). Sin embargo, la función de secreción se evalúa principalmente mediante estudios electrogénicos, en los que se determina la I_{sc} .

La I_{sc} es una medida del movimiento iónico activo que refleja el transporte de iones a través de la vía transcelular. Se sabe que este parámetro representa fielmente la

secreción transcelular de Cl^- en línea celular T_{84} (156) y por ello se utiliza para caracterizar dicha función epitelial.

La estimulación de la secreción mediada por un agonista de dicha función, como la forskolina, sirvió para demostrar, en mucosa/submucosa de colon distal de rata, que el aumento de Isc característico tras el tratamiento se correspondía mayoritariamente con la estimulación de la secreción electrogénica de Cl^- (153). Sin embargo, es necesario considerar una diferencia importante entre el colon de mamífero y la línea celular, pues se sabe que la forskolina a su vez estimula una leve secreción de HCO_3^- , en mucosa/submucosa cólica de rata, a través de la membrana apical, que se corresponde aproximadamente con el 20-30% del valor de Isc (153). La ausencia de Cl^- del medio o la inhibición del transportador Na-K-2Cl , consiguen disminuir los valores de Isc pero sin anularlos debido a la participación de la secreción de HCO_3^- , lo que demuestra que el valor de Isc representa mayoritariamente el transporte vectorial de Cl^- pero no es el único responsable del incremento de Isc mediado por el agonista.

Con toda probabilidad, el valor de Isc de nuestro modelo experimental se correlaciona en su mayoría con la secreción electrogénica de Cl^- , al igual que ocurre en el modelo anteriormente nombrado. Sin embargo, ante la escasa información en la literatura procedimos a validarlo. Para ello, se estudió la Isc basal y la estimulada por forskolina en un medio en ausencia de Cl^- .

Así, la eliminación del ión Cl^- provocó un descenso brusco de la Isc basal, alcanzando valores muy bajos, pero no nulos, probablemente debido a la secreción de HCO_3^- . La presencia de un ión no transportable, en sustitución del Cl^- , hizo que, en ausencia de movimiento transcelular de Cl^- , descendiera la Isc basal. El valor de E_{50} alcanzó valores muy elevados, lo que produjo un gran aumento de la RT . Este último dato proporciona información sobre la permeabilidad del tejido, incluyendo la conductancia de la membrana apical, basolateral y paracelular. El incremento tan acusado de la RT fue la consecuencia del descenso de la conductancia transcelular debido a la pérdida del transporte de Cl^- desde la vertiente basolateral hacia la apical.

A continuación estudiamos la Isc respecto de la estimulación por forskolina en un medio sin Cl^- , como fue descrito por autores como Kockerling, Diener o Fassler

(35, 157, 158) en sus modelos experimentales. El resultado de la ausencia del anión fue un descenso importante en el incremento característico de la I_{sc} en respuesta a forskolina del orden del 75%. Como cabía esperar aproximadamente el 25% de la respuesta secretora al agonista se mantuvo en ausencia de Cl^- , probablemente como consecuencia de la secreción adicional de HCO_3^- al igual que sucedía en el modelo experimental mucosa/submucosa cólica de rata estudiado por el equipo de Schultheiss y colaboradores (153). Así el resultado sugiere que el valor de I_{sc} representa mayoritariamente el transporte vectorial de Cl^- .

Los resultados obtenidos, en secreción basal y estimulada, sirvieron para validar el método de trabajo, considerar que la I_{sc} representaba en su mayoría la secreción electrogénica de Cl^- .

3. Efecto del H_2O_2 en la secreción

La pared intestinal se encuentra expuesta a concentraciones elevadas de oxidantes tanto en condiciones normales como patológicas. Los MORs, generados de manera endógena como consecuencia del metabolismo normal de las células epiteliales y de los leucocitos (103), entran en contacto con el epitelio intestinal a través de la membrana basolateral, pudiendo alterar la funcionalidad normal de la capa mucosa.

Sin embargo, la mucosa intestinal es la única capaz de generar oxidantes tanto en el tejido como en la luz del tubo (159). En el lumen se alcanzan concentraciones elevadas de MORs, que pueden alterar la funcionalidad normal, como consecuencia de su citotoxicidad (160). Se sabe que durante el transcurso de episodios activos de enfermedades como la EII tiene lugar la migración transepitelial de neutrófilos hasta las criptas generando abscesos y produciendo un proceso inflamatorio de las mismas conocido como criptitis (126) Durante los periodos de inflamación intestinal intensa estos leucocitos liberan cantidades elevadas de MORs, entre ellos el H_2O_2 y el HOCl (126) en respuesta a agentes proinflamatorios, lo que hace que la mucosa se encuentre sujeta a un estrés oxidativo importante desde su vertiente luminal.

A su vez, en la luz intestinal residen un elevado número de agentes prooxidantes exógenos procedentes de la dieta, de fármacos o de metabolitos

bacterianos (159). Por ello, la membrana apical de las células epiteliales también se encuentra expuesta a dosis elevadas de oxidantes, capaces de producir alteraciones morfofuncionales.

Aún sabiendo que los oxidantes no sólo entran en contacto con la mucosa cólica a través de la vertiente basolateral, sino también sobre la apical, la mayoría de los autores han centrado sus estudios en la determinación del efecto de los MORs en la función de secreción tras su exposición sobre la superficie submucosa. Entre ellos se encuentra el grupo de Grisham y colaboradores, que trabajó en ileon de rata (9).

Otros grupos, como el de Tamai y colaboradores, evaluaron el efecto de los oxidantes en mucosa/submucosa de rata desde ambas vertientes (10). Su trabajo demostró que la NH_2Cl , el H_2O_2 y el HOCl producían un incremento de la secreción, exclusivamente tras su adición a la cubeta submucosa. La exposición apical, a concentración 100 μM , no originó cambios en la I_{sc} basal. Sin embargo, el grupo de Karayalcin ya había demostrado previamente que a mayor concentración, el H_2O_2 era capaz de producir un incremento monofásico de la I_{sc} basal (52). Aún así, este último trabajo centró su interés principal en el efecto sobre la superficie serosa, pues se demostró una respuesta mayor y bifásica tras el tratamiento desde esta vertiente.

Atendiendo a las condiciones de estrés oxidativo a las que se encuentra sometida la vertiente luminal del intestino consideramos necesario conocer tanto la participación de los oxidantes desde la luz como su efecto morfofuncional sobre el colon. A su vez, es imprescindible tener información del tejido intacto sometido a oxidación, pues permite determinar la respuesta global del intestino en una situación que se aproxima más a las condiciones fisiológicas.

El H_2O_2 es uno de los oxidantes más extensamente estudiado como regulador de la secreción de Cl^- , pues este MOR desarrolla un papel importante en la iniciación y propagación del daño inflamatorio intestinal. Se sabe que es un oxidante altamente tóxico y que durante el desarrollo de la colitis ulcerosa y granulomatosa los fagocitos, comúnmente activados (161), se generan incluso concentraciones milimolares en las proximidades de los colonocitos (162).

Inicialmente elegimos trabajar con una dosis de H₂O₂ de 10 mM para alcanzar una concentración de oxidante elevada en la superficie de las células epiteliales de la mucosa cólica. El H₂O₂ añadido a la cubeta debía difundir y atravesar la capa de moco, con actividad protectora antioxidante, y llegar hasta la superficie epitelial (163).

Tras definir todas las condiciones experimentales, se estudió el efecto del H₂O₂ luminal sobre la Isc basal. El resultado del contacto de la mucosa cólica con el oxidante fue un incremento transitorio de la Isc basal, cuyo valor máximo se alcanzó a los 5 minutos de la adición del H₂O₂. El efecto producido sobre la Isc fue monofásico, al igual que ocurría en el modelo que utiliza mucosa/submucosa cólica de rata (52).

La Isc basal y la estimulada por forskolina, en nuestro modelo experimental, representa mayoritariamente el transporte vectorial de Cl⁻. Con toda probabilidad el aumento de Isc producido por el H₂O₂ debería ser también la consecuencia de la estimulación de la secreción electrogénica de Cl⁻. Para comprobarlo se eliminó el ión Cl⁻ de la solución tampón y efectivamente se demostró que el aumento de Isc era la respuesta de la activación del transporte vectorial de Cl⁻. Así, este resultado sugiere que el H₂O₂ ubicado en la luz intestinal actúa como un agente prosecretor con una respuesta rápida y transitoria.

Karayalcin demostró que el H₂O₂, aplicado sobre la capa submucosa, producía la máxima intensidad en secreción a una concentración de 1 mM (52). A mayores dosis, los picos de Isc fueron disminuyendo como consecuencia del efecto tóxico que ejercía el H₂O₂ sobre el tejido. Sin embargo, en nuestro modelo experimental obtuvimos un pico de alta intensidad a concentración 10 mM. Incluso, hubo ausencia de respuesta secretora a una dosis menor (5 mM). A mayores concentraciones el valor del Δ Isc fue decayendo, probablemente como consecuencia de la toxicidad que ejerce sobre las células epiteliales, al igual que ocurría en el modelo de Karayalcin (52). Por tanto, el H₂O₂ proporcionó en nuestro modelo experimental un efecto dosis-dependiente, con características similares a las del modelo de Karayalcin y colaboradores, aunque desplazado hacia dosis mayores. Así, nuestros resultados sugieren que la vertiente luminal de la mucosa del colon distal de la rata presenta una mayor resistencia al H₂O₂.

A continuación se investigó si la respuesta del colon distal de la rata tras el tratamiento con H_2O_2 era un comportamiento común ante otros agentes oxidantes. Para este estudio se utilizaron dos agentes oxidantes no fisiológicos, el PAO y la cloramina T (131, 132).

El PAO es una molécula permeable a la membrana celular que reacciona específicamente con grupos tiólicos próximos formando anillos estables e inhibe proteínas tirosín-fosfatasas (PTPs) (131). Existen datos que sugieren que el PAO oxida residuos de cisteína (141). Por tanto este agente nos sirvió para realizar un estudio comparativo pues se sabe que el H_2O_2 ejerce los mismos efectos (oxidación de grupos tiólicos de residuos de cisteína (142) e inhibición PTPs (164)). La adición de este oxidante a la superficie luminal del colon distal de la rata ocasionó una respuesta rápida y transitoria de características similares a la originada por el H_2O_2 , lo que sugiere que la estimulación de la secreción se debe a la oxidación de grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína de proteínas o bien a la inhibición de PTPs que participan en la regulación de la secreción electrogénica de Cl^- .

Para evaluar si el colon distal de la rata también respondía al tratamiento luminal con otro agente oxidante de grupos sulfhidrilo se utilizó la cloramina T. La respuesta del tejido al tratamiento fue, igualmente, un aumento rápido y transitorio de la I_{sc} basal. Ahora, el resultado sugiere que la estimulación de la secreción electrogénica de Cl^- se podría deber sólo a la oxidación de grupos tiólicos de enzimas o proteínas clave en dicha función y no a la oxidación de PTPs, pues no existen datos publicados que demuestren que la cloramina T inhibe específicamente a este tipo de proteínas. Lo que no es posible dilucidar es el tipo de residuo oxidado responsable de la estimulación de la I_{sc} basal, pues en la literatura no queda claro si la cloramina T actúa única y exclusivamente sobre metioninas o cisteínas (132, 165, 166). Sí se podría sugerir que la oxidación de residuos de cisteína es responsable de la secreción activada por los 3 oxidantes, pero no se podría saber si la oxidación de residuos de metionina también participa activamente o no en la respuesta secretora mediada por la cloramina T.

La secreción estimulada por el H_2O_2 fue una respuesta rápida, transitoria y con un periodo de duración muy corto. Un comportamiento con estas características

parecía ser la consecuencia de una activación directa del epitelio, como sucede en línea celular T₈₄ (128) o bien debido a la actuación de algún mediador, con actividad prosecretora, liberado bajo las condiciones oxidantes inducidas. Basándonos en el hecho de que en mucosa/submucosa cólica de rata, un modelo experimental más próximo al nuestro, el H₂O₂ producía la liberación de ACh tras el un aumento de los niveles de PGs (52, 167) nos planteamos investigar la implicación de ambos mediadores en la respuesta secretora estimulada por el H₂O₂ en nuestro modelo experimental. En nuestro caso, a diferencia del resultado de Karayalcin y colaboradores, el H₂O₂ estimuló la secreción de Cl⁻ a través de un mecanismo independiente de la liberación de PGs. La respuesta secretora fue mediada únicamente por la liberación de ACh. Este resultado sugiere que el H₂O₂ desde la luz induce la estimulación de la secreción electrogénica de Cl⁻ a través de un mecanismo que implica menor número de mediadores que los que induce este oxidante desde la superficie basal. Lo más probable es que la respuesta al H₂O₂ se deba a la activación del sistema nervioso entérico, aunque no se podría descartar la posibilidad de liberación de ACh por otro tipo celular diferente.

Sabiendo que nuestro modelo experimental se comportaba de manera similar ante el tratamiento con PAO como con H₂O₂, cabía esperar que ambos siguieran una vía de activación análoga. Por ello se evaluó la implicación de ACh y PGs en la respuesta al PAO y se demostró la participación del neurotransmisor a través de un mecanismo independiente de la liberación de PGs. Del mismo modo, la cloramina T ejerce un efecto prosecretor que depende de la liberación de ACh. Así, el colon distal de la rata parece comportarse de manera similar ante el tratamiento luminal con diferentes agentes oxidantes, incluso no fisiológicos, que inducen la oxidación de grupos sulfhidrilos.

Desde el punto de vista fisiopatológico nuestros resultados se podrían explicar de la siguiente manera: durante las episodios activos de la EII o de enfermedades bacterianas del tracto digestivo, existe migración transepitelial de neutrófilos (126). La función principal de estos polimorfonucleares consiste en la defensa frente a patógenos a través de su actividad fagocítica (126). Pero, además este tipo celular se caracteriza por sobreproducir MORs durante la respuesta inflamatoria (126), con una clara función defensiva. Sabiendo que uno de los objetivos de la secreción de Cl⁻ es la higiene del

tracto gastrointestinal, se podría proponer que el organismo ha desarrollado un mecanismo de defensa rápido, en que estarían implicados en parte los neutrófilos que liberan cantidades elevadas de oxidantes, como el H_2O_2 , para inducir hipersecreción a corto plazo, como primer mecanismo de defensa, para eliminar los patógenos alojados en la luz del intestino. Parece que por tratarse de una molécula de naturaleza lipofílica y con una vida media relativamente larga (162), puede atravesar fácilmente las membranas celulares y difundir a través de las diversas capas intestinales, lo que permitiría activar un mecanismo que estimulara el sistema nervioso en un periodo de tiempo corto. Así, la secreción intestinal inducida por los oxidantes favorecería la eliminación de todo el contenido luminal, tóxico y lesivo, junto con los MORs liberados, pues la presencia continua de estos últimos en el lumen podría inducir alteraciones morfofuncionales importantes, que desembocarían en la lesión de la barrera epitelial (9, 94, 117). Se necesitan dosis elevadas de H_2O_2 luminal para alcanzar un efecto prosecretor máximo, pues a pesar de la relativa facilidad de la que dispone este oxidante para atravesar las membranas biológicas, se trata de una molécula altamente reactiva que probablemente interacciona con facilidad con los sustratos que se encuentra a su paso, haciendo así disminuir la concentración final que alcanza las capas más internas y que activa la respuesta del intestino.

4. Efecto del H_2O_2 en la función de barrera

La barrera epitelial es un mecanismo de defensa físico fundamental para el intestino, pues impide la entrada de sustancias potencialmente tóxicas o antígenos lumbinales al interior del organismo. Múltiples agentes, entre ellos el H_2O_2 , tienen capacidad para alterarla, lo que se traduce en un aumento de la permeabilidad intestinal (9, 94). Diferentes autores han demostrado que a nuestra concentración de trabajo (10 mM) el efecto lesivo, sobre el ileon de la rata (9) o la línea celular Caco-2 (94), es muy intenso. Sin embargo durante los estudios de secreción que realizamos no se observaron cambios significativos en la RT de nuestro modelo experimental. Quizás el tiempo de exposición no fue lo suficientemente elevado como para obtener cambios en la RT, por ello nos planteamos ampliar el periodo de incubación hasta 120 minutos. Pero incluso tras aumentar del tiempo de exposición hasta 2 horas no se observó un descenso acusado de la RT del tejido.

La ausencia de cambios importantes en la resistencia eléctrica tras el tratamiento con H₂O₂ luminal, en comparación con los resultados de Rao o Grisham, nos llevó a plantearnos la posibilidad de un error en la metodología empleada. Por ello, se evaluó la permeabilidad paracelular del tejido expuesto a H₂O₂ mediante estudios de difusión a macromoléculas marcadas, fácilmente detectables. El marcador de menor tamaño que empleamos fue el FITC, de peso molecular 376.3 Da, que por sus características fluorescentes nos permitió valorar el estado de la permeabilidad del colon distal de la rata durante el tratamiento con H₂O₂, y con ello ver que no se producían cambios significativos tras la exposición al oxidante. Así, el resultado del efecto del H₂O₂ apical sobre la RT se correlacionó con el de la permeabilidad paracelular.

Con el fin de estudiar posibles alteraciones morfológicas sin traducción funcional se evaluó, a nivel microscópico, el efecto que tuvo el H₂O₂ sobre el colon. El estudio mostró una lesión de la mucosa muy leve a pesar del tratamiento con H₂O₂ 10 mM durante 120 minutos. El epitelio de revestimiento presentaba una ligera descamación y el resto de la mucosa mantenía su estructura normal. Por tanto, el H₂O₂ apical a concentración 10 mM, no daña ni funcional ni morfológicamente el colon distal de la rata.

El aumento de la concentración de H₂O₂ luminal condujo a un descenso significativo de la RT, lo que demostró que este oxidante producía su efecto sobre la función de barrera siguiendo un comportamiento dosis-dependiente. Lo más llamativo de nuestros resultados es que la caída de la RT sólo se observó a concentraciones muy elevadas con respecto a las utilizadas por otros autores en sus estudios en línea celular (94) ó íleon de rata (9). Si retomamos los resultados obtenidos durante los estudios de secreción basal, podemos observar que el efecto prosecretor se conseguía a dosis mucho más elevadas que las que encontramos en la bibliografía (52), por tanto, se podría concluir que el colon distal de la rata ofrece una mayor resistencia al H₂O₂ luminal que basal. Quizás la mucosa cólica ha desarrollado un mecanismo físico de protección mayor frente a las sustancias oxidantes ubicadas en la luz intestinal, en el que desempeña una función importante el moco (163).

Para conocer las lesiones morfológicas ocasionadas por el tratamiento del tejido cólico a la máxima concentración utilizada durante los estudios de RT, se evaluaron microscópicamente las muestras expuestas durante 120 minutos a H₂O₂ 100 mM. La valoración del tejido tras el estrés oxidativo inducido demostró una lesión superior a la originada por una dosis de 10 mM, pero con un daño de ligera intensidad para lo previsto. Esto sugiere que la lesión funcional del H₂O₂ luminal es mayor que la alteración morfológica que causa. Por tanto, estos resultados refuerzan el concepto de una función de resistencia potente frente al H₂O₂ luminal.

Cabía pensar que nuestro modelo experimental contaba con algún mecanismo de protección potente frente al H₂O₂, que evitaba la lesión tisular. Para valorar tal hipótesis y si el tejido se comportaba de igual modo frente a otros oxidantes no fisiológicos, se estudió el efecto del PAO y de la cloramina T apical sobre nuestro modelo de trabajo.

La exposición a PAO, a concentración 0.2 mM, ocasionó un descenso importante en la RT, siguiendo un comportamiento tiempo-dependiente. Esta dosis fue lesiva para nuestro modelo experimental, al igual que lo había sido para la línea celular Caco-2 (94). Así el colon distal de la rata y la línea celular Caco-2 parecen igualmente susceptibles al tratamiento con PAO. Sin embargo ante la exposición al H₂O₂ la monocapa celular es mucho más sensible que nuestro modelo experimental (94) que no presenta grandes cambios en su función de barrera.

El incremento de la concentración de PAO potenció la caída de la RT, lo que demostró que este oxidante originaba cambios en la función de barrera cuya intensidad dependía de la dosis empleada (comportamiento dosis-dependiente).

Los estudios de difusión de FITC sirvieron para corroborar que el PAO luminal estaba ocasionando un descenso en la RT como consecuencia de un aumento de la permeabilidad paracelular.

Se sabe que el PAO origina la fosforilación de proteínas asociadas con las uniones intercelulares, encargadas del mantenimiento de la función de barrera epitelial, lo que se traduce en un descenso de la RT, sin cambios importantes en la morfología

celular (93). Probablemente, en nuestro modelo experimental, el descenso de la RT observado se deba a alteraciones proteicas similares. Para evaluar si la lesión causada por el PAO sobre las uniones entre células era tan importante como para haber generado huecos intercelulares que favorecieran el paso de moléculas aún mayores que el FITC, se evaluó la permeabilidad a FD4, un marcador con un peso molecular de 4400 Da. Sin embargo, el resultado demostró que el PAO luminal no había favorecido la difusión de esta molécula, más de diez veces superior al FITC. Por tanto, se concluiría que la lesión mediada por el PAO produce cambios en las uniones intercelulares, lo que supone la separación entre células vecinas que facilita el transporte de moléculas del orden de 300 Da pero no de 4400 Da por vía paracelular.

Sin embargo, no se puede afirmar dicha conclusión sin considerar una de las limitaciones de nuestro modelo experimental, como es la presencia de las capas más externas que podrían retener las moléculas de FD4. En tal caso, a pesar de existir lesión en la barrera epitelial no se observaría un incremento del transporte del fluoróforo. Sin embargo, existen trabajos publicados, como el de Venkatraman y colaboradores, que demuestran que el tratamiento luminal del colon distal de rata intacto con un detergente fisiológico, el ácido deoxicólico, favorecía el transporte de una molécula de 4000 Da de peso molecular (148). A pesar de la presencia de las capas muscular y serosa, el tratamiento fue lo suficientemente agresivo como para provocar una pérdida de la barrera epitelial, que permitía el paso de moléculas voluminosas que no quedaban retenidas en las capas más externas. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la lesión originada por el PAO fue menor a la producida por el ácido deoxicólico, y con ello el espacio entre las células epiteliales era inferior tras el tratamiento con el oxidante que con el detergente fisiológico.

Quizás también habría que considerar si el método de determinación de la concentración de nuestro marcador no fue lo suficientemente sensible como para detectar concentraciones bajas del FD4 que atravesaron el tejido. Sin embargo confiamos en la metodología, pues el equipo de fluorimetría utilizado para el estudio fue capaz de medir concentraciones nanomolares.

Por tanto, cabe destacar, de los resultados obtenidos en los estudios de permeabilidad paracelular, que el PAO origina cambios en la función de barrera

importantes al igual que ocurre en línea celular Caco-2 (94). Por el contrario, el colon distal de la rata parece ser mucho más resistente frente al ataque por H_2O_2 que la monocapa celular (94).

Con el fin de evaluar y conocer las lesiones ocasionadas por el PAO apical en la estructura de la mucosa cólica se evaluó el tejido tratado mediante microscopía óptica. El resultado del estudio demostró que las lesiones no fueron extensas, sino que se localizaron principalmente a nivel de la superficie de la mucosa cólica. Así, las alteraciones funcionales del colon distal de la rata tras el tratamiento con PAO apical fueron mayores que las lesiones morfológicas.

Tras conocer el efecto del PAO sobre el colon distal de la rata, y para comprobar la especificidad, se determinó el efecto del otro oxidante no fisiológico, la cloramina T. La exposición continua de cloramina T apical, a concentración 5 mM, sobre la superficie mucosa, produjo una disminución significativa de la RT con un comportamiento tiempo-dependiente. Por tanto, el efecto de este agente oxidante de grupos tiólicos fue una pérdida importante de la función de barrera al igual que ocurría con el PAO, que se acentuaba conforme aumentamos la concentración (dosis-dependencia). Por tanto la cloramina T luminal es un agente con capacidad para alterar la función de barrera intestinal del colon distal de la rata.

Al igual que proponíamos que los oxidantes (H_2O_2 , PAO y cloramina T) luminales podrían inducir la secreción electrogénica de Cl^- como consecuencia de la oxidación de grupos sulfhidrilos se podría sugerir que la lesión funcional originada por el PAO y la cloramina T fuese debida a la oxidación de proteínas clave para el mantenimiento de la estructura del epitelio cólico. Sin embargo, habría que considerar que los oxidantes también tienen capacidad para producir la peroxidación de los lípidos que conforman las membranas celulares y desestabilizar la estructura normal epitelial. Por tanto, tras los resultados obtenidos no podemos concluir que la cloramina T y el PAO, ambos luminales, ocasionan alteraciones en la función de barrera única y exclusivamente como consecuencia de la oxidación específica de grupos tiólicos proteicos.

Una vez conocido el efecto de la cloramina T en la RT pretendimos evaluar el estado de la permeabilidad paracelular al igual que hicimos para el H₂O₂ y el PAO. Sin embargo surgió un problema metodológico pues la cloramina T originó el apagamiento de la fluorescencia emitida por el FITC. Al no tratarse de un experimento relevante en nuestro estudio se descartó la idea de evaluar la permeabilidad paracelular usando marcadores no fluorescentes y se pasó a valorar microscópicamente las alteraciones morfológicas ocasionadas por este oxidante. El estudio desveló una lesión leve de la estructura de la mucosa, que afectó principalmente a su superficie.

En los estudios morfológicos realizados a las muestras tratadas con cada uno de los oxidantes (H₂O₂, PAO y cloramina T), se ha visto que la estructura cólica ha sufrido cambios de carácter leve similares en los 3 casos. Sin embargo, la RT y la permeabilidad del tejido se vieron fuertemente afectadas tras la exposición a los oxidantes no fisiológicos a diferencia del efecto observado tras el tratamiento con H₂O₂ 10 mM. Así el PAO y la cloramina T producen la alteración de la función de barrera epitelial, efecto que no produce el H₂O₂, sin inducir cambios importantes en la estructura de la pared del colon. Por tanto este resultado sugiere que el colon distal de la rata está preparado ante un ataque por H₂O₂, probablemente mediante un mecanismo de defensa endógeno, que evita la alteración de la función de barrera, y específico, porque no protege frente a todos los agentes con actividad oxidante.

Se sabe que la capa de moco desempeña una función de barrera importante, capaz de proteger frente a los oxidantes (163). Se podría pensar en ella como la responsable de la protección frente al H₂O₂, pues existen datos que demuestran que el moco traqueal de oveja actúa degradando el H₂O₂ (168). Por tanto, sería posible que el H₂O₂ añadido se degradara al entrar en contacto con la capa de moco que protege la mucosa cólica, evitando así la lesión. Quizás esta capa tenga la capacidad para defender al tejido del ataque del H₂O₂ luminal, pero lo que ya ha quedado demostrado previamente, es que no tiene capacidad para proteger frente a todos los oxidantes.

Para evaluar una posible degradación del H₂O₂ apical tras entrar en contacto con el tejido cólico, se evaluó la concentración final de este oxidante en la cubeta y se consideró como control una cámara de Ussing sin tejido. El resultado de este experimento demostró que los niveles de H₂O₂ disminuían significativamente tras 120

minutos de incubación en la cámara con tejido, pero que también tenía lugar en las cubetas sin muestra cólica. Por tanto, la desaparición del H₂O₂ no se debía al contacto de éste con el tejido, sino a las propias condiciones experimentales.

Este descenso en la dosis de H₂O₂ podría ser el causante de la ausencia de un efecto nocivo sobre el tejido. Sin embargo, la concentración final en la cubeta seguía manteniéndose lo suficientemente elevada como para producir una lesión superior a la observada. Por tanto, lo más lógico era pensar que el colon de la rata había desarrollado un mecanismo de protección endógeno potente y específico frente al H₂O₂, y que en él participaban activamente las enzimas endógenas (catalasa y GPx).

5. Implicación de las enzimas endógenas antioxidantes

El organismo se protege frente a los MORs, generados durante el metabolismo normal, a través de la acción de los antioxidantes. La primera línea de defensa específica conocida frente a los oxidantes está constituida por enzimas con capacidad para degradarlos. La catalasa y la GPx se encargan de la destrucción del H₂O₂ generado. Su función se conoce con detalle, pero existen pocos datos que desvelen el papel que desempeñan en el intestino intacto sometido a estrés inducido, a pesar de que se trata de un órgano sujeto a una elevada producción de MORs,.

Esta tesis ya tenía como objetivo investigar la implicación de ambas enzimas durante el estrés inducido por la adición apical de H₂O₂. Pero el interés se hizo aún mayor cuando se observó que tras el tratamiento con H₂O₂, a dosis elevadas, no se obtenía un claro efecto nocivo sobre la función de barrera y se pensaba en ellas como posibles mediadores de una protección antioxidante endógena.

Para estudiar la implicación de catalasa se inhibió su actividad enzimática con aminotriazol. Para asegurar que la actividad enzimática quedaba inhibida se eligió como concentración de trabajo 50 mM y se evaluó el efecto del H₂O₂ luminal (10 mM). El resultado del tratamiento fue una caída importante de la RT del tejido, lo que sugiere que esta enzima endógena desempeña una función de defensa importante frente a dosis elevadas de H₂O₂.

El aminotriazol por sí mismo no alteró la RT del tejido, lo que nos lleva a pensar que el efecto generado por el H₂O₂ en la RT se deba única y exclusivamente a la pérdida de la actividad enzimática de la muestra. De esta manera el tejido quedaría desprovisto de defensa antioxidante, pudiendo ser fácilmente atacable por el H₂O₂.

A continuación se evaluó el efecto del H₂O₂ (10 mM) apical sobre el tejido preincubado con dosis menores de aminotriazol. Observamos que a medida que descendía la cantidad de inhibidor la RT sufría una alteración menor. El resultado sugiere que a medida que desciende la actividad de catalasa el tejido queda más expuesto al ataque oxidante. Por tanto, esta enzima desarrollaría una función antioxidante importante, susceptible al aminotriazol, a través de un mecanismo dosis-dependiente.

Finalmente, la determinación de la actividad de catalasa de las muestras expuestas a aminotriazol y H₂O₂ desveló, efectivamente, que el tejido sufría un descenso de la actividad enzimática conforme aumenta la dosis de aminotriazol. Por tanto, este resultado sugiere que el colon distal de la rata presenta un potente mecanismo de defensa antioxidante, en el que participa activamente la catalasa. Su inhibición desemboca en un descenso importante de la RT tras el tratamiento con H₂O₂ exógeno.

La catalasa desempeña una función de protección primordial en nuestro modelo experimental, probablemente metabolizando el H₂O₂ a nivel local. Se habla de una protección localizada pues ya se demostró anteriormente que el tejido no tenía capacidad suficiente para degradar todo el H₂O₂ que se añadía a la cubeta. Esta enzima no pudo eliminar una cantidad de oxidante tan elevada pero sí ofrecer protección a nivel funcional.

La inhibición de la actividad enzimática demostró potenciar la caída de la RT mediada por el H₂O₂ a concentración 10 mM. El tejido con actividad de catalasa intacta no sufrió un descenso significativo en la función de barrera mientras que tras la pérdida de la actividad antioxidante, por inhibición con aminotriazol, la lesión se potenció. Para comprobar hasta qué punto el descenso de la actividad de catalasa aumentaba la sensibilidad del tejido al ataque por H₂O₂, se evaluó el efecto de

diferentes dosis de este oxidante en tejido con actividad de catalasa suprimida por aminotriazol. El resultado demostró que la RT no sufría cambios tras el tratamiento con una concentración de H₂O₂ de 1 mM, lo que sugiere que esa dosis tan baja de oxidante en la luz intestinal no genera cambios importantes en la función de barrera epitelial incluso ante una deficiencia en la actividad enzimática.

A pesar de que el H₂O₂ a concentración 25 mM generó cambios significativos en la resistencia eléctrica del tejido, el efecto se potenció al suprimir la actividad de catalasa con aminotriazol. Este resultado sugiere que la enzima no tiene suficiente capacidad para evitar la lesión mediada por el H₂O₂ a esa dosis pero sí para proteger en parte. Sin embargo a dosis tan altas como 100 mM, la actividad enzimática de catalasa no es lo suficientemente potente como para proteger al tejido frente al ataque del oxidante. Con toda probabilidad, la toxicidad que origina es tan elevada que el tejido es incapaz de defenderse ante ella.

Los estudios de difusión a macromoléculas desvelaron que el descenso de la RT mediado por el H₂O₂ (10 mM), en tejido tratado con aminotriazol, venía acompañado de un aumento de la permeabilidad paracelular a FITC. Sin embargo, el transporte de FD4 era ligeramente superior aunque no alcanzó la significación estadística. Por tanto, la inhibición de catalasa potenció la lesión mediada por el H₂O₂, lo que aumentó los espacios intercelulares que favorecieron el paso de moléculas del orden de 300 Da y no de tamaño mayor a través de la vía paracelular.

Uno de los resultados más llamativo del daño mediado por el H₂O₂, en muestras con actividad de catalasa modificada por aminotriazol, fue a nivel microscópico. La lesión que ocasionó el oxidante, y no el inhibidor, afectó a todo el espesor de la capa mucosa, incluidas las criptas intestinales, con destrucción de parte de dicha capa. Por tanto, parece que la catalasa endógena del colon distal de la rata desempeña un papel protector tanto funcional como morfológico fundamental frente al H₂O₂ luminal.

Un trabajo posterior del equipo de Rao, de nuevo en línea celular Caco-2, demostró que el H₂O₂ producía alteraciones importantes en la RT incluso a concentración 20 µM y que el efecto se potencia al inhibir la actividad enzimática de

catalasa (169). Este resultado validó la importancia de esta enzima frente al ataque por H_2O_2 , sin embargo demuestra que la monocapa celular es mucho más susceptible al ataque por este oxidante que el colon distal de la rata. La línea celular Caco-2 no dispone de un mecanismo enzimático lo suficientemente potente como para prevenir las lesiones que ocasiona el H_2O_2 a una dosis tan baja.

El colon distal de la rata no sufre cambios morfofuncionales significativos tras el tratamiento con H_2O_2 gracias a la actividad de catalasa endógena. Por el contrario, el tejido sufrió alteraciones funcionales importantes tras la exposición a PAO y cloramina T. Se sabe que la catalasa es un enzima con actividad específica frente al H_2O_2 y además es lógico pensar que no tiene capacidad para actuar sobre oxidantes no fisiológicos.

Tras investigar la función de catalasa, se determinó el papel que desempeñaba la otra enzima antioxidante específica, la GPx, frente al estrés oxidativo inducido por la adición de H_2O_2 luminal. Los resultados obtenidos durante los estudios de catalasa sugerían que su participación protectora era muy baja o incluso nula, pues la ausencia única de actividad de catalasa hizo que las lesiones ocasionadas por el H_2O_2 fuesen muy importantes.

Aún así, procedimos a evaluar la implicación de la enzima GPx siguiendo el mismo procedimiento que empleamos para estudiar la catalasa. Para ello se inhibió su actividad, utilizando ácido mercaptosuccínico, y se evaluó el efecto del H_2O_2 apical sobre la función de barrera. El resultado del estudio demostró que la caída de la RT no se agravaba como consecuencia de la inhibición de la GPx. Por el contrario, el valor de RT fue ligeramente superior al de las muestras tratadas con H_2O_2 y actividad de GPx intacta. Esto sugiere que la inhibición de esta enzima podría evitar la lesión en lugar de favorecerla. El trabajo del equipo de Rao anteriormente referenciado demostró que la inhibición de GPx prevenía la lesión que ocasiona el H_2O_2 en la línea celular Caco-2 (169). Quizás podía ocurrir algo similar en nuestro modelo experimental que no se vislumbraba con claridad debido a la ausencia de efecto del H_2O_2 por la acción de la catalasa.

El H₂O₂ sólo ocasiona alteraciones importantes en la función de barrera de nuestro modelo experimental cuando el tejido tenía inhibida su actividad de catalasa, así que nos planteamos evaluar si la inhibición de la GPx sería capaz de proteger frente a dicha lesión. Para ello, se inhibieron ambas enzimas y se sometió al tejido a H₂O₂ (10 mM) apical. El resultado demostró que el ácido mercaptosuccínico prevenía la lesión mediada en una primera etapa. El tejido con actividad de catalasa inhibida sufría una fuerte lesión significativa tras el tratamiento con H₂O₂ mientras que la preincubación del tejido con ácido mercaptosuccínico lo evitaba durante los primeros 60 minutos de incubación con H₂O₂. A partir de ese momento la RT decaía paulatinamente hasta nivelarse con el valor de las muestras sin actividad de catalasa.

La microscopía óptica reveló igualmente que la preincubación con ácido mercaptosuccínico proporcionaba la protección de la microestructura cólica. Transcurridos 60 minutos de incubación con H₂O₂ la mitad de la capa mucosa mantenía su morfología intacta mientras que la destrucción de la capa mucosa ya había tenido lugar en ese periodo de tiempo en las muestras tratadas con aminotriazol. A los 120 minutos de incubación, la lesión de las muestras doblemente inhibidas se había extendido hasta afectar aproximadamente a las 2/3 partes de la capa mucosa, aunque el fondo de las criptas permanecía intacto.

La GPx es una enzima antioxidante conocida por su capacidad para degradar y proteger frente al H₂O₂, sin embargo los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental sugerían que tiene un efecto contrario, es decir, la protección aparece como consecuencia de la inhibición de su actividad.

Esta enzima antioxidante necesita GSH como agente reductor. La actividad de GPx supone consumo de GSH intracelular, mientras que su inhibición permite que se mantengan los niveles normales. Se sabe que el GSH protege frente al daño mediado por algunos oxidantes (170, 171) pues forma parte de una segunda línea de defensa (no enzimática) frente a los MORs. Por tanto, un aumento de los niveles intracelulares tras la inhibición de GPx podría ser el motivo de la protección observada en nuestro modelo experimental. Ello nos llevó a determinar los niveles intracelulares de GSH a los 60 y 120 minutos de incubación con H₂O₂.

El resultado del estudio desveló que los niveles intracelulares de GSH, de las muestras doblemente inhibidas y tras 60 minutos de tratamiento con H_2O_2 , fueron similares a los de las muestras control, mientras que las muestras sólo tratadas con aminotriazol demostraron tener niveles muy bajos. A los 120 minutos de incubación con H_2O_2 , la concentración de GSH disminuyó hasta aproximarse al valor de las muestras sólo con la actividad de catalasa inhibida, aunque quedando ligeramente por encima.

Por tanto, estos resultados sugerían que el descenso de la actividad de GPx previene el daño mediado por el H_2O_2 durante un periodo de 60 minutos debido al mantenimiento de los niveles de GSH intracelulares. Tras 120 minutos, la concentración de GSH decrece, aunque sin alcanzar los valores mínimos detectados en las muestras inhibidas únicamente con aminotriazol. Con ello aumenta la lesión de la estructura cólica y desciende la RT, aunque sin llegar a las condiciones máximas de daño presentes en las muestras con actividad de catalasa modificada. Parecía que la GPx endógena del colon distal de la rata desempeñaba una función lesiva superior al papel de protección inicialmente identificado. Sin embargo, estos hallazgos parecían muy contradictorios a pesar de que autores como Rao y colaboradores (169) obtuvieran un resultado similar. Por ello, nos planteamos buscar limitaciones en la metodología empleada para el estudio. El primer aspecto a evaluar fue asegurar que el inhibidor empleado (el ácido mercaptosuccínico) era el adecuado para el estudio. Estructuralmente, el inhibidor dispone de un grupo sulfhidrilo fácilmente atacable por el H_2O_2 . La interacción entre ambos agentes supondría un descenso significativo en la concentración de oxidante y probablemente de ácido reducido. Tal como demostramos, la disminución de la dosis de H_2O_2 en la cubeta fue la causa de que tanto la RT como el nivel de GSH intracelular se mantuvieran durante un periodo de 60 minutos y que la alteración morfológica fuera menor. Por tanto, el ácido mercaptosuccínico actúa como “scavenger” sobre el H_2O_2 exógeno.

Sabiendo que el ácido mercaptosuccínico dispone de un grupo tiólico fácilmente atacable por los agentes oxidantes, resultaba posible que interaccionara con el PAO y produjera un descenso de la concentración útil de ambos agentes, lo que prevendría la lesión mediada por este oxidante. Por ello, se estudió el efecto del PAO sobre la RT del tejido previamente incubado y mantenido con el inhibidor. El resultado

mostró que, incluso tras 120 minutos de incubación con PAO, la RT del tejido no sufrió cambios significativos. Se puede concluir que el ácido mercaptosuccínico actúa como “scavenger” frente a los oxidantes de grupos tiólicos exógenos.

Cuando por analogía en su mecanismo de acción se empleó GSH, en lugar de ácido mercaptosuccínico, se observó un resultado similar, es decir, se evitó el descenso de la RT característico tras el tratamiento con PAO apical. Este resultado sugiere que el ácido mercaptosuccínico exógeno tiene un efecto antioxidante análogo al del GSH, y que la prevención de la lesión tisular se debe a su papel reductor y no a la inhibición de la enzima GPx. Así, se podría proponer al ácido mercaptosuccínico no sólo como inhibidor de la GPx sino también como agente reductor, que se podría ser utilizado en el futuro como antioxidante en estudios de estrés oxidativo.

Tras conocer las limitaciones metodológicas del uso del ácido mercaptosuccínico para evaluar la implicación de la GPx, estudiamos todas las posibilidades a nuestro alcance. Sin embargo, nos encontramos con la falta de medios para valorar la participación enzimática de manera aislada y sin interferencias en nuestro modelo experimental. La única posibilidad consistiría en la utilización de ratones “knock-out” para la enzima GPx, que permitiría evaluar el efecto que produciría el H₂O₂ en ausencia de actividad enzimática. Sin embargo, se trataría de un modelo experimental completamente diferente al nuestro y los resultados obtenidos en el estudio no se podrían comparar con los obtenidos en colon de rata sana. Sería necesario realizar un trabajo completo en este tipo de animal.

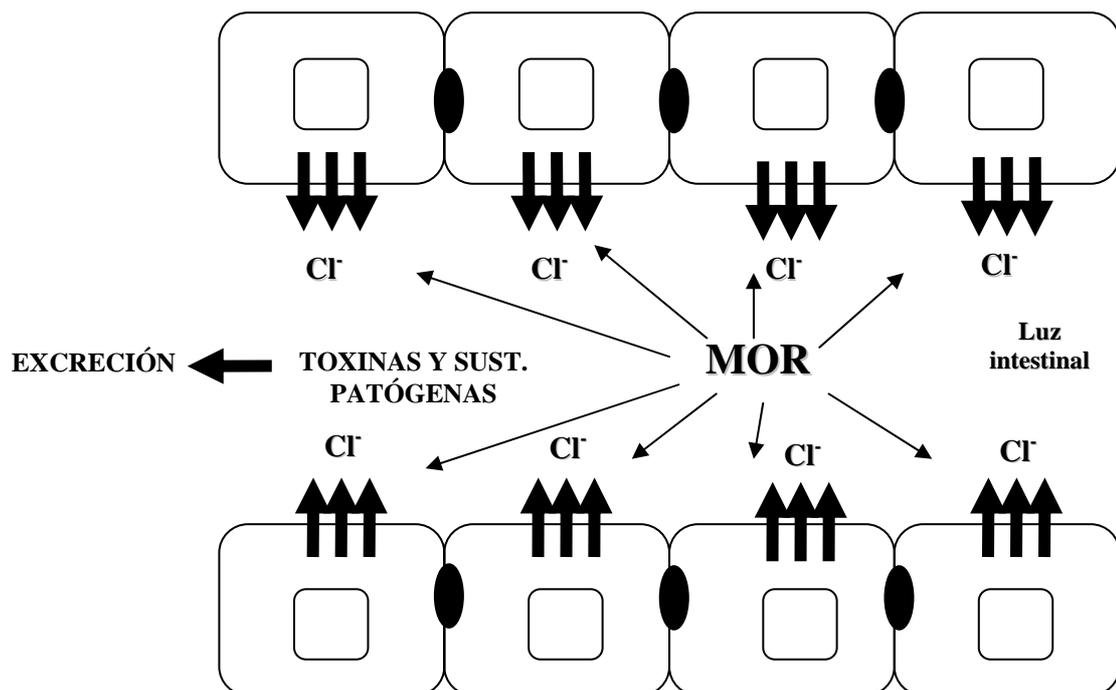
Una posible solución que se planteó inicialmente para evaluar la implicación de GPx, en nuestro modelo experimental y en nuestras condiciones de trabajo, consistía en eliminar el ácido mercaptosuccínico antes de añadir el H₂O₂ a la cubeta. El equipo de Rao siguió este protocolo en su estudio en la línea celular Caco-2 (169). Sin embargo había que asegurar que la enzima permanece inhibida de manera irreversible y además que el tejido no retiene una cantidad de ácido remanente capaz de degradar el H₂O₂ que alcanza la superficie tisular. Durante el estudio que realizó este equipo no se consideró ninguno de los inconvenientes que aquí reseñamos, por lo que no se puede asegurar que el efecto observado sea única y exclusivamente el de la GPx.

La solución podría ser un cambio de inhibidor, sin embargo no disponemos de ninguno que no interfiera colateralmente. Un claro ejemplo sería el uso de S-nitro-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP), un donador de NO, que inactiva la GPx bovina de manera dosis- y tiempo-dependiente (172). Pero se sabe que el NO y sus derivados son potentes agentes oxidantes (126) que contribuyen en la lesión oxidante y que probablemente potenciarían el efecto del H₂O₂. Por otra parte, la inhibición de la síntesis de GSH, con L-butionina sulfoximina (BSO) (173), no parece ser una buena solución para estudiar la implicación de la GPx de manera aislada, pues el descenso de otro agente que forma parte de la defensa antioxidante natural, el GSH, con toda probabilidad favorecerá la lesión mediada por el H₂O₂ e incluso impide conocer el efecto aislado de la enzima. Este inhibidor sólo permitiría conocer el papel del sistema de GPx-GSH, pero no el de la enzima por sí misma, que es nuestro objetivo.

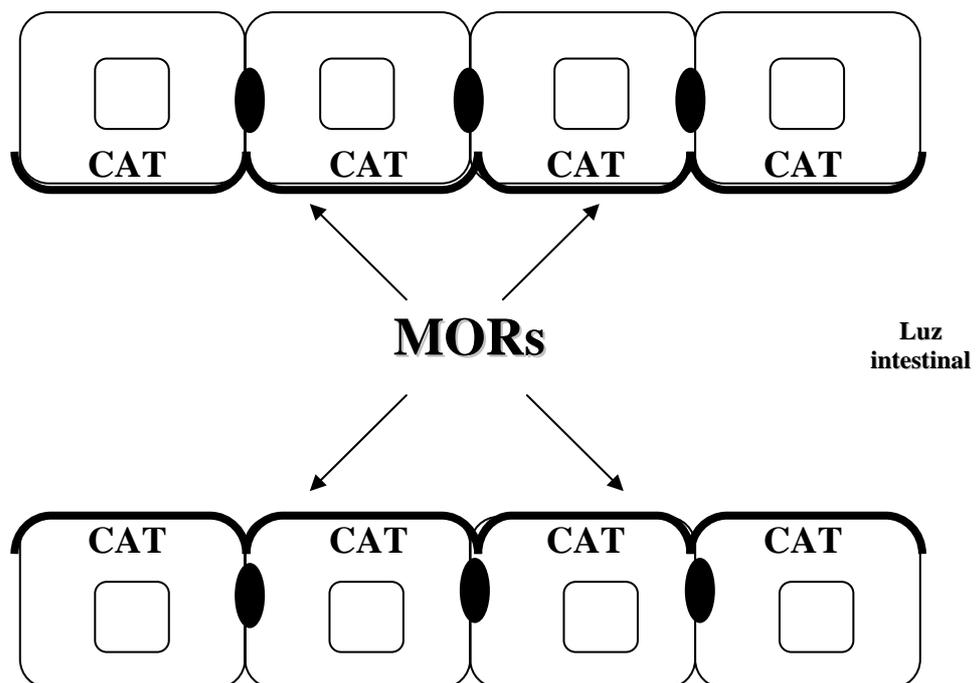
Aún con las limitaciones metodológicas se podría concluir que su participación protectora frente al H₂O₂ luminal es muy baja o prácticamente nula comparado al papel que desarrolla la catalasa endógena.

Por tanto, evaluando todos los resultados obtenidos durante nuestro estudio proponemos que el colon distal de la rata ha desarrollado un importante mecanismo de defensa antioxidante frente al H₂O₂ generado en la luz intestinal, que constaría de varias etapas:

1. Durante el desarrollo de determinados estados fisiopatológicos tiene lugar la migración de neutrófilos hasta la luz intestinal y con ello la sobreproducción de MORs. El objetivo principal es la eliminación de las sustancias patógenas causantes de la lesión intestinal. Los MORs liberados no sólo destruirían los patógenos localizados en la luz intestinal, sino que inducirían la secreción electrogénica de Cl^- de una forma rápida y transitoria, para conseguir la limpieza del tubo digestivo. La estimulación de la hipersecreción no sólo eliminaría las sustancias patógenas sino también el exceso de MORs que se encuentran en contacto directo con el epitelio. Por tanto, se trataría de la primera línea de defensa antioxidante inducida e inespecífica que actuaría frente a todos los agentes capaces de oxidar grupos tiólicos. Se trataría de una primera respuesta rápida de eliminación de agentes tóxicos para las células.



2. Un efecto insuficiente del primer mecanismo defensivo dejaría al intestino expuesto a una concentración elevada de MORs, es decir, un estrés oxidativo prolongado. Por ello, el colon distal habría desarrollado una segunda línea de defensa antioxidante específica frente al H_2O_2 , en la que participaría muy activamente la enzima catalasa. El tejido estaría preservado frente a una posible lesión morfofuncional importante incluso ante dosis elevadas de oxidantes.



CONCLUSIONES

1ª CONCLUSIÓN

- 1.1 El colon distal de la rata responde frente al H₂O₂ luminal con un aumento rápido y transitorio de la secreción electrogénica de Cl⁻ basal. El comportamiento secretor es común al tratamiento apical con agentes oxidantes no fisiológicos, como son el PAO y la cloramina T.
- 1.2 El efecto prosecretor surge probablemente como consecuencia de la activación del sistema nervioso entérico que libera ACh a través de un mecanismo independiente de la síntesis de PGs.

2ª CONCLUSIÓN

- 2.1 La función de barrera característica del colon distal de la rata sufre cambios morfofuncionales importantes tras la exposición prolongada a oxidantes lumbinales.
- 2.2 El tejido es más susceptible ante el ataque por los oxidantes no fisiológicos (PAO y cloramina T) que ante el H₂O₂.

3ª CONCLUSIÓN

El colon distal de la rata presenta un potente mecanismo enzimático antioxidante específico frente al H₂O₂ luminal en el que la enzima catalasa desempeña un papel crítico.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Simon GL, Gorbach SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*. 1984 Jan;86(1):174-93. Review.
- (2) Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-9. Review.
- (3) Field M, Rao MC, Chang EB. Intestinal electrolyte transport and diarrheal disease (2). *N Engl J Med*. 1989 Sep 28;321(13):879-83. Review.
- (4) Hecht G, Pothoulakis C, LaMont JT, Madara JL. Clostridium difficile toxin A perturbs cytoskeletal structure and tight junction permeability of cultured human intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest*. 1988; 82: 1516-24.
- (5) Karlsson A, Markfjall M, Stromberg N, Dahlgren C. Escherichia coli-induced activation of neutrophil NADPH-oxidase: lipopolysaccharide and formylated peptides act synergistically to induce release of reactive oxygen metabolites. *Infect Immun*. 1995 Dec;63(12):4606-12.
- (6) Qiu B, Pothoulakis C, Castagliuolo I, Nikulasson S, LaMont JT. Participation of reactive oxygen metabolites in Clostridium difficile toxin A-induced enteritis in rats. *Am J Physiol*. 1999 Feb;276(2 Pt 1):G485-90.
- (7) Qadri F, Raqib R, Ahmed F, Rahman T, Wenneras C, Das SK, Alam NH, Mathan MM, Svennerholm AM. Increased levels of inflammatory mediators in children and adults infected with Vibrio cholerae O1 and O139. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Mar;9(2):221-9.
- (8) Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig. Dis. Sci* 1988; 33 Supl: 6S-15S.
- (9) Grisham MB, Gaginella TS, Von Ritter C, Tamai H, Be RM, Granger DN. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport and epithelial cell viability. *Inflammation* 1990; 14 (5): 531-42.
- (10) Tamai H, Kachur JF, Baron DA, Grisham MB, Gaginella. Monochloramine, a neutrophil-derived oxidant, stimulates rat colonic secretion. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 257: 887-94.
- (11) Izzo AA, Mascolo N, Capasso F. Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Dig Dis Sci*. 1998 Aug;43(8):1605-20. Review.
- (12) Conner EM, Brand SJ, Davis JM, Kang DY, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease: toxins, mediators and modulators of gene expression. *Inflammatory Bowel Diseases* 1996; 2 (2): 133-47.

- (13) Selby W. Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease. *Vet Microbiol.* 2000 Dec 20;77(3-4):505-11.
- (14) Farthing MJ. Severe inflammatory bowel disease: medical management. *Dig Dis.* 2003;21(1):46-53.
- (15) Unno N, Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 1998 Jun;27(2):289-307.
- (16) Meddings JB. Review article: Intestinal permeability in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997 Dec;11 Suppl 3:47-53; discussion 53-6.
- (17) Yamada T, Grisham MB. Pathogenesis of tissue injury: role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen. *Inflammatory Bowel Disease: from bench to bedside.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1994: 133-50.
- (18) Deshmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole VS, Agnese D, Shah PC, Reddell M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am J Physiol* 1997; 273: C1130-C1135.
- (19) Mc Cord JM. Oxygen derived radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-63.
- (20) Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen derived free radicals in digestive tract diseases. *Surgery* 1983; 94: 415-22.
- (21) Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *CRit Care Med* 1993; 21: 1376-86.
- (22) Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG, Lundgren O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology* 1994; 106: 629-36.
- (23) Horoton JW, White JW. Free radical scavengers prevent intestinal ischemia reperfusion-mediated cardiac dysfunction. *J Surg Res* 1993; 55: 282-9.
- (24) Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen species in the lung. *Lab Invest* 1995; 73: 3-19.
- (25) Schoenberg MH, Beger HG. Oxygen radicals in intestinal ischemia and reperfusion. *Chem Biol. Interact* 1990; 76: 141-61.
- (26) Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):245-89. Review.
- (27) Powell DW. Barrier function of epithelia. *Am. J. Physiol.* 1981; 241: G275-88. Review.

- (28) Karp G. *Biología celular y molecular*. Capítulo 7: Interacciones entre células y su entorno. Páginas 255-64. Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- (29) Lamont JT. Mucus: the front line of intestinal mucosal defense. *Ann N Y Acad Sci*. 1992;664:190-201. Review.
- (30) Barrett K, Keely SJ. Chloride secretion by the intestinal epithelium: Molecular basis and regulatory aspects. *Annu. Rev. Physiol*. 2000; 62: 535-72.
- (31) Trier JS. Cell migration in the intestine. *Gastroenterology*. 1968 May;54(5):989-90.
- (32) Langman JM, Rowland R. The number and distribution of lymphoid follicles in the human large intestine. *J Anat*. 1986 Dec;149:189-94.
- (33) Keast JR. Mucosal innervation and control of water and ion transport in the intestine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1987;109:1-59. Review.
- (34) Surprenant A. Control of the gastrointestinal tract by enteric neurons. *Annu Rev Physiol*. 1994;56:117-40. Review.
- (35) Kockerling A, Fromm M. Origin of cAMP-dependent Cl⁻ secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol*. 1993 May;264(5 Pt 1):C1294-301.
- (36) Clauss W, Schafer H, Horch I, Hornicke H. Segmental differences in electrical properties and Na-transport of rabbit caecum, proximal and distal colon in vitro. *Pflugers Arch*. 1985 Mar;403(3):278-82
- (37) Sandle GI, Wills NK, Alles W, Binder HJ. Electrophysiology of the human colon: evidence of segmental heterogeneity. *Gut*. 1986 Sep;27(9):999-1005.
- (38) Jorgensen PL. Sodium and potassium ion pump in kidney tubules. *Physiol Rev*. 1980 Jul;60(3):864-917. Review.
- (39) Geibel JP, Rajendran VM, Binder HJ. Na(+)-dependent fluid absorption in intact perfused rat colonic crypts. *Gastroenterology*. 2001 Jan;120(1):144-50.
- (40) Rajendran VM, Geibel J, Binder HJ. Chloride-dependent Na-H exchange. A novel mechanism of sodium transport in colonic crypts. *J Biol Chem*. 1995 May 12;270(19):11051-4.
- (41) Suzuki Y, Kaneko K, Maruyama M, Hayashi H. Basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in epithelial cells from guinea pig distal colon. *Jpn J Physiol*. 1994;44 Suppl 2:S305-7.
- (42) Mall M, Bleich M, Schurlein M, Kuhr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K. Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):G1274-81.

- (43) Li Y, Halm ST, Halm DR. Secretory activation of basolateral membrane Cl⁻ channels in guinea pig distal colonic crypts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Apr;284(4):C918-33.
- (44) Lipecka J, Bali M, Thomas A, Fanen P, Edelman A, Fritsch J. Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Apr;282(4):C805-16.
- (45) Ikuma M, Geibel J, Binder HJ, Rajendran VM. Characterization of Cl-HCO₃ exchange in basolateral membrane of rat distal colon. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Oct;285(4):C912-21.
- (46) Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol*. 1999 Jun 1;517 (Pt 2):317-26.
- (47) Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol*. 1999 Mar;276(3 Pt 1):C621-7.
- (48) Sandle GI, Foster ES, Lewis SA, Binder HJ, Hayslett JP. The electrical basis for enhanced potassium secretion in rat distal colon during dietary potassium loading. *Pflugers Arch*. 1985 Apr;403(4):433-9.
- (49) Dorge A, Beck FX, Rechkemmer G. Cellular site of active K absorption in the guinea-pig distal colonic epithelium. *Pflugers Arch*. 1998 Jul;436(2):280-8.
- (50) Kaunitz JD, Sachs G. Identification of a vanadate-sensitive potassium-dependent proton pump from rabbit colon. *J Biol Chem*. 1986 Oct 25;261(30):14005-10.
- (51) Perrone RD, McBride DE. Aldosterone and PCO₂ enhance rubidium absorption in rat distal colon. *Am J Physiol*. 1988 Jun;254(6 Pt 1):G898-906.
- (52) Karayalcin SS, Sturbaum CW, Wachsman JT, Cha JH, Powell DW. Hydrogen peroxide stimulates rat colonic prostaglandin production and alters electrolyte transport. *J Clin Invest*. 1990 Jul; 86(1): 60-8.
- (53) Greger R. Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:467-91. Review.
- (54) Mayol JM, Alarma-Estrany P, O'Brien TC, Song JC, Prasad M, Adame-Navarrete Y, Fernandez-Represa JA, Mun EC, Matthews JB. Electrogenic ion transport in mammalian colon involves an ammonia-sensitive apical membrane K⁺ conductance. *Dig Dis Sci*. 2003 Jan;48(1):116-25.
- (55) Hrnjez BJ, Song JC, Prasad M, Mayol JM, Matthews JB. Ammonia blockade of intestinal epithelial K⁺ conductance. *Am J Physiol*. 1999 Sep;277(3 Pt 1):G521-32.

- (56) Sandle GI, McNicholas CM, Lomax RB. Potassium channels in colonic crypts. *Lancet*. 1994 Jan 1;343(8888):23-5.
- (57) Bleich M, Briel M, Busch AE, Lang HJ, Gerlach U, Gogelein H, Greger R, Kunzelmann K. KVLQT channels are inhibited by the K⁺ channel blocker 293B. *Pflugers Arch*. 1997 Aug;434(4):499-501.
- (58) Mandel KG, McRoberts JA, Beuerlein G, Foster ES, Dharmasathaporn K. Ba²⁺ inhibition of VIP- and A23187-stimulated Cl⁻ secretion by T84 cell monolayers. *Am. J. Physiol*. 1986; 250: C486-94.
- (59) Dharmasathaporn K, Cohn J, Buerlein G. Multiple calcium-mediated effect or mechanisms regulate chloride secretory responses in T84 cells. *Am. J. Physiol*. 1989; 256: C1224-30.
- (60) Cohn JA. Vasoactive intestinal peptide stimulates protein phosphorylation in a colonic epithelial cell line. *Am. J. Physiol*. 1987; 253: G420-24.
- (61) Lytle C, Forbush III B. Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl. *Am. J. Physiol*. 1996; 270: C437-48.
- (62) Weber WM, Cuppens H, Cassiman JJ, Clauss W, Van Driessche W. Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflugers Arch*. 1999 Sep;438(4):561-9.
- (63) Gerlach AC, Gangopadhyay NN, Devor DC. Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hIK1. *J Biol Chem*. 2000 Jan 7;275(1):585-98.
- (64) Clarke LL, Harline MC. CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na⁺ absorption in a cystic fibrosis mouse model. *Am J Physiol*. 1996 Feb;270(2 Pt 1):G259-67.
- (65) Ahn W, Kim KH, Lee JA, Kim JY, Choi JY, Moe OW, Milgram SL, Muallem S, Lee MG. Regulatory interaction between the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and HCO₃⁻ salvage mechanisms in model systems and the mouse pancreatic duct. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):17236-43
- (66) Kunzelmann K. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1999;137:1-70. Review.
- (67) Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, et al. Stimulation of intestinal Cl transport by heat-stable enterotoxin: activation of cAMP-dependent protein-kinase by cGMP. *Am. J. Physiol*. 1992; 263: C607-15.

- (68) Dharmasathaphorn K, Pandol SJ. Mechanisms of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J. Clin. Invest.* 1986; 77: 348-54.
- (69) Nielsen MS, Warth R, Bleich M, Weyand B, Greger R. The basolateral Ca²⁺-dependent K⁺ channel in rat colonic crypt cells. *Pflugers Arch.* 1998 Jan;435(2):267-72.
- (70) Hug H, Sarre TF. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?. *Biochem. J.* 1993; 291: 329-43.
- (71) Jia Y, Matthews CJ, Hanrahan JW. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 4978-84.
- (72) Dharmasathaphorn K, Huott PA, Vongkovit P, Beuerlein G, Pandol SJ, Ammon HV. Cl⁻ secretion induced by bile salts. A study of the mechanism of action based on a cultured colonic epithelial cell line. *J Clin Invest.* 1989 Sep;84(3):945-53.
- (73) Mauricio AC, Slawik M, Heitzmann D, von Hahn T, Warth R, Bleich M, Greger R. Deoxycholic acid (DOC) affects the transport properties of distal colon. *Pflugers Arch.* 2000 Mar;439(5):532-40.
- (74) Quist RG, Ton-Nu HT, Lillienau J, Hofmann AF, Barrett KE. Activation of mast cells by bile acids. *Gastroenterology.* 1991 Aug;101(2):446-56.
- (75) Castagliuolo I, LaMont JT, Letourneau R, Kelly C, O'Keane JC, Jaffer A, Theoharides TC, Pothoulakis C. Neuronal involvement in the intestinal effects of *Clostridium difficile* toxin A and *Vibrio cholerae* enterotoxin in rat ileum. *Gastroenterology.* 1994 Sep;107(3):657-65.
- (76) Frieling T, Dobрева G, Weber E, Becker K, Rupprecht C, Neunlist M, Schemann M. Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in the distal colon through activation of submucosal neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1999 Jan; 359(1): 71-9.
- (77) Wershil BK, Castagliuolo I, Pothoulakis C. Direct evidence of mast cell involvement in *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in mice. *Gastroenterology.* 1998 May;114(5): 956-64.
- (78) Wasserman SI, Barrett KE, Huott PA, Beuerlein G, Kagnoff MF, Dharmasathaphorn K. Immune-related intestinal Cl⁻ secretion. I. Effect of histamine on the T84 cell line. *Am J Physiol.* 1988 Jan;254(1 Pt 1): C53-62.
- (79) Berschneider HM, Powell DW. Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest.* 1992 Feb; 89(2): 484-9.

- (80) Wang YZ, Cooke HJ. H₂ receptors mediate cyclical chloride secretion in guinea pig distal colon. *Am J Physiol.* 1990 Jun; 258(6 Pt 1):G887-93.
- (81) Barrett KE, Huott PA, Shah SS, Dharmasathaphorn K, Wasserman SI. Differing effects of apical and basolateral adenosine on colonic epithelial cell line T84. *Am J Physiol.* 1989 Jan; 256(1 Pt 1): C197-203.
- (82) Barrett KE, Cohn JA, Huott PA, Wasserman SI, Dharmasathaphorn K. Immune-related intestinal chloride secretion. II. Effect of adenosine on T84 cell line. *Am J Physiol.* 1990 May;258(5 Pt 1):C902-12.
- (83) Strohmeier GR, Reppert SM, Lencer WI, Madara JL. The A_{2b} adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *J Biol Chem.* 1995 Feb 3;270(5):2387-94.
- (84) Barrett KE, Bigby TD. Involvement of arachidonic acid in the chloride secretory response of intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1993 Feb; 264(2 Pt 1): C446-52.
- (85) Devor DC, Frizzell RA. Modulation of K⁺ channels by arachidonic acid in T84 cells. II. Activation of a Ca(2+)-independent K⁺ channel. *Am J Physiol.* 1998 Jan; 274(1 Pt 1): C149-60.
- (86) Weymer A, Huott P, Liu W, McRoberts JA, Dharmasathaphorn K. Chloride secretory mechanism induced by prostaglandin E₁ in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest.* 1985 Nov;76(5):1828-36.
- (87) Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Feb 1; 89(3): 947-51.
- (88) Joo NS, London RM, Kim HD, Forte LR, Clarke LL. Regulation of intestinal Cl⁻ and HCO₃⁻ secretion by uroguanylin. *Am J Physiol.* 1998 Apr; 274(4 Pt 1): G633-44.
- (89) Halm DR, Halm ST, DiBona DR, Frizzell RA, Johnson RD. Selective stimulation of epithelial cells in colonic crypts: relation to active chloride secretion. *Am J Physiol.* 1995 Oct;269(4 Pt 1):C929-42.
- (90) Stuart RO, Nigam SK. Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 6072-6.
- (91) Volberg T, Zick Y, Dror R, Sabanay H, Gilon C, et al. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *EMBO J.* 1992; 11: 1733-42.
- (92) Collares-Buzato CB, Jepson MA, McEwan GT, Simmons NL, Hirst BH. Junctional uvomorulin/E-cadherin and phosphotyrosine-modified protein content are

correlated with paracellular permeability in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelia. *Histochemistry*. 1994 Mar; 101(3): 185-94.

(93) Staddon JM, Herrenknecht K, Smales C, Rubin LL. Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J Cell Sci*. 1995 Feb;108 (Pt 2):609-19.

(94) Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 1997; 273: G812-G823.

(95) Karczewski J, Groot J. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions III. Tight junction regulation by intracellular messengers: differences in response within and between epithelia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2000; 279: G660-5.

(96) Van der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 69-87.

(97) Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* 1994; 35: 483-9.

(98) Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 1999; 25: 155-72.

(99) Lievin V, Peiffer I, Hudault S, et al. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-52.

(100) Stadtman ER, Berlett BS. Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem*. 1991 Sep 15;266(26):17201-11.

(101) Dalton TP, Shertzer HG, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:67-101.

(102) Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol*. 1999;188:203-55. Review.

(103) Fernández-Bañares F. Papel de los metabolitos de oxígeno reactivos en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal crónica intestinal. *Gastroenterol Hepatol* 1995; 18 (10): 526-32.

(104) Klebanoff SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. Inflammation-basic principles and clinical correlates. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. New York: Raven Press, 1992: 541-88.

- (105) Huycke MM, Abrams V, Moore DR. Enterococcus faecalis produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis*. 2002 Mar;23(3):529-36.
- (106) Huycke MM, Moore DR. In vivo production of hydroxyl radical by Enterococcus faecalis colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic Biol Med*. 2002 Sep 15;33(6):818-26.
- (107) Felten A, Barreau C, Bizet C, Lagrange PH, Philippon A. Lactobacillus species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J Clin Microbiol*. 1999 Mar;37(3):729-33.
- (108) Lugea A, Salas A, Casalot J, Guarner F, Malagelada J-R. Surface hidrofobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* 2000; 46: 515-521.
- (109) Gaginella TS, Kachur JF, Tamai H, Keshavarzian A. Reactive oxygen and nitrogen metabolites as mediators of secretory diarrhea. *Gastroenterology*. 1995 Dec;109(6):2019-28. Review.
- (110) Hills BA, Butler BD, Lichtenberger LM. Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach. *Am J Physiol*. 1983 May;244(5):G561-8.
- (111) Lichtenberger LM. The hydrophobic barrier properties of gastrointestinal mucus. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:565-83.
- (112) Butler BD, Lichtenberger LM, Hills BA. Distribution of surfactants in the canine gastrointestinal tract and their ability to lubricate. *Am J Physiol*. 1983 Jun;244(6):G645-51.
- (113) Goddard PJ, Kao YC, Lichtenberger LM. Luminal surface hydrophobicity of canine gastric mucosa is dependent on a surface mucous gel. *Gastroenterology* 1990 Feb;98(2):361-70.
- (114) Abel J, de Ruiter N. Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol Lett* 1989; 47: 191-6.
- (115) Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems-a review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull*. 1987 Apr;43(2):371-85. Review.
- (116) Bern JM, Sturbaum CW, Karayalcin SS, Berschneider HM, Wachsman JT, Powell D. Immune system control of rat and rabbit colonic electrolyte transport. Role of prostaglandins and enteric nervous system. *J Clin Invest* 1989, 83. 1810-20.

- (117) Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. iNOS upregulation mediates oxidant-induced disruption of F-actin and barrier of intestinal monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001 Jun;280(6):G1234-46.
- (118) Nathanson MH, Gautam A, Ng OC, Bruck R, Boyer JL. Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am J Physiol.* 1992 Jun;262(6 Pt 1):G1079-86.
- (119) Vessis AA, Mela-Riker L. Potential role of mitochondrial calcium metabolism during reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989 Jun;256(6 Pt 1):C1196-206.
- (120) Ar'Rajab A, Dawidson I, Fabia R. Reperfusion injury. *New Horiz.* 1996 May;4(2):224-34.
- (121) McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest.* 1996 Jul 1;98(1):136-41
- (122) Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988 Dec;255(6 Pt 2):H1269-75.
- (123) Suematsu M, Suzuki M, Kitahora T, Miura S, Suzuki K, Hibi T, Watanabe M, Nagata H, Asakura H, Tsuchiya M. Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases--the analysis of free radical generation by using chemiluminescence probe. *J Clin Lab Immunol.* 1987 Nov;24(3):125-8.
- (124) Williams JG. Phagocytes, toxic oxygen metabolites and inflammatory bowel disease: implications for treatment. *Ann R Coll Surg Engl.* 1990 Jul;72(4):253-62. Review.
- (125) Williams JG, Hughes LE, Hallett MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut.* 1990 Feb;31(2):187-93.
- (126) Grisham MB, Kvietys PR. Role of neutrophils in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, third edition, 1997.
- (127) Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Aug 1;288(2):481-7.
- (128) DuVall MD, Guo Y, Matalon S. Hydrogen peroxide inhibits cAMP-induced Cl⁻ secretion across colonic epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998 Nov;275(5 Pt 1):C1313-22.

- (129) Zareie M, Brattsand R, Sherman PM, McKay DM, Perdue MH. Improved effects of novel glucocorticosteroids on immune-induced epithelial pathophysiology. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Jun;289(3):1245-9.
- (130) Bridges RJ, Rummel W, Simon B. Forskolin induced chloride secretion across the isolated mucosa of rat colon descendens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1983 Aug;323(4):355-60.
- (131) Lajas AI, Pozo MJ, Camello PJ, Salido GM, Pariente JA. Phenylarsine oxide evokes intracellular calcium increases and amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. *Cell Signal.* 1999 Oct;11(10):727-34.
- (132) Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Gagliano N, Di Simplicio P, Colombo R, Milzani A. Methionine oxidation as a major cause of the functional impairment of oxidized actin. *Free Radic Biol Med.* 2002 May 1;32(9):927-37.
- (133) Trovero F, Brochet D, Breton P, Tambute A, Begos A, Bizot JC. Pharmacological profile of CEB-1957 and atropine toward brain muscarinic receptors and comparative study of their efficacy against sarin poisoning. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Jun;150(2):321-7.
- (134) Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins.* 1994 Jan;47(1):55-9.
- (135) Ueda M, Kinoshita H, Yoshida T, Kamasawa N, Osumi M, Tanaka A. Effect of catalase-specific inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole on yeast peroxisomal catalase in vivo. *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Feb 14;219(1):93-8.
- (136) Chaudiere J, Wilhelmsen EC, Tappel AL. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. *J Biol Chem.* 1984 Jan 25;259(2):1043-50.
- (137) Tomita M, Menconi MJ, Delude RL, Fink MP. Polarized transport of hydrophilic compounds across rat colonic mucosa from serosa to mucosa is temperature dependent. *Gastroenterology.* 2000 Mar;118(3):535-43.
- (138) Ellerby LM, Bredesen DE. Measurement of cellular oxidation, reactive oxygen species, and antioxidant enzymes during apoptosis. *Methods Enzymol.* 2000;322:413-21.

- (139) Lencer WI, Delp C, Neutra MR, Madara JL. Mechanism of cholera toxin action on a polarized human intestinal epithelial cell line: role of vesicular traffic. *J Cell Biol.* 1992 Jun; 117(6): 1197-1209.
- (140) McNamara B, Winter DC, Cuffe JE, O'Sullivan GC, Harvey BJ. Basolateral K⁺ channel involvement in forskolin-activated chloride secretion in human colon. *J Physiol.* 1999 Aug 15;519 Pt 1:251-60.
- (141) Ruddock NT, Arnett KL, Wilson BJ, Milanick MA. Chloro(2,2':6',2''-terpyridine) platinum inhibition of the renal Na⁺,K⁺-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Jun;284(6):C1584-92. Epub 2003 Jan 29.
- (142) Prasad M, Goyal RK. Differential modulation of voltage-dependent K⁺ currents in colonic smooth muscle by oxidants. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004 Mar;286(3):C671-82.
- (143) Sand P, Svenberg T, Rydqvist B. Carbachol induces oscillations in membrane potential and intracellular calcium in a colonic tumor cell line, HT-29. *Am J Physiol.* 1997 Oct;273(4 Pt 1):C1186-93.
- (144) Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989 Mar; 96(3): 736-49.
- (145) Barrett KE. Positive and negative regulation of chloride secretion in T₈₄ cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 265: C859-68.
- (146) Prasad M, Ito S, Silen W. Functional studies of in vitro rat distal colon before and after restitution. *Surgery.* 1997 Apr;121(4):430-9.
- (147) Scheppach W, Dusel G, Kuhn T, Loges C, Karch H, Bartram HP, Richter F, Christl SU, Kasper H. Effect of L-glutamine and n-butyrate on the restitution of rat colonic mucosa after acid induced injury. *Gut.* 1996 Jun;38(6):878-85.
- (148) Venkatraman A, Ramakrishna BS, Pulimood AB. Butyrate hastens restoration of barrier function after thermal and detergent injury to rat distal colon in vitro. *Scand J Gastroenterol.* 1999 Nov;34(11):1087-92.
- (149) Nobles M, Diener M, Mestres P, Rummel W. Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP- and the Ca(2+)-pathway. *Acta Physiol Scand.* 1991 Jul;142(3):375-86.
- (150) Sandle GI, McGlone F. Segmental variability of membrane conductances in rat and human colonic epithelia. Implications for Na, K and Cl transport. *Pflugers Arch.* 1987 Sep;410(1-2):173-80.

- (151) Andres H, Rock R, Bridges RJ, Rummel W, Schreiner J. Submucosal plexus and electrolyte transport across rat colonic mucosa. *J Physiol*. 1985 Jul;364:301-12.
- (152) Hardcastle J, Hardcastle PT, Noble JM. The secretory action of barium chloride in rat distal colon. *J Physiol* 1985 Apr; 361: 19-33.
- (153) Schultheiss G, Horger S, Diener M. The bumetanide-resistant part of forskolin-induced anion secretion in rat colon. *Acta Physiol Scand*. 1998 Oct;164(2):219-28.
- (154) To CH, Do CW, Zamudio AC, Candia OA. Model of ionic transport for bovine ciliary epithelium: effects of acetazolamide and HCO. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Jun;280(6):C1521-30.
- (155) Chao AC, Katayama Y. Regulation of endogenous chloride conductance in *Xenopus* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Nov 14;180(3):1377-82.
- (156) Dharmasathorn K, Madara JL. Established intestinal cell lines as model systems for electrolyte transport studies. *Methods Enzymol* 1990; 192: 354-89.
- (157) Diener M, Rummel W. Distension-induced secretion in the rat colon: mediation by prostaglandins and submucosal neurons. *Eur J Pharmacol*. 1990 Mar 13;178(1):47-57
- (158) Fassler JE, O'Dorisio TM, Goddard CG, Gaginella S. Peptides of human immunodeficiency virus (HIV) evoke rat colonic electrolyte secretion inhibitable by the somatostatin analog octreotide. *Life Sci*. 1991;48(4):PL13-7.
- (159) Nalini S, Balasubramanian KA. Effect of luminal exposure of oxidants on intestinal mucosal lipid peroxidation and absorptive function. *Scan J Gastroenterol* 1993; 28: 281-4.
- (160) Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982 Nov;47(5):412-26. Review.
- (161) Sommers SC, Korelitz BI. Mucosal-cell counts in ulcerative and granulomatous colitis. *Am J Clin Pathol*. 1975 Mar;63(3):359-65.
- (162) Test ST, Weiss SJ. Quantitative and temporal characterization of the extracellular H₂O₂ pool generated by human neutrophils. *J Biol Chem*. 1984 Jan 10;259(1):399-405.
- (163) Hiraishi H, Terano A, Ota S, Mutoh H, Sugimoto T, Harada T, Razandi M, Ivey KJ. Role of mucous glycoprotein in protecting cultured rat gastric mucosal cells against toxic oxygen metabolites. *J Lab Clin Med* 1993 Apr; 121(4): 570-8.

- (164) Hecht D, Zick Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Oct 30;188(2):773-9.
- (165) Miles AM, Smith RL. Functional methionines in the collagen/gelatin binding domain of plasma. *Biochemistry.* 1993 Aug 17;32(32):8168-78.
- (166) Prasad M, Goyal RK. Differential modulation of voltage dependent k⁺ currents in colonic smooth muscle by oxidants. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003 Nov 12 [Epub ahead of print].
- (167) Gaginella TS, Grisham MB, Thomas DB, Walsh R, Moumami C. Oxidant-evoked release of acetylcholine from enteric neurons of the rat colon. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Dec; 263(3): 1068-73.
- (168) Salathe M, Guldemann P, Conner GE, Wanner A. Hydrogen peroxide-scavenging properties of sheep airway mucus. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 May; 151(5): 1543-50.
- (169) Rao RK, Li L, Baker RD, Baker SS, Gupta A. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000 Aug;279(2):G332-40.
- (170) Olson CE. Glutathione modulates toxic oxygen metabolite injury of canine chief cell monolayers in primary culture. *Am J Physiol.* 1988 Jan; 254(1 Pt 1): G49-56.
- (171) Stein HJ, Hinder RA, Oosthuizen MM. Gastric mucosal injury caused by hemorrhagic shock and reperfusion: protective role of the antioxidant glutathione. *Surgery.* 1990 Aug; 108(2): 467-73; discussion 473-4.
- (172) Asahi M, Fujii J, Suzuki K, Seo HG, Kuzuya T, Hori M, Tada M, Fujii S, Taniguchi N. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem.* 1995 Sep 8; 270(36): 21035-9.
- (173) Dorval J, Hontela A. Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003 Oct 15;192(2):191-200.