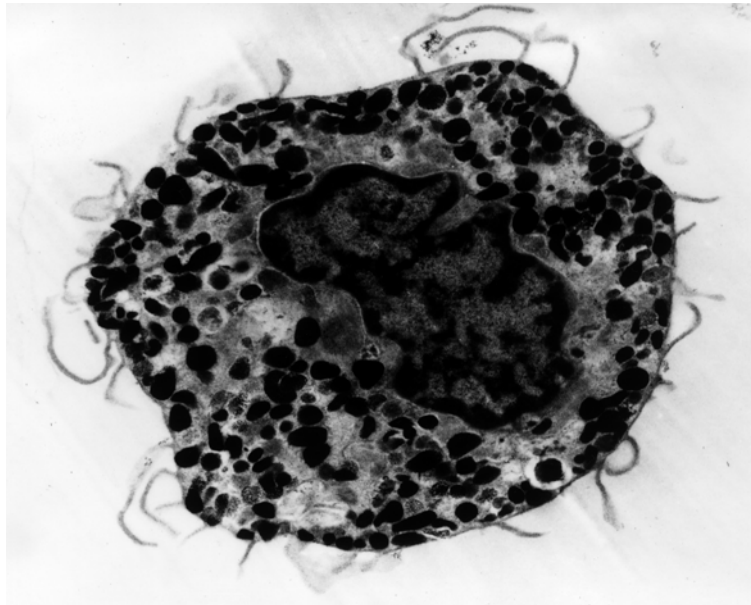




UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**ACTIVIDAD DE LOS MASTOCITOS DE LA MUCOSA
INTESTINAL EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD Y
MECANISMOS NEUROENDOCRINOS REGULADORES DE LA
FUNCIÓN MASTOCITARIA**



Yolanda Saavedra Torres
Bellaterra, 2005



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**ACTIVIDAD DE LOS MASTOCITOS DE LA MUCOSA
INTESTINAL EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD Y
MECANISMOS NEUROENDOCRINOS REGULADORES DE LA
FUNCIÓN MASTOCITARIA**

Yolanda Saavedra Torres
Bellaterra, 2005



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE VETERINÀRIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA CEL·LULAR, FISIOLOGIA I IMMUNOLOGIA

**ACTIVIDAD DE LOS MASTOCITOS DE LA MUCOSA
INTESTINAL EN RATAS CON HIPERSENSIBILIDAD Y
MECANISMOS NEUROENDOCRINOS REGULADORES DE LA
FUNCIÓN MASTOCITARIA**

Memòria presentada per Yolanda Saavedra Torres
per optar al grau de Doctora en Veterinària
Bellaterra, 2005

Dirigida per la Dra. Patrocinio Vergara Esteras

Portada:

Mastocito de piel canino no degranulado (Cedida por la Dra. Ana Puigdemont)

PATROCINIO VERGARA ESTERAS, professora titular de Fisiologia del Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICO: Que la memòria titulada “Actividad de los mastocitos de la mucosa intestinal en ratas con hipersensibilidad y mecanismos neuroendocrinos reguladores de la función mastocitaria”, presentada per Yolanda Saavedra Torres per a optar al grau de Doctora en Veterinària, ha estat realitzada sota la meva direcció i considerant-la finalitzada, autoritzo la seva presentació per tal que sigui jutjada pel tribunal corresponent.

I, perquè així consti, signo aquest certificat.

Bellaterra, 31 de març de 2005

P. Vergara

*Una vez descartado lo imposible, lo que queda,
por improbable que parezca, debe ser la verdad.*

Sir Arthur Conan Doyle

AGRADECIMIENTOS

La vida de una persona está formada por acontecimientos que marcan su trayectoria y la realización de la tesis doctoral ha sido sin duda alguna una experiencia que ha marcado la mía. Son muchos los momentos vividos, las sensaciones percibidas y los conocimientos adquiridos durante esta etapa predoctoral y finalizado este período quisiera expresar mi gratitud a todas aquellas personas que de un modo u otro han hecho posible todas estas vivencias:

En primer lugar quisiera expresar mi más sincera gratitud a la directora de este trabajo, la Dra. Patri Vergara, por iniciarme en el campo de la investigación, por sus buenos consejos y por el incansable apoyo, que me ha ofrecido durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Fernando de Mora, por su disponibilidad y consejos cuando tenía cualquier duda y por su ayuda en el diseño de los experimentos *in vitro*.

A la Dra. Neus Prats y al Dr. Alberto Marco, por sus consejos en la técnica inmunohistoquímica y por enseñarme a identificar y a contar mastocitos.

Así mismo, hacer extensivo mi agradecimiento a Jordi Cantó, por permitirme dedicar parte del tiempo que debería haber dedicado al SE, a dar el último empujón a esta tesis.

Quiero expresar también mi agradecimiento a todas las personas que integran la Unitat de Fisiologia de la Facultat de Veterinària. A la Dra. Maite Martín y al Dr. Marcel Jiménez, por su constante disposición para ayudarme en las pequeñas cosas de cada día. Al Dr. Eduard Goñalons, por las entrañables e inolvidables charlas durante la hora de la comida. A la Dra. Ester Fernández y al Dr. Xavier Manteca, por su buena disposición en momentos de necesidad. A Willy y a Pepe Ruiz, por tener siempre una mano tendida y la puerta del despacho abierta. A Antonio, por su invalorable apoyo técnico. A Pepe Martín, por su valioso apoyo administrativo y por su insustituible apoyo moral.

Y por último, aunque no menos importante, a todos y a cada uno de los compañeros que han ido pasando por el despacho de becarios a lo largo de estos seis años. A Carme, por

iniciarme en la manipulación de roedores y en las técnicas quirúrgica, de perfusión y de ELISA. A Dani, por aconsejarme en la manipulación de *T. spiralis* y por enseñarme la técnica de los strain-gauges. A Lidia, Adnan y Pere, por su ayuda y apoyo desinteresados. A Anna M^a por su simpatía e incansable buen humor. A Ricard, Mariona y Mónica, con los que he compartido y comparto la mayor parte de mi tiempo, por los buenos momentos que hemos vivido juntos durante estos años y con los que puedo siempre contar. A mi compi del SIAL, Nanchito, por su constante ayuda y apoyo moral. A Emma y a Bego, por su infinito buen rollo. A Joan Carles, por saber escuchar y alentarme en todo momento. A Estefanía, Diana, Ester J., Carol, Anna D., Rosa, Jordi A., Jordi G., Lina, y a todos quienes en algún momento han sido mi punto de apoyo, sinceramente, mil gracias.

A mi querida familia, en especial a mis padres, a quienes agradezco la vida y el esfuerzo en darme la posibilidad de unos estudios universitarios; a mi hermano Manu, por todos los momentos compartidos y por hacerme reír, porque ha sido bonito crecer a su lado. Y también a Paula, por su ánimo y preocupación.

En memoria de Javier Guerrero

A mis padres y hermano,
por estar siempre ahí.

ÍNDICE

1... INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Estructura del intestino delgado.....	3
1.2. Regulación de la función intestinal.....	3
1.3. Motilidad intestinal.....	6
1.4. La mucosa intestinal como órgano del sistema inmune	8
1.4.1. La respuesta inmune	8
1.4.2. Estructura y función de la mucosa intestinal	12
1.4.3. Los mastocitos	15
1.4.4. Activación mastocitaria independiente de IgEs.....	18
1.4.5. Activación mastocitaria mediada por IgEs: reacción alérgica.....	19
1.4.6. Funciones de los mastocitos a nivel gastrointestinal	22
1.4.7. Mastocitos y patología	24
1.5. La respuesta intestinal a antígenos	26
1.5.1. Captación de antígenos a nivel intestinal.....	26
1.5.2. Tolerancia oral	27
1.5.3. <i>Bystander supression</i>	30
1.5.4. Mastocitos e hipersensibilidad intestinal (alergia alimentaria).....	31
1.5.5. Alergia alimentaria y enfermedad intestinal (síndrome del intestino irritable).....	33
1.6. Modelos experimentales de sensibilización.....	35
1.7. Modelo experimental de hiperplasia mastocitaria: infección intestinal con <i>Trichinella spiralis</i>	39
2. La regulación neuroendocrina de los mastocitos de la mucosa intestinal de la rata en condiciones fisiológicas.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
4. ESTUDIOS REALIZADOS.....	45
4.1. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia.....	45
4.2. Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells.....	55

4.3. Functional consequences of orally induced sensitization to ovalbumin: differences between normal and high-IgE responder rats	67
5. DISCUSIÓN.....	97
6. CONCLUSIONES.....	103
7. BIBLIOGRAFÍA.....	105

ANEXO

Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions

INTRODUCCIÓN

Este trabajo de investigación se centra en el estudio de la regulación de la actividad de los mastocitos de la mucosa intestinal y su posible influencia sobre la actividad motora intestinal en condiciones fisiológicas y de hipersensibilidad alimentaria. Los mastocitos son células del sistema inmune que se localizan próximas a los nervios entéricos y que liberan una amplia variedad de mediadores inflamatorios que pueden afectar a la función nerviosa del sistema entérico y a la contractibilidad del músculo liso intestinal.

Existen una serie alteraciones intestinales que se engloban bajo el nombre de Síndrome del Intestino Irritable (IBS), que se caracterizan por hipersensibilidad intestinal (Naliboff *et al.*, 1997) y cuya causa es todavía desconocida. Se cree que esta hipersensibilidad del intestino podría estar causada por una deficiente recuperación de los mecanismos de control de la funcionalidad intestinal después de un proceso nocivo para el intestino, ya sea infeccioso, parasitario o tóxico. Tampoco se descarta la participación de factores genéticos y ambientales. Recientemente, las alergias alimentarias no diagnosticadas y la intolerancia a algunos componentes de la dieta, entre otros, se han descrito también como posibles factores con un papel importante en la aparición y perpetuación del IBS (Locke, III *et al.*, 2000; Vermillion *et al.*, 1988).

La somatostatina (SS) es un péptido que puede actuar como hormona o como neurotransmisor a nivel del sistema nervioso central (SNC) y periférico y a nivel de otros órganos y sistemas orgánicos. El principal efecto de la SS, tanto a nivel del sistema nervioso como del sistema endocrino es inhibitorio de la liberación de otros neuropéptidos u hormonas (Foreman & Piotrowski, 1984).

A nivel gastrointestinal, la SS no es únicamente liberada desde terminales nerviosos intrínsecos y extrínsecos de las capas submucosa y mucosa (Furness & Costa, 1980), sino que también es sintetizada en células neuroendocrinas especializadas de la mucosa intestinal (Payan *et al.*, 1984), las células D. Las células D están distribuidas a lo largo de la mucosa gastrointestinal, pero especialmente concentradas a nivel del estómago y duodeno. Las acciones principales de la SS a este nivel son inhibitorias en la digestión, destinadas a aumentar el período de tiempo durante el que los nutrientes son

susceptibles de ser asimilados, disminución de la motilidad y de la secreción y absorción intestinales.

Sin embargo, existe cierta controversia respecto al efecto de la SS durante la inflamación. Heiman y Crews (Heiman & Crews, 1984) describieron la SS como un agente pro-inflamatorio que estimulaba la liberación de mediadores derivados del ácido araquidónico en los mastocitos. Contrariamente, la SS también se ha descrito como inmunosupresiva y antiinflamatoria (Kataeva *et al.*, 1994). Además, la SS y su análogo el octreotide han sido utilizados en el tratamiento de procesos inflamatorios de origen inmune en varios sistemas orgánicos (Sakane & Suzuki, 1998; Venier *et al.*, 1988). Los resultados de algunos estudios indican que el tratamiento de pacientes de IBS con acetato de octreotide podría aliviar los signos de aumento de hipersensibilidad visceral (Plourde *et al.*, 1993). Esta diversidad de efectos podría ser debida a diferentes acciones de la SS sobre diferentes tipos celulares, o a respuestas distintas a la SS por parte de diferentes poblaciones mastocitarias. Como consecuencia, la acción de la SS sobre los mastocitos de la mucosa intestinal (IMMC) podría ser directa, a través de otras células inmunes también presentes en la mucosa, o a través de neuronas sensibles a la SS.

Este trabajo se centra en estudiar el efecto de la somatostatina sobre la actividad de los mastocitos de la mucosa intestinal en condiciones normales y durante hiperplasia mastocitaria. Con esta finalidad hemos utilizado la infestación con el nematodo *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) como modelo de hiperplasia mastocitaria intestinal. Este modelo, por sus características, podríamos considerarlo un buen modelo de IBS, ya que se da una agresión intestinal seguida de todo un proceso de regeneración y una aparente recuperación de la normalidad.

Posteriormente se planteó la posibilidad de que el efecto observado de la somatostatina pudiera darse también en individuos con problemas de alergia o intolerancia alimentarias. Con esta finalidad hemos buscado, entre los diferentes modelos de sensibilización descritos, el que mejor se adapte a la situación real de sensibilización a componentes de la dieta. Esta búsqueda ha resultado una ardua tarea que ha supuesto emplear todo el resto del tiempo y recursos destinados a esta tesis doctoral en definir un modelo experimental adecuado. Como consecuencia, el estudio del efecto de la somatostatina en el modelo de rata con alergia alimentaria queda pendiente para futuros estudios.

Seguidamente, para poder entender mejor el trabajo, revisaremos algunos de los conceptos anatómicos y fisiológicos del intestino. Al mismo tiempo, intentaremos resumir los conocimientos existentes respecto al efecto de la actividad mastocitaria sobre el intestino en condiciones normales y de hipersensibilidad.

Estructura del intestino delgado

El intestino delgado es un órgano de forma tubular que va desde la parte distal del píloro hasta la válvula íleo-cecal. A pesar de su estructura continua, normalmente se divide anatómicamente en tres partes de oral a aboral: duodeno, yeyuno e íleon. Respecto a su estructura, posee cuatro capas: la mucosa, la más externa y en contacto con el medio externo, donde además de las células epiteliales y enteroendocrinas destaca la lámina propia con gran variedad celular y que tiene funciones defensivas, estructurales y de comunicación; la submucosa, donde encontramos gran cantidad de fibras nerviosas, vasos sanguíneos y linfocitos; la muscular, formada por células musculares lisas distribuidas estructuralmente en dos capas: la circular, más externa, y la longitudinal, más interna y en contacto con la última capa del intestino; la serosa, formada básicamente por células epiteliales planas y tejido conjuntivo.

Regulación de la función intestinal

El intestino es una estructura altamente innervada. En concreto posee dos plexos ganglionares, uno situado en la submucosa y conocido como el plexo de Meissner o submucoso; y el otro entre las dos capas musculares lisas, llamado plexo de Auerbach o mientérico. Estos plexos distribuyen sus fibras por toda la pared intestinal, donde se localizan una gran cantidad de neuronas y fibras nerviosas que proceden tanto de la innervación intrínseca propia del intestino, como de las fibras que proceden del sistema nervioso autónomo.

El control nervioso del intestino por lo tanto, tiene dos componentes: el intrínseco, conocido como sistema nervioso entérico (SNE), y el extrínseco, que inerva el intestino a través del nervio vago y de los nervios simpáticos. Así pues, aunque muchas funciones intestinales, como el reflejo peristáltico o el crecimiento y multiplicación de las células de la mucosa están directamente controladas por el SNE, las influencias

extrínsecas sobre el intestino son continuas y fundamentales para el buen funcionamiento de este órgano.

La inervación extrínseca regula la actividad motora intestinal mediante fibras eferentes motoras y también comunica el intestino con el SNC a través de fibras aferentes sensitivas, siendo por tanto las principales responsables de dar sensibilidad al tracto intestinal. Aunque actúa de forma autónoma, este circuito nervioso también recibe influencia de vías nerviosas procedentes del SNC, y de hormonas, formando todos ellos conjuntamente un sistema integrado de regulación funcional.

Las fibras sensitivas aferentes se distribuyen abundantemente por todo el recorrido intestinal y proyectan terminaciones a todas las capas de la pared intestinal (Berthoud *et al.*, 1995). Estas terminaciones pueden responder a estímulos químicos, mecánicos u hormonales y, aunque envían la información al SNC, se ha visto que tanto las aferentes sensitivas asociadas al sistema nervioso simpático como las vagales, pueden activar de forma refleja las vías eferentes motoras. Un buen ejemplo de eso serían la mayor parte de acciones motoras intestinales de la colecistoquinina (CCK) que son mediadas a través de aferentes vagales que hacen reflejo en eferentes motoras. Es por esto, tal como veremos más adelante, que en nuestros estudios hemos utilizado la respuesta motora a la administración de CCK exógena como parámetro para evaluar el estado de estos circuitos durante la sensibilización.

Se ha visto que las vías vagales aferentes presentan una gran cantidad de receptores en su membrana, lo que las hace susceptibles de recibir la influencia de un gran número de moléculas activas con orígenes y efectos diversos. Además, muchas de estas moléculas pueden llegar a ser activadoras de estas vías y actuar como moduladoras de su sensibilidad. Al mismo tiempo, algunas de estas moléculas, como la serotonina, la histamina, la bradiquinina o las prostaglandinas, también pueden tener un papel muy importante en el desarrollo y regulación de los procesos inmunes e inflamatorios.

Algunas de estas moléculas con capacidad para alterar la sensibilidad de las vías aferentes vagales pueden proceder de células del sistema inmune-inflamatorio como los mastocitos, hecho que nos podría indicar la relación existente entre los procesos inflamatorios, la hipersensibilidad y la alteración motora del intestino descrita en los procesos de IBS.

Los neurotransmisores liberados en los terminales nerviosos entéricos pueden ser excitadores como la acetilcolina (ACh), la serotonina (5-HT) y la neuroquinina, o inhibidores como el óxido nítrico (NO). Algunos de ellos pueden ser de naturaleza peptídica, como la somatostatina, la sustancia P, el neuropéptido Y, el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), el *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) y la colecistoquinina (CCK).

El NO, que forma parte de la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica no colinérgica del intestino, puede también actuar como neuromodulador, ya que provoca inhibición de la liberación de otros neurotransmisores dentro del mismo terminal nervioso o actuando como un neurotransmisor sobre neuronas entéricas o células musculares lisas del tracto gastrointestinal. Así, por ejemplo, el NO inhibe la liberación de serotonina por parte de células enterocromafines mediante la liberación de neurotransmisores entéricos como la ACh y la sustancia P (Ginap & Kilbinger, 1998). El NO también puede actuar como un segundo mensajero dentro de las células musculares o las células intersticiales de Cajal (ICCs). El VIP y el ATP forman también parte de la neurotransmisión inhibitoria no adrenérgica no colinérgica intestinal. Debido a la relajación que provoca el NO sobre el músculo liso intestinal y tal como veremos más adelante, en nuestros estudios hemos utilizado la respuesta motora a la administración de N_o-nitro-L-arginine (L-NNA) como parámetro para evaluar el estado del tono inhibitorio y excitatorio durante la sensibilización.

Los mastocitos pueden activarse tanto por mecanismos inmunológicos, como por estímulos no inmunológicos, como por ejemplo, neurotransmisores liberados en los terminales nerviosos del tracto gastrointestinal. Además se ha visto que las diferentes poblaciones mastocitarias responden de forma diferente a los neurotransmisores (Shanahan *et al.*, 1985). Así, por ejemplo, la sustancia P induce secreción de iones, frecuente en procesos patológicos del intestino (Raithel *et al.*, 1999), actuando directamente sobre células epiteliales, o indirectamente a través de nervios o mastocitos. Pero la relación entre mastocitos y nervios en la regulación del transporte epitelial de iones es bidireccional. Por consiguiente, los mediadores mastocitarios pueden actuar sobre los terminales nerviosos estimulando la liberación de neurotransmisores que pueden conducir a la activación directa (sustancia P, VIP, ACh, 5-HT) de células epiteliales o activación indirecta (sustancia P, ACh, neurotensina) a través de mastocitos de mucosa para inducir secreción intestinal de iones (Yu & Perdue, 2001).

Motilidad intestinal

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

En la rata, como en los humanos, los patrones de motilidad intestinal se pueden dividir en interdigestivos y digestivos. En los períodos interdigestivos o de ayuno, se da un patrón de motilidad cíclico conocido como complejo motor migratorio, que en el caso de la rata se repite cada 15-20 minutos (Ruckebusch, 1977) y que tiene como funciones el mantenimiento del tono motor intestinal y empujar los restos de contenido intestinal caudalmente para vaciar el intestino delgado de contenido y evitar así posibles proliferaciones bacterianas perjudiciales (Code & Pickard, 1973).

La ingestión de alimentos desorganiza este patrón de ayuno interrumpiendo los complejos motores migratorios, y dando lugar a un patrón nuevo caracterizado por contracciones fásicas irregulares e intermitentes. Estas contracciones se pueden clasificar en contracciones de segmentación y peristálticas. Las dos tienen como finalidad el desplazamiento aboral del bolo alimenticio y su mezcla, para una mejor digestión y absorción de los nutrientes.

Todo lo que hemos explicado hasta ahora referente a la motilidad intestinal se da en condiciones fisiológicas y en animales conscientes. Por otro lado, el modelo aplicado en nuestros estudios es uno de los más utilizados en estudios de motilidad intestinal y se lleva a cabo en rata anestesiada a la que se le ha practicado una laparotomía. Esto provoca que se den ciertas alteraciones de estos patrones fisiológicos de motilidad.

Ya en el año 1900, Bayliss y Starling (Bayliss & Starling, 1900) describieron los efectos inhibitorios de la laparotomía sobre la actividad motora del intestino. Se ha visto que este efecto es debido tanto a la incisión de las capas musculares abdominales y del peritoneo como al contacto de los intestinos con el aire, y que en los dos casos se

inhiben los complejos motores migratorios, que hasta pueden tardar siete horas en reaparecer.

En lo que respecta a la anestesia, los efectos sobre la motilidad intestinal dependerán obviamente del protocolo anestésico utilizado en cada caso. En el nuestro, hemos utilizado tiopental sódico, que se ha visto que reduce en un 20 % la velocidad de propagación de los complejos motores migratorios (Bueno *et al.*, 1978). Debido a todo esto y a la duración de nuestros protocolos experimentales, en nuestro modelo la actividad motora no se presenta en forma de los patrones de motilidad intestinal descritos. Por lo tanto, uno de los primeros pasos del estudio ha sido caracterizar la actividad espontánea intestinal presente y analizar las posibles alteraciones causadas por la sensibilización. A pesar de todo, hay que destacar que muchos estudios han demostrado la integridad tanto de los circuitos de control motor del intestino como de su reflejo más característico, el peristáltico.

El reflejo peristáltico, estudiado por primera vez en el año 1900 (Bayliss & Starling, 1900), es el conjunto de movimientos coordinados de las capas musculares del intestino que tiene como finalidad propulsar el contenido luminal en sentido aboral. A pesar de su complejidad, se ha visto que está totalmente controlado y regulado por el SNE, manteniéndose intacto en segmentos aislados de intestino.

Este reflejo se puede desencadenar tanto por la distensión del intestino, que activa mecanorreceptores localizados en las capas musculares, como por la estimulación directa de la mucosa por parte del contenido luminal. En este sentido hay que decir que en el caso del intestino delgado, la estimulación de la mucosa es el factor más relevante a la hora de desencadenar este reflejo (Grider & Jin, 1994). El resultado global de este reflejo es la contracción de la capa muscular circular en sentido oral al punto de estimulación y la relajación de la capa muscular longitudinal en el mismo segmento estimulado. Contrariamente, en el segmento intestinal en sentido aboral al punto de estimulación se contrae la musculatura longitudinal y se relaja la circular.

Todos estos fenómenos de contracción y relajación coordinados se dan por la estimulación de diferentes tipos de poblaciones neuronales a la vez. Se produce una activación de motoneuronas excitatorias liberadoras de acetilcolina y sustancia P que causan la contracción circular oral y la contracción longitudinal aboral al punto de

estimulación; mientras que simultáneamente, también se activan neuronas inhibitorias nitrérgicas responsables de la relajación coordinada de las dos capas musculares.

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

Los movimientos rítmicos gastrointestinales dependen, en parte, de la frecuencia de la actividad eléctrica de ondas lentas. Las ondas lentas son oscilaciones del potencial de membrana del músculo liso que regulan la aparición de los potenciales de acción, que a su vez inducen la contracción muscular. Es decir, las ondas lentas permiten la organización en el espacio y en el tiempo de las contracciones del tracto digestivo (Granger *et al.*, 1985). La frecuencia y la propagación de las ondas lentas dependen de las ICCs en asociación con el plexo de Auerbach (Huizinga *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1994).

La respuesta inmune

Históricamente, la inmunidad se definió como la capacidad de resistencia del organismo frente a microorganismos y toxinas que lesionan los tejidos y órganos. Recientemente, la inmunidad se ha definido como la reacción del organismo a sustancias extrañas, incluyendo microorganismos y macromoléculas de naturaleza diversa (proteínas, polisacáridos), sin consecuencias fisiológicas o patológicas. Las células y las moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmune, y su respuesta coordinada y colectiva a la entrada de sustancias extrañas es la respuesta inmune. En determinadas circunstancias, estos mecanismos que normalmente protegen al individuo frente a infecciones y que elimina sustancias extrañas, es capaz de inducir lesión tisular y enfermedad.

La inmunidad puede ser innata, caracterizada por mecanismos generales, no específicos frente a sustancias concretas, y constituida por: barreras físicas y químicas (epitelios, sustancias producidas por los epitelios), proteínas circulantes (sistema de complemento, otros mediadores), células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y otros leucocitos

(células *natural killer*). La patogenicidad de los microorganismos depende en parte de su habilidad para superar los mecanismos de inmunidad innata.

Pero existen otros mecanismos de defensa que son estimulados por la exposición a un agente específico, y que aumentan en magnitud y en capacidad defensiva con cada exposición sucesiva al mismo. Se trata de la inmunidad adquirida o específica, en la que participan anticuerpos (moléculas responsables del reconocimiento específico del antígeno) y linfocitos. Las sustancias extrañas que inducen respuestas inmunes específicas, o son el objetivo de dichas respuestas se denominan antígenos.

La respuesta inmune específica normalmente se estimula cuando un individuo es expuesto a un antígeno extraño. La forma de inmunidad inducida por este proceso de inmunización recibe el nombre de inmunidad activa porque el individuo inmunizado juega un papel activo en la respuesta al antígeno. Se puede transferir la inmunidad específica a un individuo no inmunizado transfiriendo células o suero de un individuo específicamente inmunizado. El individuo receptor se vuelve inmune al antígeno en cuestión sin haber estado expuesto ni haber respondido nunca frente al antígeno. Este tipo de inmunidad recibe el nombre de inmunidad pasiva. La inmunidad se mide determinando si el individuo previamente expuesto a un antígeno manifiesta una reacción detectable cuando se vuelve a exponer al antígeno (challenge). La presencia de respuesta es una indicación de “sensibilidad” al challenge. Los individuos que han sido previamente expuestos a un antígeno reciben el nombre de “sensibilizados”. Las enfermedades que son consecuencia de reacciones inmunes anormales o excesivas se denominan enfermedades de hipersensibilidad.

La respuesta inmune específica puede ser de dos tipos, humoral (mediada por anticuerpos) y mediada por células o celular (mediada por linfocitos T). La respuesta inmune específica se caracteriza por:

- * Especificidad: la respuesta inmune específica, como su nombre indica, es específica frente a antígenos distintos, e incluso frente a porciones específicas de un mismo antígeno, denominadas epítomos, ya que los linfocitos B y T expresan receptores específicos en su superficie.
- * Diversidad: el sistema inmune de los mamíferos puede discriminar como mínimo entre 10^9 epítomos distintos.

- * Memoria: la exposición previa del sistema inmune a un antígeno aumenta su capacidad para volver a responder frente al mismo antígeno debido a un fenómeno denominado memoria inmunológica. El antígeno estimula la proliferación de linfocitos específicos y la producción de células de memoria específicas que persisten durante largos períodos de tiempo y que son más eficientes en la eliminación del antígeno que los linfocitos estimulados en la respuesta primaria.
- * Especialización: el sistema inmune responde de forma distinta a los diferentes antígenos.
- * Autolimitación: las respuestas inmunes normales disminuyen a lo largo del tiempo tras la estimulación por el antígeno, ya que con la progresión de la respuesta se elimina el antígeno y por consiguiente el estímulo que activa los linfocitos.
- * Discriminación entre propio y extraño: el sistema inmune individual normal es capaz de reconocer, responder y eliminar los antígenos extraños, mientras permanece inactivo frente a sustancias propias con características antigénicas. Esta no respuesta inmunológica recibe el nombre de tolerancia, y se mantiene parcialmente por la eliminación de los linfocitos que expresan receptores específicos frente a antígenos propios, y parcialmente por la inactivación funcional de los linfocitos auto-reactivos después de encontrarse con el antígeno propio. Anormalidades en la inducción o el mantenimiento de la tolerancia dan lugar a respuestas inmunes frente a antígenos propios, originando enfermedades autoinmunes.

En la respuesta inmune específica se diferencian las siguientes fases:

- * Reconocimiento: consiste en la unión del antígeno extraño a receptores específicos de los linfocitos maduros, que existen previamente a la exposición al antígeno. Los linfocitos B expresan en su superficie moléculas que se unen a antígenos de naturaleza diversa (proteínas, polisacáridos, etc.), mientras que los receptores que expresan los linfocitos T sólo reconocen antígenos peptídicos.
- * Activación: es la secuencia de acontecimientos inducida en los linfocitos como consecuencia del reconocimiento específico del antígeno. Los linfocitos antígeno específicos proliferan, amplificando la respuesta protectora. Los linfocitos generados se diferencian en células efectoras (destinadas a la eliminación del antígeno) o en células de memoria (preparadas para responder a la re-exposición al antígeno). Los diferentes tipos de linfocito se diferencian en células efectoras distintas. Los linfocitos B se diferencian en células secretoras de anticuerpos específicos que reconocen el

antígeno e inician los mecanismos de eliminación. Los linfocitos T se diferencian en células que activan los fagocitos que eliminan los microorganismos intracelulares, o en linfocitos que lisan directamente las células que están produciendo antígenos extraños como proteínas víricas. La activación de los linfocitos requiere dos tipos de señales, una es la proporcionada por el antígeno, y la otra procede de otras células, que pueden ser linfocitos T colaboradores (*helper*) o células accesorias.

- * Efectora: los linfocitos activados (células efectoras) desarrollan las funciones destinadas a la eliminación del antígeno. Estas funciones suelen requerir la participación de células no linfoides y mecanismos de defensa que son también mediadores de la inmunidad innata. Por ejemplo: los anticuerpos unidos al antígeno aumentan la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos, y activa el sistema de complemento; los linfocitos T activados secretan citoquinas que aumentan las funciones de los fagocitos y estimulan respuestas inflamatorias.

Varios factores influyen en el tipo de anticuerpos producidos:

- * Tipos de citoquinas producidas por los linfocitos T activados: los linfocitos Th1 producen IFN- γ , que inhibe la síntesis de IgEs dependiente de IL-4 en las células B, promueve la fijación del complemento y la fagocitosis por los macrófagos; por lo tanto son importantes para la eliminación de microorganismos intracelulares. Los linfocitos Th2 producen IL-4, que promueve la síntesis de IgEs, IL-5, responsable de la activación de eosinófilos, e IL-10 e IL-13, que inhiben la activación de macrófagos; es decir, los linfocitos Th2 son importantes en la respuesta mediada por IgEs y eosinófilos y suprimen la inmunidad mediada por células y la hipersensibilidad de tipo retardada.
- * Lugar de exposición al antígeno: los antígenos que alcanzan la circulación general y los órganos periféricos inducen la producción de anticuerpos de múltiples isotipos. Los antígenos inhalados o administrados vía oral tienden a estimular la producción de IgA.
- * Naturaleza del estímulo antigénico: la administración de dosis altas de antígeno vía sistémica y sin adyuvantes suele inhibir la producción de anticuerpos, induciendo tolerancia, o no respuesta, de los linfocitos B y linfocitos T.

Estructura y función de la mucosa intestinal

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

Tras el nacimiento, la función de barrera del epitelio intestinal está todavía en desarrollo. El desarrollo postnatal de la homeostasis inmunitaria en la mucosa depende del establecimiento de una flora comensal normal y de la introducción de los antígenos de la dieta en las dosis y en los momentos oportunos. En general, el sistema inmune intestinal está normalmente preparado para la inducción de tolerancia frente a antígenos inocuos. Ya en el año 1963, Abrams (Abrams *et al.*, 1963) definió la actividad inmunitaria en ausencia de enfermedad como “inflamación fisiológica” del intestino. Hoy en día se desconoce todavía cómo el sistema inmune es capaz de reaccionar frente a un agente patógeno o sustancia nociva y permanecer inactivo frente a la flora normal y los antígenos inocuos de la dieta.

La mucosa intestinal es continuamente bombardeada por gran variedad de microorganismos y antígenos proteicos. Para hacer frente a estos agentes el sistema inmune mucoso ha generado dos tipos de respuesta adaptativa:

- exclusión del agente mediante secreción de inmunoglobulinas (A y M sobre todo): modulan e inhiben la colonización bacteriana, impidiendo la entrada de agentes luminales solubles.
- mecanismos de supresión para evitar una reacción exagerada (hipersensibilidad) local y periférica contra sustancias inocuas que bombardean la superficie de la mucosa: recibe el nombre de tolerancia oral (Brandtzaeg, 1996).

La mucosa intestinal contiene tres tipos celulares con función de detección: neuronas, células endocrinas y células del sistema inmune (mastocitos, linfocitos, granulocitos, etc.) (Furness *et al.*, 1999).

Estos tres sistemas de detección están mucho más desarrollados en el intestino que en cualquier otro órgano. El SNE contiene alrededor de 10^8 neuronas, el sistema endocrino gastrointestinal utiliza más de 20 hormonas identificadas, y el sistema inmune intestinal

contiene el 70-80% del total de células inmunitarias del organismo. Evidentemente, el tracto gastrointestinal responde de forma integrada a los cambios en su contenido luminal. Por lo tanto, es esencial la existencia de un completo entendimiento entre las funciones sensitivas del intestino, el procesamiento y respuesta a la información, y la interacción entre las señales nerviosas, hormonales e inmunitarias.

Las neuronas que detectan el estado de los tejidos son neuronas aferentes primarias. Se denominan primarias porque son las primeras neuronas de las vías reflejas, y aferentes porque van hacia centros de control reflejos. Hay tres tipos de neuronas aferentes primarias asociadas al intestino (Furness *et al.*, 1998):

- * Intrínsecas (IPANs): también llamadas neuronas sensitivas intrínsecas, que contienen los cuerpos celulares y conexiones en la pared intestinal.
- * Extrínsecas: con los cuerpos celulares en los ganglios espinales vagales y en los ganglios de la raíz espinal dorsal.
- * Intestinofugales: con cuerpos celulares en el intestino y proyecciones hacia neuronas que están fuera de la pared intestinal.

Cientos de miles de células endocrinas están dispersas entre las células epiteliales del intestino y reaccionan a los cambios en el contenido luminal liberando hormonas, que en general se dirigen a otras zonas del sistema digestivo (Miller *et al.*, 1978). Por ejemplo, la CCK es liberada desde el duodeno en respuesta a una comida; las principales señales químicas para esta liberación son los productos de digestión de las grasas y las proteínas. La CCK actúa sobre el páncreas, estimulando la liberación de enzimas digestivos y sobre la vesícula biliar, induciendo la liberación de sales biliares al duodeno.

Los tejidos diana de las hormonas intestinales también son las neuronas. Ejemplos: la CCK estimula los terminales nerviosos aferentes vagales, resultando en un reflejo de inhibición del vaciamiento gástrico y la saciedad (Miller *et al.*, 1978), y en la interrupción de los complejos motores migratorios (Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995); las neuronas aferentes vagales también son estimuladas por la serotonina (5-HT); la motilina activa el SNE dando lugar a los complejos motores migratorios. Y a la inversa, muchos tipos de células endocrinas están sometidos a control nervioso. Por ejemplo, la

liberación de gastrina está inducida por la actividad vagal y vías nerviosas intrínsecas, y la estimulación vagal también induce liberación de 5-HT.

Para defender la membrana epitelial, el intestino delgado y el grueso han desarrollado una serie de especializaciones llamadas colectivamente GALT (tejido linfoide asociado al sistema gastrointestinal). Dentro de la pared, el GALT incluye células M, linfocitos y células inmunitarias asociadas, como macrófagos, eosinófilos, mastocitos y neutrófilos (Blumberg *et al.*, 1995). Los linfocitos se organizan en agregados: las placas de Peyer en el intestino delgado, ganglios linfáticos mesentéricos, ganglios linfáticos aislados y células inmunitarias aisladas, que constituyen los elementos linfoides no organizados de la mucosa e incluyen los linfocitos intraepiteliales y los linfocitos de la lámina propia.

Los antígenos son captados por células M, que son enterocitos modificados. El antígeno transportado a través del epitelio por la célula M, es procesado por macrófagos y células dendríticas y después presentado a los linfocitos T locales, que estimulan a su vez a linfocitos B locales. Los linfocitos B migran y proliferan en la lámina propia de la mucosa y producen anticuerpos, IgA sobre todo. Cierta proporción de linfocitos migran hacia las placas de Peyer y hacia los ganglios linfáticos mesentéricos, desde donde pasan a la circulación y a localizarse en el MALT (tejido linfoide no intestinal asociado a la mucosa) y en el GALT, utilizando receptores específicos y vénulas postcapilares para guiar su localización (Collins, 1996). El MALT y el GALT se caracterizan por el predominio de producción local de IgA y por la localización de señales a través de las cuales linfocitos activados derivados de una superficie mucosa pueden recircular y localizarse selectivamente en la misma o en otras superficies mucosas (Kantele *et al.*, 1999). La conexión entre las diferentes superficies mucosas permite que la inmunidad que se inicia en un órgano proteja otras superficies mucosas. Este proceso se cree que es importante en la generación de tolerancia oral (Strobel & Mowat, 1998).

Durante mucho tiempo, cuando se estudiaban los fenómenos inmunológicos del organismo, se enfocaban los estudios tomando el sistema inmune como el elemento activo y los sistemas y tejidos del organismo no propiamente inmunitarios como el elemento pasivo que sólo actuaba o se alteraba en función de los efectos del primero. Más adelante se ha visto que éstos últimos podrían tener un papel activo dentro de la respuesta inmunitaria llegando a ser fundamentales. Así pues, hay que entender la respuesta inmune como un conjunto de interacciones bidireccionales entre los elementos

inmunitarios propiamente dichos y el resto de tejidos y sistemas en los cuales se está dando.

Uno de los sistemas que tiene más influencias sobre el sistema inmune es el sistema nervioso. Un buen ejemplo de esto podrían ser las alteraciones que sobre las respuestas inmunes producen los estados de estrés o el gran número de estudios que evidencian un agravamiento de los procesos inflamatorios como consecuencia de la pérdida de la inervación sensitiva. Por todas estas razones se puede hablar de neuroinmunología al hacer referencia al área que estudia las interrelaciones entre estos dos sistemas básicos.

En referencia al ámbito de este trabajo, es decir el intestino, existen muchos estudios que han demostrado las interrelaciones entre los dos sistemas. Anatómicamente se ha descrito una íntima relación entre las terminaciones nerviosas intestinales y diferentes tipos celulares inflamatorio-inmunitarios (Stead, 1992a), entre ellos los mastocitos, hecho que todavía se observa de forma más evidente en los pacientes afectados por enfermedad inflamatoria intestinal (Barbara *et al.*, 2000). Los productos de las células inmunitarias e inflamatorias sensibilizan los terminales nerviosos aferentes, despolarizan las neuronas entéricas, y estimulan el músculo liso y las células epiteliales de la mucosa; los neurotransmisores afectan a las células inmunitarias, al diámetro de las arteriolas, a la permeabilidad vascular, y al transporte de fluido epitelial; y los productos de las células endocrinas afectan a los terminales nerviosos y a las células inmunitarias (Bueno *et al.*, 1997; Castro & Arntzen, 1993; Collins, 1996; Cooke, 1994).

Los mastocitos

Los mastocitos son una población de células heterogénea que derivan de células precursoras de la médula ósea y migran a tejidos periféricos como células inmaduras, diferenciándose *in situ*. Históricamente se clasificaron según diferencias fenotípicas, básicamente propiedades de tinción (Enerback, 1966a; Enerback, 1966b). Pero además de las diferencias morfológicas e histoquímicas, también se diferencian en su desarrollo, perfiles de activación y bioquímica, en su contenido en mediadores y en sus respuestas a secretagogos mastocitarios y a agentes estabilizadores (Lorentz *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 1997; Pearce *et al.*, 1982b; Pearce *et al.*, 1982a; Shanahan *et al.*, 1985; Theoharides *et al.*, 1982).

Los mastocitos actúan como células proinflamatorias en procesos patológicos como la alergia, la inflamación crónica, las parasitosis por helmintos y los tumores, pero también tienen funciones fisiológicas múltiples, como la cicatrización de heridas (Artuc *et al.*, 1999; Iba *et al.*, 2003), y la regulación de la respuesta inmune del organismo, especialmente frente a parásitos y bacterias (Malaviya *et al.*, 1996). Los mastocitos, tras la activación inducida por mecanismos dependientes o independientes de IgEs, liberan gran cantidad de mediadores proinflamatorios, inmunoreguladores y reguladores del tejido.

Las células precursoras de los mastocitos llegan a través de la circulación hasta los tejidos periféricos, donde maduran. La localización final de los mastocitos depende de receptores específicos, como por ejemplo la integrina β -7, que es crítica para la localización de las células precursoras de mastocitos en el intestino delgado (Gurish *et al.*, 2001). La presencia, *in situ*, de los mastocitos maduros requiere que la vía SCF/c-kit esté intacta.

Los mastocitos maduros son abundantes en los tejidos mucosos (principalmente cerca de vasos sanguíneos y nervios) que están en contacto con el medio externo, como el tracto respiratorio, el tracto intestinal y la piel (Schwartz, 1994). También se localizan en órganos linfoides. Más del 40% del volumen total del mastocito está ocupado por las membranas de los gránulos de secreción. Los gránulos de los mastocitos se originan en el aparato de Golgi, que es responsable de la síntesis y organización de los mediadores preformados (Caulfield *et al.*, 1980).

En los roedores los mastocitos maduros son de dos tipos:

- Mastocitos de mucosa (MMC) (intestino, bronquios, timo, hígado y submucosa gástrica): contienen sulfato de condroitina como proteoglicano en los gránulos citoplasmáticos. Son dependientes de citoquinas producidas por linfocitos T.
- Mastocitos de tejido conjuntivo (CTMC) (piel, pulmón y superficies serosas): contienen heparina como proteoglicano. Están implicados en la respuesta inmune innata a las bacterias.

Los CTMC y los MMC son histoquímica, ultraestructural y funcionalmente distintos. Los mecanismos reguladores de la liberación de histamina también son diferentes, mientras que la regulación de TNF- α es similar.

En los roedores, a diferencia de los CTMC, que poseen numerosos gránulos ricos en histamina y serotonina, los mastocitos de mucosa intestinal (IMMC) tienen poco contenido en histamina y serotonina (Heavey *et al.*, 1988). Ambos tipos son ricos en proteasas granulares de secreción, que difieren según el tipo de mastocito (Crowe & Perdue, 1992b; Friend *et al.*, 1996; Gurish & Austen, 2001). En la rata, los IMMC expresan selectivamente RMCP II (del inglés *Rat Mast Cell Protease II*), y los CTMC expresan RMCP I (Befus *et al.*, 1995; Lutzelschwab *et al.*, 1997). Estas proteasas han sido utilizadas ampliamente como marcadores específicos de la activación de las dos poblaciones mastocitarias (Miller *et al.*, 1983).

Los mastocitos de mucosa y de tejido conjuntivo proliferan en respuesta a diferentes estímulos (Enerback & Lowhagen, 1979; Enerback *et al.*, 1981; Marshall *et al.*, 1987a). El tipo de mastocito no está necesariamente predeterminado, pero sí fuertemente influenciado por el microambiente (Kobayashi *et al.*, 1986; Otsu *et al.*, 1987).

La activación de los mastocitos da lugar a 2 tipos de respuesta:

- Secreción del contenido pre-formado de los gránulos por exocitosis:
 - * aminas biógenas: histamina, serotonina (5-HT).
 - * proteoglicanos: heparina, sulfato de condroitina.
 - * proteasas
 - * TNF- α
- Síntesis de nuevos precursores:
 - * Síntesis enzimática de mediadores lipídicos a partir de precursores almacenados en las membranas celulares, y en algunos casos en los cuerpos lipídicos. Son: prostaglandinas, leucotrienos, factor de agregación plaquetaria.
 - * Inicio de la transcripción, translación y secreción de citoquinas. Son: TNF- α , IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-16, GM-CSF, MCP-1, IFN- γ .

Algunos mediadores mastocitarios de nueva síntesis son factores quimiotácticos, de crecimiento y reguladores, que reclutan y activan otras células pro-inflamatorias como linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Algunas de estas células participan en el mantenimiento de la permeabilidad intestinal aumentada, característica de patologías como la alergia alimentaria y la enfermedad inflamatoria intestinal (Wershil *et al.*, 1996).

Activación mastocitaria independiente de IgEs

Como ya hemos mencionado anteriormente, los mastocitos pueden ser activados vía IgEs o independientemente de IgEs. La respuesta a estimulación independiente está condicionada por el fenotipo del mastocito. La activación de mastocitos independiente de IgEs no requiere la presencia de calcio externo, y se completa en menos de 1 minuto. Son secretagogos independientes el compuesto 48/80 y la sustancia P. El compuesto 48/80 es considerado un degranulador de mastocitos de tejido conjuntivo. El bromolasalocid es un secretagogo que actúa tanto sobre mastocitos de tejido conjuntivo como de mucosa. También los mediadores inflamatorios liberados por eosinófilos pueden estimular los mastocitos sin mediación de IgEs.

Durante el destete hay niveles altos de RMCP II en el suero y aumento en el número de IMMC, sugiriendo un papel de estas células durante esta fase del desarrollo intestinal. La morfología de los IMMC durante este período sugiere que están activados (Cummins *et al.*, 1988). Tras el destete, los niveles séricos de RMCP II y el número de IMMC vuelven a la normalidad. La activación de los IMMC durante este período del desarrollo no es neurogénica.

El SCF (del inglés *stem cell factor*) regula el desarrollo de los mastocitos humanos a partir de las células precursoras (Galli *et al.*, 1993), pero también regula las funciones de los mastocitos humanos maduros. Además, también aumenta la liberación de histamina y la producción de leucotrienos. A nivel gastrointestinal el SCF promueve la supervivencia y proliferación de los mastocitos (Bischoff *et al.*, 1996a).

En los roedores, la IL-3 es el principal factor estimulador del desarrollo y regulador de la función mastocitaria.

El NO también regula la degranulación de mastocitos (Iikura *et al.*, 1998).

Los mastocitos poseen receptores para el NGF (del inglés *nerve growth factor*), necesario para el crecimiento de las neuritas y para el mantenimiento de los nervios periféricos. La concentración de esta molécula está aumentada en humanos con enfermedad alérgica (Bonini *et al.*, 1996), provocando un aumento en el número de mastocitos y estimulando la liberación de histamina (Marshall *et al.*, 1999; Nilsson *et*

al., 1997). De forma similar, el NGF produce proliferación de mastocitos cuando se inyecta a ratas (Bienenstock *et al.*, 1987).

Activación mastocitaria mediada por IgEs: reacción alérgica

Uno de los mecanismos efectores más poderosos del sistema inmune es la reacción de hipersensibilidad inmediata, iniciada por la estimulación, dependiente de IgEs, de los mastocitos titulares y basófilos circulantes. La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en la reacción de hipersensibilidad inmediata está resumida en la figura 1. El contacto inicial con un antígeno extraño conduce a la síntesis de IgEs específicas en las células B. Las IgEs secretadas se unen a receptores Fc ϵ RI de alta afinidad que se hallan en la superficie celular de mastocitos y basófilos. Una nueva exposición al antígeno, que se une cruzadamente a las moléculas de IgE específicas ancladas a la membrana celular de mastocitos y basófilos, da lugar a la activación de estas células, la exocitosis de los gránulos y a la síntesis de nuevos mediadores. La duración de la activación y los mediadores liberados en la degranulación mastocitaria está determinada por el balance entre estímulos de activación y señales inhibitorias. Los mediadores liberados son responsables de las manifestaciones clínicas y patológicas de la reacción de hipersensibilidad, ya que provocan aumento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, contracción del músculo liso visceral y bronquial e inflamación local. Esta activación mediada por IgEs, que se inicia a los pocos minutos tras la exposición al antígeno, se considera el mecanismo básico de activación de los mastocitos en la reacción alérgica. En la forma sistémica más extrema de la reacción de hipersensibilidad, llamada anafilaxis, los mediadores provocan broncoconstricción y colapso cardiovascular que puede conducir a la muerte del individuo.

La hipersensibilidad inmediata forma parte de una respuesta mayor, que tiene lugar como consecuencia de la activación y liberación de mediadores mastocitarios, y que recibe el nombre de reacción de fase tardía. Los mediadores atraen numerosas células inflamatorias, como eosinófilos, neutrófilos y linfocitos, que infiltran el tejido. Se inicia entre 2 y 4 horas después de la reacción de hipersensibilidad inmediata. La inflamación es máxima a las 24 horas y después desaparece gradualmente. La reacción de fase tardía es un mecanismo de defensa frente a infecciones helmínticas y también está implicada en la lesión tisular característica de enfermedades alérgicas como el asma. Los

eosinófilos son las principales células inflamatorias de las reacciones alérgicas y persisten durante la fase aguda y cuando la inflamación se hace crónica, provocando hiperplasia de las criptas, atrofia de vellosidades e infiltración linfocítica a nivel del tracto gastrointestinal (Ferguson & Sallam, 1992; Nagata *et al.*, 1995; Piliponsky *et al.*, 2001).

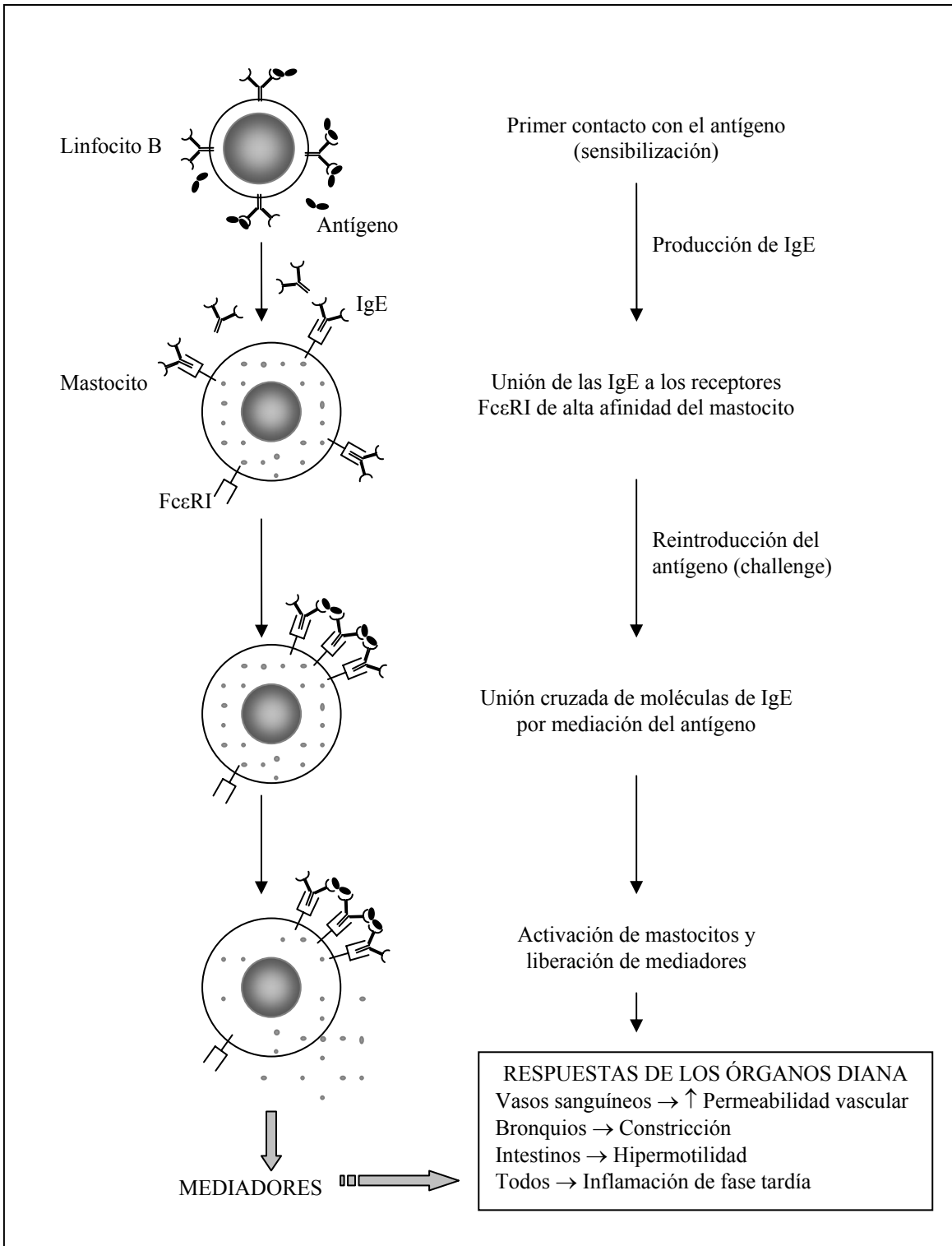


Figura 1. Reacción de hipersensibilidad inmediata

Los alérgenos activan los mastocitos sólo en individuos atópicos (predispuestos a las reacciones alérgicas), no en individuos no sensibilizados. En los primeros, una gran proporción de las IgEs unidas a la membrana plasmática de los mastocitos es específica contra un antígeno. En este caso, el contacto con el antígeno une cruzadamente suficientes moléculas de IgE para desencadenar la activación del mastocito. En los individuos no sensibilizados, las IgEs unidas son específicas para varios antígenos diferentes, y en consecuencia, no se une cruzadamente el número suficiente de moléculas de IgE específicas para un mismo antígeno, necesario para inducir la activación de los mastocitos.

Los individuos atópicos presentan mayor cantidad de IgEs circulantes (frente a gran variedad de alérgenos ambientales) que los individuos no sensibilizados. Se ha visto que los individuos atópicos poseen mayor número de eosinófilos activados y mayor cantidad de células T secretoras de IL-4 en sangre periférica que los individuos no sensibilizados. Además, estas células T producen mayor cantidad de IL-4 por célula que los linfocitos T de individuos no sensibilizados. Todos estos factores contribuyen a la mayor producción de IgEs asociada a la atopía.

La unión de las moléculas de IgE a los receptores de alta afinidad presentes en la membrana del mastocito, en ausencia de antígeno, puede generar señales que estimulan la proliferación mastocitaria sin desencadenar degranulación (Kawakami & Galli, 2002).

Funciones de los mastocitos a nivel gastrointestinal

En el tracto gastrointestinal los mastocitos están presentes en todas las capas, pero se localizan predominantemente en la lámina propia y en la submucosa. En la mucosa gastrointestinal son abundantes los mastocitos de mucosa, sobre todo en estómago, duodeno e íleon (Metcalf, 1984). Los mastocitos se encuentran en situación de equilibrio entre las funciones fisiológicas y los efectos patológicos en los individuos normales. Una alteración de este equilibrio conduce a reacciones patológicas (Stenton *et al.*, 1998).

Los mastocitos, además de poder ser estimulados vía IgE-dependiente (antígenos) e IgE-independiente (toxinas bacterianas, neurotransmisores, mediadores inflamatorios liberados por granulocitos, etc.), pueden responder incluso a la distensión mecánica, o simplemente a la manipulación del intestino delgado, dando lugar a cierto grado de activación y degranulación (Vermillion *et al.*, 1993).

Los mastocitos son células claramente implicadas en la protección del tejido al daño inflamatorio y en la maduración intestinal, liberando TNF- α y IL-10 (Stenton *et al.*, 1998). El TNF- α aumenta la proliferación y migración de linfocitos intraepiteliales (Ebert, 1998). La IL-10 también previene el daño de la mucosa intestinal. El NO, que puede tener efectos protectores o adversos a nivel intestinal, es otro de los mediadores que puede ser liberado por los mastocitos.

Se ha demostrado una asociación muy estrecha entre mastocitos de mucosa y aferentes vagales (Williams *et al.*, 1995). Se ha visto que la degranulación de los mastocitos está implicada en la disrupción de los complejos motores migratorios por la acción de la colecistoquinina (CCK) endógena, por lo tanto los mastocitos están activamente implicados en el control fisiológico de la motilidad intestinal. Además, la CCK degranula los mastocitos de mucosa actuando sobre receptores de CCK tipo B (Juanola *et al.*, 1998). Sin embargo, la infusión exógena de CCK-8 induce sólo una ligera degranulación de mastocitos (Rodríguez-Membrilla *et al.*, 1995; Vergara *et al.*, 2002).

Los mastocitos de mucosa intestinal están estratégicamente localizados debajo de la membrana basal y en contacto con fibras nerviosas, indicando el potencial de estas células como reguladoras de las propiedades de barrera y transporte del epitelio. De hecho, la principal función de las β -quimasas solubles liberadas por los mastocitos es promover la permeabilidad de la mucosa intestinal en las reacciones de hipersensibilidad alérgica, ya que estas proteasas participan en la alteración del colágeno tipo IV de la lámina basal (importante para el mantenimiento de la integridad del epitelio) (King & Miller, 1984; Patrick *et al.*, 1988).

Para estudiar el papel de los mastocitos en la regulación de la fisiología de la mucosa intestinal se han utilizado básicamente dos tipos de modelos animales:

- modelos de alergia alimentaria
- modelos de infección parasitaria

Mastocitos y patología

Existen evidencias crecientes de que las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) no alérgicas están mediadas por mecanismos inmunológicos, como por ejemplo las enfermedades autoinmunes y reacciones de hipersensibilidad desencadenadas por antígenos exógenos (Crowe & Perdue, 1992b). Estos mecanismos implican la infiltración y activación de mastocitos y eosinófilos, que son fuentes potentes de mediadores inflamatorios y son muy numerosos en la barrera gastrointestinal (Befus *et al.*, 1985; Metcalfe, 1984). Durante la inflamación se producen cambios en los mastocitos de la mucosa y en los nervios (Kranefeld *et al.*, 1998). Estos cambios se asocian a desórdenes funcionales (permeabilidad, transporte y motilidad) e hiperalgesia del intestino (Perdue *et al.*, 1990).

Se ha observado un incremento en el número de mastocitos en la mucosa del íleon y el colon de pacientes con IBD. En pacientes con enfermedad de Crohn existe aumento del número de mastocitos y secreción de histamina, acompañada de edema masivo de la mucosa intestinal y dilatación de los vasos linfáticos (Dvorak *et al.*, 1988). La histamina es responsable de la diarrea en la enfermedad inflamatoria intestinal y en la alergia alimentaria. También en pacientes con colitis ulcerosa el número de mastocitos está aumentado (King *et al.*, 1992; Nolte *et al.*, 1990; O'Sullivan *et al.*, 2000). En un mismo paciente, el número de mastocitos en el tejido inflamado es mayor que en el tejido normal.

Las diferentes acciones de los mediadores mastocitarios en la IBD sugieren que debe existir un balance entre mediadores pro-IBD y mediadores anti-IBD. Si se altera este equilibrio se desencadena enfermedad. Existen además mecanismos de amplificación de la señal de degranulación, que son el elemento clave en el proceso fisiopatológico de respuesta local de larga duración de los mastocitos, asociada con enfermedades como la IBD, el asma y la rinitis alérgica (He, 2004). Hasta el momento se conocen dos vías de amplificación, la histamina y la triptasa, a través de las cuales los mastocitos amplifican sus señales de degranulación. Estas vías pueden actuar sobre mastocitos adyacentes de forma autocrina o paracrina.

El número de mastocitos está también significativamente elevado en la mayoría de pacientes con síndrome del intestino irritable (IBS) a nivel del íleon terminal (O'Sullivan *et al.*, 2000). No se sabe si las alteraciones en la percepción visceral que presentan estos pacientes se producen a nivel de las aferentes viscerales primarias, a nivel central en el cerebro, o en ambas localizaciones. La localización próxima de los mastocitos a fibras nerviosas sensitivas (Stead *et al.*, 1989), y la red de comunicación bidireccional existente entre el SNC, el intestino y los mastocitos (Perdue *et al.*, 1991), hacen pensar que estos últimos podrían ser responsables de las alteraciones en la percepción visceral de estos pacientes, pero no por alteraciones en su número, sino por un estado funcional determinado (Weston *et al.*, 1993). Aunque no se descarta que cambios sutiles en el sistema inmune mucoso puedan incrementar potencialmente la excitabilidad de las neuronas implicadas en reflejos locales y vías centrales, conduciendo a IBS (Collins *et al.*, 1999).

Por otro lado, la histamina secretada por mastocitos, se ha visto que influye en los patrones de motilidad del intestino delgado (Cooke, 1992; Konturek & Siebers, 1980). Pero la histamina por sí misma no puede ser responsable de todas las alteraciones presentes en los pacientes con IBS. Varias sustancias secretadas por los mastocitos son nociceptivas, como los fosfatos de adenosina, la bradiquinina, la histamina, las citoquinas, el potasio, los leucotrienos y el TNF (Theoharides & Sant, 1991), y podrían actuar directamente sobre fibras nociceptivas y también causar dolor abdominal alterando el umbral de sensibilidad de neuronas entéricas aferentes primarias.

Además, los mastocitos liberan varias sustancias (incluyendo la 5-HT) capaces de afectar a la liberación de neurotransmisores desde neuronas aferentes (Skaper *et al.*, 2001). La 5-HT también influye sobre vías eferentes dando lugar a contracción muscular local vía interneuronas, que puede darse lejos del lugar de inflamación.

El estrés, factor considerado agente causal de la perpetuación de patología intestinal, también induce cambios en la funcionalidad de la mucosa por mediación de nervios colinérgicos (Saunders *et al.*, 1997) y está relacionado con la degranulación de mastocitos. El estrés activa los mastocitos intestinales, que liberan mediadores que pueden aumentar la permeabilidad vascular y la secreción intestinal, debido a la acción directa de los mediadores sobre receptores epiteliales y/o a la acción indirecta vía nervios/neurotransmisores (Collins, 2001; Castagliuolo *et al.*, 1996; Yu & Perdue,

2001). El estrés ambiental que se puede considerar de baja intensidad, como por ejemplo el cambio de habitación en el estabulario, afecta a la mucosa intestinal induciendo aumento de la degranulación de los mastocitos, activación de las *globet cells*, separación de células epiteliales y alteración de la ultraestructura del endotelio capilar. Estos cambios incrementan la permeabilidad de los capilares de la mucosa intestinal (Wilson & Baldwin, 1999). Ya que algunos mediadores como la histamina se ha visto que dan lugar a poros en el endotelio de las vénulas (Wu & Baldwin, 1992), es probable que el estrés de baja intensidad selectivamente comprometa la barrera de intercambio sangre-tejido. También se ha visto, que en condiciones de estrés el número de mastocitos en la mucosa de la vejiga urinaria está incrementado (Ercan *et al.*, 1999).

Los mastocitos en el tracto respiratorio juegan también un papel importante en las reacciones alérgicas y en una serie de desórdenes inflamatorios liberando gran variedad de sustancias biológicamente activas. Están además implicados en la patogénesis del asma bronquial. Se localizan en los tejidos vascular, mucoso y conjuntivo. El número está elevado en zonas con inflamación crónica.

Captación de antígenos a nivel intestinal

La presencia del glicocáliz en la zona apical del epitelio intestinal restringe el tamaño de las partículas que pueden ser internalizadas por los enterocitos, favoreciendo la captación de antígeno por las células M. Las células M facilitan el transporte de macromoléculas sin un procesamiento celular significativo, y mediante las células presentadoras de antígeno (sobre todo células dendríticas y células B), hacia el tejido linfóide subyacente de las placas de Peyer (Neutra, 1998). Sin embargo, los antígenos administrados oralmente están sujetos a varios factores fisiológicos que pueden alterar dramáticamente sus propiedades químicas (bajo pH, pepsina, tripsina y bilis). Este procesamiento puede alterar la antigenicidad y puede dar lugar a exposición o destrucción de epítomos específicos previamente al procesamiento del antígeno por las células presentadoras de antígeno. La cantidad de proteína intacta inmunológicamente que llega a la circulación es menos del 0.01 % de la ingerida.

La principal función de los enterocitos epiteliales es la absorción de nutrientes. Aunque también tienen función inmunorreguladora, ya que expresan en su superficie apical

varias moléculas que, en situación de inflamación, podrían actuar como receptores de antígenos, lo que aumentaría la internalización por endocitosis (Hershberg & Mayer, 2000). Otras funciones de los enterocitos son la secreción de citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, liberación de eicosanoides y producción de NO. Se ha visto que el procesamiento intracelular de las proteínas antigénicas en el interior de los enterocitos es importante para el mantenimiento de la tolerancia oral. Sin embargo, algunas de estas proteínas son degradadas por los enzimas intracelulares, eliminando así sus propiedades antigénicas. Por otro lado, aunque la vía transcelular puede ser beneficiosa en la mayoría de los casos, resultando en tolerancia oral, éste puede no ser el caso si el fenotipo epitelial está alterado, como por ejemplo en individuos con hipersensibilidad. Teóricamente, los antígenos que cruzan el epitelio intercelularmente (regulado por los mastocitos), se saltan el procesamiento intracelular necesario para la tolerancia oral y activan las células inmunitarias residentes en la lámina propia. Este fenómeno a veces da lugar a un aumento de la permeabilidad de forma aguda sin consecuencias a largo plazo. Por lo tanto, es necesaria una desregulación crónica de la barrera epitelial para el desarrollo de la enfermedad. Por otro lado, la invasión de los enterocitos por patógenos entéricos también resulta en una respuesta inflamatoria/inmune mediada por quimioquinas que reclutan células (Kagnoff & Eckmann, 1997). Se ha visto que ciertas citoquinas, como el TGF- β (del inglés *transforming growth factor beta*) están claramente implicadas en la generación de tolerancia oral (Strobel & Mowat, 1998), ya que inhibe la proliferación de linfocitos y aumenta la función de barrera del epitelio (Planchon *et al.*, 1994). En conclusión, diversas variables más o menos definidas influyen en el desarrollo de la inmunidad mucosa y la tolerancia oral, constituyendo un mecanismo complejo y bastante enigmático que es básico para la defensa inmunitaria adaptativa y las reacciones inmunológicas adversas a la comida.

Tolerancia oral

La tolerancia oral consiste en la supresión de la respuesta inmune humoral y mediada por células a la inmunización con un antígeno proteico, inducida por la administración oral previa del mismo antígeno (Husby *et al.*, 1994; Chase, 1946; Wells, 1911). La tolerancia oral previene las respuestas inmunes contra bacterias que normalmente residen como comensales en la luz intestinal y que son necesarias para la digestión y la absorción de los nutrientes.

La inducción de tolerancia oral frente a un antígeno de la dieta depende de diversos factores:

- genéticos
- dosis y edad en la primera exposición al antígeno
- frecuencia en la exposición al antígeno
- estructura y composición del antígeno proteico
- integridad de la barrera epitelial
- grado de activación inmunitaria local, que viene reflejado por el perfil de citoquinas y la expresión de moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígeno de la mucosa.

Para la inducción de tolerancia, es necesario que receptores antígeno específicos de linfocitos T (receptor TCR) y/o linfocitos B (inmunoglobulinas) reconozcan el antígeno. Estos receptores son los mismos que reconocen el antígeno en el caso de inducción de respuesta inmune. La tolerancia puede ser central o periférica.

La tolerancia central se induce en linfocitos inmaduros localizados en el interior de los órganos linfoides durante la fase de maduración. Durante la maduración, el reconocimiento del antígeno conduce a la muerte o inactivación del linfocito. Algunos de estos linfocitos inmaduros contactan con autoantígenos, y se vuelven tolerantes hacia ellos. La tolerancia central es importante para el mantenimiento de la no respuesta hacia antígenos que están presentes a altas concentraciones en los órganos linfoides, pero no en el caso de antígenos extraños administrados en la periferia.

La tolerancia periférica frente a antígenos extraños se induce en linfocitos maduros cuando son expuestos al antígeno en determinadas condiciones. Como mínimo tres mecanismos diferentes participan en la inducción de tolerancia periférica: la delección clonal (o muerte celular), la anergia clonal (o inactivación funcional sin muerte celular) y la supresión activa del crecimiento y diferenciación de linfocitos inmunocompetentes (llevada a cabo por células supresoras). Se desconoce si estos mecanismos representan diferentes fases secuenciales del mecanismo de inducción de tolerancia, o si la inducción de uno u otro está determinada por el antígeno y las condiciones de presentación del mismo. Por lo tanto, un fallo en el sistema inmune del individuo para

responder frente a un antígeno puede ser debido a cualquier combinación de los siguientes fenómenos: ausencia (deleción), inactivación (anergia) de linfocitos T y/o B, y efectos inhibitorios de las células supresoras.

Todavía no está claro si los eventos inmunorreguladores más importantes para la inducción de tolerancia oral frente a antígenos de la dieta tienen lugar en las placas de Peyer, en la lámina propia, o en órganos linfáticos sistémicos. Algunos estudios demuestran que las proteínas administradas vía oral inducen anergia clonal de linfocitos T. Sin embargo, se desconoce qué tipo de células presentadoras de antígeno presentan los antígenos administrados vía entérica para inducir tolerancia de células T y cómo la anergia inducida por el antígeno oral puede suprimir la respuesta sistémica. Otra hipótesis es que los antígenos orales podrían estimular la producción de citoquinas como el TGF- β , que inhibe la proliferación de linfocitos, resultando en la supresión de la respuesta inmune. Las células productoras de TGF- β podrían migrar a lugares distantes al lugar de entrada del antígeno, e incluso inhibir la respuesta inmune en la periferia.

Elson y colaboradores (Elson *et al.*, 2001) postulan que algunas de las bacterias comensales del intestino que entran a través de las placas de Peyer y folículos linfoides intestinales promueven una respuesta anti-inflamatoria que impide la maduración y activación de células dendríticas, cuya función es procesar y presentar antígenos. Entonces las células dendríticas inmaduras estimulan preferentemente el desarrollo de células T reguladoras, induciendo así tolerancia. Perturbaciones en el balance entre células T reguladoras y efectoras proinflamatorias favorece que éstas últimas promuevan el desarrollo de inflamación patológica intestinal. Una vez establecido, este desequilibrio tiende a reforzarse debido a la presencia de citoquinas proinflamatorias en el medio y a la estabilidad fenotípica de las células T efectoras diferenciadas.

Tampoco está claro por qué la administración oral de algunos antígenos, como proteínas solubles en grandes dosis, inducen tolerancia sistémica de células T, mientras que la administración de otros antígenos, como las vacunas atenuadas de la polio, inducen la secreción de anticuerpos en las mucosas dependiente de células T y a células de memoria de larga duración (Garside & Mowat, 1997; Weiner, 1997). Una posible explicación es que los microorganismos, contrariamente a las proteínas solubles,

infectan o activan las células presentadoras de antígeno en el epitelio intestinal e inducen inmunidad local específica. La inmunización vía oral supondría una vacuna fácil de administrar, más barata, y evitaría la utilización de agujas, pero normalmente, la administración oral de un antígeno induce tolerancia. Cualquiera que sea el mecanismo, el fenómeno de la tolerancia oral supone un tratamiento potencial de las enfermedades autoinmunes en las que el autoantígeno es conocido, y otros procesos clínicos en los que sea beneficioso inhibir respuestas inmunes específicas hacia un antígeno proteico.

Bystander suppression

La administración vía oral de un antígeno soluble a un animal generalmente causa tolerancia frente al antígeno. Si el antígeno se administra junto con otro antígeno en el momento de la inmunización, disminuye la respuesta inmune frente al nuevo antígeno. Este fenómeno recibe el nombre de *bystander suppression* (Groux *et al.*, 1997).

Numerosos estudios destinados al desarrollo de nuevos tratamientos de enfermedades autoinmunes se basan en este fenómeno. Por ejemplo, si se administra ovoalbúmina vía oral a ratas, y posteriormente son inmunizadas con ovoalbúmina y la proteína básica mielina, quedan protegidas frente a encefalomiелitis autoinmune (Miller *et al.*, 1991). La *bystander suppression* también podría ser importante en el tratamiento de enfermedades alérgicas y de enfermedades inflamatorias como la artritis (Yoshino *et al.*, 1995), especialmente si el antígeno inductor de la enfermedad es desconocido o si varios antígenos están actuando sinérgicamente en la patogénesis de la enfermedad (Pullerits *et al.*, 1998).

Los mecanismos implicados en la generación de *bystander suppression* tras la administración oral de un antígeno suelen estar mediados por células Th1 (Friedman & Weiner, 1994; Melamed & Friedman, 1994). Sin embargo, en individuos jóvenes, también las células Th2 pueden verse implicadas (Dahlman-Hoglund *et al.*, 1995; Dahlman-Hoglund *et al.*, 1997). En modelos de generación de *bystander suppression* mediante administración intraperitoneal de un antígeno soluble, la tolerancia también está mediada por células Th1 (Burstein *et al.*, 1992; de Wit *et al.*, 1992; Lundin *et al.*, 1996). Se ha sugerido que esto podría ser debido a la eliminación fisiológica rápida, por filtración glomerular, de la proteína o fragmentos proteicos de la circulación, de manera

que el antígeno no permanece el tiempo suficiente para la inducción de tolerancia dependiente de células Th2. Además, los linfocitos Th2 son más resistentes a la tolerancia que los linfocitos Th1 (Peterson *et al.*, 1993). Se ha visto que la administración de una única dosis de ovoalbúmina induce tolerancia Th1 (Melamed & Friedman, 1994), pudiendo llegar a conseguir una respuesta también tipo Th2 si se incrementa la duración de la administración del antígeno soluble a 20 días (Melamed *et al.*, 1996). En el caso de los roedores, se ha visto que las respuestas mediadas por células a la ovoalbúmina pueden ser tolerizadas de por vida (Strobel & Ferguson, 1987).

Mastocitos e hipersensibilidad intestinal (alergia alimentaria)

Las reacciones de hipersensibilidad intestinal se producen tras la ingestión de antígenos de la dieta o la infección con ciertos parásitos entéricos. A pesar de que tales reacciones son beneficiosas para eliminar los parásitos, las reacciones frente a proteínas inocuas de la dieta son inapropiadas. La prevalencia actual de la alergia alimentaria ha aumentado sustancialmente en la última década, de forma similar al aumento en la prevalencia de otras condiciones atópicas como el asma y la rinitis alérgica. Se cree que la alergia alimentaria es el resultado de la sensibilización a proteínas de la dieta durante la infancia temprana, debido posiblemente a un sistema inmune inmaduro o a una barrera gastrointestinal incompleta. Con el paso de los años muchos de estos niños se vuelven tolerantes, pero unos pocos desarrollan alergias que se mantienen durante toda su vida (Bischoff *et al.*, 2000).

Una reacción adversa a la comida hace referencia a cualquier reacción anormal después de la ingestión de los alimentos o aditivos alimentarios. Las reacciones adversas a la comida pueden ser consecuencia de deficiencias enzimáticas como la intolerancia a la lactosa, de respuestas farmacológicas exageradas a agentes naturales o químicos como las aminas vasoactivas en los vinos, o de respuestas inmunes.

Las respuestas inmunes a la comida pueden definirse mecánicamente como mediadas y no mediadas por IgEs, aunque las más caracterizadas son las reacciones de hipersensibilidad tipo I (mediadas por IgEs) (Gleich, 1980). En los pacientes genéticamente predispuestos (atópicos), la alergia alimentaria está generalmente producida por una sobreproducción de IgEs contra proteínas normales de la dieta (Sutton & Gould, 1993). Los pacientes normalmente tienen molestias gastrointestinales

más que sistémicas, y raramente presentan niveles plasmáticos detectables de proteasas mastocitarias, que normalmente están elevados en otras formas de anafilaxis sistémicas (Lin *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1987). Pero el espectro de la alergia alimentaria va desde síntomas cutáneos, como la dermatitis atópica, apareciendo varias horas tras la ingestión del alimento responsable, hasta síntomas que ponen en peligro la vida y que aparecen inmediatamente tras la ingestión. Adicionalmente, algunos individuos experimentan síntomas de alergia sólo si la comida es ingerida previamente a un estímulo físico específico (por ejemplo, el ejercicio vigoroso) o si el individuo tiene alergias estacionales concomitantes (Kagan, 2003).

La reacción de hipersensibilidad se inicia por la unión del antígeno a moléculas de IgE específicas unidas a los mastocitos de la lámina propia, que son las células efectoras clave en la reacción de hipersensibilidad (Berin *et al.*, 1998). Los mediadores bioactivos liberados por los mastocitos activados actúan sobre receptores de otros tipos celulares, dando lugar a secreción de iones, la fuerza conductora para la secreción de agua que da lugar a diarrea, y aumento de la permeabilidad paracelular (Crowe & Perdue, 1992a; Scott *et al.*, 1988). En los roedores, la secreción de iones empieza a los 3 min tras el estímulo antigénico, lo que sugiere que la sensibilización altera el transporte transepitelial del antígeno (Berin *et al.*, 1997). Varios estudios sugieren que los mediadores mastocitarios (posiblemente interactuando con nervios para la liberación de neurotransmisores) actúan sobre receptores epiteliales, debilitando las *tight junctions* (uniones intercelulares de los enterocitos) y facilitando el paso de macromoléculas entre las células epiteliales.

Los mediadores mastocitarios también alteran la actividad mioeléctrica y motora (Scott *et al.*, 1988; Scott & Tan, 1996), interrumpiendo la motilidad normal en situación de ayuno y tras la ingesta, iniciando una serie de agrupaciones de contracciones que se propagan en sentido aboral, y que se asocian con un incremento de la velocidad del tránsito intestinal y que tiene como objetivo la eliminación de los antígenos del tracto gastrointestinal (Diamant *et al.*, 1989; Maric *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1988). Estos mediadores reclutan otras células inflamatorias que contribuyen a las reacciones de hipersensibilidad de fase tardía liberando una segunda tanda de mediadores que amplifican la respuesta.

Los principales problemas en el diagnóstico de la alergia alimentaria son la dificultad en la visualización de las manifestaciones y la no existencia de métodos fiables para la confirmación del diagnóstico.

El cromoglicato disódico (DSCG) y el doxantrazol, inhibidores de la degranulación de mastocitos, inhiben los cambios en la motilidad inducidos por el antígeno (Perdue & Gall, 1985; Perdue & Gall, 1986), mientras que el compuesto 48/80 y la concavalina A (secretagogos) inducen cambios en la motilidad, confirmando la implicación de los mastocitos en los cambios en la motilidad durante la reacción de hipersensibilidad (Scott *et al.*, 1990; Scott & Maric, 1993). La atropina y el hexametonio bloquean las alteraciones de motilidad inducidas por el antígeno, lo que sugiere que las alteraciones dependen de la activación neuronal de los mastocitos (Fargeas *et al.*, 1992; Scott & Tan, 1996). Esto concuerda con la disminución de las alteraciones debida al pretratamiento sistémico con capsaicina y antagonistas de la sustancia P (Fargeas *et al.*, 1993). Todos estos hallazgos sugieren que las aferentes vagales controlan la respuesta de anafilaxis intestinal inducida por proteínas de la dieta.

Se sabe poco sobre la patofisiología de las reacciones de hipersensibilidad intestinal, y la mayor parte de la información disponible deriva de estudios en animales (Crowe & Perdue, 1992b). En la rata y en los humanos, la activación de mastocitos da lugar a liberación de mediadores mastocitarios específicos que actúan sobre nervios que amplifican la respuesta de hipersensibilidad (McKay & Bienenstock, 1994). La hiperplasia de mastocitos puede ser uno de los mecanismos mediante los cuales el intestino puede hacerse más reactivo a los antígenos ambientales o de la dieta. Además del aumento en el número de mastocitos gastrointestinales, con frecuencia se observa aumento en el número de eosinófilos en estos pacientes, incluso previo a la hiperplasia mastocitaria (Bischoff *et al.*, 1996b). Por otro lado, algunas proteínas de los gránulos de los eosinófilos pueden inducir degranulación de mastocitos (Piliponsky *et al.*, 2002).

Alergia alimentaria y enfermedad intestinal (síndrome del intestino irritable)

El síndrome del intestino irritable (IBS) es una enfermedad multifactorial, que afecta aproximadamente al 15-20 % de la población general. Se define como una alteración de la función gastrointestinal sensitiva y motora, caracterizada por hipersensibilidad

visceral a estímulos mecánicos y químicos. Los síntomas asociados son dolor abdominal y alteraciones en la defecación, que pueden manifestarse como diarrea o estreñimiento.

Los factores más frecuentemente relacionados con la aparición de IBS son los episodios previos de enteritis infecciosa (Gwee *et al.*, 1999) y las alergias alimentarias no diagnosticadas (Smout *et al.*, 2000; Zar *et al.*, 2002). De hecho, tras un proceso inflamatorio agudo gastrointestinal, el 30 % de los individuos desarrolla síntomas persistentes. También pacientes en fase de remisión de enfermedad inflamatoria intestinal presentan síntomas compatibles con IBS. Otros factores implicados recientemente en la etiopatología del IBS son: psicosociales (MacQueen *et al.*, 1989; Monnikes *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 1998), disminución de la capacidad de eliminación del gas intestinal, alteraciones en el procesamiento de señales aferentes, cambios en la microflora intestinal y en el metabolismo de la serotonina y factores genéticos (Barbara *et al.*, 2004a).

Varios mecanismos están implicados en la hipersensibilidad visceral: el efecto modulador del SNC en respuesta a la información que le llega del intestino, la hiperexcitabilidad de las neuronas de la raíz dorsal, y la sensibilización de los terminales nerviosos sensitivos a nivel del órgano. Esta sensibilización podría ser debida a una reacción inflamatoria leve a nivel de la pared intestinal, ya que numerosos estudios han demostrado la existencia de un número elevado de mastocitos en la mucosa del íleon terminal, ciego, colon y recto de pacientes con IBS (O'Sullivan *et al.*, 2000; Bauer & Razin, 2000; Dong *et al.*, 2004). Algunos de estos estudios también han demostrado un aumento en el grado de activación de los mismos (Barbara *et al.*, 2004b; Park *et al.*, 2003). Estas observaciones, similares a las observadas en la alergia alimentaria, junto con el hecho de que una proporción significativa de pacientes con IBS atribuyen sus síntomas a reacciones adversas a la comida, postulan una relación directa entre las dos patologías.

Este aumento en el número de mastocitos, su localización próxima a la inervación de la mucosa (Stead *et al.*, 1987; Stead *et al.*, 1989), y la demostración, tanto en modelos animales como en pacientes, que la activación de los mastocitos y liberación de sus mediadores incrementa la excitabilidad de las neuronas entéricas y de las aferentes primarias (Gao *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2003) reafirman la implicación de los

mastocitos en las alteraciones funcionales, sensitivas y motoras del IBS (Bueno *et al.*, 1997; Castex *et al.*, 1994).

En resumen, la activación de los mastocitos intestinales, resultante de una infección entérica previa o de alergia intestinal, podría jugar un papel central en las manifestaciones de la hipersensibilidad intestinal tanto a nivel de la respuesta motora como en las alteraciones de la percepción visceral características de esta enfermedad.

Modelos experimentales de sensibilización

Las industrias, antes de lanzar nuevas proteínas dietéticas al mercado, deben definir su alergenicidad potencial. La identidad serológica de proteínas nuevas con alérgenos humanos conocidos, la similitud estructural o la homología en secuencias de aminoácidos con proteínas alergénicas, y la resistencia a la digestión proteolítica en un fluido similar al fluido gástrico, no son suficientes para predecir el poder sensibilizante de las proteínas (Kimber *et al.*, 2003). Las proteínas inmunogénicas inducen la producción de IgGs específicas, pero no IgEs. Las proteínas potencialmente alergénicas inducen producción de IgGs e IgEs específicas. Características proteicas como el tamaño, la estabilidad proteolítica, la función biológica, el estado de glucosilación, la inmunogenicidad y las vías de procesamiento para la subsiguiente presentación al sistema inmune, influyen en la respuesta inmune inducida por la proteína (Kimber & Dearman, 2001). La habilidad de una proteína para estimular respuestas de IgEs no necesariamente representa un riesgo para la salud humana; por ejemplo, puede no causar sensibilización cuando se administra con la dieta o si los niveles de exposición son insuficientes. Para que una proteína induzca sensibilización tras la ingestión oral, tiene que tener cierto nivel de estabilidad en el ambiente gástrico para interactuar efectivamente con el sistema inmune mucoso. Sin embargo, tras la administración por sonda, incluso proteínas inestables son capaces de inducir respuestas inmunes en ratones (Dearman *et al.*, 2002).

Los modelos animales son una herramienta valiosa para identificar el potencial de sensibilización de las proteínas. Para el estudio de las reacciones de hipersensibilidad, se han desarrollado básicamente dos tipos de modelos animales, que difieren en la

utilización de parásitos entéricos o proteínas de la dieta como agentes sensibilizantes (Baird *et al.*, 1985; Byars & Ferraresi, 1976; Lake, 1983).

Los criterios a considerar para la elección del modelo animal para el estudio de la alergenicidad de un producto son: especie y cepa, producción de respuesta tipo Th2 (da lugar a producción de IgEs), capacidad de desarrollar tolerancia oral, ruta de administración del antígeno durante la sensibilización y el challenge (exposición al antígeno), y el uso de adyuvantes (Penninks & Knippels, 2001; Taylor & Lehrer, 1996). En general, para la evaluación del potencial alergénico intrínseco de las nuevas proteínas, se prefiere la administración oral y si es posible evitando la utilización de adyuvantes, que es la forma en la que el individuo será expuesto a la proteína. Un factor crítico que afecta al resultado de los estudios de sensibilización oral es la pre-exposición de los animales o de su generación parental al antígeno a investigar. Cuando se hacen estudios de sensibilización oral a proteínas, hay que asegurarse que como mínimo dos generaciones de animales hayan sido alimentadas con dieta libre del antígeno (Knippels *et al.*, 1998b). La dosis de alérgeno influye también en el desarrollo de sensibilización oral (Mowat *et al.*, 1987; Peng *et al.*, 1989).

Varios modelos animales roedores y no roedores se han utilizado como modelos de sensibilización: ratón, rata, perro, cerdo y cobaya (Tryphonas *et al.*, 2003). Algunos de estos estudios se han realizado utilizando la sensibilización parenteral y el challenge enteral (Byars & Ferraresi, 1976; Curtis *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1990). A pesar de que los efectos del challenge oral en estos modelos de hipersensibilidad mediada por IgEs se han investigado, la ruta natural de administración durante el período de sensibilización no se ha tenido en cuenta.

En el caso del ratón se utiliza sobre todo la cepa BALB/c, que se caracteriza por el desarrollo de respuestas inmunes tipo Th2 y producción de IgEs. La sensibilización oral (incluso en combinación con adyuvantes) en esta especie se asocia al desarrollo de tolerancia (Li *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000), por lo que normalmente se utiliza la sensibilización sistémica (normalmente intraperitoneal) (Dearman *et al.*, 2000; Kimber *et al.*, 2000).

Las ventajas del perro atópico como modelo es su mayor tamaño, que permite la realización de procedimientos más complejos a nivel gastrointestinal, como la toma de

muestras de mucosa por endoscopia sin sacrificar al animal. Aunque presenta también limitaciones: es más caro de mantener, y su respuesta inmune no está tan bien caracterizada como en modelos de roedores; además la sensibilización es un proceso largo (más de 18 meses) y requiere la utilización de adyuvantes (Ermel *et al.*, 1997). También se ha descrito la alergia espontánea en el perro (afecta al 8% de la población, (Helm *et al.*, 2003)), que se manifiesta por dermatitis alérgica (similar a lo que ocurre en los humanos).

El cerdo se ha utilizado como modelo debido a la similitud con la especie humana en cuanto a la anatomía de la piel y del tracto digestivo, la fisiología y la inmunología. Pero presenta el inconveniente que no existen anticuerpos específicos para la detección de IgEs de cerdo en el mercado, y por lo tanto no se puede confirmar la presencia de IgEs antígeno-específicas en los animales sensibilizados (Helm, 2002).

En la rata, animal en el que se ha estudiado ampliamente la sensibilización a proteínas de la dieta en presencia de adyuvantes (Atkinson & Miller, 1994; Atkinson *et al.*, 1996), también se ha estudiado la sensibilización oral a proteínas administradas a través de la dieta o por administración intragástrica (Atkinson *et al.*, 1996; Bazin & Platteau, 1976; Jarrett *et al.*, 1976). La conclusión de estos estudios fue que aunque la sensibilización a las proteínas administradas vía oral era posible, a veces se inducía tolerancia (Steinmann *et al.*, 1990).

Posteriormente, la cepa de rata Brown Norway (BN), que se caracteriza por respuestas tipo Th2, ha sido descrita como la cepa más adecuada para la inducción de síntesis de IgEs específicas comparada con otras cepas de rata (Wistar, PVG, Hooded Lister) (Knippels *et al.*, 1998b; Knippels *et al.*, 1999c; Knippels & Penninks, 2002), ya que comparte con los humanos atópicos la predisposición genética a desarrollar alergias (Holt & Turner, 1985).

En estudios relativamente recientes se ha utilizado la rata BN para el estudio de la sensibilización oral a proteínas tras la administración a través de la dieta o por sonda intragástrica en presencia (Atkinson *et al.*, 1996) y en ausencia de adyuvantes (Knippels *et al.*, 1998b; Knippels *et al.*, 1998a; Knippels *et al.*, 1999c; Knippels *et al.*, 1999b; Knippels *et al.*, 2000). Se ha descrito como un modelo animal adecuado para inducir respuestas IgGs e IgEs específicas a la administración diaria intragástrica de OVA sin la utilización de adyuvantes (Knippels *et al.*, 1999a). Además, el perfil de alérgenos

reconocidos por el sistema inmune de la rata BN parece ser comparable con el perfil de alérgenos reconocidos por los pacientes humanos alérgicos (Knippels & Penninks, 2003; Knippels *et al.*, 2000). Falta investigar si los anticuerpos específicos inducidos en la rata reaccionan con los mismos epítomos que reaccionan los anticuerpos del suero de pacientes humanos.

La cepa de rata Sprague-Dawley (SD), ampliamente utilizada en todo tipo de estudios, no se caracteriza por estar predispuesta a presentar respuestas tipo Th1 o Th2 (Hylkema *et al.*, 2000; Renzi, 1996). Sin embargo, se ha utilizado como modelo de sensibilización a nematodos intestinales (Marzio *et al.*, 1992), y como modelo de sensibilización vía sistémica con utilización de adyuvantes en numerosos estudios sobre la reacción alérgica intestinal (Crowe *et al.*, 1990; Turner *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 2001) y sobre el asma (Careau *et al.*, 2002; Hylkema *et al.*, 2002a; Hylkema *et al.*, 2002b).

La ovoalbúmina (OVA) es una proteína del huevo de gallina que se ha utilizado ampliamente como modelo de alérgeno (Knippels *et al.*, 1998b). La sensibilización a la OVA aumenta la permeabilidad intestinal en condiciones basales y en respuesta al challenge. En condiciones basales no hay grandes cambios estructurales, pero en cambio, tras el challenge, el aumento de permeabilidad está asociado a la activación de mastocitos y a la reducción de la altura de las vellosidades en ratas sensibilizadas (Crowe *et al.*, 1993).

Los adyuvantes son sustancias que se administran junto con el antígeno para aumentar la intensidad de la respuesta inmunitaria, ya sea con objetivo preventivo (vacunación) o para inducir sensibilización (Scott *et al.*, 1988). El reconocimiento inmunitario de antígenos en ausencia de adyuvantes tiende a inducir tolerancia más que inmunogenicidad. Dos de los adyuvantes más utilizados en los modelos de sensibilización son la toxina pertúsica y el hidróxido de aluminio (Crowe *et al.*, 1990; Lindsay *et al.*, 1994; Pauwels *et al.*, 1983; Sestini *et al.*, 1989).

Las diversas rutas de sensibilización inducen perfiles de sensibilización diferentes aunque tienen algunos factores en común. Por otro lado, se ha demostrado que la sensibilización por sí misma altera las propiedades de barrera del intestino (Berin *et al.*, 1997). La presencia de IL-4, que es producida en exceso por los linfocitos T de la

mucosa intestinal después de la sensibilización en modelos animales, está también presente en individuos atópicos.

Modelo experimental de hiperplasia mastocitaria: infección intestinal con Trichinella spiralis

T. spiralis es un nematodo que pertenece a la familia *Trichinellidae*, que presenta un único género, *Trichinella*. Este género sólo contempla cuatro especies: *T. spiralis*, *T. nelson*, *T. nativa* y *T. pseudospiralis*; y se caracteriza por tener una fase adulta parásita en la mucosa intestinal y una fase larvaria que parasita las fibras musculares.

T. spiralis presenta un tipo de ciclo llamado auto-heteroxeno. Así pues, a pesar de la necesidad de pasar por dos hospedadores sucesivos, el ciclo se desarrolla completamente en uno solo. En otras palabras, el parásito realiza todo el ciclo en el mismo hospedador, en el que permanece a la espera de ser transferido a otro hospedador, donde hará otro ciclo completo, y así sucesivamente.

El ciclo de este parásito se puede dividir en dos fases: la intestinal y la muscular. La fase intestinal empieza con la ingestión por, parte del nuevo hospedador, de carne que contiene las larvas del parásito encapsuladas dentro de sus fibras musculares. Cuando llega al estómago, y por acción de la pepsina y el ácido clorhídrico, se produce la digestión de la musculatura y las larvas quedan libres. En pocas horas estas larvas invaden la mucosa de las zonas más proximales del intestino delgado y penetran dentro de las células epiteliales de la mucosa, dando lugar a la formación de grandes sincitios (Wright, 1979). En el interior de los enterocitos se desarrollan las distintas etapas larvarias (de L1 a L4) hasta la forma adulta. Seguidamente, estos adultos copulan y las hembras, después de un período de embriogénesis, liberan las nuevas larvas.

A partir de aquí, las larvas atraviesan la lámina propia del intestino y por vía linfática y sanguínea migran hacia la musculatura estriada. Por su parte los adultos permanecen en el intestino durante un período de tiempo variable dependiendo de la especie utilizada como hospedador y finalmente son expulsados con las heces. En el caso de la rata este período es de aproximadamente 20-23 días (Castro & Fairbairn, 1969).

La fase muscular empieza con la entrada de las larvas en las fibras musculares. Dentro de la fibra muscular, la larva aumenta de tamaño y experimenta varias transformaciones entre las que hay que destacar la formación de la cápsula, considerada la fase final del

ciclo. Esta cápsula, después de un período de tiempo muy variable que puede ser desde algunos meses a dos años, puede sufrir un proceso de calcificación que no afecta a la viabilidad de las larvas. Así pues, estas larvas pueden mantenerse en este estado durante el resto de la vida del hospedador parasitado a la espera de ser ingeridas por un nuevo hospedador y poder reiniciar el ciclo nuevamente.

La infestación con larvas de este parásito es un modelo de inflamación intestinal ampliamente utilizado en diferentes especies animales. Este modelo, aparte de su baja complejidad técnica y bajo coste económico, presenta un amplio abanico de posibilidades experimentales. Así, además de ser un buen modelo de inflamación intestinal y puesto que la fase intestinal del parásito es transitoria y la inflamación que produce es reversible, permite utilizarlo también como un buen modelo para el estudio del síndrome del intestino irritable (IBS), ya que, aunque existe reversibilidad morfológica, ciertos parámetros fisiológicos pueden permanecer alterados después de superada la fase intestinal del parásito y revertido el proceso inflamatorio (Barbara *et al.*, 1997).

El hecho de que el proceso inflamatorio afecte sólo a la parte más proximal del intestino delgado y que el íleon no se vea morfológicamente alterado, nos permite también utilizar este modelo para el estudio de los posibles efectos remotos que puede tener la inflamación sobre segmentos intestinales alejados del mismo proceso inflamatorio. Estos efectos, tal y como se ha apuntado en otros estudios, estarían producidos por la interacción del proceso inflamatorio con uno o varios mecanismos de control sistémicos que actuarían provocando estas alteraciones remotas (Marzio *et al.*, 1990).

La activación de los mastocitos y liberación de mediadores durante la fase aguda de la inflamación provoca daños en la mucosa, destinados a aumentar la permeabilidad y la motilidad para facilitar la expulsión del parásito (Perdue *et al.*, 1989). La degranulación mastocitaria actúa como estímulo para la expansión de la población mastocitaria en el intestino (Marshall *et al.*, 1987b; Marshall *et al.*, 1990) provocando hiperplasia transitoria de mastocitos de mucosa dependiente de células T, que comienza el día 6 y es máxima el día 12 post-infección (Woodbury *et al.*, 1984). Tras la expulsión del parásito, el transporte epitelial de iones y los niveles séricos de RMCP II vuelven a la normalidad (Perdue *et al.*, 1990). Sin embargo, persiste durante algún tiempo un incremento considerable (8-10 veces) en el número de mastocitos de la mucosa (Perdue

et al., 1990). Después las ratas se vuelven inmunes a la reinfección, ya que el parásito actúa como un antígeno provocando sensibilización, y se produce una respuesta anafiláctica si vuelve a haber exposición al parásito vía oral, lo que conduce a su rápida expulsión. Es por tanto también útil como modelo de alergia alimentaria.

En el ratón, la proteasa específica mMCP-1 (análoga a la RMCP II de la rata) está implicada en la eliminación de *T. spiralis* (Knight *et al.*, 2000). En estudios realizados en ratones deficientes en mMCP-1 se ha visto que esta proteasa participa en la regulación de la hiperplasia mastocitaria durante la infestación por nematodos y su ausencia se asocia con alteraciones en el tamaño y la estructura interna de los gránulos de los IMMC (Wastling *et al.*, 1998). Más del 95% de los IMMC en el ratón y entre el 40 y 50% de los IMMC en la rata se localizan intraepitelialmente durante la expulsión del parásito (Miller, 1996; Scudamore *et al.*, 1995).

El SNE a través de neurotransmisores como el VIP, la sustancia P, la somatostatina y la β -endorfina, que actúan sobre los mastocitos, está también implicado en la regulación del parasitismo intestinal (Stead *et al.*, 1987).

La regulación neuroendocrina de los mastocitos de la mucosa intestinal de la rata en condiciones fisiológicas

De lo explicado anteriormente se deduce que los mastocitos están implicados en la regulación de la función de la mucosa intestinal tanto en situación fisiológica como patológica. Previamente a esta tesis consideramos la realización del estudio de la regulación de los mastocitos en condiciones fisiológicas (Véase anexo). Nuestros objetivos fueron determinar en qué grado los mastocitos están controlados por el sistema nervioso y por estímulos endocrinos que habitualmente controlan las respuestas a la comida en el sistema gastrointestinal. Utilizamos un modelo *in vivo* en el que el intestino fue perfundido con una peptona (ovoalbúmina hidrolizada, OVH) con el objetivo de estudiar: el papel del nervio vago en el control de los mastocitos, el papel de las fibras aferentes sensitivas sensibles a la capsaicina, la implicación de las vías adrenérgicas, y el efecto de los péptidos relacionados con la colecistoquinina (CCK) en la actividad mastocitaria. En el siguiente párrafo se resumen los resultados que obtuvimos.

La perfusión duodenal de OVH incrementó la liberación de *Rat Mast Cell Protease II* (RMCP II, proteasa específica de los mastocitos de la mucosa) respecto a la liberación basal. Las ratas vagotomizadas presentaban una liberación de RMCP II basal inferior a las no vagotomizadas, indicando que existe un tono vagal que regula la actividad mastocitaria basal. La vagotomía tras la perfusión de OVH redujo nuevamente los niveles de RMCP II hasta valores basales, indicando que la activación de los mastocitos inducida por el OVH está mediada, en parte, por vías vagales. En las ratas vagotomizadas, el OVH también incrementó la liberación de RMCP II, es decir, que la activación de los mastocitos por el OVH no está únicamente sometida a control vagal, sino que el OVH podría estar actuando también por otros mecanismos, como podrían ser mecanismos endocrinos, o la acción directa sobre los mastocitos. Todo esto demuestra que tras la ingesta se origina una respuesta neuroendocrina que implica una modulación del sistema inmune gastrointestinal por mediación de la activación mastocitaria.

La aplicación de capsaicina indujo una importante disminución de la concentración de RMCP II. La administración posterior de OVH indujo un incremento en los niveles de RMCP II, pero inferior a la respuesta inducida por la OVH en los animales controles.

De todo esto se deduce que la activación basal de los mastocitos y la respuesta al OVH están mediadas también por la estimulación de aferentes de la mucosa.

Las vías simpáticas son también moduladoras de la actividad mastocitaria basal, ya que la administración de antagonistas adrenérgicos (fentolamina y propanolol) indujo una disminución de la concentración basal de RMCP II, más evidente cuanto mayor era la concentración de RMCP II basal, lo cual indica la existencia de una correlación entre el tono de las vías adrenérgicas y el nivel de activación de los mastocitos. Las vías adrenérgicas actúan además como mediadoras en la respuesta al OVH, ya que la perfusión de OVH posterior a la infusión de antagonistas no indujo ningún cambio en los niveles de RMCP II.

La infusión intravenosa de CCK-8 incrementó ligeramente la liberación de RMCP II, mientras que la infusión de CCK-33 y gastrina indujeron una disminución en la concentración de RMCP II. Las peptonas, productos de la degradación enzimática de las proteínas, son capaces de estimular reflejos neuroendocrinos en la luz intestinal, como por ejemplo la estimulación de la secreción pancreática mediante la liberación de CCK, y de inducir cambios motores en estómago e intestino mediante la liberación de hormonas y la activación de reflejos nerviosos. La CCK podría estar implicada en la respuesta de los mastocitos al OVH por mediación de receptores CCK-B.

Nuestros resultados indicaron que en condiciones fisiológicas, los mastocitos de la mucosa intestinal están regulados tanto por reflejos nerviosos como por respuestas endocrinas inducidas por estímulos intraluminales.

A partir de aquí nos propusimos como objetivo profundizar en el estudio del control neuroendocrino de la respuesta de los mastocitos durante la inflamación intestinal inducida por *T. spiralis* y durante la hipersensibilidad.

OBJETIVOS

El estudio previo llevó a la realización de esta tesis, que se ha centrado en profundizar en el conocimiento de las interrelaciones celulares que tienen lugar durante los procesos de hipersensibilidad del intestino. Concretamente, los principales objetivos han sido:

1. Determinar el posible efecto de la somatostatina sobre la actividad mastocitaria de la mucosa intestinal en estado fisiológico y de inflamación.
2. Determinar el efecto de la sensibilización sobre la población mastocitaria, en dos cepas de rata, una de ellas predispuesta a la hipersensibilidad.
3. Describir las posibles alteraciones motoras crónicas intestinales observadas en este modelo de hipersensibilidad.
4. Establecer en nuestro laboratorio un modelo adecuado de hipersensibilidad alimentaria.
5. Comparar la respuesta mastocitaria y sus implicaciones en dos cepas diferentes de rata, una de ellas predispuesta a la hipersensibilidad.

En resumen, el objetivo final es entender los mecanismos de comunicación neuroinmunológica tanto en situación fisiológica como patológica, actualmente uno de los campos de investigación más activos dentro de la fisiopatología intestinal. El descifrado y la comprensión de las interrelaciones celulares que tienen lugar durante los procesos de hipersensibilidad en el intestino son claves para avanzar en el estudio de patologías intestinales tan importantes en la clínica humana como el IBS, y en la búsqueda de nuevas y más eficaces terapéuticas. La comprensión de estas interrelaciones es fundamental para el desarrollo de la prevención y terapia de las patologías inflamatorias intestinales.

Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia

Y. Saavedra, P. Vergara*

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Received 4 April 2002; received in revised form 7 October 2002; accepted 8 October 2002

Abstract

Several studies demonstrate that intestinal mucosal mast cells (IMMC) are modulated by nervous reflexes as well as by intraluminal content. We recently demonstrated that peptones, such as ovalbumin hydrolysate (OVH), induce the release of rat mast cell protease II (RMCP II), indicating IMMC degranulation. The response is due to complex neuroendocrine reflexes. Somatostatin (SS) and its analogues have been used as potential treatments for inflammation in other body systems with contradictory results. The aim of this study was to evaluate if somatostatin could contribute to the reduction of intestinal mucosal mast cell degranulation.

Anesthetized rats were prepared for duodenal perfusion and mast cell activation was measured by analysis of RMCP II concentration in the duodenal perfusate. Somatostatin significantly decreased RMCP II concentration in both nonstimulated conditions and after ovalbumin hydrolysate perfusion. However, when somatostatin was given previously to OVH, the peptone still induced a slight increase of RMCP II. Similar effects were observed in animals previously treated with capsaicin. These protocols were repeated in animals infected with *Trichinella spiralis*, which induces mucosal mast cell hyperplasia. In these cases, somatostatin blocked the effect of OVH, thus, preventing an increase in RMCP II concentration. Fresh frozen tissue sections from the duodenum were processed in an attempt to demonstrate the presence of SS receptors in mast cells using immunofluorescence and Fluo-peptide labeling techniques. Confocal images from duodenum specimens demonstrate the existence of SS receptors in positive cells for RMCP II.

Taken together, these results indicate that somatostatin diminishes mast cell activity and in consequence could prevent the intestinal responses to mast cell hyperplasia.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Octreotide; RMCP II; Vagal afferents; Visceral sensitivity

1. Introduction

Mast cell-mediated events play a role in functional disorders associated with allergic and inflammatory gastrointestinal responses [1]. The fact that these cells are present in the intestinal wall in healthy conditions establishes the possibility not only of a defensive function, but also of a regulatory function under physiological gastrointestinal conditions [2–4]. Mucosal mast cells (IMMC) are abundant along the whole gastrointestinal tract, but the duodenum shows a higher concentration of cells, together with the stomach and ileum [5,6].

Alteration of intestinal epithelial secretion and motility by immune activation of intestinal mast cells is a well-studied phenomenon [7,8]. However, in addition to their essential role in gastrointestinal hypersensitivity reactions, mast cells may be activated by several non-immunological stimuli including neurotransmitters, neuropeptides [9], and nerve stimulation [10]. Recently, it has been demonstrated that IMMC from the small intestine of nonsensitized animals can be activated by physiological stimuli including the presence of peptones in the lumen [3]. The response is due to complex neuroendocrine reflexes in which sensitive afferents and the vagus nerves play an important role [4].

Activated mast cells release large quantities of both preformed and newly generated, biologically active molecules. Among them, rat mast cell protease II (RMCP II) is an abundant specific neutral protease of rat mucosal mast cells that can be measured and serve as a useful marker of mast cell activation [11,12].

* Corresponding author. Unitat de Fisiologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain. Tel.: +34-93-5811848; fax: +34-93-5812006.

E-mail address: patri.vergara@uab.es (P. Vergara).

Previous studies on the distribution of mast cells in the gut of nematode-infected animals have focused on mast cells in the mucosa and lamina propria. Such studies have demonstrated an increase in mast cell numbers in the mucosa between days 10 and 14 after infection, suggesting that systemic factors influence the proliferation of IMMC in the sensitized intestine [13,14].

Somatostatin (SS) is present throughout the gastroenteropancreatic system. It is not only released from peripheral nerve endings of intrinsic and extrinsic neurons in the submucosal and muscular layers, but also synthesized in specialized neuroendocrine cells in the mucosa [15,16]. An antagonist effect of SS on the release of several neuropeptides has been described [17]. Specific receptors for neurotransmitters have been identified in many immune cells [18]. However, there is some controversy regarding the effect of SS during inflammation. Heiman and Crews [19] described SS as a proinflammatory agent that stimulated the release of arachidonic acid-derived mediators from mast cells. Conversely, SS has been described as immunosuppressive and anti-inflammatory [20,21]. Furthermore, SS and its analogue octreotide have been used as potential treatments for inflammation in several body systems [22,23]. This indicates either different actions in different immune cells or different responses of different mast cell population to somatostatin.

We previously demonstrated that degranulation of IMMC in the rat can be induced by perfusing OVH intraduodenally [4]. This model has proved useful in the study of IMMC neuroendocrine regulation [2,4].

The objectives of our study were as follows: (1) to evaluate if SS could contribute to reduce IMMC secretion (i) under nonstimulated conditions, (ii) after mast cell stimulation with a peptone, and (iii) during mast cell hyperplasia; (2) to demonstrate the existence of surface receptors for SS in IMMC.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All experimental protocols were carried out under the supervision and regulations of the ethical committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. In this study, male Sprague–Dawley rats (Iffa-Credo, France), 8–10 weeks old and weighing 300–350 g, were used. Animals had free access to water and a standard pellet diet containing (percent total weight) 17.6% protein, 43.3% starch, and 2.5% fat (A-04 Panlab, Barcelona, Spain). This diet does not contain any trace of ovalbumin or any other egg derivative. Rats were specific pathogen-free when purchased, and from reception to their use in a protocol (between 7 and 21 days), they were kept in clean standard conditions. The absence of intestinal parasites was systematically checked. They were maintained in an environmentally controlled room (temperature, 20–

21 °C; humidity, 60%; photoperiod, 12-h light/dark) in groups of three to four animals. The night before the experiment, food was removed and each animal caged individually.

2.2. *Trichinella* infection

Rats were infected administering 1 ml of 0.9% saline solution containing 7.500 *T. spiralis* larvae by gavage. The larvae were obtained from CD1 mice infected for 30–90 days before as described by Castro and Fairbairn [24].

2.3. Animal preparation

Experiments were performed in healthy rats as well as in infected rats after 12–14 days post infection (PI). Animals were fasted for 16–18 h before experiments. Rats were anaesthetized by inhalation of halothane to allow cannulation with a polyethylene tubing of the right jugular vein. Stage III anesthesia was maintained with Pentothal Sodium bolus infusions in the jugular vein as required. Body temperature was maintained at 37 °C by placing the rat on a heating pad. A tracheotomy was performed in order to avoid respiratory problems due to the anesthesia. The intestine was exposed through an abdominal midline incision, and a polyvinyl tube was inserted in the duodenal lumen by an incision in the stomach wall and passed through the pylorus. Another plastic tube was inserted at the end of the duodenum next to Treitz ligament, to allow drainage and perfusate collection. The total length of the duodenum exposed to perfusion was 7–8 cm. After surgery, the abdomen was covered with gauze soaked in liquid Vaseline to avoid tissue dryness and loss of heat. Animals were killed at the end of the experiment with an overdose of anaesthetic. Duodenum was continuously perfused with phosphate-buffered saline (PBS) at a speed of 12 ml/h and the perfusate collected at 15-min intervals for RMCP II evaluation. The methodology as well as the assessment of RMCP II values was validated in previous studies [3,4].

2.4. Measurement of rat mast cell protease II (RMCP II)

Perfusate samples for RMCP II were frozen and stored at –80 °C until assayed. RMCP II concentration in the duodenal perfusate was measured by ELISA. A monoclonal antibody against RMCP II raised in mice was diluted to a concentration of 2 µg/ml in a 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6). Coated plates were incubated with the antibody at 4 °C for 21–24 h before use. A 30-min incubation with 4% (w/v) BSA at 37 °C was done before loading standard and unknown samples to avoid unspecific reaction. The sample incubation was at 37 °C for 30 min. A sheep antiRMCP II antibody and a horseradish peroxidase conjugate were added afterwards and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were developed using *o*-phenylenediamine as substrate and read at 450 nm after reaction was stopped with 0.25 M sulphuric acid solution. RMCP II concentration was quantified against RMCP II

standard curve. All these products were obtained from Moredun Animal Health (Edinburgh, UK).

2.5. Substances

Albumin chicken egg hydrolysate (OVH) was dissolved in phosphate-buffered saline solution (PBS) (5% w/v). Somatostatin (SS) was diluted in saline solution for intravenous infusion. Capsaicin was dissolved in 5% DMSO and 5% Tween 80, and then diluted in PBS. All these products were purchased from Sigma (St. Louis, MO).

2.6. Experimental protocols

In all these experiments, mast cell activation was measured through RMCP II concentration analysis in the perfusate. After an equilibration period of 30 min, intestinal perfusate was collected in ice-chilled tubes until the end of the experiment. The volumes collected were carefully measured. However, no significant changes in volume due to experimental protocols were observed. In all experiments, samples from the first 45 min were used to evaluate basal RMCP II concentration. SS was intravenously infused for 45 min into the jugular vein at a rate of 1 ml/h. OVH was intraduodenally perfused for 45 min. If both substances (SS and OVH) had to be given, the procedure was as follows: first, OVH alone for 45 min followed by OVH and SS for 45 min. This protocol was also used in a reverse way: first, SS for 45 min followed by SS and OVH for 45 min. Samples were collected for 45 min after stopping the treatment to evaluate recovery of the response. The rats were then killed. In a previous study [4], we had already demonstrated that in these experimental conditions, RMCP II concentration remains stable for 4 h.

2.7. Experimental groups and rationale of the experiments

- (1) Effect of somatostatin in nonstimulated conditions. SS (3×10^{-9} mol/kg/h) was intravenously infused and RMCP II concentration compared to basal levels previous to SS infusion ($n=6$). Before selecting this SS dose, the effect of SS at 3×10^{-11} mol/kg/h was evaluated. As a result of the absence of any valuable change in RMCP II concentration at this low dose (data not shown), we continued our experiments with the dose of 3×10^{-9} mol/kg/h.
- (2) OVH stimulation. Three groups of animals were used: (a) a control group where only OVH was perfused intraduodenally ($n=9$); (b) a group where SS was infused during OVH stimulation ($n=5$); and (c) a group ($n=7$) where the protocol was reversed, SS infusion started previously to OVH perfusion.
- (3) Effect of capsaicin on SS response. In two groups ($n=4$ each), animals were treated with the selective neurotoxin capsaicin. Capsaicin (600 mol/l) was perfused intraduodenally for 1 h. Following this, PBS perfusion con-

tinued for 45 min, and then SS was infused. In one group, duodenal perfusate was changed to OVH perfusion.

- (4) SS effect during mucosal mast cell hyperplasia. Mastocytosis was induced by oral *T. spiralis* infection. Four groups of animals were established: (a) control infected group ($n=4$) where saline was perfused continuously (this group was necessary to establish stability of RMCP II levels); (b) control infected group where OVH was infused ($n=4$); (c) infected animals treated with capsaicin and OVH perfusion ($n=4$); and (d) infected animals treated with somatostatin and OVH perfusion ($n=7$).

2.8. Statistics

All data are expressed as mean \pm S.E. of ng/ml of RMCP II. Statistical analysis for significant differences was performed according to *t*-test for paired or unpaired data, ordinary or repeated measures ANOVA, followed by a post hoc Bonferroni test as appropriate.

2.9. Tissue collection for Fluo-peptide-receptor-binding and for immunofluorescence

Rats, fasted overnight (18 h) but allowed ad libitum access to water, were killed by decapitation and bled. The duodenum was then removed and small (<1 cm) samples were then embedded in Tissue-Tek optimum cutting temperature (OCT) 4583 compound (Miles, Diagnostics Division, Elkhart, IN) and quick-frozen in isopentane, cooled in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until freeze sectioning.

2.10. Fluo-peptide-receptor-binding

Fresh frozen sections (20 μ m) of the duodenum samples were preincubated in isotonic buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1% bovine serum albumin, and 1 mg/ml bacitracin) containing peptidase inhibitors (800 μ M 1,10-phenanthroline, 8 mM leupeptin, and 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, all purchased from Sigma) at room temperature for 10 min, followed by incubation with 40 nM Fluo-somatostatin (SS labeled with the fluorophore fluorescein) (NEN, Boston, MA) in preincubation buffer at room temperature for 2 h. Direct exposure to light during incubation period was avoided. Nonspecific binding was assessed by including a 100-fold excess of unlabeled somatostatin in parallel incubations. After incubation, sections were rapidly washed 4×60 s in rinsing buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, 10 mM MgCl₂) at 4 °C and fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min.

2.11. Mucosal mast cell identification

Fixed sections obtained from Fluo-somatostatin-receptor-binding were incubated with 3% normal goat serum (NGS)

in Tris-buffered saline (TBS) for 30 min, washed 2×5 min in TBS, incubated in TBS with 1% NGS and 1% Triton-X100 for 15 min, and washed in TBS for 10 min. The sections were then incubated with monoclonal mouse antiRMCP II antibody (Moreduin) diluted 1:100 in TBS with 0.5% NGS and 0.05% Triton-X100 overnight at 4 °C. Negative controls were obtained by the primary antibody omission from the staining protocol. Next day, after washing 2×10 min in TBS, the sections were finally incubated with goat antimouse IgG (Fc specific) TRITC conjugate (Sigma) diluted 1:64 in TBS for 45 min at room temperature. After washing in TBS, the sections were mounted on glycerol vinyl alcohol aqueous mounting solution (Zymed, CA). As immunoreactivity was not completely abolished in negative controls, two additional methods were tested in order to ensure that the cells that we were examining were mucosal mast cells. Firstly, polyclonal biotinylated sheep antisera to RMCP II diluted 1:80 in PBS was used instead of the sandwich technique with the primary and secondary antibodies. Negative controls were obtained by incubation with biotinylated sheep IgG diluted 1:40 in PBS. After washing 2×10 min in PBS, the sections were then incubated with avidin–rodamine diluted 1:500 for 1 h at room temperature. Secondly, sections were incubated with tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II) (Rubipy), which induces a specific orange fluorescence in mast cell granules [25]. In this case, fixed sections were incubated with Rubipy 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 5 min at room temperature. After washing 2×10 min in TBS, the sections were mounted as previously described. Fluorescence was visualized with a Leica TCS 4D confocal microscope equipped with argon–krypton laser and appropriate optics and filter modules for FITC, TRITC, and rodamine detection.

3. Results

3.1. Effect of somatostatin on basal RMCP II concentration (nonstimulated conditions)

Somatostatin infused intravenously (3×10^{-9} mol/kg/h, $n=6$) significantly reduced basal RMCP II concentration from 2.68 ± 1.05 to 0.52 ± 0.09 ng/ml (Fig. 1).

The somatostatin effect was immediate and continued even after SS infusion was stopped. RMCP II values had not returned to basal levels when the experiment was stopped.

3.2. Effect of SS on OVH stimulated mast cell response

Duodenal perfusion of ovalbumin hydrolysate (OVH) ($n=9$) significantly increased RMCP II concentration when compared to RMCP II levels during phosphate-buffered saline infusion (Fig. 2a). In basal conditions, RMCP II concentration was 1.63 ± 0.41 ng/ml and after an hour of ovalbumin perfusion increased to 5.06 ± 1.75 ng/ml (between two- and threefold increase compared to basal

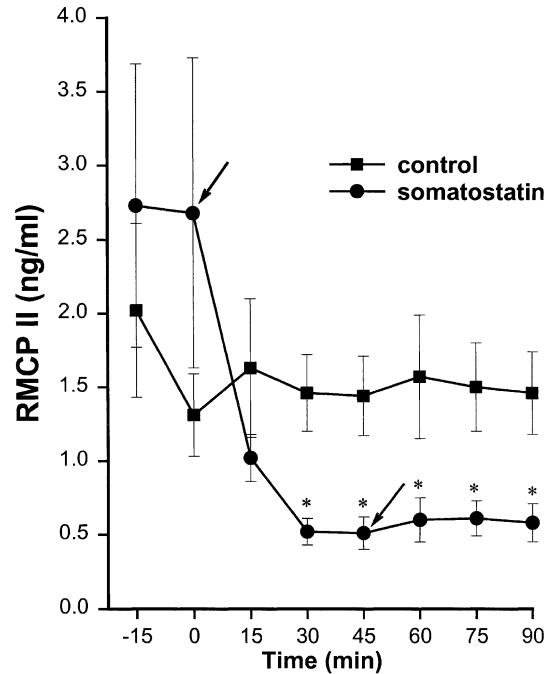


Fig. 1. RMCP II concentration (ng/ml) in the duodenal perfusate during phosphate-buffered saline (PBS) duodenal perfusion. Arrows indicate the start and the end of somatostatin (SS) (3×10^{-9} mol/kg/h) intravenous infusion ($n=6$). * $P<0.05$ comparison vs. basal RMCP II concentration before SS infusion. The control group is showed to discard a time effect on RMCP II concentration.

level). Then SS i.v. infusion, simultaneous to OVH, decreased RMCP II values back to basal levels ($n=5$; Fig. 2a). In order to clarify whether SS was acting specifically on OVH response or just modifying basal mast cell activity, SS was given previous to OVH in another group of animals. In these conditions, when OVH was given after SS, OVH increased RMCP II levels from 0.93 ± 0.36 (SS alone) to 2.85 ± 0.69 ng/ml (SS+OVH) ($n=7$; Fig. 2b). Although RMCP II concentration was not different from basal RMCP II concentration in the control group, the increase induced by OVH was also two to three times greater.

3.3. Effect of somatostatin in capsaicin-treated animals

Capsaicin induced a similar response to the one observed with SS: it decreased RMCP II basal levels and significantly decreased OVH effect on RMCP II concentration. The infusion of somatostatin in capsaicin-treated animals further reduced RMCP II concentration, both in nonstimulated conditions as well as during OVH perfusion ($n=4$; Fig. 3).

3.4. Effect of somatostatin during mast cell hyperplasia

In *T. spiralis*-infected rats, basal RMCP II concentration (32.78 ± 17.66 ng/ml) was significantly higher than in healthy rats. However, there was a wide variation between animals. In consequence, some variations can be seen

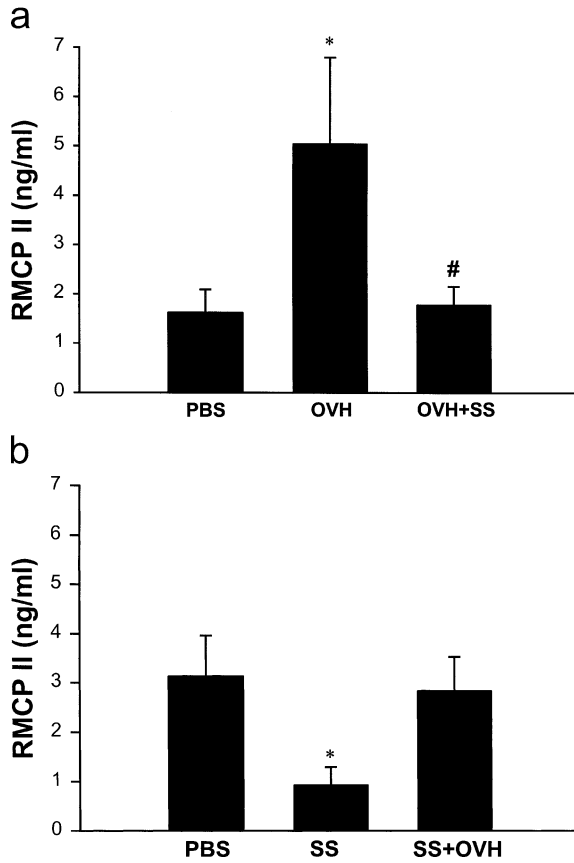


Fig. 2. Bar diagram showing the effect of somatostatin (SS) infusion on RMCP II concentration (ng/ml) during mast cell stimulation by OVH. (a) SS infusion started 45 min after ovalbumin hydrolysate (OVH) stimulation of RMCP II release ($n=5$); $*P<0.05$ vs. PBS; $\#P<0.05$ vs. OVH. (b) OVH perfusion started 45 min after SS diminution of RMCP II release ($n=7$); $*P<0.05$ vs. PBS.

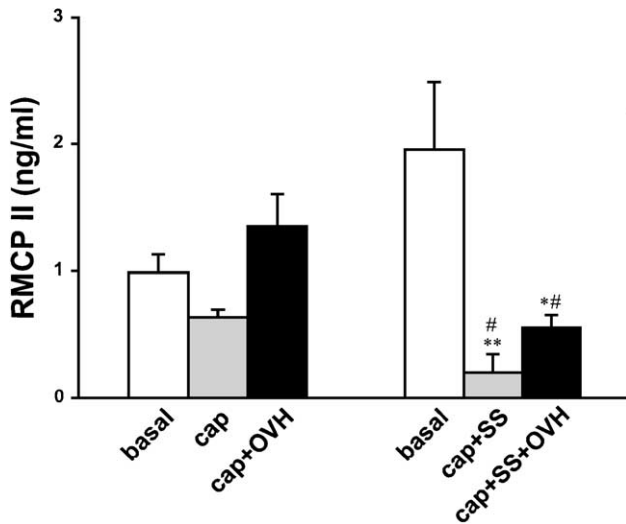


Fig. 3. Bar diagram comparing the effect of intraduodenal capsaicin (cap) treatment on RMCP II concentration (ng/ml) with ($n=4$) or without ($n=4$) simultaneous somatostatin (cap+SS) infusion. Ovalbumin hydrolysate (OVH) was perfused for 1 h and 45 min after capsaicin treatment. Left panel: capsaicin-treated group. Right panel: capsaicin+SS-treated group. $\#P<0.05$ vs. capsaicin-treated group; $*P<0.05$ or $**P<0.01$ vs. basal.

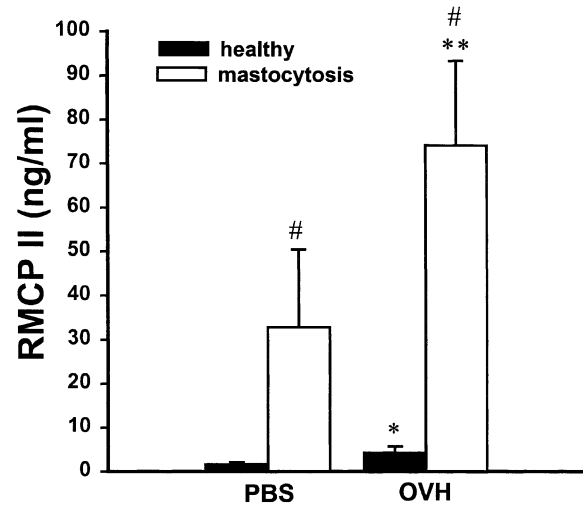


Fig. 4. Bar diagram showing the differences on RMCP II concentration (ng/ml) in the duodenal perfusate between healthy controls ($n=9$) and animals with mucosal mast cell hyperplasia (*T. spiralis*) ($n=4$), both during phosphate-buffered saline (PBS) or ovalbumin hydrolysate (OVH) perfusion. $*P<0.05$ or $**P<0.01$ vs. PBS in the same group; $\#P<0.01$ vs. the same condition in healthy control.

between mean basal RMCP II concentration in the different experiments. To avoid misinterpretation of the results, we took the following precautions: (a) a control group was used where only PBS was perfused ($n=4$) to evaluate the stability of RMCP II concentration in relation to time (we did not observe any significant variation in the RMCP II concentration during a collecting period of 3 h (data not shown)); (b) only paired data analysis was performed comparing data from each individual (before and after treatment) to avoid individual variation interference. Accordingly, OVH perfusion significantly increased RMCP

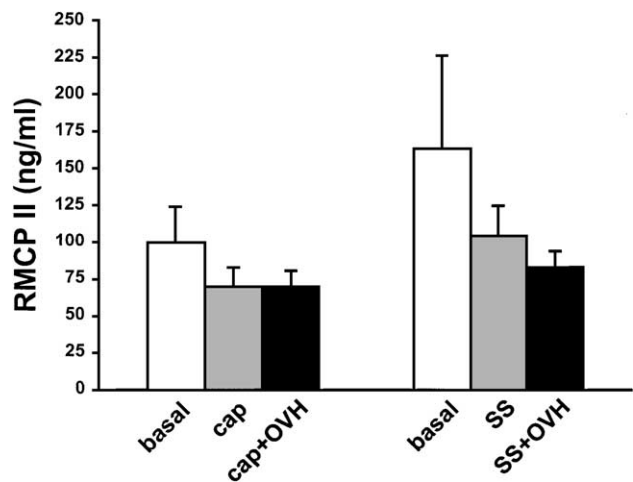


Fig. 5. RMCP II concentration (ng/ml) in the duodenal perfusate after capsaicin intraduodenal treatment (cap; $n=4$) or after somatostatin infusion (SS; $n=7$) in animals with mucosal mast cell hyperplasia (*T. spiralis*). Ovalbumin hydrolysate (OVH) perfusion was performed for 1 h and 45 min after treatment. Left panel: capsaicin-treated group. Right panel: SS-treated group. Both treatments completely block response to OVH.

II concentration in the perfusate to 74.25 ± 19.18 ng/ml ($n=4$; Fig. 4).

In the infected rats, SS infusion caused a slight decrease in RMCP II concentration from 163.45 ± 63.29 to 104.78 ± 20.53 ng/ml without reaching statistical significance. However, SS completely blocked the effect of OVH perfusion. In fact, a slight decrease of RMCP II concentration to 83.22 ± 11.34 ng/ml was observed ($n=7$; Fig. 5). The group of animals treated with capsaicin showed a similar response: capsaicin did not modify RMCP II concentration but completely blocked the response to OVH ($n=4$; Fig. 5).

3.5. Fluo-somatostatin-receptor-binding and immunofluorescence

To demonstrate the presence of SS receptors in mast cell surface, fresh frozen duodenum sections were incubated with Fluo-somatostatin. As shown in Fig. 6 (Fluo-SS), cells showing green fluorescence are distributed scattered along the length of the epithelium. In contrast, when sections were incubated with a 100-fold excess of unlabeled SS, no fluorescence was observed (Fig. 6, Fluo-SS+SS). To better determine if the cells that showed SS receptors were mast cells, immunofluorescence technique for the specific RMCP II was performed (Fig. 6, RMCP II). Confocal images showed (Fig. 6, Fluo-SS+RMCP II) that somatostatin labeling and RMCP II staining are coincident. RMCP II immunoreactivity significantly faded in the negative controls but it was not completely absent (Fig. 6, RMCP II-ve). This indicated the need to perform mast cell identification using two other techniques. Both techniques—the staining with the biotinylated antibody (to avoid the use of a secondary antibody) (Fig. 6, RMCP II bio) and the incubation with Rubipy (Fig. 6, Rubipy)—corroborated that somatostatin receptors are present in mucosal mast cells (Fig. 6, Fluo-SS+RMCP II bio and Fluo-SS+Rubipy). We did not observe staining in any other intestinal structure.

4. Discussion

This study demonstrates that somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation. We propose that there is a direct action of the peptide on mast cells since we demonstrate that somatostatin selectively binds to mast cells. This modulatory effect is also observed during mast cell hyperplasia as a consequence of *T. spiralis* infection. In consequence, we hypothesize that somatostatin could be involved in the physiological control of mast cells and has a modulatory effect during the inflammatory response of the intestine.

Previous studies have shown controversial effects of somatostatin on inflammation [19,21]. One study demonstrated that SS could be used as a proinflammatory agent that stimulates release of inflammation mediators by peritoneal mast cells [19]. In contrast, our study demonstrates

that SS has a clear inhibitory effect on intestinal mucosal mast cell degranulation. This contradiction is probably due to a different response to somatostatin by different types of mast cells as demonstrated in two previous studies: connective and mucosal mast cell-type showed differentiated responses to neuromodulators [9], and SS decreased intestinal inflammation in mice infected with *T. spiralis* [20].

Somatostatin in the GI tract is mainly located in the D cells scattered along the GI mucosa but specially concentrated at the gastric and duodenal mucosa [16]. In addition, somatostatin positive neurons are located in both the myenteric and submucous plexus of the enteric nervous system [26]. In consequence, somatostatin action on IMMC could be either (i) directly on mast cells, (ii) through other immune cells also present in the mucosa, or (iii) through neurons responding to somatostatin.

Supporting the hypothesis of a direct effect are our results with confocal images showing SS receptors in mast cells. Because of some technical problems due to an unspecific reaction of the secondary antibody to mast cells (probably due to the IgE receptor present in these cells), we had to use two additional techniques (polyclonal biotinylated antiRMCP II–avidin–rodamine fluorophore and the specific granule staining with Rubipy), which did not require the use of the secondary antibody. The results obtained revealed that the cells that showed SS receptors were mucosal mast cells. Furthermore, the distribution of these immunoreactive cells correlated with the distribution of mucosal mast cells described in a previous study [27].

SS receptors have been previously visualized on enterocytes, other immune cell types and enteric neurons both by in situ hybridization and immunocytochemistry [28–30]. In contrast, we were unable to detect any staining in structures other than IMMCs. The reason for this controversy is probably a lower sensitivity of our technique, which is based on the competitive union to somatostatin receptors, requiring a higher concentration of receptors to produce a positive staining. However, the clear fade-out of the labeling by incubation of Fluo-somatostatin with a 100-fold excess of unlabeled somatostatin corroborates specificity of the staining. Therefore, our results do not discard that SS could exert some effects on mast cells by indirectly acting on either immune or nerve structures. However, the specific intensive staining of mast cells we observed indicates that a direct action is more likely.

We had previously demonstrated that in physiological conditions, IMMCs are driven by a nervous reflex involving vagal afferents and adrenergic innervation. In addition, the intraluminal presence of OVH is able to further stimulate this reflex [3,4]. Several studies have also suggested a response of mast cells through vagus nerves [2,31,32]. In consequence, the rationale of the capsaicin experiments was to detect an interaction between somatostatin and afferent innervation. We had previously demonstrated that capsaicin had a similar effect to vagotomy on IMMCs; it reduced basal levels of RMCP II and reduced, but did not abolish, mast cell response

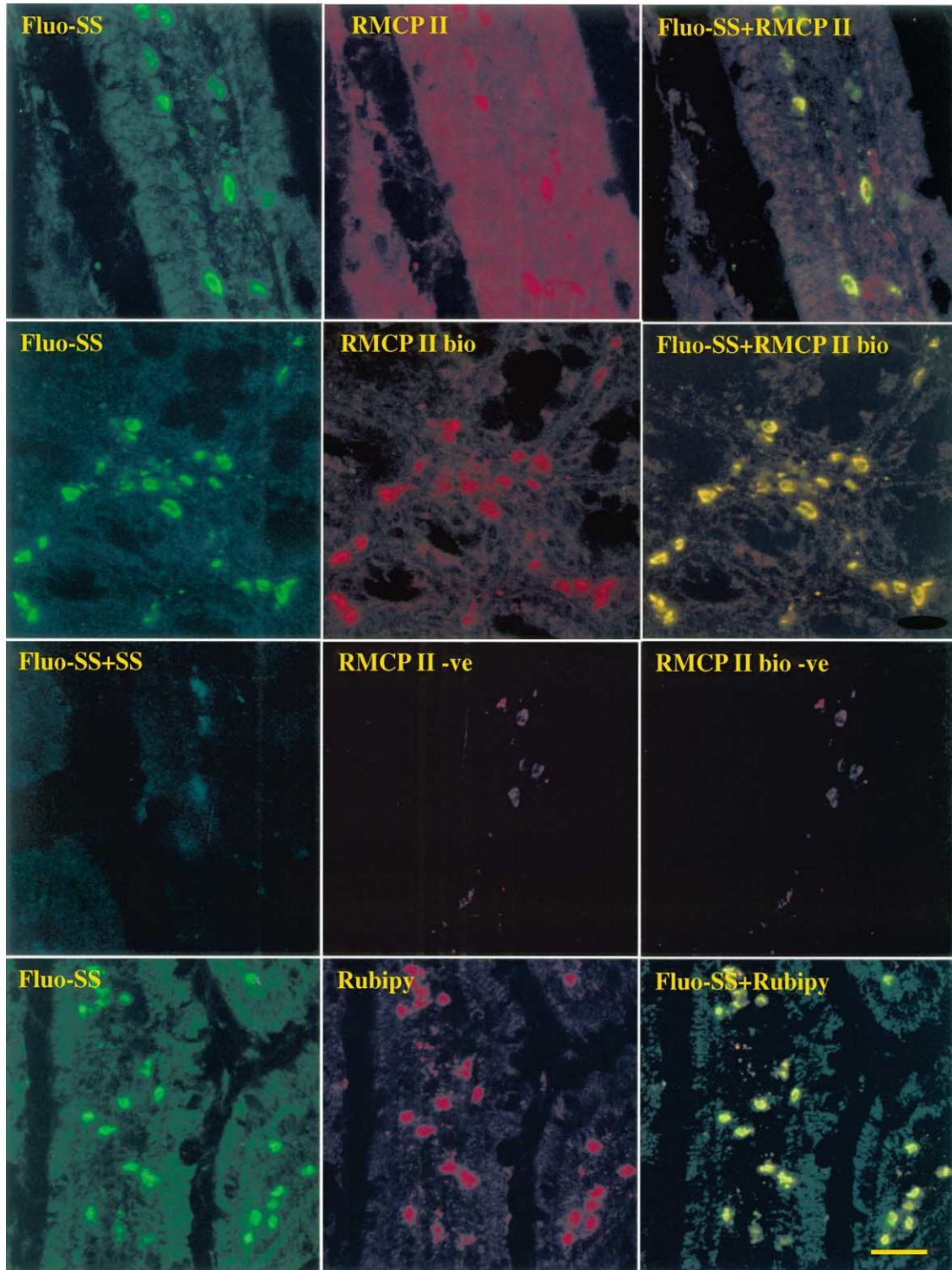


Fig. 6. Confocal microscope images of duodenum sections (20 μm) from healthy rats. Fresh frozen sections were incubated with Fluo-somatostatin (Fluo-SS; 40 nM). Nonspecific binding was assessed by including a 100-fold excess of unlabeled somatostatin in parallel incubations (Fluo-SS+SS); in this case, no fluorescence was observed. After being incubated with Fluo-SS, fixed sections were processed for the specific RMCP II immunofluorescence with both a monoclonal mouse antibody (RMCP II) and polyclonal biotinylated antisera (RMCP II bio) to identify the reactive cells as mast cells. Negative controls were obtained by the primary antibody omission (RMCP II-ve) and by incubation with biotinylated IgG (RMCP II bio-ve), respectively. Confocal images (Fluo-SS+RMCP II, Fluo-SS+RMCP II bio) show that SS labeling and RMCP II staining are coincident in both cases. Another set of fixed sections, after being incubated with Fluo-SS, was incubated with Rubipy. The confocal image (Fluo-SS+Rubipy) corroborates that SS receptors are present in mucosal mast cells. Images were captured by using different filters on a Leica TCS 4D confocal microscope with argon–krypton laser. Scale bar, 30 μm .

to OVH [4]. The results from the present study show that somatostatin and capsaicin have similar effects, indicating the involvement of afferent pathways in SS response. However, the fact that SS in capsaicin-treated animals further decreased RMCP II supports the hypothesis of a direct action of SS on intestinal mucosal mast cells.

A recent study has demonstrated that vagal afferents can be inhibited by somatostatin via ss_2 receptors [33]. However, authors did not rule out the possibility that SS effect on vagal afferents could be mediated by somatostatin acting in other cells that are in close proximity to afferent nerve endings. Moreover, both the response of vagal afferents to mast cell mediators such as 5-HT and the close proximity between vagal afferents and mast cells have been previously demonstrated [34,35]. The fact that mast cell hyperplasia as well as afferent vagal hypersensitivity could be the cause of abnormal visceral sensitivity suggests somatostatin analogues as a useful treatment for these disturbances as already suggested [33].

The high RMCP II concentration observed in our *T. spiralis*-infected rats is consistent with previous studies that revealed that the evolution of the number and distribution of IMMCs are dependent on the phase of parasitic infection studied [6,14,36]. By days 10–14 after *T. spiralis* infection, we observed a clear increase in the number of mast cells (data not shown). For this reason, we chose 12–14 days PI for our experiments. Animals with mast cell hyperplasia had higher RMCP II concentration than healthy animals. Furthermore, OVH induced a significant increase in RMCP II concentration in the perfusate. This response, bigger in magnitude than in healthy animals, represented, as in healthy animals, a two- to threefold increase in relation to RMCP II basal concentration. These observations provide support to explain why inflammatory processes modify responses mediated by mast cells and how inflammation can aggravate pathologies such as food allergy.

Afferent nerve remodeling has been observed after mast cell hyperplasia in parasite models [37]. In consequence, the increased RMCP II concentration in these animals is in accordance with the increased number of mast cells, but could also be due to an increased sensitivity of the vagal reflexes. Both somatostatin and capsaicin induced similar effects, both slightly reduced RMCP II concentration but more interestingly, both completely blocked OVH response. This suggests that somatostatin or somatostatin analogues could be used to diminish mucosal mast cell activity and prevent anomalous responses of mast cells in either food allergy, intestinal inflammation, or during visceral hypersensitivity. However, we have to be careful when concluding that somatostatin could be used as a general mast cell stabilizer, since other studies with connective type mast cells demonstrate that somatostatin can activate this type of mast cell [38,39]. Our study also corroborates that mast cell differentiation (mucosal and connective types) is important in determining responses to several stimuli as previously suggested [9].

In summary, both in health and during mast cell hyperplasia, SS reduces mucosal mast cell activity and decreases protease secretion, in both basal conditions as well as after mast cell stimulation. This action raises the possibility that SS and its analogues could be used in the treatment of inflammatory and allergic intestinal processes.

Acknowledgements

We thank M. Martí for her knowledgeable assistance with the confocal microscope, A. Acosta for his assistance with the animals, and A.C. Hudson for editorial revision of the manuscript.

This work was supported by Dirección General de Investigación en Ciencia y Tecnología, grant PM98-0171 by Comissionat per a Universitats i Recerca, Generalitat de Catalunya, grants 1999SGR 00272 and 2001SGR 00214.

We are also grateful to Universitat Autònoma de Barcelona for the financial support of Y. Saavedra.

References

- [1] Wershil BK. Role of mast cells and basophils in gastrointestinal inflammation. In: Marone G, editor. Human basophils and mast cells: clinical aspects. Chem Immunol 1995;62:187–203.
- [2] Santos J, Saperas E, Mourelle M, Antolín M, Malagelada JR. Regulation of intestinal mast cells and luminal protein release by cerebral thyrotropin-releasing hormone in rats. Gastroenterology 1996;111:1465–73.
- [3] Juanola C, Giralt M, Jiménez M, Mourelle M, Vergara P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. Am J Physiol 1998;275:G63–7.
- [4] Vergara P, Saavedra Y, Juanola C. Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. Neurogastroenterol Motil 2002;14:1–8.
- [5] Norris HT, Zamcheck N, Gottlieb LS. The presence and distribution of mast cells in the human gastrointestinal tract. Gastroenterology 1963;44:448–54.
- [6] Kim I, Im JA, Lee KJ, Ryang YS. Mucosal mast cell responses in the small intestine of rats infected with *Echistosoma hortense*. Korean J Parasitol 2000;38:139–43.
- [7] Oliver MR, Daimen TM, Kirk DR, Rioux KP, Scott RB. Colonic and jejunal motor disturbances after colonic antigen challenge of sensitized rat. Gastroenterology 1997;112:1996–2005.
- [8] Pothoulakis C, Karmeli F, Kelly CP, Eliakim R, Joshi MA, O'Keane CJ, et al. Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. Gastroenterology 1993;105:701–7.
- [9] Shanahan F, Denburg JA, Fox J, Bienenstock J, Befus D. Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. J Immunol 1985;135:1331–7.
- [10] MacQueen G, Marshall J, Perdue MH, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosa mast cells to secrete rat mast cell protease II. Science 1989;243:83–5.
- [11] Miller HRP, Woodbury RG, Huntley JF, Newlands GFJ. Systemic release of mucosal mast cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. Immunology 1983;49:471–9.
- [12] Tsai M, Shih L, Newlands GFJ, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, et al. The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo: analysis by anatomical distribution, histochemistry and protease phenotype. J Exp Med 1991;174:125–31.

- [13] Pitts RM, Mayrhofer G. Local and systemic factors regulating mucosal mast cells. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983;71:309–16.
- [14] Woodbury RG, Miller HR, Huntley JF, Newlands GF, Palliser AC, Wakelin D. Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature* 1984;312:450–2.
- [15] Payan DG, Levine JD, Goetzl EJ. Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J Immunol* 1984;132:1601–4.
- [16] Polak JM, Bloom SR. Somatostatin localization in tissues. *Scand J Gastroenterol* 1986;21:115–215.
- [17] Foreman JC, Jordan CC. Neurogenic inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 1984;5:116–9.
- [18] Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Integrative neuroimmunology of the digestive tract. *Vet Res* 1996;27:427–42.
- [19] Heiman AS, Crews FT. Hydrocortisone selectively inhibits IgE-dependent arachidonic acid release from rat peritoneal mast cells. *Prostaglandins* 1984;27:335–43.
- [20] Kataeva G, Agro A, Stanisz AM. Substance-P-mediated intestinal inflammation: inhibitory effects of CP 96,345 and SMS 201–995. *Neuroimmunomodulation* 1994;1:350–6.
- [21] Takeba Y, Suzuki N, Takeno M, Asai T, Tsuboi S, Hoshino T, et al. Modulation of synovial cell function by somatostatin in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:2128–38.
- [22] Venier A, De Simone C, Forni L, Ghirlanda G, Uccioli L, Serri F, et al. Treatment of severe psoriasis with somatostatin: four years of experience. *Arch Dermatol Res* 1998;280:S51–4 [Supplement].
- [23] Sakane T, Suzuki N. The role of somatostatin in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16:745–9.
- [24] Castro GA, Fairbairn D. Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *J Parasitol* 1969;51:51–8.
- [25] Bertolesi GE, Trigoso CI, Espada J, Stockert JC. Cytochemical application of tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II): fluorescence reaction with sulfated polyanions of mast cell granules. *J Histochem Cytochem* 1995;43:537–43.
- [26] Furness JB, Costa M, Franco R, Llewellyn-Smith JJ. Neural peptides in the intestine: distribution and possible functions. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1980;22:601–17.
- [27] Metcalfe DD. Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cell. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1984;53:563–75.
- [28] O'Dorisio MS. Neuropeptide modulation of the immune response in gut associated lymphoid tissue. *Int J Neurosci* 1988;38:189–98.
- [29] Schäfer J, Meyerhof W. sst1 mRNA is the prominent somatostatin receptor mRNA in the rat gastrointestinal tract: reverse transcription polymerase chain reaction and in situ-hybridization study. *Neuropeptides* 1999;33:457–63.
- [30] Reubi JC, Laissie JA, Waser B, Steffen DL, Hipkin RW, Schonbrunn A. Immunohistochemical detection of somatostatin sst2a receptors in the lymphatic, smooth muscular, and peripheral nervous systems of the human gastrointestinal tract: facts and artifacts. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2942–50.
- [31] Gottwald TP, Lhoták S, Stead RH. Effect of truncal vagotomy and capsaicin on mast cells and IgA-positive plasma cells in rat jejunal mucosa. *Neurogastroenterol Motil* 1997;9:25–32.
- [32] Király A, Sütö G, Guth P, Taché Y. Ketotifen prevents gastric hyperemia induced by intracisternal thyrotropin-releasing hormone at a low dose. *Eur J Pharmacol* 1997;334:241–7.
- [33] Booth CE, Kirkup AJ, Hicks GA, Humphrey PPA, Grundy D. Somatostatin sst₂ receptor-mediated inhibition of mesenteric afferent nerves of the jejunum in the anesthetized rat. *Gastroenterology* 2001;121:358–69.
- [34] Blackshaw LA, Grundy D. Effects of 5-hydroxytryptamine on discharge of vagal mucosal afferent fibres from the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J Auton Nerv Syst* 1993;45:41–50.
- [35] Williams RM, Stead RH, Berthoud H. Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation* 1997;4:266–70.
- [36] Woodbury RG, Miller HRP. Quantitative analysis of mucosal mast cell protease in the intestines of *Nippostrongylus*-infected rats. *Immunology* 1982;46:487–95.
- [37] Stead RH. Nerve remodelling during intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 1992;664:443–55.
- [38] Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 1998;139:403–13.
- [39] Wershil BK, Vergara P, Lu L. Neuropeptides alter IgE-dependent mast cell mediator release: a possible role for modulation of allergic responses by the nervous system in the gut. *Gastroenterology* 1999;116:A845.

Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells

Y. SAAVEDRA & P. VERGARA

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain

Abstract Undiagnosed food allergies have been proposed as possible causes of promoting and perpetuating irritable bowel syndrome. Our aim was to find out if sensitization could induce chronic functional motor disturbances in the intestine and the mechanisms implicated. Rats were sensitized to ovalbumin (OVA) following three hypersensitivity induction protocols, two parenteral and one oral. Rat mast cell protease II (RMCP II) release in response to OVA challenge and immunoglobulin E (IgE) concentration were measured in serum. At least 1 week after challenge, small intestinal motility was evaluated using strain gauges. Intestinal tissue samples from orally sensitized rats were checked for *in vitro* stimulation with OVA. Mucosal mast cells were counted from duodenum sections. All sensitized rats showed intestinal hypermotility. Only rats sensitized by parenteral procedure showed an increase in RMCP II after OVA challenge in serum. IgEs increased only in the *Bordetella pertussis* sensitized group. Small intestine sections from orally sensitized rats released more RMCP II than sections from control rats. All sensitized rats showed an increase in the number of mucosal mast cells in duodenum. In conclusion, hypersensitivity to food proteins induces chronic motor alteration that persists long after antigen challenge and an excited/activated state of sensitized mucosal mast cells.

Keywords hypersensitivity, intestinal motility, irritable bowel syndrome, mucosal mast cells, rat mast cell protease II.

Address for correspondence

Patri Vergara, PhD, Unitat de Fisiologia, Edifici V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.
Tel: 34-93-5811848; fax: 34-93-5812006;
e-mail: patri.vergara@uab.es

Received: 1 April 2004

Accepted for publication: 3 September 2004

INTRODUCTION

The underlying cause of the physiopathological symptoms in irritable bowel syndrome (IBS) remains unclear. In recent years, a number of factors have been suggested as having a role in promoting and perpetuating IBS: previous episodes of infectious enteritis, genetic factors, changes in bacterial microflora and undiagnosed food allergies or food intolerance.^{1,2}

Allergic reactions are known to evoke inflammatory cell infiltration and activation at various mucosal sites, including the gastrointestinal tract.^{3,4} Mucosal mast cells lie in close proximity to enteric nerves⁵ and release a wide array of inflammatory mediators that are capable of affecting enteric nerve function^{6–8} and muscle contractility.²

Animal models of intestinal allergy, using food proteins or enteric parasites as sensitizing agents, demonstrate alterations of gut function, including changes in intestinal ion transport, permeability and motility.^{2,9}

However, because of the fact that allergy is considered a systemic response rather than a localized response, most animal models of food allergy research have been conducted using parenteral sensitization (with the use of adjuvants) and enteral challenges.^{10–12} Sensitization to food proteins administered through the diet or by gavage has only been used in high-immunoglobulin E (IgE) responders such as the Brown Norway rat.^{13,14}

Intestinal motility alterations have been associated with mucosal mast cell degranulation after antigen challenge in sensitized rats.^{9,15–17} However, there are no long-term studies evaluating chronic changes induced by food sensitization.

The aim of our study was to find out if sensitization could induce chronic functional motor changes and to assess the involvement of mucosal mast cells. Both parenteral and oral hypersensitivity induction protocols were used, and the motor activity of the intestine

including intestinal mucosal mast cell number and activity were evaluated. Parts of this study were communicated previously in abstract form.¹⁸

MATERIALS AND METHODS

Animals

In this study, 59 male Sprague–Dawley rats (Charles River, Les Oucius, France) were used. Animals had free access to water and a standard pellet diet that did not contain any trace of ovalbumin (OVA) or any other egg derivative. Rats were pathogen free when purchased and they were kept in clean conventional conditions (between 1 and 10 weeks). They were maintained in an environmentally controlled room in groups of three to four animals. The night before the experiment, food was removed and each animal was caged individually. Control animals were handled the same way as treated animals. Rats were purchased at different ages according to the duration of sensitization protocol. In consequence, all animals had similar ages and weight at the time of the experiment.

Substances

Ovalbumin Grade V (Sigma, St Louis, MO, USA) was diluted in sterile saline to induce sensitization and in non-sterile saline for challenge. CCK-8, sulphated form (Peptide Institute, Osaka, Japan), was diluted in 1% sodium bicarbonate to 10^{-4} mol L⁻¹ and sterile saline to work concentration. Atropine (Merck, Darmstadt, Germany) and *N*_ω-nitro-L-arginine (L-NNA) (Sigma) were diluted in sterile saline. Compound 48/80 (Sigma) was diluted in Krebs buffer. Bovine serum albumin (BSA) Grade V (Sigma) was diluted in sterile saline.

Hypersensitivity to ovalbumin: induction protocols

Several protocols for inducing sensitivity to OVA were used. All of them have been previously reported by several authors.^{10,18}

Bordetella pertussis protocol Rats ($n = 9$) 8–10 weeks old were sensitized as described previously¹⁰ with 1 mg of OVA and 25 mg of Al(OH)₃ in 1 mL of sterile saline injected subcutaneously (s.c) and 0.5 mL of *B. pertussis* vaccine (2×10^{10} organisms; Berna Institute, Madrid, Spain) injected intraperitoneally (i.p).

11-day protocol Rats ($n = 9$) 8–10 weeks old were intraperitoneally (i. p) sensitized as described previously¹⁴

with 0.5 mL of 0.2 mg mL⁻¹ OVA solution in sterile saline injected on days 0, 2, 4, 7, 9 and 11. To potentiate the immune response, 0.2 mL of 25 mg mL⁻¹ Al(OH)₃ adjuvant suspension in sterile saline mixed with 0.5 mL of OVA was injected on day 0.

Oral protocol Following Knippels,¹⁹ 6-week-old rats ($n = 12$) were orally exposed to OVA by gavage (1 mg OVA mL⁻¹ saline solution, 1 mL/animal). Gavage dosing was performed daily during 6 weeks.

Controls

A group of rats ($n = 11$) not exposed to OVA was used as control (unsensitized control group). Three sham groups, *B. pertussis* sham ($n = 6$), 11-day sham ($n = 6$) and oral sham ($n = 6$), in which induction protocols were conducted as described before but replacing OVA by saline solution were used as control groups of the *B. pertussis*, 11-day and orally sensitized groups respectively.

Challenges and blood samples

After the sensitization period, animals were submitted to either saline (0.5 mL of saline solution 0.9% NaCl) or OVA (0.5 mL of 0.2 g mL⁻¹ OVA solution) challenge by gavage. Unsensitized control and sham animals were also challenged as described for sensitized animals. As a control of the specific response to OVA, two rats sensitized after the 11-day induction protocol were submitted to BSA challenge (0.5 mL of 0.2 g mL⁻¹ BSA solution). Following previous studies,^{7,20} challenge in the *B. pertussis* sensitized group was performed 14 days after hypersensitivity induction, 28 days after the first injection in the 11-day sensitized group and 7 days after the end of the induction period in the orally sensitized group. The night before the challenge, food was removed and the animal was caged individually. Blood samples from the saphenous vein were taken before (T_0) and 3 h after (T_f) challenge. Animals did not have access to food until the two blood samples had been taken. Serum obtained was kept at -30 °C until Rat mast cell protease II analysis was performed.

Motility experiments: animal preparation

A week after challenge each animal was fasted for 16–18 h before experiments. Anaesthesia was induced by inhalation of halothane to allow cannulation with polyethylene tubing of the right jugular vein. Stage III of anaesthesia was maintained with thiopental

sodium bolus infusion in the jugular vein as required. Body temperature was maintained at 37 °C by placing the rat on a heating pad. Rats were tracheotomized to facilitate spontaneous breathing. The abdomen was opened through a midline incision and the intestine was exposed. Three strain gauges (3 × 5 mm; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) were placed to record circular muscle activity and sutured to the intestinal wall of duodenum (at 2 cm from the pylorus), proximal jejunum (at 2 cm from Treitz's ligament), and ileum (10 cm from cecum). Strain gauges were connected to high-gain amplifiers (Lectromed MTP8, Lectromed, New Jersey, UK) and amplified signals were sent to a recording unit (PowerLab/800; ADI Instruments, Sydney, Australia). Two electrode holders, with two platinum electrodes each were inserted into the intestinal lumen through a small incision of the intestinal wall to induce ascending excitation of the peristaltic reflex by stimulating of intestinal mucosa, as previously described.²¹ Electrode holders were placed 1 cm distally to the strain gauge of the duodenum and the ileum. Animals were killed at the end of the experiment with an overdose of anaesthesia. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Experimental protocol for motor response evaluation

Before starting the protocol, a sample of blood from the jugular vein was taken for IgE analysis. After an equilibration period of 30 min, spontaneous motor activity was recorded during 60 min. Afterwards, CCK-8 (3×10^{-9} mol kg⁻¹ min⁻¹) was intravenously infused. After at least 1 h to allow a return to basal conditions, mucosal electrical stimulation of the duodenum and ileum to elicit ascending excitation was applied at 30 V, 0.6 ms and 2, 4 and 6 Hz. An intravenous bolus of L-NNA (10^{-5} mol kg⁻¹) was administered 10 min after electrical stimulation. After at least 30 min to allow motility normalization, the pattern of electrical stimulation was repeated. Afterwards, atropine (0.3 mg kg⁻¹) was also intravenously infused as a bolus and 10 min later the electrical stimulus was repeated. The area under the curve (AUC in mm²) was measured during the first 60 min-period of the protocol, during electrical stimulation and for the 10 min of CCK-8 infusion. Inhibitory tone was evaluated comparing the AUC taken for 10 min before L-NNA infusion with the AUC taken for 10 min starting 10 min after L-NNA infusion. Frequency expressed as contractions/minute was also measured

during spontaneous motility recording and after L-NNA infusion. This protocol has been previously validated.²²

Measurement of RMCP II

Rat mast cell protease II concentration in the serum was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a commercial kit (Moredun Animal Health, Edinburgh, UK) as previously described.^{23,24}

Measurement of total IgE

Serum samples for IgE detection were frozen and stored at -30 °C until assayed. IgE concentration in the serum was measured by ELISA using a commercial kit (Crystal Chem Inc., Chicago, IL, USA).

In vitro stimulation of small intestine sections

Unsensitized control ($n = 5$) and orally sensitized ($n = 6$) rats were killed by decapitation and the abdominal cavity was opened to remove the small intestine. Three centimetre segments were taken from the duodenum, jejunum (beginning 10 cm distal to the Treitz's ligament) and ileum and placed in Krebs buffer bubbled with a mixture of 5% CO₂ and 95% O₂ (pH 7.35 and 37 °C) containing (in mmol L⁻¹): NaCl, 115; MgCl₂, 1.2; KH₂PO₄, 2; NaHCO₃, 25; glucose, 11.1; CaCl₂, 1.25. The tissue was then opened along the mesenteric border and sectioned into pieces of 1 cm² approximately. Each piece was placed in a tube with 2 mL of oxygenated Krebs buffer. After an equilibration period of 10 min, a 200 µL sample was taken from each tube (initial sample) and the volume was replaced by Krebs buffer (control) or OVA solution (1 mg mL⁻¹) or compound 48/80 (2 mg mL⁻¹) at each small bowel segment. Three hours later, 200 µL samples were taken from the tubes (poststimulation sample) and the tissue segments were weighed and placed in 2 mL of fresh Krebs buffer, ground and submitted to three cycles of freezing/thawing in order to break mucosal mast cell membranes and release cellular contents. After 5 min centrifugation at 3220 g, 200 µL samples from supernatants were taken (pellet sample). All the samples were frozen and stored at -30 °C until assayed for RMCP II analysis by ELISA as described. Rat mast cell protease II concentrations were standardized by the weight of the respective specimen. The sum of initial, poststimulation and pellet RMCP II was considered as the total RMCP II for each specimen.

RMCP II immunohistochemistry and mucosal mast cell count

Immunodetection of RMCP II was carried out on paraformaldehyde-fixed duodenum sections using a monoclonal antibody (Moredun). Detection was performed with avidin/oxidase (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections were counterstained with haematoxylin and counted at $\times 400$ magnification. Positively stained mast cells were counted in three to five sections per animal. Seven to 10 well-oriented villus-crypt units (VCU) were examined per section using an Olympus CH2 microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Analysis of all morphological data was performed blinded to prevent observer bias.

Statistics

All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis of the results was performed with ordinary ANOVA followed by a *post hoc* Bonferroni test for the motility studies and mast cell counts between control and sham groups. Unpaired student's *t*-test was used for comparison of each sensitized group with its respective sham group. Statistical analysis of results for the challenge was performed with two-way ANOVA followed by *post hoc* Bonferroni test. Statistical analysis of results for the *in vitro* stimulation was performed with unpaired student's *t*-test. Differences between groups were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Spontaneous activity

Control unsensitized rats showed spontaneous activity consisting of isolated contractions with a frequency of 0.2–0.8 contractions min^{-1} in the duodenum (67% of the experiments), jejunum (34%) and ileum (50%). In sensitized rats, these contractions were substituted by intense bursts of clustered contractions followed by periods of inactivity. However, these changes varied according to the intestinal segment and the hypersensitivity induction protocol followed (Fig. 1). No differences were found in intestinal motility between control rats and sham groups.

The duodenum was the section of the small intestine most affected by sensitization. Frequency (contraction/min) and magnitude of contractions ($\text{mm}^2 \text{min}^{-1}$) significantly increased in all the three sensitized groups (Fig. 2). Motor alterations in the jejunum and ileum were not as evident as in the duodenum. Only the 11-day sensitized group showed a

significant increase in magnitude of contractions when compared with controls (Table 1).

CCK motor response

In control rats, intravenous infusion of CCK-8 [$3 \times 10^{-9} \text{ mol kg}^{-1} (10 \text{ min})^{-1}$] induced an increase of both tonic and phasic contractions in the duodenum and an inhibition of spontaneous mechanical activity in the jejunum. No difference was found between unsensitized controls [AUC (mm^2) $(10 \text{ min})^{-1}$, $(550.3 \pm 91.49, n = 6)$] and sham groups (*B. pertussis* $566.2 \pm 126.6, n = 6$; 11-day $458.1 \pm 82.32, n = 6$; oral $669.5 \pm 141.6, n = 6$; $P = 0.61$). The response to CCK was slightly greater in sensitized groups (*B. pertussis* $1017 \pm 267.9, n = 7, P = 0.21$; 11-day sensitized $635.7 \pm 116.9, n = 7, P = 0.26$; oral sensitized $960.6 \pm 172.7, n = 6, P = 0.22$) when compared with its respective sham group. However, the great variability in the responses prevented a statistical significance. Inhibitory response to CCK remained unchanged in all the sensitized groups.

Inhibitory tone

The magnitude of contractions in the jejunum increased after L-NNA both in control rats and in sham groups when compared with their respective spontaneous motility before L-NNA administration. This increase of magnitude was slightly higher at the animals receiving adjuvants. Similar results were found in the duodenum and ileum. In contrast, in the sensitized groups L-NNA induced no further increase in intestinal spontaneous motility (Fig. 3).

Effect of sensitization on the ascending contraction

Electrical stimulation on the intestinal mucosa always induced an ascending contraction recorded at the oral strain gauge. This response was increased by L-NNA and reduced by atropine. Table 2 shows responses obtained in both unsensitized and sensitized groups after electrical field stimulation at 2 and 6 Hz in duodenum and ileum (4 Hz data were omitted to simplify presentation of the results). In general, ascending contraction was not modified in any OVA-sensitized group.

Total IgE concentration

No difference was observed in IgE concentration between unsensitized rats ($13.41 \pm 4.32, n = 15$) and

sham groups (*B. pertussis* 8.84 ± 2.7 , $n = 5$; 11-day 15.32 ± 2.22 , $n = 5$; oral 15.05 ± 1.56 , $n = 6$). Serum total IgE concentration significantly increased only in the *B. pertussis* sensitized group (180.9 ± 58.43 ng mL⁻¹, $n = 9$; $P < 0.001$) when compared with *B. pertussis* sham group. Neither the 11-day sensitized (12.23 ± 5.6 , $n = 9$) nor orally sensitized (8.37 ± 4.45 , $n = 8$) groups showed any significant increase of IgE.

Systemic mucosal mast cell activation (RMCP II release)

Serum RMCP II concentrations, a marker of mucosal mast cell activation, were similar at prechallenge (T_0)

in all groups. No difference was observed in RMCP II concentration after sham challenge (T_t) with saline solution. In contrast, OVA challenge resulted in significantly high levels of serum RMCP II both in the *B. pertussis* sensitized group and in the 11-day sensitized group postchallenge (T_t) when compared with unsensitized groups (Fig. 4) (no difference was observed between pre- and postchallenge RMCP II concentration between unsensitized control and sham groups). No changes in RMCP II concentration were observed in the orally sensitized group after OVA challenge. Challenge with BSA in the 11-day sensitized rats did not modify RMCP II concentration.

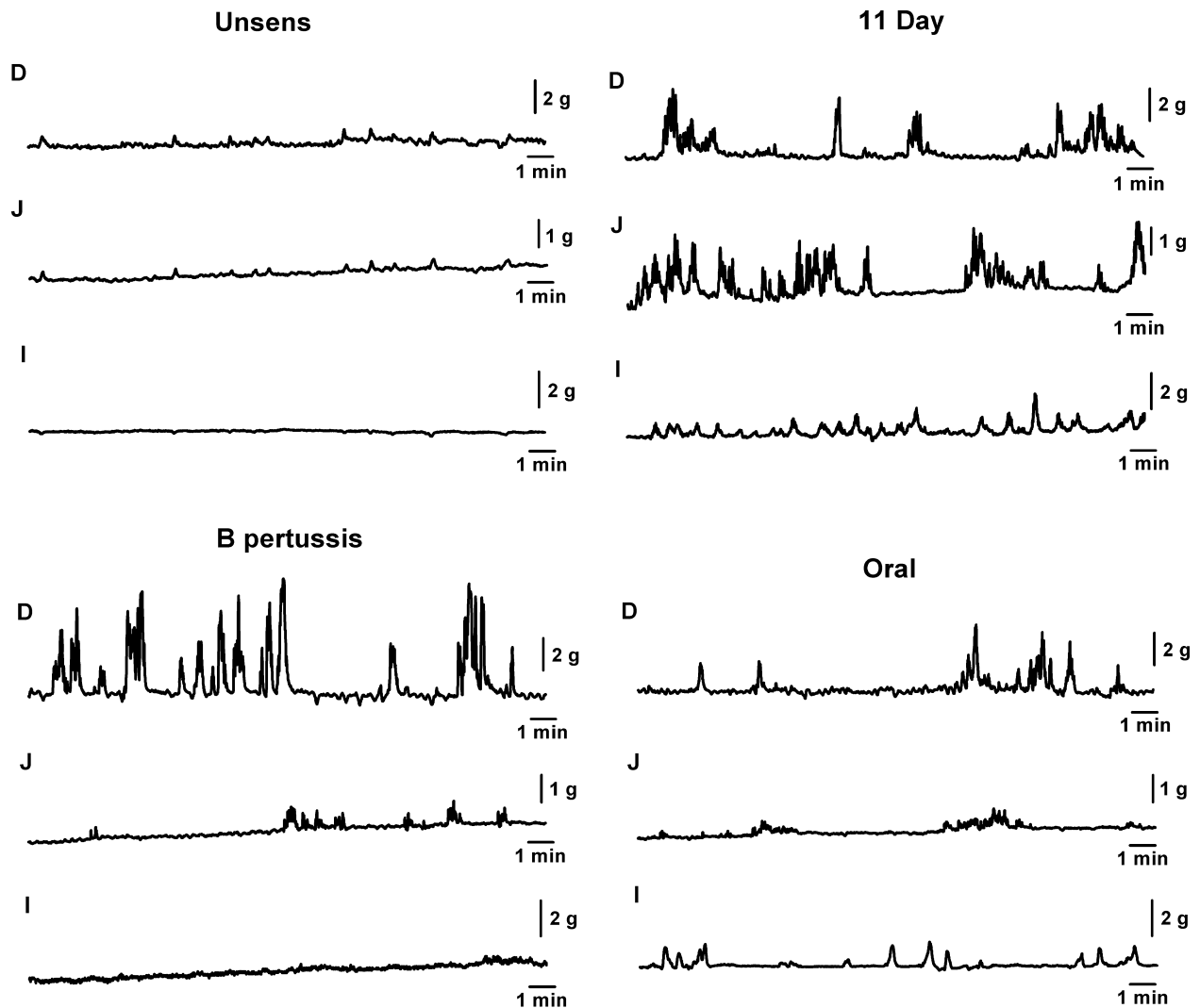


Figure 1 Representative recordings of mechanical activity showing the spontaneous motor events in duodenum (D), jejunum (J) and ileum (I) in unsensitized control (unsens) group and after OVA hypersensitivity induction by three different protocols (*Bordetella pertussis*, 11-day and oral). Similar recordings were obtained in all the rats of each group.

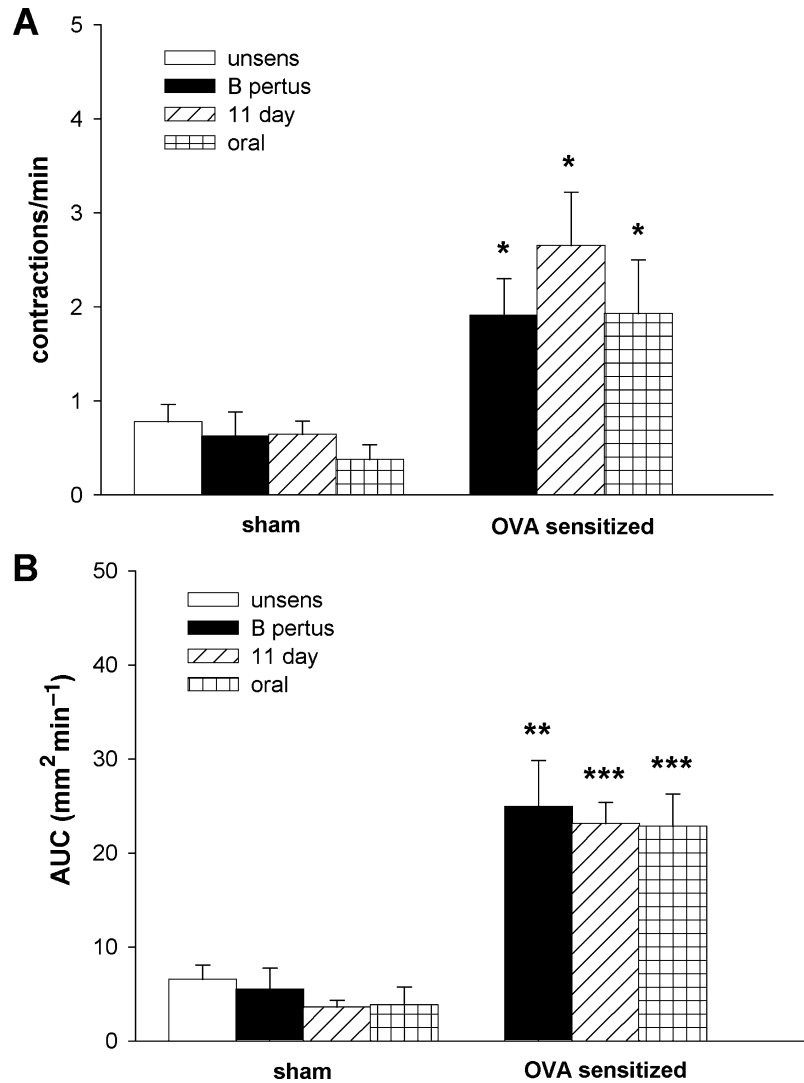


Figure 2 Quantification of the spontaneous motility (frequency and magnitude of the contraction) in the duodenum of unsensitized control ($n = 6$), sham sensitized [*Bordetella pertussis* ($n = 6$), 11 day ($n = 6$), and oral ($n = 6$)] and ovalbumin-sensitized rats [*B. pertussis* ($n = 9$), 11-day ($n = 9$) and oral ($n = 6$)]. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$, respectively, vs respective sham sensitized group.

Table 1 Spontaneous motility in jejunum and ileum of unsensitized control, sham sensitized groups, *Bordetella pertussis* sensitized, 11-day sensitized and orally sensitized rats

	Unsens	<i>B. pertussis</i> sham	11-day sham	Oral sham	<i>B. pertussis</i> sensitized	11-day sensitized	Oral sensitized
Jejunum							
Freq	0.18 ± 0.096	0.13 ± 0.074	0.35 ± 0.19	0.18 ± 0.11	0.77 ± 0.41	0.89 ± 0.45	0.27 ± 0.14
Magn	2.15 ± 0.37	2.92 ± 0.43	1.73 ± 0.39	2.07 ± 0.62	11.46 ± 4.74	18.06 ± 5.02*	3.3 ± 0.77
Ileum							
Freq	0.21 ± 0.09	0.39 ± 0.11	0.34 ± 0.11	0.12 ± 0.07	0.28 ± 0.15	0.74 ± 0.21	0.4 ± 0.14
Magn	2.39 ± 0.71	4.14 ± 0.69	4.52 ± 0.79	2.69 ± 0.98	3.48 ± 0.83	17.4 ± 2.08***	4.26 ± 1.23

Freq, frequency is expressed as contractions min⁻¹; Magn, magnitude of contraction AUC (mm²) min⁻¹ (mean ± SEM). * $P < 0.05$ or *** $P < 0.001$ in relation to spontaneous motility of its respective sham group (*B. pertussis* sham, 11-day sham or oral sham).

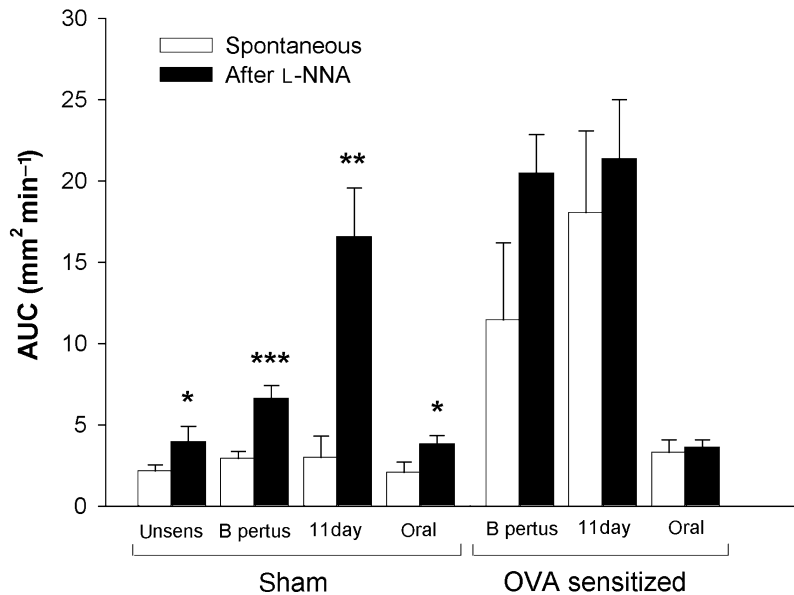


Figure 3 Effect of L-NNA infusion on magnitude of contractions in the jejunum of unsensitized control ($n = 6$), sham sensitized [*Bordetella pertussis* ($n = 6$), 11-day ($n = 6$) and oral ($n = 6$)], and ovalbumin sensitized rats [*B. pertussis* ($n = 9$), 11 day ($n = 9$), and oral ($n = 6$)]. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$, respectively, vs spontaneous motility before L-NNA in the same group.

Local mucosal mast cell activation (RMCP II release from intestinal sections)

Spontaneous mucosal mast cell release of RMCP II in orally sensitized rats was higher than in unsensitized control rats in duodenum, jejunum and ileum (Fig. 5A). Rat mast cell protease II release was significantly higher in sensitized animals in relation to control unsensitized animals after OVA and 48/80 incubation (Fig. 5B).

RMCP II immunohistochemistry and mucosal mast cell count

Unsensitized control rats and sham groups showed similar number of mucosal mast cells (expressed per VCU). However, the number of mucosal mast cells increased significantly in all the three sensitized groups of rats compared with their respective sham groups (Fig. 6).

DISCUSSION

The results of this study demonstrate that food sensitized rats show chronic alterations in small intestine motility. These motor alterations are not due to an immediate OVA challenge, but are concurrent with increased number and activity of intestinal mast cells upon antigen challenge.

Allergy response to food is generally considered as a systemic response and, in consequence, most allergy studies are conducted using parenteral sensitization models. However, our results clearly show two

important facts: (i) that IgE increase due to OVA sensitization is not always present. Only the use of *B. pertussis*, a known IgE-selective adjuvant,²⁵ is able to increase IgE, and (ii) that it is possible to induce sensitization to food proteins, OVA in this case, without any detectable systemic increase of RMCP II. Our study corroborates that food sensitivity is very difficult to detect by conventional methods (IgE and mast cell mediators in serum), as previously proposed.²⁶

The results from the *in vitro* experiments clearly demonstrate that mucosal mast cells from orally sensitized animals release more RMCP II than those from unsensitized rats, even in the absence of any exogenous stimulus. Furthermore, the oral sensitized group showed an increase in the number of mast cells present in the intestinal mucosa. These results corroborate enteral sensitization to OVA and the implication of mast cells in the sensitization process. Moreover, the IgE and RMCP II increase observed in the serum after parenteral sensitization vs the absence of any detectable increase after enteral sensitization suggests that some allergic responses could be restricted to the intestine making them difficult to diagnose. Intestinal mucosal mast cells only represent 2–3% of the total lamina propria cells and RMCP II released by this relatively small number of cells could be non-detectable in the serum.

We previously demonstrated that intestinal mucosal mast cells from rats previously unexposed to OVA respond to OVA hydrolysate with an increase of RMCP II, modify nervous reflexes and modulate endocrine responses induced by intraluminal stimulus.^{23,24}

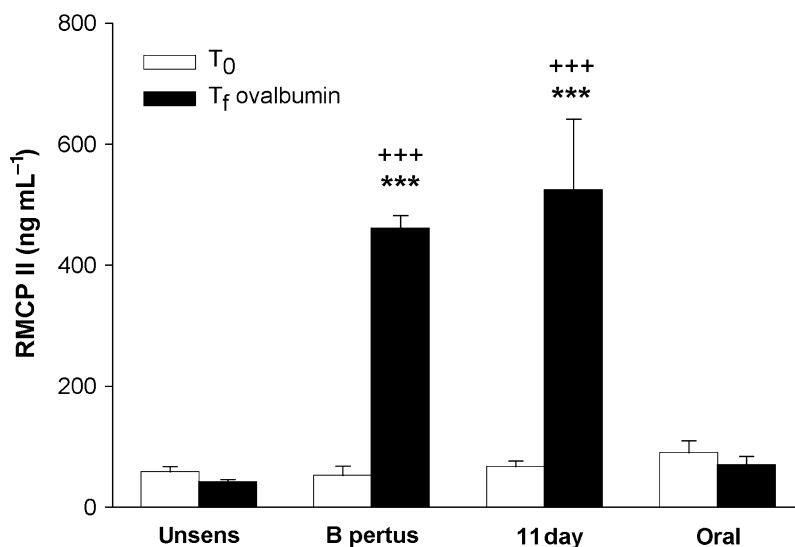
Table 2 Magnitude of ascending contraction expressed as AUC[mm² min⁻¹ (mean ± SEM)] after electrical stimulation at 2 and 6 Hz in duodenum and ileum before L-NNA infusion (control), after L-NNA infusion (L-NNA) and after atropine infusion (atropine)

	Control	L-NNA	Atropine
Duodenum			
2 Hz			
Unsensitized	18.27 ± 7.62	56.89 ± 8.8	3.83 ± 1.98
<i>B. pertussis</i> sham	18.31 ± 7.89	44.73 ± 13.3	1.66 ± 0.95
11-day sham	14.45 ± 7.43	28.54 ± 6.36	6.02 ± 1.77
Oral sham	21.5 ± 13.79	52.99 ± 6.47	8.15 ± 3.44
<i>B. pertussis</i> sensitized	46.8 ± 16.76	78.37 ± 27.07	0.39 ± 0.23
11-day sensitized	10.96 ± 3.21	57.42 ± 17.03	0.93 ± 0.54††
Oral sensitized	18.13 ± 8.26	37.55 ± 7.97	2.6 ± 1.16
6 Hz			
Unsensitized	32.76 ± 7.24	48.42 ± 15.81	3.41 ± 1.81
<i>B. pertussis</i> sham	21.49 ± 3.89	57.46 ± 14.46	1.86 ± 1.17
11-day sham	14.36 ± 3.63*	40.75 ± 9.72	2.2 ± 0.87
Oral sham	29.75 ± 5.63	38.96 ± 7.48	3.7 ± 2.16
<i>B. pertussis</i> sensitized	44.24 ± 16.39	94.43 ± 21.85	3.3 ± 0.5
11-day sensitized	18.33 ± 3.67	50.07 ± 9.73	1.81 ± 1.45
Oral sensitized	26.25 ± 7.63	66.02 ± 10.65†	1.53 ± 1.23
Ileum			
2 Hz			
Unsensitized	3.68 ± 1.1	5.06 ± 1.5	0.41 ± 0.23
<i>B. pertussis</i> sham	3.15 ± 2.025	30.01 ± 11.7	7.31 ± 4.94
11-day sham	0.37 ± 0.3	16.5 ± 14.03	8.91 ± 5.06
Oral sham	5.68 ± 5.6	9.89 ± 7.33	18.7 ± 8.37
<i>B. pertussis</i> sensitized	6.12 ± 3.36	15.24 ± 7.76	12.06 ± 5.14
11-day sensitized	8.16 ± 6.36	19.05 ± 6.96	19.92 ± 6.18
Oral sensitized	1.39 ± 0.48	2.31 ± 0.62	7.49 ± 3.9
6 Hz			
Unsensitized	39.85 ± 8.14	51.71 ± 14.72	13.27 ± 4.83
<i>B. pertussis</i> sham	47.49 ± 12.85	61.12 ± 16.12	24.28 ± 7.68
11-day sham	61.64 ± 13.59	93.42 ± 12.74	49.61 ± 7.87**
Oral sham	19.16 ± 6.25	28.44 ± 8.62	15.88 ± 5.74
<i>B. pertussis</i> sensitized	30.44 ± 6.83	107.1 ± 33.27	29.69 ± 12.32
11-day sensitized	56.52 ± 20.43	113 ± 24.55	34.16 ± 8.56
Oral sensitized	26 ± 7.68	39.9 ± 12.9	15.64 ± 7.51

P* < 0.05, *P* < 0.01 in relation to unsensitized control rats.

†*P* < 0.05, ††*P* < 0.01 in relation to respective sham sensitized group.

Figure 4 Rat mast cell protease II (RMCP II) concentration (ng mL⁻¹) in serum from unsensitized and ovalbumin (OVA) sensitized rats before (*T*₀) and after gavage challenge (*T*_f). All rats received OVA solution challenge (0.2 g mL⁻¹, 0.5 mL/rat). Bars represent mean ± SEM from unsensitized control (*n* = 4), *Bordetella pertussis* sensitized (*n* = 4), 11-day sensitized (*n* = 4), and orally sensitized (*n* = 6) rats. ****P* < 0.001 compared with unsensitized controls; +++*P* < 0.001 compared with *T*₀ values of the same group.



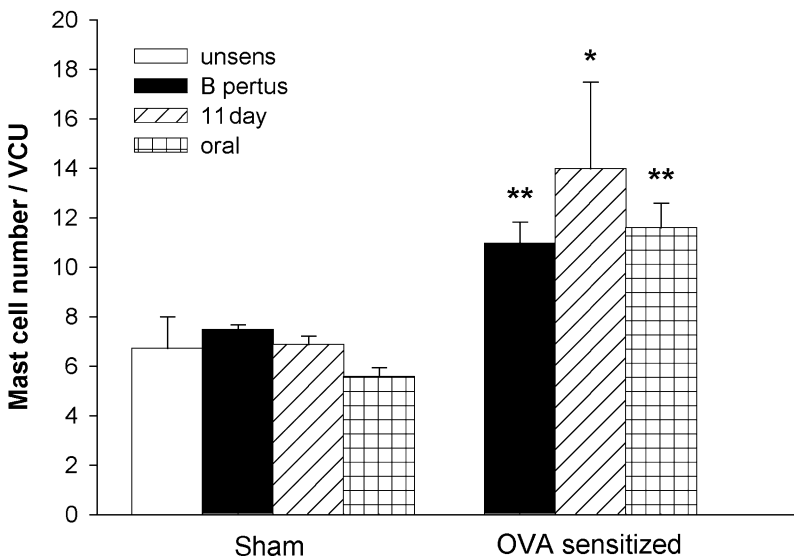
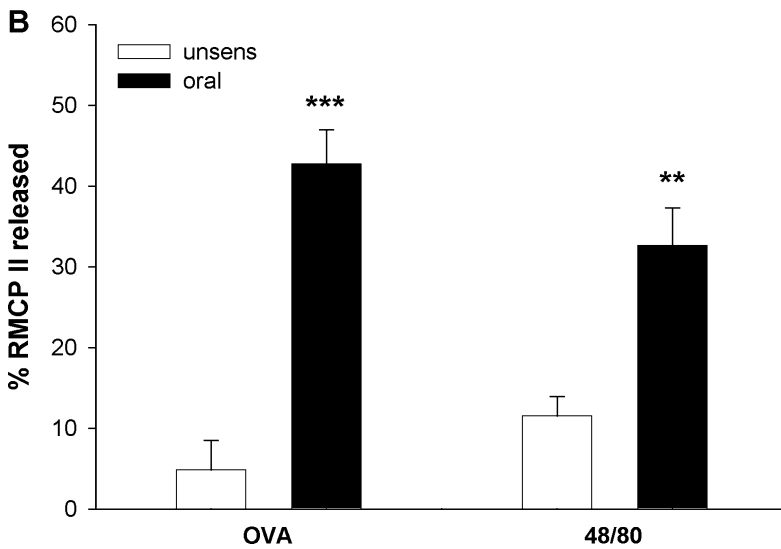
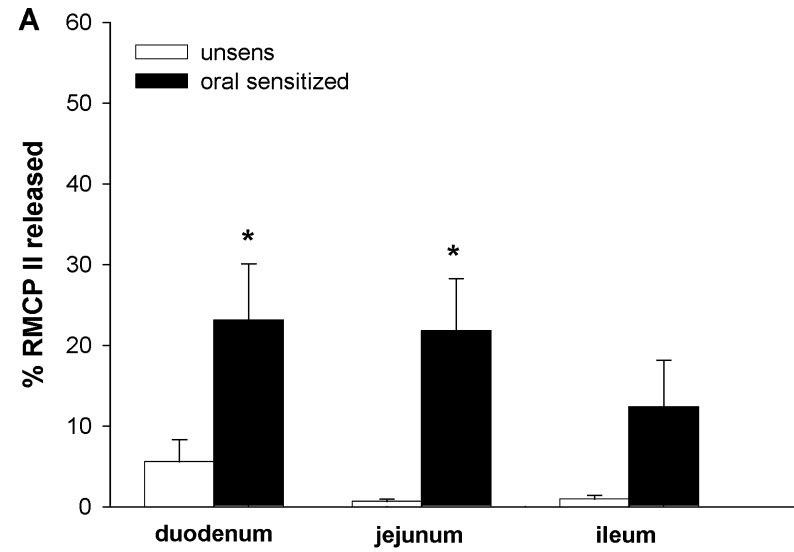


Figure 5 (A) Percentage of rat mast cell protease II (RMCP II) spontaneously released from duodenum, jejunum and ileum sections of unsensitized controls (unsens) and orally sensitized (oral sensitized) rats in basal conditions without stimulus. * $P < 0.05$ vs unsensitized control rats in the same intestinal section. (B) Percentage of RMCP II released from duodenum sections of unsensitized controls (unsens) and orally sensitized (oral) rats after stimulation with ovalbumin (OVA) and compound 48/80. ** $P < 0.01$ or *** $P < 0.001$, respectively, vs unsensitized control rats stimulated with the same secretagogue.

Figure 6 Duodenal mucosal mast cell number expressed per villus-crypt unit (VCU) counted in 7–10 units per section. Three to five sections were counted per rat. Bars represent mean \pm SEM from four to six rats from each hypersensitivity induction protocol (sham and sensitized). * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$, respectively, compared with its respective sham group.

Therefore, it is possible that mast cell response to OVA in orally sensitized rats could be the consequence of the repeated exposure to OVA rather than a reaction of hypersensitivity. This hypothesis could also explain the absence of IgE or systemic RMCP II response to challenge. However, due either to allergic sensitization or continuous stimulation, the results of our study clearly show that animals with chronic intestinal motor disturbances have increased number of mast cells in the intestinal mucosa. There is a significant number of studies that demonstrate a correlation between mast cell activation and stimulation of the enteric nervous system located in close proximity to mast cells.^{27–29} The higher release of RMCP II even in basal conditions in orally sensitized animals also suggests that mucosal mast cells in these animals are in a continuous excited–activated state that maintains an increased excitability of the nervous structures of the intestine. Similarly, motility alterations observed in parenterally sensitized groups (*B. pertussis* and 11-day sensitized) could be related to an excited–activated state of their mast cells rather than due to the increase on mast cell numbers.

The proximity of mast cells to afferent nerve endings⁵ implies that mast cell mediator release could increase afferent sensitivity, explaining the alterations in visceral perception observed in IBS patients. Some substances released by mast cells are nociceptive molecules that not only decrease the threshold of sensitivity in mucosal sensitive afferent fibres, but also produce pain due to their action on nociceptive nerve pathways. Moreover, some substances released by mast cells can alter small intestine motility patterns^{30,31} and also contribute to IBS symptoms.

Our protocol was designed to evaluate the different structures controlling motility, therefore we briefly discussed each parameter. Concerning spontaneous motility, motor changes were observed in all sensitized animals but differ depending on the intestinal segment and the induction protocol considered. The three hypersensitivity induction protocols induced alterations in spontaneous motility in the duodenum. In contrast, alterations in jejunum and ileum motility were only evident in the 11-day protocol. Thus, hypersensitivity to OVA induces hypermotility mainly in the proximal areas of the intestine. The fact that 11-day protocol involved intraperitoneal injections could explain the wider reaction of the intestine in this model.

With respect to CCK response, an abnormal response to CCK has been suggested in patients with IBS.²⁰ We previously characterized the motor effects of CCK using the same experimental protocol as in the current

study.³² In addition, we also showed that inflammation induced by nematode infection increases the excitatory component of this response both at the duodenum and jejunum because of an increase of vagal sensitivity.^{22,33} In the present study, CCK response of sensitized animals, although of a larger magnitude, did not show a significant difference in relation to CCK response in unsensitized and sham animals. In consequence, while our results suggest a change in vagal afferent sensitivity induced by OVA sensitization, they do not actually confirm it.

L-NNA infusion blocks the tonic release of NO at the intestine and it is commonly used as a tool to evaluate functionality of the intestinal inhibitory tone. In a previous study, the jejunum showed the greatest response to L-NNA.³² However, in the present study, L-NNA did not increase motor activity in OVA sensitized rats, indicating that inhibitory tone in these animals is altered and that hypermotility observed after OVA sensitization could be, at least in part, a consequence of a decreased inhibitory tone.

Finally, regarding ascending contraction, distal electrical stimulation has been used extensively to induce ascending excitation, a well-characterized component of the peristaltic reflex.²⁴ The response to electrical stimulation observed in sensitized animals indicates that there is no significant effect of OVA sensitization at the nerve–muscle level.

In conclusion, both parenteral and enteral sensitizations to OVA induce chronic changes in mucosal mast cell sensitivity. Sensitized mucosal mast cells predispose the small intestine to overreact to intercurrent non-IgE-mediated stimulus. Chronic mast cell activation could be responsible for chronic changes in motor activity and could explain some of the clinical signs observed in IBS patients. This study demonstrates that enteral hypersensitivities to food could be a contributory factor of IBS symptoms and that such hypersensitivity is difficult to diagnose.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. de Mora for his knowledgeable assistance with the *in vitro* experiments, to A. Acosta for his assistance with the animals and A. C. Hudson for editorial revision of the manuscript. This work was supported by Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant SAF2002-03463 by Comissionat per a Universitats i Recerca, Generalitat de Catalunya, Grants 1999SGR 00272 and 2001SGR 00214. We are also grateful to Universitat Autònoma de Barcelona for the financial support of Y. Saavedra.

REFERENCES

- 1 Locke CR, Zinsmeister AR, Talley NJ, Fett SL, Melton LJ. Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 157–65.
- 2 Vermillion DL, Ernst PB, Scicchitano R, Collins SM. Antigen-induced contraction of jejunal smooth muscle in the sensitized rat. *Am J Physiol* 1988; **255**: G701–08.
- 3 Barbara G, Vallance BA, Collins SM. Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1224–32.
- 4 De Giorgio R, Barbara G, Blennerhassett P *et al.* Intestinal inflammation and activation of sensory nerve pathways: a functional and morphological study in the nematode infected rat. *Gut* 2001; **49**: 822–27.
- 5 Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 2975–79.
- 6 Castro GA, Harari Y, Russell D. Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. *Am J Physiol* 1987; **253**: G540–48.
- 7 Cooke HJ. Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. *Am J Physiol* 1994; **266**: G167–78.
- 8 Wang YZ, Palmer JM, Cooke HJ. Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pig. *Am J Physiol* 1991; **260**: G307–14.
- 9 Scott RB, Gall DG, Maric M. Mediation of food protein-induced jejunal smooth muscle contraction in sensitized rats. *Am J Physiol* 1990; **259**: G6–14.
- 10 Crowe SE, Soda K, Stanisiz AM, Perdue MH. Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am J Physiol* 1993; **264**: G617–23.
- 11 Curtis GH, Patrick MK, Catto-Smith AG, Gall DG. Intestinal anaphylaxis in the rat. Effect of chronic antigen exposure. *Gastroenterology* 1990; **98**: 1558–66.
- 12 Turner MW, Barnett GE, Strobel S. Mucosal mast cell activation patterns in the rat following repeated feeding of antigen. *Clin Exp Allergy* 1990; **20**: 421–27.
- 13 Bazin H, Platteau B. Production of circulating reaginic (IgE) antibodies by oral administration of ovalbumin to rats. *Immunology* 1976; **30**: 679–84.
- 14 Knippels LMJ, Penninks AH, Smit JJ, Houben GF. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **156**: 161–69.
- 15 Scott RB, Diamant SC, Gall DG. Motility effects of intestinal anaphylaxis in the rat. *Am J Physiol* 1988; **255**: G505–11.
- 16 Scott RB, Tan DTM. Mediation of altered motility in food protein induced intestinal anaphylaxis in Hooded Lister rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; **74**: 320–30.
- 17 Scott RB, Tan DTM, Miampamba M, Sharkey KA. Anaphylaxis-induced alterations in intestinal motility: role of extrinsic neural pathways. *Am J Physiol* 1998; **275**: G812–21.
- 18 Saavedra Y, Vergara P. Ovalbumin sensitization induces intestinal chronic motor alterations in rats. *Neurogastroenterol Motil* 2003; **15**(5): 79 (A203).
- 19 Knippels LMJ, Penninks AH, Spanhaak S, Houben GF. Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* 1998; **28**: 368–75.
- 20 Harvey RF, Read AE. Effect of cholecystokinin on colonic motility and symptoms in patients with the irritable-bowel syndrome. *Lancet* 1973; **7793**: 1–3.
- 21 Giralt M, Vergara P. Inhibition by CCK of ascending contraction elicited by mucosal stimulation in the duodenum of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2000; **12**: 173–80.
- 22 Torrents D, Vergara P. In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol* 2000; **279**: G543–51.
- 23 Juanola C, Giralt M, Jiménez M, Mourelle M, Vergara P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am. J Physiol* 1998; **275**: G63–67.
- 24 Vergara P, Saavedra Y, Juanola C. Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol Motil* 2002; **14**: 1–8.
- 25 Helm RM. Food allergy animal models. An overview. *Ann NY Acad Sci* 2002; **964**: 139–50.
- 26 Bischoff SC, Mayer JH, Manns MP. Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; **121**: 270–83.
- 27 Frieling T, Cooke HJ, Wood JD. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after sensitization to milk antigen. *Am J Physiol* 1994; **267**: 1087–93.
- 28 Frieling T, Parmer JM, Cooke HJ, Wood JD. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 1994; **107**: 1602–09.
- 29 Liu S, Hu HZ, Gao N *et al.* Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am J Physiol* 2003; **284**: 154–64.
- 30 Cooke HJ, Wang YZ, Rogers R. Mechanisms of neural-immune system interactions. *Dig Dis Sci* 1992; **37**: 966 (A-4).
- 31 Konturek SJ, Siebers R. Role of histamine H₁- and H₂-receptors in myoelectric activity of small bowel in the dog. *Am J Physiol* 1980; **238**: G50–6.
- 32 Giralt M, Vergara P. Both afferent and efferent nerves are implicated in cholecystokinin motor actions in the small intestine of the rat. *Regul Peptid* 1999; **81**: 73–80.
- 33 Torrents D, Torres R, De Mora F, Vergara P. Antinerve growth factor treatment prevents intestinal dysmotility in *Trichinella spiralis*-infected rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; **302**: 659–65.

Functional consequences of orally induced sensitization to ovalbumin: differences between normal and high-IgE responder rats

Y. Saavedra, P. Vergara.

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

Running head: Orally induced sensitization to OVA: strain differences

Key words: hypersensitivity, mucosal mast cells, RMCP II.

Address for correspondence:

Patri Vergara, PhD

Unitat de Fisiologia

Edifici V

Universitat Autònoma de Barcelona

08193 Bellaterra

Spain

Telephone no. 34-93-5811848

Fax no. 34-93-5812006

e-mail: patri.vergara@uab.es

ABSTRACT

Sensitization to luminal antigens has been suggested as a possible cause of several disorders of difficult diagnosis. The aim of this work was to study the functional consequences of orally induced sensitization to OVA in atopy predisposed rats (BN) versus normal responder rats (SD). OVA had opposite effects in BN and SD rats. OVA-specific IgEs were detected only in sensitized BN rats. Sensitized SD rats did not show any significant increase of RMCP II but showed higher number of mast cells in the intestine. In contrast, RMCP II release was lower in the serum and in the duodenum after orally induced sensitization in BN rats. Number of mast cells was also lower in the intestine of orally sensitized BN rats. However, challenge to OVA had similar effects in both rat strains: increase of RMCP II in parenterally sensitized but not in orally sensitized animals. After sensitization, SD rats showed intestinal hypermotility. In contrast, the excitatory response to L-NNA decreased as a result of sensitization in BN rats. In conclusion, only atopy genetically predisposed rats showed specific IgE in response to food allergens. The immune response to orally induced sensitization to OVA was restricted to the intestine in both BN and SD rats. Mast cell number and mast cell activity showed a clear correlation to intestinal dysmotility.

INTRODUCTION

Sensitization to luminal antigens has been established as the main cause of several disorders such as food allergy, eosinophilic gastroenteritis, celiac disease, cow's-milk protein enteropathy. Immune response to luminal antigens has also been suggested as a possible cause of other gastrointestinal pathologies of unknown etiology, such as inflammatory bowel disease (IBD) and irritable bowel syndrome (IBS) (4; 9; 22), as well as in other pathological processes affecting organs outside the gastrointestinal system such as asthma and arthritis (2; 15).

Several studies in humans show that it is not always possible to determine sensitization to luminal antigens (1). It is generally accepted that responses to food allergens are mediated by IgE and the activation of mast cells. In consequence, both specific anti IgE molecules and mast cell mediators are used to establish a diagnosis of allergy. However, clinically diagnosed food allergies often fail to show significant increases of IgE or mast cell mediators in serum samples. In addition, although allergy is more frequent in genetically predisposed individuals (the so called atopic genotype), allergies have also been diagnosed in non predisposed individuals (27).

Several animal models have been extensively used to study food allergy. Some of these studies use genetically predisposed animals. One of the most commonly used is the Brown Norway (BN) rat, a rat strain considered a Th2-type responder (high IgE producer) that resembles atopic humans in their genetic predisposition to react with an overproduction of IgE (11). In addition, other animals, including many different rat strains with no predisposition to show a clear Th1 or Th2 profile, such as the Sprague-Dawley (SD) rat strain used in our study (13), have been also used for allergen sensitization using adjuvants.

Several intestinal anaphylactic induction protocols have been developed using enteric parasites or food proteins as sensitizing agents by parenteral sensitization (4; 23). However, the development of well validated enteral allergen models to study food allergy and the allergenicity of food proteins is still in process. Knippels et al. (17-20) reported that BN rats may provide a suitable model for enteral sensitization to food proteins.

In a previous study we used oral Knippels' protocol to induce ovalbumin (OVA) hypersensitivity in SD rats and evaluated chronic functional motor changes and mucosal mast cell activity induced by sensitization. Although we could not demonstrate any significant increase of IgE concentration or significant increases of mast cell mediators in serum, we found increased number of intestinal mucosal mast cells, as well as an increased mast cell

activity at the intestine accompanied by intestinal hypermotility (29).

These results showing clear functional alterations in the intestine but with an absence of an IgE response indicated a need for further study. The aim of this work was to further study sensitization to OVA and to evaluate if the genetic background could determine the type of immune response and the functional consequences of sensitization. We used both BN and SD rats that were orally sensitized to OVA. To compare these results with others, we also used two well established systemic sensitization protocols using adjuvants (6; 7; 36). The parameters studied were: 1) presence of specific anti-OVA IgE; 2) Rat mast cell protease II (RMCP II) in blood before and in response to OVA challenge; 3) Evaluation of the chronic consequences of sensitization by a) counting the number of intestinal mucosal mast cells; b) measuring release of RMCP II in the intestine and c) recording the intestinal motor activity. Parts of this study have been presented in abstract form (28).

MATERIALS AND METHODS

Animals. In this study, two different strains of rats were used, 87 Sprague-Dawley (SD) rats (non-genetically predisposed to develop allergy), and 66 Brown Norway (BN) rats (high-IgE responder rats) (Charles River Laboratories, Les Oncins, France). Animals had free access to water and a standard pellet diet that did not contain any trace of ovalbumin or any other egg derivative. Rats were specific pathogen free when purchased and from reception to their use in a protocol (between 1 and 10 weeks) they were kept in clean conventional conditions. They were maintained in an environmentally controlled room in groups of 3-4 animals. The night before the experiment, food was removed and each animal caged individually. Rats were purchased at different ages according to the duration of sensitization protocol. In consequence, all animals were of similar age and weight at the time of the experiment. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

Substances. Ovalbumin Grade V (Sigma, St. Louis, MO) was diluted in sterile saline solution for sensitization and in non-sterile saline solution for oral challenge. Bovine serum albumin (BSA) Grade V (Sigma, St. Louis, MO) was diluted in sterile saline.

Hypersensitivity to ovalbumin. Induction protocols. Induction protocols used in previous studies differ in the way of application and whether adjuvants are used or not. In order to differentiate the effect of adjuvants and to compare orally induced sensitization with other methods, the following protocols were used:

Bordetella pertussis protocol. Rats (SD n=15, BN n=10) 8-10 weeks old were sensitized as described previously (6) with 1 mg of ovalbumin and 25 mg of Al(OH)₃ in 1 ml of sterile saline injected subcutaneously (*s. c.*) and 0.5 ml of *Bordetella pertussis* vaccine (2x10¹⁰ organisms; Berna Institute, Madrid, Spain) injected intraperitoneally (*i. p.*). *Bordetella pertussis* toxin is a well known adjuvant that induces IgE production, priming mast cells that degranulate in response to antigen (5).

11 day protocol. Rats (SD n=21, BN n=18) 8-10 weeks old were intraperitoneally (*i. p.*) sensitized as described previously (18) with 0.5 ml of a 0.2 mg ml⁻¹ OVA solution in sterile saline injected on days 0, 2, 4, 7, 9 and 11. To potentiate the immune response, 0.2 ml of a 25 mg ml⁻¹ Al(OH)₃ adjuvant suspension in sterile saline mixed with the 0.5 ml of OVA was injected on day 0.

Oral protocol. Following previous studies (18; 29), six-week-old rats (SD n=12, BN n=10), were orally exposed to OVA by gavage (1 mg OVA ml⁻¹ saline solution, 1 ml/animal). Gavage dosing was performed daily during 6 weeks.

Controls. Two groups of rats (SD n=21, BN n=16) not exposed to ovalbumin were used as controls (unsensitized control group). Three sham sensitized groups for each strain, *B. pertussis* sham (SD n=6, BN n=4), 11 day sham (SD n=6, BN n=4) and oral sham (SD n=6, BN n=4), in which induction protocols were conducted as described before but replacing OVA by saline solution, were used as control groups of the *B. pertussis*, 11 day and orally sensitized groups, respectively.

Challenges. After the sensitization period, animals were submitted to either saline (0.5 ml of saline solution 0.9 % NaCl) or OVA (0.5 ml of 0.2 g ml⁻¹ OVA solution) challenge by gavage. Unsensitized control and sham animals were also challenged as described for sensitized animals. Following previous studies (6; 19), challenge in the *B. pertussis* sensitized group was performed 14 days after hypersensitivity induction; 28 days after the first injection in the 11 day sensitized group; and 7 days after the end of the induction period in the orally sensitized group. The night before the challenge, food was removed and the animal caged individually. Blood samples from the saphenous vein were taken before (T₀) and 3 hours after (T₁) challenge. Animals did not have access to food until the two blood samples had been taken. Serum obtained was kept at -30°C until Rat Mast Cell Protease II (RMCP II) analysis was performed.

Experimental procedures. At least 8 days after the challenge, animals from all groups were submitted to one of the following experimental procedures to evaluate the chronic consequences of OVA sensitization: 1) Duodenal perfusion and determination of RMCP II in the perfusate or 2) Recording of intestinal motor activity.

Animal preparation for perfusion experiments. Animals were fasted for 16-18 h before experiments. Rats were anesthetized by inhalation of halothane to allow cannulation with polyethylene tubing of the right jugular vein. Stage III anesthesia was maintained with Pentothal Sodium bolus infusions in the jugular vein as required. Body temperature was maintained at 37°C by placing the rat on a heating pad. A tracheotomy was performed in order to avoid respiratory problems due to the anesthesia. A sample of blood from the jugular vein was taken for IgE and RMCP II analysis. The intestine was exposed through an

abdominal midline incision, and a polyvinyl tube was inserted in the duodenal lumen by an incision in the stomach wall and passed through the pylorus. Another plastic tube was inserted at the end of the duodenum next to Treitz's ligament, to allow drainage and perfusate collection. The total length of the duodenum exposed to perfusion was 7-8 cm. After surgery, the abdomen was covered with gauze soaked in liquid Vaseline to avoid tissue dryness and loss of heat. Duodenum was continuously perfused with phosphate buffer saline (PBS) at a speed of 12 ml/h. After a resting period of 30 minutes, the perfusate was collected at 15-min intervals in ice-chilled tubes for RMCP II evaluation. Animals were killed at the end of the experiment with an overdose of anesthetic. The methodology as well as the assessment of RMCP II values was validated in previous studies (14; 37).

Animal preparation for motility experiments. Rats were prepared for surgery as in the previous procedure and a sample of blood from the jugular vein was also taken for IgE and RMCP II analysis. The abdomen was opened through a midline incision, and the intestine was exposed. Three strain gauges (3x5 mm; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) were placed to record circular muscle activity and sutured to the intestinal wall of duodenum (at 2 cm from the pylorus), proximal jejunum (at 2 cm from Treitz's ligament), and ileum (10 cm from cecum), respectively. Strain gauges were connected to high-gain amplifiers (Lectromed MTP8, Lectromed, St Peter, Jersey, UK), and amplified signals were sent to a recording unit (PowerLab/800, ADI Instruments, Sydney, Australia).

Motor response evaluation. After a resting period of 30 min, spontaneous motor activity of the intestine was recorded during 60 min and the area under the curve (AUC) of the recording estimated. To further evaluate the two components of the motor response: inhibitory (mainly nitrenergic) and excitatory (cholinergic and tachykininergic), intestinal motility was also recorded after administration of an intravenous bolus of N ω -nitro-L-arginine (L-NNA) (10^{-5} mol kg $^{-1}$), a blocker of nitric oxide synthase. The AUC recorded during 10 min before L-NNA infusion and the AUC during 10 min starting 10 min after L-NNA infusion were compared. The difference between these two AUCs indicates the magnitude of inhibitory tone while the motor activity of the intestine during L-NNA infusion indicates the excitatory tone of the intestine. These parameters were selected from a protocol previously validated (35) because they were the most affected by sensitization in our previous study (29).

Measurement of total IgE. Serum samples for IgE detection were frozen and stored at -30°C

until assayed. IgE concentration in the serum was measured by ELISA using a commercial kit (Crystal Chem Inc. (Chicago, IL)).

Measurement of anti OVA-specific IgE. Anti OVA-specific IgE was measured as described by Hylkema and colleagues (12) with some modifications. Wells were coated overnight at 4°C with a mouse mAb to rat IgE (B41-1, Pharmingen, San Diego, CA, USA) at 2 µg/ml, 100 µl/well. After washing the plates three times with PBS/0.05% Tween-20, 300 µl/well each time, plates were blocked with 4% BSA/PBS/0.05% T20 for 2 h at room temperature. After washing the plates three times, serum samples were added to the wells at 1:4 dilutions in 2% BSA/PBS/0.05% T20. Serum samples were titrated and plates were incubated for 1 h at 37°C. After washing the plates three times as described, biotinylated OVA (10 µg/ml in 2% BSA/PBS/0.05% T20) was added for 1 h at 37°C and plates were washed again. As a second step, streptavidin-peroxidase polymer ultrasensitive (S2438 Sigma, Saint Louis, MO, USA) 1:500 in PBS/T20 was added for 15 min at 37°C. After washing, plates were developed for 15 min at room temperature after addition of 3, 5, 3', 5'-tetramethylbenzidine (T0440 Sigma, Saint Louis, MO, USA). Color development was stopped with 2 M H₂SO₄ and absorption was measured at 405 nm. Serum samples from unsensitized control SD and BN rats were used as negative controls. Negative control serums were measured at a 1:4 dilution, providing the reference value taken to determine the titer of the test sera. Each test serum was titrated starting at a 1:4 dilution and the reciprocal of the furthest serum dilution giving an extinction >0.1 units above the reference value was read as the titer. All analyses were performed in duplicate. Inter-assay variation was prevented to interfere in the results by including samples from control, sham and sensitized rats in each 96-well plate.

Measurement of Rat Mast Cell Protease II (RMCP II). RMCP II concentration in the serum and in the perfusate was measured by ELISA using a commercial kit (Moredun Animal Health (Edinburgh, UK)) as previously described (14; 29; 37).

RMCP II immunohistochemistry and mucosal mast cell counts. Tissue samples from animals submitted to either saline or OVA challenge were taken for mucosal mast cell counts. Immunodetection of RMCP II was carried out on paraformaldehyde-fixed duodenum, jejunum and ileum sections using a monoclonal antibody (Moredun, UK). Detection was performed with avidin/peroxidase (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame,

CA, USA). Sections were counterstained with hematoxylin and counted at x400 magnification. Positively stained mast cells were counted in three to five sections per intestinal segment and animal. Seven to ten well-oriented villus-crypt units (VCU) were examined per section using an Olympus CH2 microscope (Olympus, Barcelona, Spain). Analysis of all morphological data was performed blind to prevent observer bias.

Statistics. All data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis of the results was performed with ordinary ANOVA followed by a post hoc Bonferroni test for the comparison of unsensitized control and sham sensitized groups. Unpaired student's t-test was used for comparison of each sensitized group with its respective sham group. Statistical analysis of results for the challenge and perfusion studies was performed with two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni test. Unpaired student's t-test was used for comparison of intestinal segments motility in BN rats with its respective in SD rats. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

Total IgE concentration. BN rats showed higher total IgE concentration in serum than SD rats. Furthermore, the adjuvant *B pertussis* significantly increased IgE in BN rats. All sensitized BN groups showed a significant increase of IgE. In contrast, in SD rats only the group that received *B. pertussis* plus OVA showed an increase on IgE concentration (Fig. 1).

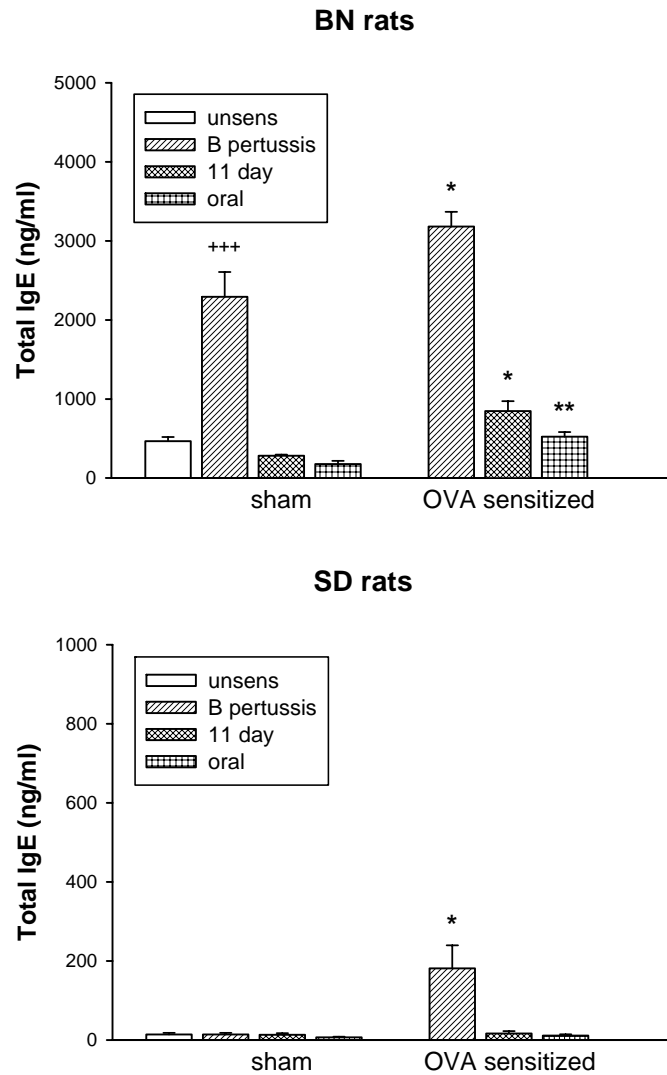


Fig. 1.- Total IgE concentration (ng/ml) in serum from BN and SD rats. Bars represent mean \pm SEM from unsensitized control (BN n=11, SD n=16), sham sensitized (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral; n=4-6 each group), and ovalbumin (OVA) sensitized (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral; n=5-12 each group). *P<0.05, **P<0.01 or ***P<0.001, respectively, compared with its respective sham group. +++P<0.001 compared with unsensitized control rats.

Anti OVA-specific IgE concentration. Anti OVA-specific IgEs were only detected in OVA-sensitized BN rats (Fig. 2). In SD rats, all OVA-sensitized groups gave negative results, independently of the sensitization protocol used.

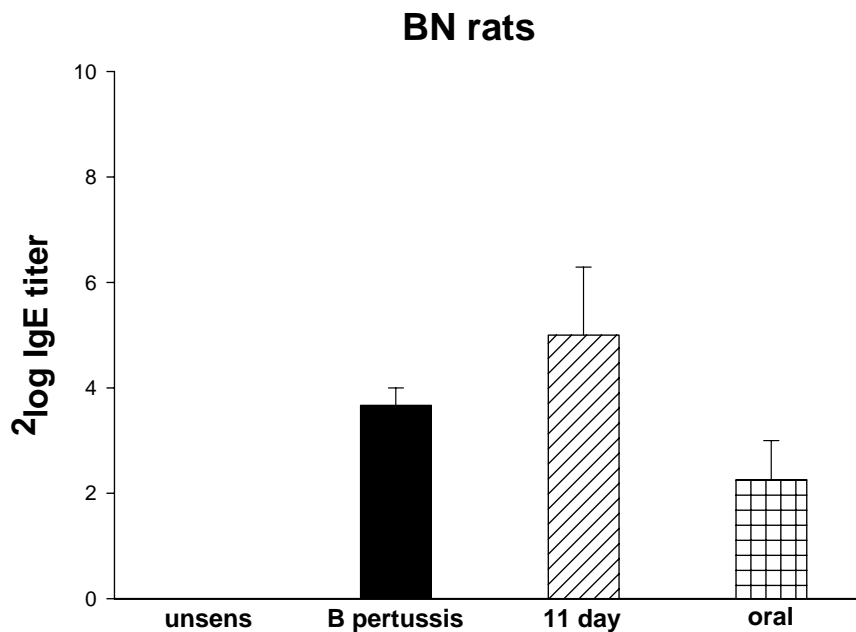


Fig. 2.- Anti ovalbumin (OVA)-specific IgE on *B pertussis* sensitized, 11 day sensitized and orally sensitized BN rats (n=4 each). The data are presented as mean $^2\log$ IgE titer \pm SEM of responding rats. Anti OVA-specific IgE could not be detected in SD exposed animals.

Spontaneous mucosal mast cell systemic release of RMCP II. BN rats showed higher RMCP II concentration in blood than SD rats. Furthermore, sham sensitized BN rats showed a further slight increase of RMCP II while no effect of sham sensitization was observed in SD rats. In contrast, RMCP II concentration was very significantly decreased in BN OVA-sensitized groups while it remained unchanged in SD OVA-sensitized groups (Fig. 3).

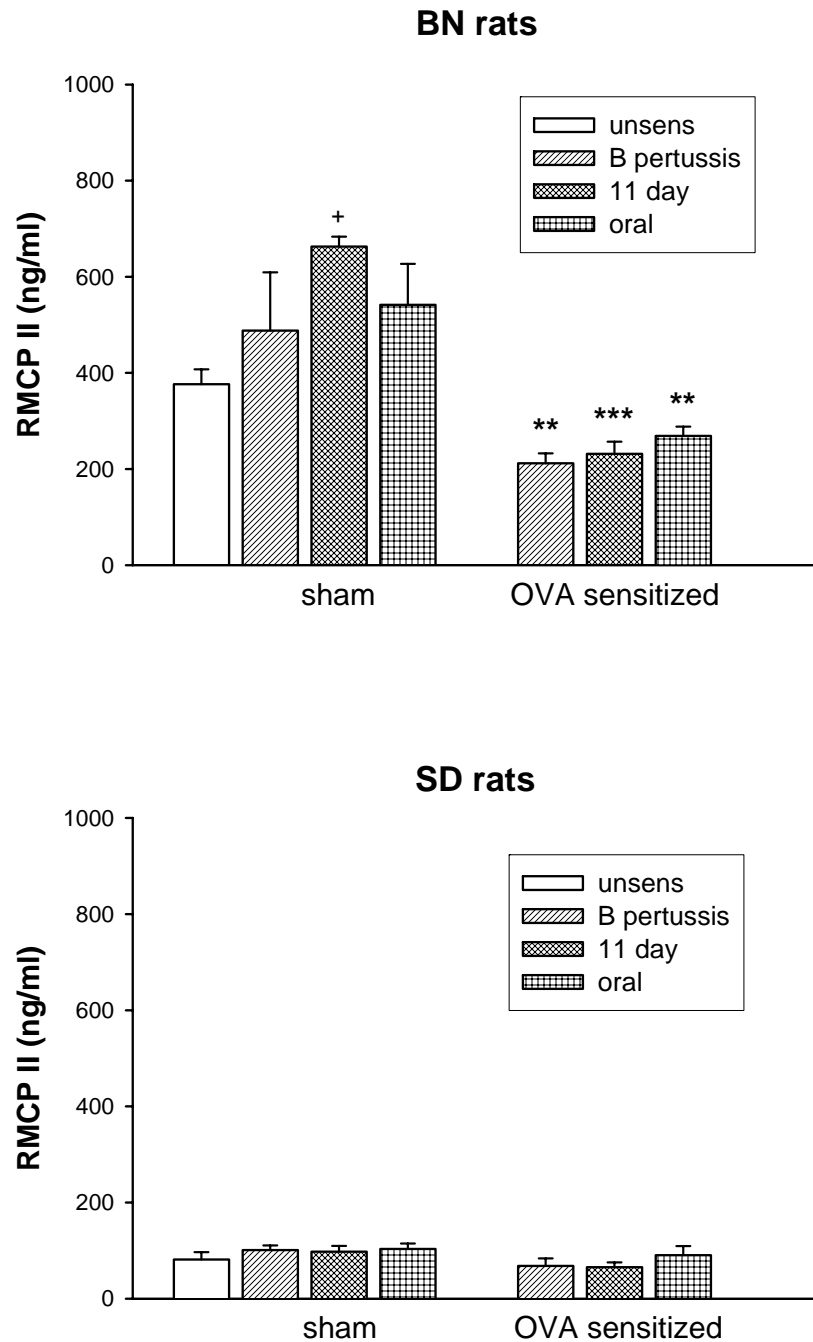


Fig. 3.- Rat Mast Cell Protease II (RMCP II) concentration (ng/ml) in serum from BN and SD rats. Bars represent mean \pm SEM from unsensitized control (BN n=10, SD n=7), sham sensitized (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral; n=4-5 each group), and ovalbumin sensitized rats (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral (n=6-10 each group). **P<0.01 or ***P<0.001 compared with its respective sham group; +P<0.05 compared with unsensitized control rats.

Mucosal mast cell activation. In contrast to basal RMCP II concentration results, challenge with OVA had the same effect on the two rat strains. OVA challenge resulted in a significant increase of serum RMCP II concentration only in *B pertussis* and in 11 day sensitized groups in both BN and SD strains. No changes in RMCP II concentration was observed in orally sensitized groups after OVA challenge in either BN or SD rats (Table 1).

Table 1.- Rat Mast Cell Protease II (RMCP II) concentration (ng/ml) in serum from unsensitized and OVA-sensitized rats before (T₀) and after (T_f, 3-h post-challenge values) gavage challenge. Rats received ovalbumin solution challenge (0.2 g/ml, 0.5 ml/rat).

BN RATS	T ₀	T _f
Unsensitized	250.14 ± 27.21	220.41 ± 50.49
<i>B pertussis</i> sensitized	212.46 ± 29.76	919.54 ± 94.2 ** ++
11 day sensitized	197.51 ± 20.58	916.67 ± 56.95 ** ++
Orally sensitized	268.67 ± 19.35	256.82 ± 46.84
SD RATS	T ₀	T _f
Unsensitized	58.39 ± 8.62	42.18 ± 3.12
<i>B pertussis</i> sensitized	52.92 ± 14.77	461.48 ± 20.14 ** ++
11 day sensitized	66.82 ± 9.32	524.67 ± 116.45 *** ++
Orally sensitized	90.01 ± 19.25	69.95 ± 13.84

Expressed as mean ± SEM from unsensitized control (n=4), *B pertussis* sensitized (n=4), 11 day sensitized (n=6) and orally sensitized (n=6) BN rats; means ± SEM from unsensitized control (n=4), *B pertussis* sensitized (n=4), 11 day sensitized (n=4) and orally sensitized (n=6) SD rats. **P<0.01 or ***P<0.001, respectively, compared with unsensitized controls; ++ P<0.01 compared with T₀ values of the same group.

RMCP II immunohistochemistry and mucosal mast cell count. BN control and sham sensitized rats showed a higher number of mucosal mast cells in the duodenum than SD rats (Fig. 4). Similar results were found in jejunum and ileum (data not shown). Consequences of OVA sensitization were different in BN and SD rats. While OVA sensitization significantly increased mucosal mast cell numbers independently of the protocol of sensitization used in SD rats, BN rats did not show such a clear effect. Systemic sensitization seems to increase mast cell number while orally induced sensitization did not. In fact, there was a slight decrease in the number of mast cells located at the mucosa of BN orally sensitized rats. In order to discard the possibility that this apparent lower number was a consequence of a long-lasting degranulation due to the OVA challenge performed earlier, the animals were split into two groups: 1) those that the interval between the challenge and the experiment had been 28 days or more, and 2) those that the interval was 7-10 days. Both subgroups showed a similar number of MMC (7.61 ± 0.95 in group 7-10 days (n=3); 8.54 ± 0.65 in group ≥ 28 days (n=3)), and in consequence a possible effect of the challenge was discarded.

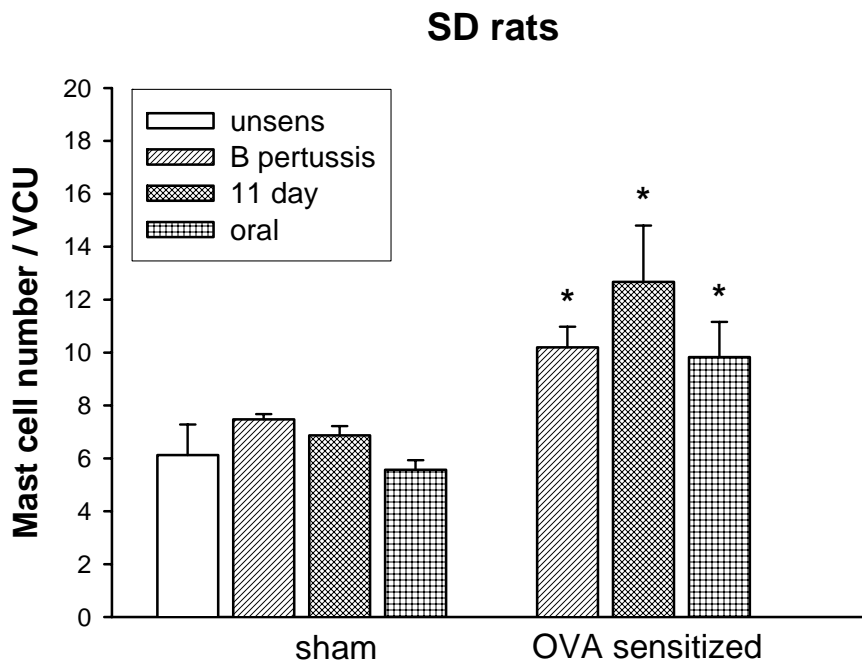
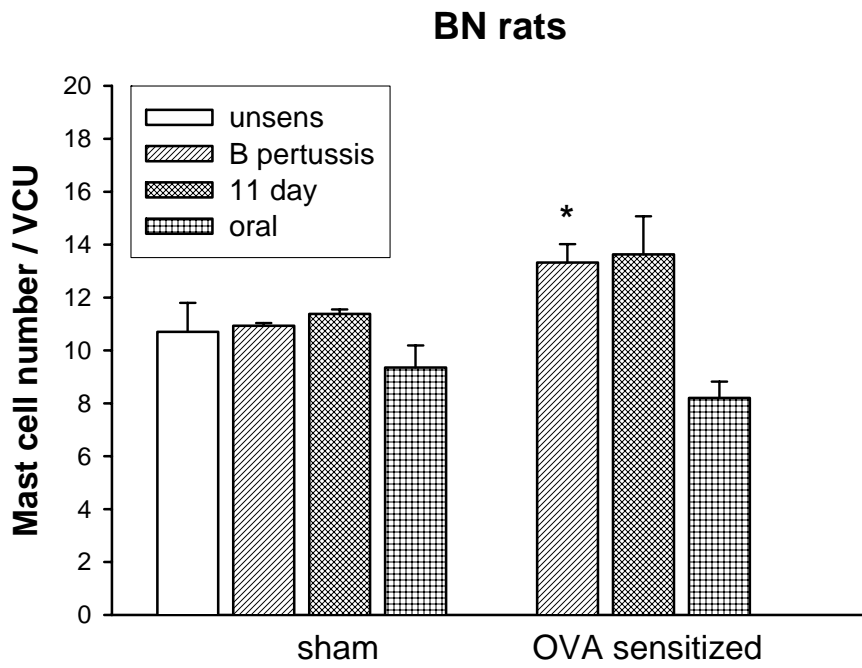


Fig. 4.- Duodenal mucosal mast cell number expressed per villus-crypt unit (VCU) counted in 7-10 units per section. Three to five sections were counted per rat. Bars represent mean \pm SEM from 5-9 rats from each hypersensitivity induction protocol (sham and sensitized) of BN or SD rats. * $P < 0.05$, compared with its respective sham group.

Intestinal mucosal mast cell activity. As with mast cell number results, mast cell activity was also different in BN and SD rats. BN rats also showed a higher spontaneous RMCP II release in the duodenum. Mast cell activity was not modified by OVA sensitization, except in orally sensitized BN rats, in which there was a significant decrease of the RMCP II released. In contrast, all groups of sensitized SD rats showed a similar increase of mast cell activity. This effect was of greater magnitude in the *B. pertussis* group (Fig. 5).

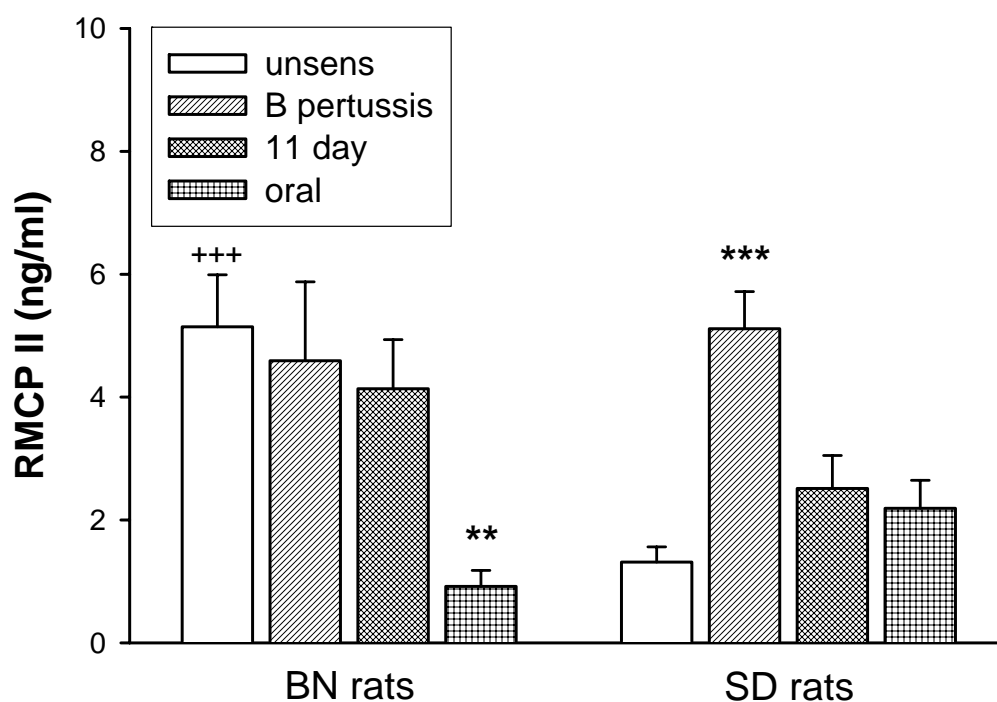


Fig. 5.- Rat Mast Cell Protease II (RMCP II) concentration (ng/ml) in duodenum perfusate from BN and SD rats. Mean \pm SEM are presented for unsensitized control (BN n=11, SD n=14), *Bordetella pertussis* sensitized (BN n=5, SD n=15), 11 day sensitized (BN n=10, SD n=5) and orally sensitized (BN n=5, SD n=6) rats. **P<0.01 or ***P<0.001, respectively, compared with unsensitized control rats of the same strain; +++P<0.001 compared with SD rats.

Intestinal motor evaluation: spontaneous motility. The duodenum was the section of the small intestine most affected by sensitization. Motor alterations in the jejunum and ileum were similar but of less magnitude than in the duodenum.

No differences were observed in the spontaneous motor activity of the duodenum between BN and SD rats. However, their response to sensitization was very different. Spontaneous activity of the intestine in BN rats was significantly increased in sham sensitized groups. The effect was similar in the 3 sham groups, independently of both the way of OVA administration or the use or not of adjuvants. Sensitization to OVA in BN rats did not further modify intestinal motor activity (Fig. 6).

In contrast, SD sham sensitized groups showed an intestinal activity similar to unsensitized control animals. Furthermore, OVA-sensitized SD rats showed a significant increase of motor activity. No differences were observed due to the protocol of sensitization (Fig. 6).

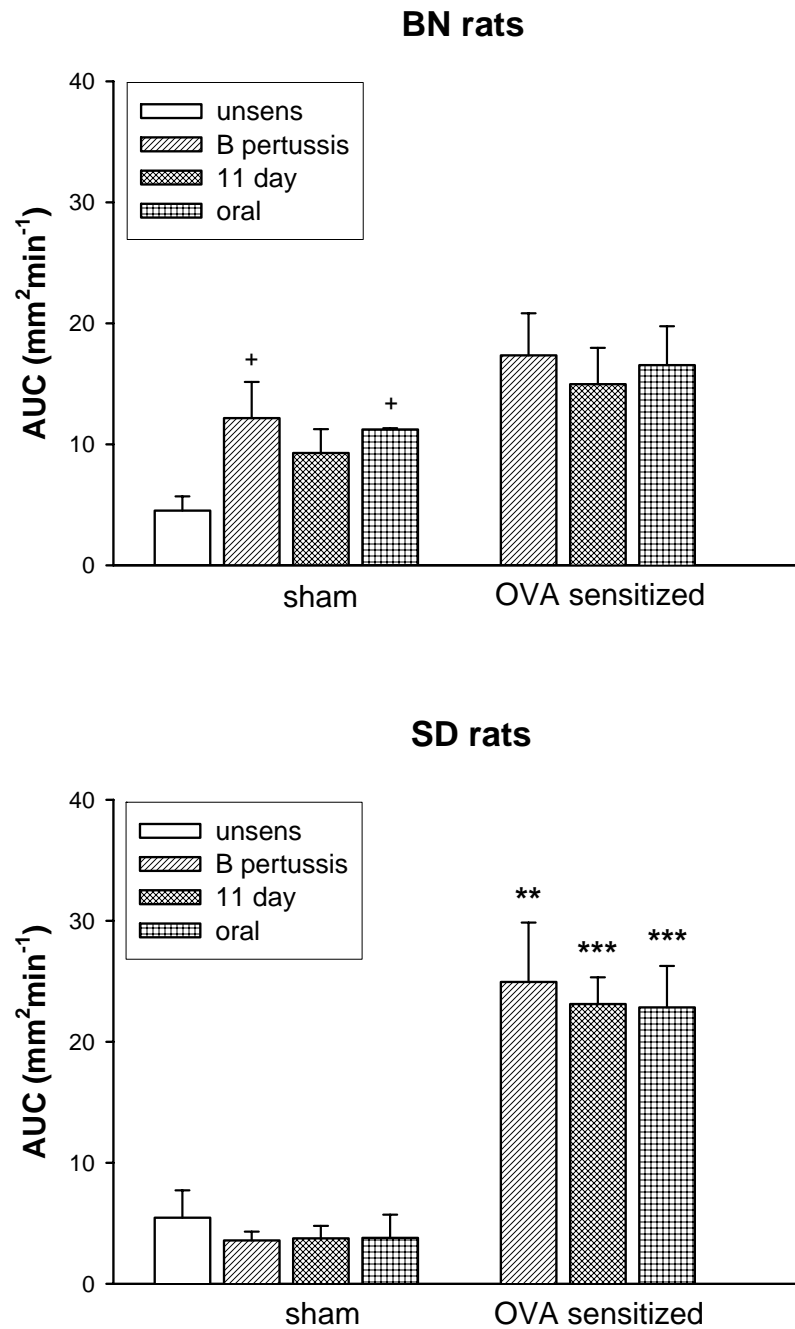


Fig. 6.- Quantification of the spontaneous motility (magnitude of the contraction) in the duodenum of BN and SD rats. Mean \pm SEM are presented for unsensitized control (BN n=6, SD n=6), sham sensitized (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral; n=4-6 each group), and ovalbumin sensitized rats (*Bordetella pertussis*, 11 day and oral (n=4-9 each group). **P<0.01 or ***P<0.001 compared with its respective sham group; +P<0.05 compared with unsensitized control rats.

Intestinal motor evaluation: inhibitory and excitatory tone.

In unsensitized control animals, L-NNA increased motor activity. The motor activity after L-NNA was of greater magnitude in BN than in SD rats, indicating that although inhibitory tone is present in both rat strains, the excitatory component of the motor response seems to be increased in BN rats. Sham sensitization showed a slight increase of AUC after L-NNA in both rat strains in comparison to unsensitized control rats. This effect was of bigger magnitude in sham sensitized BN groups. In contrast, orally sensitization to OVA had an opposite effect in BN and SD rats. While in SD rats sensitization abolished inhibitory tone (AUC before and after L-NNA was of the same magnitude), sensitization in BN rats did not abolish inhibitory tone but decreased the abnormal excitatory response (Fig. 7).

Different consequences of orally induced OVA sensitization. Orally sensitization to OVA had opposite effects in BN and SD rats in most of the parameters studied. Table 2 summarizes responses to orally induced OVA sensitization in both rat strains as a summary.

Table 2.- Summary of effects of orally induced sensitization to OVA in BN and SD rats.

	BN	SD
Anti OVA-specific IgE	Present	Absent
Basal systemic RMCP II	Decreased	Unchanged
RMCP II (challenge)	Unchanged	Unchanged
RMCP II in perfusate	Decreased	Unchanged
IMMC number	Unchanged	Increased
Spontaneous motility	Unchanged	Increased
Inhibitory tone	Unchanged	Abolished
Excitatory tone	Diminished	Unchanged

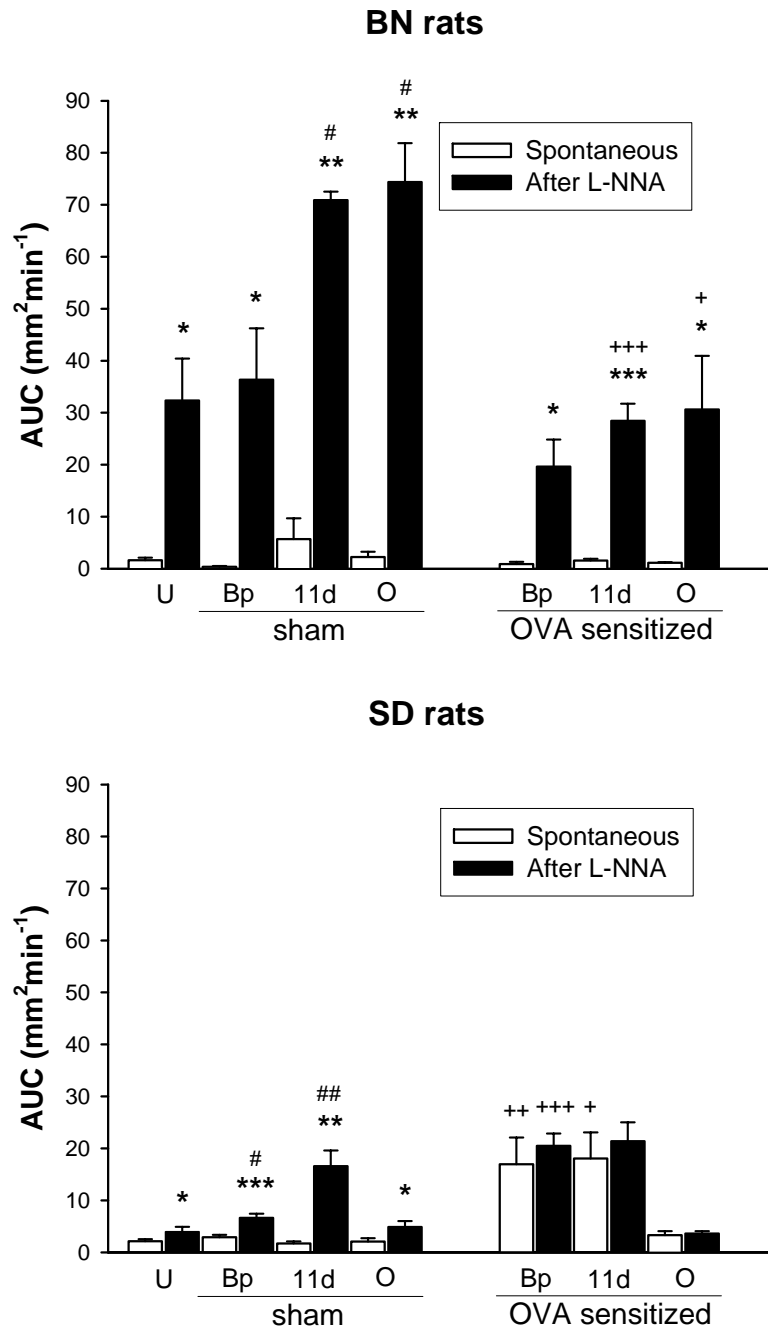


Figure 7.- Effect of L-NNA infusion on magnitude of contractions in the jejunum of BN and SD rats. Bars represent mean \pm SEM from unsensitized control (U) (BN n=6, SD n=6), sham sensitized (*Bordetella pertussis* (Bp), 11 day (11d) and oral (O); n=4-6 each group), and ovalbumin sensitized rats (*Bordetella pertussis* (Bp), 11 day (11d) and oral (O); n=4-9 each group). *P<0.05, **P<0.01 or ***P<0.001, respectively, compared with spontaneous motility before L-NNA in the same group; +P<0.05 or +++P<0.001, respectively, compared with its respective sham group in the same moment; #P<0.05 or ##P<0.01, respectively, compared with unsensitized control rats in the same moment.

DISCUSSION

This study shows that food sensitization occurs in both genetically predisposed and non predisposed animals. However, the mechanisms implicated and their consequences differ. In addition, orally induced sensitization to OVA in high-IgE responders seems to diminish mast cell activity and to reduce altered contractility of the intestine.

BN rats are well known to be high-IgE responders (11). Our results show that these animals have a higher concentration of IgE previous to sensitization. This result was expected due to the facility of these animals to respond to all sorts of potential antigens in the environment (38), but our results also demonstrate that BN rats show a higher number of mucosal mast cells and an increased mast cell activity.

Several studies have demonstrated a correlation between the response to stress and mast cell activity (30; 34). Sham groups included in our study allowed us to discriminate between the effect due to the experimental manipulation and the effect of the sensitization to OVA. Our study corroborates that stress (in this case induced by manipulation during sensitization protocol) can modify intestinal motor function. This effect was more evident in BN rats, which also showed a higher number of mast cells and of mast cell activity. These results show the high correlation between an abnormal mast cell response and the intestinal exacerbated motor response. The BN rat is a good model for human atopy and our results indicate that an exacerbated mast cell response could also derivate into abnormal motor responses of the intestine in humans. In fact, atopy in humans has been associated with irritable bowel disease (IBD) (26), a functional disorder characterized by increased motor response of the intestine (3).

Our results also corroborate the difficulty of identifying food allergies. Several clinical studies report that in patients with clinical diagnoses of food allergy, skin prick testing and even IgE analysis are quite often negative (1; 10). We demonstrate here that, especially in non-predisposed individuals, sensitization to ovalbumin does not induce specific IgE production, while sensitized animals show clear signs of response to OVA such as increased number of intestinal mast cells and increased mast cell activity. Production of OVA specific IgE seems to be independent of the induction protocol and whether adjuvants are used or not. It seems to be a genetically determined feature. However, the fact that response to challenge was similar in the two rat strains is very interesting. Only those animals that had been sensitized via parenteral showed a significant increase of RMCP II in serum. Neither BN nor SD rats orally sensitized to OVA did so. Our hypothesis is that immune response to orally induced

sensitization is a locally limited response as already suggested in humans (21). The intestine is the biggest entrance for all sorts of noxious agents and the GALT (gut associated lymphoid tissue) stops the majority of these agents crossing the gut barrier. Most of the immune responses induced in the intestine remain local. Our results indicate that in a similar way hypersensitivity reactions can be limited to the intestine. However, this does not imply that the gastrointestinal functional consequences of sensitization to food are not severe at least in relation to gastrointestinal function. Our results show the opposite. SD rats sensitized to ovalbumin presented higher mast cell number and higher mast cell activity. A consequence of this could be the motor alterations observed. But mast cell activity has also been associated with alterations of mucosa permeability and with a higher susceptibility to suffer from inflammatory intestinal disease (IBD) (24; 25).

Allergies have been associated with mast cell activation. The proposed mechanism is that mast cells are activated by specific IgE. We have already discussed above the possible association between a higher production of IgE and a higher mast cell activity. However, we did not anticipate that sensitization to OVA (independently of the protocol used) in BN rats could cause a decrease of mast cell activity. However, several studies have demonstrated that chronic exposure to OVA ameliorates asthma symptoms (31). This phenomenon is known as bystander suppression and could serve to ameliorate consequences of allergic disease. We hypothesize that BN rats are already responding to environmental stimuli with a higher mast cell activity. The administration of OVA could induce in these conditions bystander suppression for those antigens, reducing the total RMCP II concentration. The results we observed on the improvement of intestinal motor parameters in these animals indicate the need for further study. OVA sensitization could ameliorate those allergic responses in atopic humans and maybe indirectly improve other associated syndromes. However, the opposite results we observed in SD rats imply the need for a thorough diagnosis of the genetic background before implementing such a treatment.

We previously demonstrated that sensitization to OVA alters intestinal motor activity in SD rats (29). The main alteration is the suppression of inhibitory tone which would be responsible for the increased spontaneous activity observed. Inhibitory tone is essential for the intestine function. Suppression of inhibitory tone causes sustained contraction of the intestine (8). Patients with irritable bowel syndrome show an increase in the force of contraction both spontaneously and in response to neuroendocrine stimuli (16). Our results indicate that food sensitivity in non-atopic individuals could be a primary cause of IBS.

BN rats showed a motor activity that did not differ from control SD rats. However, when L-

NNA was applied a higher excitatory tone was observed. In accordance with the results observed in mast cell activity, sham sensitization increased intestinal motor activity, particularly the excitatory tone. Several mast cell mediators have been associated with smooth muscle contraction (32; 33). However, OVA sensitization in BN rats, in accordance with the observed decreased mast cell activity, did not induce a blockade of inhibitory tone but reduced the excitatory tone. In other words, OVA sensitization normalized intestinal motility in BN rats.

In conclusion, our study demonstrates that only atopy genetically predisposed rats show specific IgE in response to food allergens. Hypersensitivity to food allergens can also occur in non predisposed animals with important functional consequences. The response to orally induced sensitization to ovalbumin in both BN and SD rats was restricted to the intestine making it difficult to be diagnosed. Mast cell number and mast cell activity show a clear correlation to intestinal motor activity. Orally induced sensitization to OVA in atopy predisposed individuals could be used to ameliorate functional consequences of allergy.

ACKNOWLEDGEMENTS AND AFFILIATIONS

We thank A. Marco for his knowledgeable assistance with the immunohistochemistry study, to A. Acosta for his assistance with the animals and A. C. Hudson for editorial revision of the manuscript.

This work was supported by Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant SAF2002-03463 by Comissionat per a Universitats i Recerca, Generalitat de Catalunya, Grant 2001SGR 00214.

We are also grateful to Universitat Autònoma de Barcelona for the financial support of Y. Saavedra.

REFERENCESReference List

1. **Bischoff SC, Mayer JH and Manns MP.** Allergy and the gut. *Int Arch Allergy Immunol* 121: 270-283, 2000.
2. **Brandtzaeg P.** Review article: Homing of mucosal immune cells--a possible connection between intestinal and articular inflammation. *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 3: 24-37, 1997.
3. **Chey WY, Jin HO, Lee MH, Sun SW and Lee KY.** Colonic motility abnormality in patients with irritable bowel syndrome exhibiting abdominal pain and diarrhea. *Am J Gastroenterol* 96: 1499-1506, 2001.
4. **Crowe SE and Perdue MH.** Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* 103: 1075-1095, 1992.
5. **Crowe SE, Sestini P and Perdue MH.** Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* 99: 74-82, 1990.
6. **Crowe SE, Soda K, Stanis AM and Perdue MH.** Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am J Physiol* 264: G617-G623, 1993.
7. **Curtis GH, Patrick MK, Catto-Smith AG and Gall DG.** Intestinal anaphylaxis in the rat. Effect of chronic antigen exposure. *Gastroenterology* 98: 1558-1566, 1990.
8. **Giralt M and Vergara P.** Both afferent and efferent nerves are implicated in cholecystinin motor actions in the small intestine of the rat. *Regul Pept* 81: 73-80, 1999.
9. **He SH.** Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10: 309-318, 2004.

10. **Heine RG.** Pathophysiology, diagnosis and treatment of food protein-induced gastrointestinal diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 4: 221-229, 2004.
11. **Holt PG and Turner KJ.** Persistent IgE-secreting cells which are refractory to T-cell control. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 77: 45-46, 1985.
12. **Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M and Timens W.** The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin Exp Immunol* 129: 390-396, 2002.
13. **Hylkema MN, van der DM, Pater JM, Kampinga J, Nieuwenhuis P and Groen H.** Single expression of CD45RC and RT6 in correlation with T-helper 1 and T-helper 2 cytokine patterns in the rat. *Cell Immunol* 199: 89-96, 2000.
14. **Juanola C, Giralt M, Jimenez M, Mourelle M and Vergara P.** Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol* 275: G63-G67, 1998.
15. **Kaiser HB.** Risk factors in allergy/asthma. *Allergy Asthma Proc* 25: 7-10, 2004.
16. **Kellow JE, Eckersley GM and Jones M.** Enteric and central contributions to intestinal dysmotility in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 37: 168-174, 1992.
17. **Knippels LM, Houben GF, Spanhaak S and Penninks AH.** An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* 19: 78-82, 1999.
18. **Knippels LM, Penninks AH, Smit JJ and Houben GF.** Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 161-169, 1999.
19. **Knippels LM, Penninks AH, Spanhaak S and Houben GF.** Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin Exp Allergy* 28: 368-375, 1998.

20. **Knippels LM, Penninks AH, van Meeteren M and Houben GF.** Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem Toxicol* 37: 881-888, 1999.
21. **Lin XP, Magnusson J, Ahlstedt S, Dahlman-Hoglund A, Hanson LL, Magnusson O, Bengtsson U and Telemo E.** Local allergic reaction in food-hypersensitive adults despite a lack of systemic food-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol* 109: 879-887, 2002.
22. **Metcalfe DD.** Food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 73: 749-762, 1984.
23. **Negrao-Correa D, Adams LS and Bell RG.** Intestinal transport and catabolism of IgE: a major blood-independent pathway of IgE dissemination during a *Trichinella spiralis* infection of rats. *J Immunol* 157: 4037-4044, 1996.
24. **Perdue MH, Chung M and Gall DG.** Effect of intestinal anaphylaxis on gut function in the rat. *Gastroenterology* 86: 391-397, 1984.
25. **Perdue MH, Marshall J and Masson S.** Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* 98: 561-567, 1990.
26. **Petitpierre M, Gumowski P and Girard JP.** Irritable bowel syndrome and hypersensitivity to food. *Ann Allergy* 54: 538-540, 1985.
27. **Roehr CC, Edenharter G, Reimann S, Ehlers I, Worm M, Zuberbier T and Niggemann B.** Food allergy and non-allergic food hypersensitivity in children and adolescents. *Clin Exp Allergy* 34: 1534-1541, 2004.
28. Saavedra, Y. and Vergara, P. Ovalbumin sensitization in high-IgE responder rats reduces intestinal mucosal mast cell (IMMC) response. *Neurogastroenterol.Motil.* 16(6), 835. 2004.

Ref Type: Abstract

29. **Saavedra Y and Vergara P.** Hypersensitivity to ovalbumin induces chronic intestinal dysmotility and increases the number of intestinal mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 17: 112-122, 2005.
30. **Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T and Perdue MH.** Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278: G847-G854, 2000.
31. **Schramm CM, Puddington L, Wu C, Guernsey L, Gharraee-Kermani M, Phan SH and Thrall RS.** Chronic inhaled ovalbumin exposure induces antigen-dependent but not antigen-specific inhalational tolerance in a murine model of allergic airway disease. *Am J Pathol* 164: 295-304, 2004.
32. **Scott RB, Diamant SC and Gall DG.** Motility effects of intestinal anaphylaxis in the rat. *Am J Physiol* 255: G505-G511, 1988.
33. **Scott RB and Tan DT.** Mediation of altered motility in food protein induced intestinal anaphylaxis in Hooded-Lister rat. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 320-330, 1996.
34. **Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, Cao J, Kempuraj D and Conti P.** Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends Pharmacol Sci* 25: 563-568, 2004.
35. **Torrents D and Vergara P.** In vivo changes in the intestinal reflexes and the response to CCK in the inflamed small intestine of the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G543-G551, 2000.
36. **Turner MW, Barnett GE and Strobel S.** Mucosal mast cell activation patterns in the rat following repeated feeding of antigen. *Clin Exp Allergy* 20: 421-427, 1990.
37. **Vergara P, Saavedra Y and Juanola C.** Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol Motil* 14: 35-42, 2002.
38. **Wilson LM and Baldwin AL.** Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and

epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation* 6: 189-198, 1999.

DISCUSIÓN

El funcionamiento del sistema gastrointestinal tanto en situación fisiológica como patológica viene determinado por la respuesta integrada de tres sistemas ampliamente distribuidos por todo el organismo: sistema nervioso, sistema inmune y sistema endocrino. Estos sistemas se hallan en continua comunicación entre sí a través de mecanismos complejos.

Numerosos estudios han descrito cómo los estímulos intraluminales pueden inducir respuestas nerviosas y endocrinas. Recientemente se ha considerado que también el sistema inmune podría influir en las respuestas a nivel gastrointestinal.

Los mastocitos, aunque son considerados células del sistema inmune, responden a estímulos no sólo inmunológicos, sino a otros tipos de estímulo que pueden ser de naturaleza diversa, como neurotransmisores, estímulos nerviosos, hormonas, peptonas y cambios físicos.

Muchos estudios han descrito la implicación de los mastocitos en la patogénesis de la alergia alimentaria y en procesos inflamatorios del tracto gastrointestinal. Pero la presencia de mastocitos en los tejidos en condiciones fisiológicas hace intuir que estas células tienen también función defensiva y reguladora.

Según los resultados obtenidos en nuestro trabajo, y a pesar de la existencia de estudios que lo contradicen (Shanahan *et al.*, 1985; Heiman & Crews, 1984), la somatostatina tiene un claro efecto inhibitor sobre la degranulación de los mastocitos de la mucosa intestinal, tanto en condiciones de normalidad como de hiperplasia mastocitaria como consecuencia de la infección con *T. spiralis*. Esta contradicción en las acciones de la somatostatina se debe probablemente a diferentes respuestas a la somatostatina según el tipo de mastocito, tal y como demuestran estudios previos sobre la respuesta a sustancias neuromoduladoras de los diferentes tipos de mastocitos y el efecto supresor de la inflamación de la somatostatina en ratones infectados con *T. spiralis* (Kataeva *et al.*, 1994).

Aunque en este trabajo no hemos definido concretamente el mecanismo mediante el cual la somatostatina influye en la actividad mastocitaria, la presencia de receptores de

superficie para la somatostatina en los mastocitos refuerza la hipótesis de una acción directa, aunque no podemos descartar acciones a través de otras células inmunes o a través de neuronas sensibles a la somatostatina.

En cuanto a los resultados obtenidos en los experimentos con capsaicina, todo hace pensar que la acción de la somatostatina sobre los mastocitos de mucosa intestinal está mediada, por lo menos en parte, por vías aferentes vagales. Sin embargo, la disminución en la liberación de RMCP II observada por efecto de la somatostatina en ratas tratadas con capsaicina, apoya también la hipótesis de una acción directa de la somatostatina sobre los mastocitos.

Tal y como se describe en otros estudios (Stead, 1992b), en modelos de parasitosis intestinal existe remodelación nerviosa aferente tras la hiperplasia mastocitaria. También en nuestro caso, el aumento de la sensibilidad aferente vagal, además de la hiperplasia, podría ser uno de los factores responsables de la mayor liberación de RMCP II observada en el modelo de *T. spiralis*.

Se ha demostrado que la somatostatina puede inhibir vías nerviosas aferentes vagales a través de receptores específicos (Booth *et al.*, 2001). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que esta respuesta pueda estar mediada por la acción de la somatostatina sobre otras células que se localicen próximas a terminales nerviosos aferentes, como por ejemplo los mastocitos. Además, se ha visto que algunos mediadores mastocitarios modifican la actividad de las vías aferentes vagales (Blackshaw & Grundy, 1993; Williams *et al.*, 1995).

Estudios preliminares en nuestro laboratorio han demostrado que en condiciones fisiológicas los mastocitos de la mucosa intestinal están regulados por un reflejo nervioso que implica vías aferentes vagales e inervación adrenérgica. Hay que destacar también, que la presencia intraluminal de hidrolizado de ovoalbúmina es capaz de estimular este reflejo (Juanola *et al.*, 1998; Vergara *et al.*, 2002).

Así pues, y según nuestros resultados, la somatostatina y sus análogos podrían utilizarse para disminuir la actividad mastocitaria y prevenir las respuestas anómalas de los mastocitos en procesos inflamatorios y alérgicos del intestino o que cursen con hipersensibilidad visceral, como por ejemplo el síndrome del intestino irritable (IBS).

Existen numerosos estudios sobre la implicación de los mastocitos en la respuesta alérgica y las alteraciones de los mecanismos fisiológicos que conlleva tanto a nivel gastrointestinal como en otros sistemas del organismo. Dichos estudios utilizan mayoritariamente animales sensibilizados experimentalmente vía sistémica. La mayoría de ellos dejan a un lado las posibles alteraciones inducidas por el proceso de sensibilización en sí mismo a largo plazo, y se centran en los cambios que induce la exposición al antígeno en el transporte iónico, la permeabilidad y la motilidad intestinales (Scott *et al.*, 1990; Vermillion *et al.*, 1988).

En la realización de este trabajo hemos utilizado tres modelos de sensibilización previamente descritos (Crowe *et al.*, 1993; Knippels *et al.*, 1999a) en rata, dos de ellos vía parenteral y el último vía oral. De estos tres modelos de sensibilización, el modelo oral es el más parecido al proceso de sensibilización natural, ya que no se administran adyuvantes junto con el antígeno, y éste es siempre administrado vía oral (Knippels *et al.*, 1998b).

En los individuos genéticamente predispuestos (atópicos), la respuesta alérgica a proteínas de la dieta se debe generalmente a una sobreproducción de IgEs (Sutton & Gould, 1993). Esta predisposición al desarrollo de alergias se ha descrito también en la cepa de rata Brown Norway (BN) (Holt & Turner, 1985). Con el objetivo de comparar si el proceso de sensibilización tenía consecuencias diferentes según la predisposición genética, hemos utilizado dos cepas de rata: Sprague-Dawley (SD) y BN.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo hacen pensar que la sensibilización sólo induce producción de IgEs específicas en individuos predispuestos genéticamente. Aunque no podemos descartar que la respuesta a la ovoalbúmina en las ratas SD sea una respuesta independiente de IgEs, es probable que se trate de una respuesta local mediada por IgEs, como se ha descrito en humanos (Lin *et al.*, 2002). Tampoco podemos descartar diferencias en la captación y procesamiento del antígeno entre las dos cepas, que podrían determinar el grado de alergenidad del mismo, tal y como se ha descrito previamente (Kimber & Dearman, 2001).

La utilización de toxina de *Bordetella pertussis* como adyuvante favorece la producción de IgEs, aunque sólo en individuos predispuestos en los que existe una mayor producción de IgEs es detectable la proporción específica frente a un antígeno concreto.

Aparte de los niveles de IgEs, otro de los parámetros valorados es la concentración sérica basal de RMCP II, indicador del grado de activación de la población mastocitaria mucosa. En las ratas BN esta concentración es más alta que en las ratas SD, probablemente debido a una población mastocitaria más activa, ya sea por mayor proporción de IgEs unidas a su membrana, por mayor número de mastocitos de mucosa o por otros mecanismos más complejos. Paradójicamente, tras la sensibilización la concentración de RMCP II se mantiene en las ratas SD, mientras que disminuye considerablemente en las ratas BN. La respuesta natural basal de las ratas BN a antígenos ambientales y la posterior sensibilización experimental a la ovoalbúmina podría inducir *bystander suppression* para esos antígenos, reduciendo la liberación de RMCP II como consecuencia de una menor activación mastocitaria. En este caso la ovoalbúmina tendría claramente un efecto estabilizador sobre los mastocitos de las ratas BN.

De las diferencias entre las dos cepas en los niveles séricos de IgEs y RMCP II en respuesta a la sensibilización, se deduce que estos dos parámetros no son siempre útiles en el diagnóstico de la alergia alimentaria.

En relación con el efecto de la sensibilización sobre la actividad mastocitaria, está el número de mastocitos de la mucosa intestinal. En las ratas BN el número de mastocitos de mucosa intestinal es ligeramente superior que en las ratas SD. Paradójicamente, tras la sensibilización el número de mastocitos aumenta en las ratas no predispuestas, mientras que en las predispuestas se mantiene e incluso disminuye en el modelo de vía oral. A pesar de estas diferencias en el número de mastocitos, no creemos que éste sea el único factor que determina las diferencias observadas en la actividad mastocitaria entre cepas.

Los resultados obtenidos en los experimentos de perfusión confirman la hipótesis de una población mastocitaria más activa a nivel intestinal en las ratas BN. Además, el efecto estabilizador de la sensibilización a la ovoalbúmina en las ratas BN, probablemente debido a *bystander suppression*, y el efecto estimulador de la sensibilización en las ratas SD también queda reflejado a este nivel.

Otro de los parámetros que hemos valorado es la respuesta a la exposición oral al antígeno (challenge), que se utiliza en estudios de hipersensibilidad para el estudio de la respuesta alérgica. Nosotros la hemos utilizado no con el objetivo de inducir dicha respuesta, sino como control de la sensibilización del animal; aunque posteriormente hemos visto que sólo es útil como tal en el caso de los modelos de sensibilización vía parenteral. Dos posibles hipótesis explicarían la respuesta no visible en las ratas sensibilizadas vía oral. La primera hipótesis sería que la sensibilización vía oral actúe sólo sobre la población mastocitaria intestinal, lo cual daría lugar a menor producción de RMCP II. La segunda hipótesis sería que el tiempo transcurrido en el momento del challenge desde la última exposición al antígeno difiere en los diferentes modelos de sensibilización utilizados en este trabajo. Así, en los modelos parenterales transcurren entre dos y tres semanas, mientras que en el modelo oral transcurre sólo una semana desde la última dosis de ovoalbúmina. Una semana podría no ser tiempo suficiente para que los mastocitos hayan recuperado los niveles de RMCP II en sus gránulos, y por tanto la ovoalbúmina estimularía la degranulación de mastocitos con contenido bajo en proteasa.

Los resultados de los experimentos de motilidad muestran que la sensibilización induce hiperomotilidad intestinal en ratas predispuestas y no predispuestas. El efecto de la infusión de L-NNA demuestra que la hiperomotilidad observada en las ratas SD sensibilizadas se debe parcialmente a inhibición de vías nerviosas inhibitorias nitrérgicas. Pero la respuesta parece indicar que el tono inhibitorio se mantiene en las ratas BN sensibilizadas, y por tanto la hiperomotilidad podría también ser debida a activación de vías nerviosas excitatorias.

En el caso de la rata SD sensibilizada vía oral, las alteraciones del patrón de motilidad intestinal y el aumento en el número de mastocitos son similares a los observados en los modelos de sensibilización vía sistémica. Pero a pesar de esto, hay que destacar que no se detectan niveles elevados ni de IgEs ni de RMCP II en suero en respuesta al antígeno, lo cual podría indicar el desarrollo de tolerancia oral en lugar de sensibilización. Esta última hipótesis queda descartada, según los resultados de los experimentos realizados *in vitro*, en los que observamos que los mastocitos de estas ratas sensibilizadas vía oral presentan mayor liberación basal de RMCP II que los de ratas controles. Todos estos datos sugieren que los mastocitos en estos animales están en un estado continuo de

excitación-activación que podría ser responsable del mantenimiento de una excitabilidad aumentada en las estructuras nerviosas del intestino.

Los mastocitos se localizan anatómicamente próximos a los nervios entéricos (Stead *et al.*, 1987) y por lo tanto, los mediadores inflamatorios que liberan pueden afectar a la función del sistema nervioso entérico (Castro *et al.*, 1987; Cooke, 1994; Wang *et al.*, 1991) y a la contractibilidad del músculo liso (Vermillion *et al.*, 1988). Este fenómeno explicaría las alteraciones en la percepción visceral observadas en pacientes con IBS. Hay que considerar, por otro lado, que algunas sustancias secretadas por los mastocitos son nociceptivas y podrían por lo tanto, además de disminuir el umbral de sensibilidad de vías nerviosas aferentes, provocar dolor. Algunos de los mediadores liberados por los mastocitos pueden alterar los patrones de motilidad intestinal (Cooke, 1992; Liu *et al.*, 2003), contribuyendo también así a la manifestación sintomática del IBS.

Según los parámetros que hemos estudiado, estamos en condiciones de afirmar que la sensibilización en sí misma, aún en ausencia de estímulo, provoca alteraciones en parámetros fisiológicos como la motilidad intestinal basal, el grado de excitación-activación mastocitaria, y el número de mastocitos. Además, a partir de las diferencias observadas entre las dos cepas, podemos decir que los factores genéticos determinan el grado de alteración de estos parámetros. Aunque como sabemos, la respuesta alérgica es probablemente de efecto más inmediato y de consecuencias más graves, desde el punto de vista de la etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal y del IBS, sin duda alguna la sensibilización tiene efectos a largo plazo.

CONCLUSIONES

- 1- La somatostatina, actuando directamente sobre receptores específicos de superficie y también en parte por mediación de vías aferentes vagales, disminuye la actividad de los mastocitos de la mucosa duodenal en condiciones fisiológicas y de hiperplasia intestinal, y por lo tanto podría prevenir las consecuencias de la hiperplasia mastocitaria intestinal. La somatostatina puede estar implicada en la regulación de la función mastocitaria y tener un efecto modulador durante la respuesta inflamatoria del intestino.
- 2- El aumento en la liberación de RMCP II a nivel intestinal está directamente relacionado con el aumento en el número de mastocitos en el modelo de hiperplasia intestinal con *T. spiralis*.
- 3- El proceso de sensibilización a proteínas de la dieta en la rata da lugar a hipermotilidad crónica en el intestino delgado y alteración del número de mastocitos en la mucosa duodenal. Los mastocitos, como células del sistema inmune que están en íntimo contacto con estructuras nerviosas que controlan la motilidad, están implicados en la manifestación de estas alteraciones.
- 4- La respuesta a la administración de L-NNA hace pensar que la hipermotilidad observada en los animales sensibilizados podría ser debida, como mínimo en parte, a la disminución del tono inhibitorio basal.
- 5- Factores genéticos, la vía de exposición al alérgeno y la utilización o no de adyuvantes durante el proceso de sensibilización, influyen en la manifestación de las alteraciones inducidas por la sensibilización.
- 6- Las ratas BN presentan una población mastocitaria mucosa más activa que las ratas SD. La sensibilización a la ovoalbúmina en estas ratas induce una estabilización aparente de los mastocitos de mucosa intestinal que se manifiesta con disminución en la liberación de RMCP II a nivel sistémico y local y tendencia a la disminución en el número de IMMC.

- 7- La sensibilización a la ovoalbúmina en ratas SD hace que los mastocitos de la mucosa intestinal presenten un estado de mayor excitación-activación, que se manifiesta con aumento en la liberación de RMCP II a nivel local y aumento en el número de IMMC.
- 8- La valoración de los niveles séricos de IgEs y del incremento en la liberación de mediadores mastocitarios en respuesta al challenge, no siempre es un método adecuado para el diagnóstico de enfermedades alérgicas.
- 9- El proceso de sensibilización induce producción de IgEs específicas en ratas genéticamente predispuestas pero no en ratas no predispuestas.
- 10- La sensibilización a la ovoalbúmina, tanto parenteral como enteral, induce cambios crónicos en la sensibilidad de los mastocitos de mucosa. La activación crónica de los mastocitos induce alteraciones crónicas de la actividad motora intestinal.

Conclusión final:

La somatostatina actúa como moduladora de la actividad mastocitaria de la rata en condiciones fisiológicas y durante la hiperplasia intestinal.

El proceso de sensibilización en sí mismo induce cambios en la población mastocitaria y en los circuitos neuronales implicados en la regulación de la motilidad intestinal, y por lo tanto, altera la respuesta intestinal a cualquier estímulo y la actividad motora espontánea del intestino. Este fenómeno puede ser uno de los responsables de la hipersensibilidad intestinal descrita en pacientes con IBS.

BIBLIOGRAFÍA

- ABRAMS G.D., BAUER H. & SPRINZ H. (1963) Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germ-free and conventional mice. *Lab Invest* **12**, 355-364.
- ARTUC M., HERMES B., STECKELINGS U.M., GRUTZKAU A. & HENZ B.M. (1999) Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Exp.Dermatol.* **8**, 1-16.
- ATKINSON H.A., JOHNSON I.T., GEE J.M., GRIGORIADOU F. & MILLER K. (1996) Brown Norway rat model of food allergy: effect of plant components on the development of oral sensitization. *Food Chem.Toxicol.* **34**, 27-32.
- ATKINSON H.A. & MILLER K. (1994) Assessment [correction of Assessment] of the brown Norway rat as a suitable model for the investigation of food allergy. *Toxicology* **91**, 281-288.
- BAIRD A.W., CUTHBERT A.W. & PEARCE F.L. (1985) Immediate hypersensitivity reactions in epithelia from rats infected with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Br.J.Pharmacol.* **85**, 787-795.
- BARBARA G., DE GIORGIO R., STANGHELLINI V., CREMON C., SALVIOLI B. & CORINALDESI R. (2004a) New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment.Pharmacol.Ther.* **20 Suppl 2**, 1-9.
- BARBARA G., STANGHELLINI V., DE GIORGIO R., CREMON C., COTTRELL G.S., SANTINI D., PASQUINELLI G., MORSELLI-LABATE A.M., GRADY E.F., BUNNETT N.W., COLLINS S.M. & CORINALDESI R. (2004b) Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* **126**, 693-702.
- BARBARA G., VALLANCE B.A. & COLLINS S.M. (1997) Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice. *Gastroenterology* **113**, 1224-1232.
- BARBARA G., XING Z., HOGABOAM C.M., GAULDIE J. & COLLINS S.M. (2000) Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* **46**, 344-349.
- BAUER O. & RAZIN E. (2000) Mast Cell-Nerve Interactions. *News Physiol Sci.* **15**, 213-218.
- BAYLISS W.M. & STARLING E.H. (1900) The movements and the innervation of the large intestine. *J Physiol (London)* **26**, 107-118.(Abstract)
- BAZIN H. & PLATTEAU B. (1976) Production of circulating reaginic (IgE) antibodies by oral administration of ovalbumin to rats. *Immunology* **30**, 679-684.

- BEFUS A.D., CHIN B., PICK J., EVANS S., OSBORN S. & FORSTROM J. (1995) Proteinases of rat mast cells. Peritoneal but not intestinal mucosal mast cells express mast cell proteinase 5 and carboxypeptidase A. *J.Immunol.* **155**, 4406-4411.
- BEFUS D., GOODACRE R., DYCK N. & BIENENSTOCK J. (1985) Mast cell heterogeneity in man. I. Histologic studies of the intestine. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **76**, 232-236.
- BERIN M.C., KILIAAN A.J., YANG P.C., GROOT J.A., KITAMURA Y. & PERDUE M.H. (1998) The influence of mast cells on pathways of transepithelial antigen transport in rat intestine. *J.Immunol.* **161**, 2561-2566.
- BERIN M.C., KILIAAN A.J., YANG P.C., GROOT J.A., TAMINIAU J.A. & PERDUE M.H. (1997) Rapid transepithelial antigen transport in rat jejunum: impact of sensitization and the hypersensitivity reaction. *Gastroenterology* **113**, 856-864.
- BERTHOUD H.R., KRESSEL M., RAYBOULD H.E. & NEUHUBER W.L. (1995) Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by in vivo DiI-tracing. *Anat.Embryol.(Berl)* **191**, 203-212.
- BIENENSTOCK J., TOMIOKA M., MATSUDA H., STEAD R.H., QUINONEZ G., SIMON G.T., COUGHLIN M.D. & DENBURG J.A. (1987) The role of mast cells in inflammatory processes: evidence for nerve/mast cell interactions. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **82**, 238-243.
- BISCHOFF S.C., MAYER J.H. & MANNS M.P. (2000) Allergy and the gut. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **121**, 270-283.
- BISCHOFF S.C., SCHWENGBERG S., WORDELMANN K., WEIMANN A., RAAB R. & MANNS M.P. (1996a) Effect of c-kit ligand, stem cell factor, on mediator release by human intestinal mast cells isolated from patients with inflammatory bowel disease and controls. *Gut* **38**, 104-114.
- BISCHOFF S.C., WEDEMEYER J., HERRMANN A., MEIER P.N., TRAUTWEIN C., CETIN Y., MASCHEK H., STOLTE M., GEBEL M. & MANNS M.P. (1996b) Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease. *Histopathology* **28**, 1-13.
- BLACKSHAW L.A. & GRUNDY D. (1993) Effects of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the discharge of vagal mechanoreceptors and motility in the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J.Auton.Nerv.Syst.* **45**, 51-59.
- BLUMBERG R.S., GERDES D., CHOTT A., PORCELLI S.A. & BALK S.P. (1995) Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol.Rev.* **147**, 5-29.
- BONINI S., LAMBIASE A., BONINI S., ANGELUCCI F., MAGRINI L., MANNI L. & ALOE L. (1996) Circulating nerve growth factor levels are increased in humans with allergic diseases and asthma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 10955-10960.

- BOOTH C.E., KIRKUP A.J., HICKS G.A., HUMPHREY P.P. & GRUNDY D. (2001) Somatostatin sst(2) receptor-mediated inhibition of mesenteric afferent nerves of the jejunum in the anesthetized rat. *Gastroenterology* **121**, 358-369.
- BRANDTZAEG P. (1996) History of oral tolerance and mucosal immunity. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **778**, 1-27.
- BUENO L., FERRE J.P. & RUCKEBUSCH Y. (1978) Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *Am.J.Dig.Dis.* **23**, 690-695.
- BUENO L., FIORAMONTI J., DELVAUX M. & FREXINOS J. (1997) Mediators and pharmacology of visceral sensitivity: from basic to clinical investigations. *Gastroenterology* **112**, 1714-1743.
- BURSTEIN H.J., SHEA C.M. & ABBAS A.K. (1992) Aqueous antigens induce in vivo tolerance selectively in IL-2- and IFN-gamma-producing (Th1) cells. *J.Immunol.* **148**, 3687-3691.
- BYARS N.E. & FERRARESI R.W. (1976) Intestinal anaphylaxis in the rat as a model of food allergy. *Clin.Exp.Immunol.* **24**, 352-356.
- CAREAU E., SIROIS J. & BISSONNETTE E.Y. (2002) Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol* **26**, 579-586.
- CASTAGLIUOLO I., LAMONT J.T., QIU B., FLEMING S.M., BHASKAR K.R., NIKULASSON S.T., KORNETSKY C. & POTHOUKAKIS C. (1996) Acute stress causes mucin release from rat colon: role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am.J.Physiol* **271**, G884-G892
- CASTEX N., FIORAMONTI J., FARGEAS M.J., MORE J. & BUENO L. (1994) Role of 5-HT₃ receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology* **107**, 976-984.
- CASTRO G.A. & ARNTZEN C.J. (1993) Immunophysiology of the gut: a research frontier for integrative studies of the common mucosal immune system. *Am.J.Physiol* **265**, G599-G610
- CASTRO G.A. & FAIRBAIRN D. (1969) Carbohydrates and lipids in *Trichinella spiralis* larvae and their utilization in vitro. *J.Parasitol.* **55**, 51-58.
- CASTRO G.A., HARARI Y. & RUSSELL D. (1987) Mediators of anaphylaxis-induced ion transport changes in small intestine. *Am.J.Physiol* **253**, G540-G548
- CAULFIELD J.P., LEWIS R.A., HEIN A. & AUSTEN K.F. (1980) Secretion in dissociated human pulmonary mast cells. Evidence for solubilization of granule contents before discharge. *J.Cell Biol.* **85**, 299-312.
- CHASE M. (1946) Inhibition of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc Soc Exp Biol Med* **61**, 257(abstract)

- CODE C.F. & PICKARD D.W. (1973) The importance of the lymphatic system in the absorption of water from the intestine. *J.Physiol* **231**, 40P-41P.
- COLLINS S.M. (1996) The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* **111**, 1683-1699.
- COLLINS S.M. (2001) Stress and the Gastrointestinal Tract IV. Modulation of intestinal inflammation by stress: basic mechanisms and clinical relevance. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **280**, G315-G318
- COLLINS S.M., VALLANCE B., BARBARA G. & BORGAONKAR M. (1999) Putative inflammatory and immunological mechanisms in functional bowel disorders. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* **13**, 429-436.
- COOKE H.J. (1992) Neuro-modulation of ion secretion by inflammatory mediators. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **664**, 346-352.
- COOKE H.J. (1994) Neuroimmune signaling in regulation of intestinal ion transport. *Am.J.Physiol* **266**, G167-G178
- CROWE S.E. & PERDUE M.H. (1992a) Functional abnormalities in the intestine associated with mucosal mast cell activation. *Reg Immunol.* **4**, 113-117.
- CROWE S.E. & PERDUE M.H. (1992b) Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* **103**, 1075-1095.
- CROWE S.E., SESTINI P. & PERDUE M.H. (1990) Allergic reactions of rat jejunal mucosa. Ion transport responses to luminal antigen and inflammatory mediators. *Gastroenterology* **99**, 74-82.
- CROWE S.E., SODA K., STANISZ A.M. & PERDUE M.H. (1993) Intestinal permeability in allergic rats: nerve involvement in antigen-induced changes. *Am.J.Physiol* **264**, G617-G623
- CUMMINS A.G., MUNRO G.H., MILLER H.R. & FERGUSON A. (1988) Association of maturation of the small intestine at weaning with mucosal mast cell activation in the rat. *Immunol.Cell Biol.* **66 (Pt 5-6)**, 417-422.
- CURTIS G.H., PATRICK M.K., CATTO-SMITH A.G. & GALL D.G. (1990) Intestinal anaphylaxis in the rat. Effect of chronic antigen exposure. *Gastroenterology* **98**, 1558-1566.
- DAHLMAN-HOGLUND A., DAHLGREN U., AHLSTEDT S., HANSON L.A. & TELEMOS E. (1995) Bystander suppression of the immune response to human serum albumin in rats fed ovalbumin. *Immunology* **86**, 128-133.
- DAHLMAN-HOGLUND A., HANSON L.A. & AHLSTEDT S. (1997) Induction of oral tolerance with effects on numbers of IgE-carrying mast cells and on bystander suppression in young rats. *Clin.Exp.Immunol.* **108**, 128-137.

- DE WIT D., VAN MECHELEN M., RYELANDT M., FIGUEIREDO A.C., ABRAMOWICZ D., GOLDMAN M., BAZIN H., URBAIN J. & LEO O. (1992) The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. *J.Exp.Med.* **175**, 9-14.
- DEARMAN R.J., CADDICK H., BASKETTER D.A. & KIMBER I. (2000) Divergent antibody isotype responses induced in mice by systemic exposure to proteins: a comparison of ovalbumin with bovine serum albumin. *Food Chem.Toxicol.* **38**, 351-360.
- DEARMAN R.J., CADDICK H., STONE S., KENNA J.G., BASKETTER D.A. & KIMBER I. (2002) Immunogenic properties of rapidly digested food proteins following gavage exposure of mice: a comparison of ovalbumin with a potato acid phosphatase preparation. *Food Chem.Toxicol.* **40**, 625-633.
- DIAMANT S.C., GALL D.G. & SCOTT R.B. (1989) The effect of intestinal anaphylaxis on postprandial motility in the rat. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **67**, 1326-1330.
- DONG W.Z., ZOU D.W., LI Z.S., ZOU X.P., ZHU A.Y., XU G.M., YIN N., GONG Y.F., SUN Z.X. & MAN X.H. (2004) Study of visceral hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Chin J.Dig.Dis.* **5**, 103-109.
- DVORAK A.M., SCHLEIMER R.P. & LICHTENSTEIN L.M. (1988) Human mast cells synthesize new granules during recovery from degranulation. In vitro studies with mast cells purified from human lungs. *Blood* **71**, 76-85.
- EBERT E.C. (1998) Tumour necrosis factor-alpha enhances intraepithelial lymphocyte proliferation and migration. *Gut* **42**, 650-655.
- ELSON C.O., CONG Y., IQBAL N. & WEAVER C.T. (2001) Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin.Immunol.* **13**, 187-194.
- ENERBACK L. (1966a) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye-binding and metachromatic properties. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **66**, 303-312.
- ENERBACK L. (1966b) Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. I. Effects of fixation. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.* **66**, 289-302.
- ENERBACK L., LOWHAGEN G., LOWHAGEN O. & WINGREN U. (1981) The effect of polymyxin B and some mast-cell constituents on mucosal mast cells in the duodenum of the rat. *Cell Tissue Res.* **214**, 239-246.
- ENERBACK L. & LOWHAGEN G.B. (1979) Long term increase of mucosal mast cells in the rat induced by administration of compound 48/80. *Cell Tissue Res.* **198**, 209-215.
- ERCAN F., SAN T. & CAVDAR S. (1999) The effects of cold-restraint stress on urinary bladder wall compared with interstitial cystitis morphology. *Urol.Res.* **27**, 454-461.

- ERMEL R.W., KOCK M., GRIFFEY S.M., REINHART G.A. & FRICK O.L. (1997) The atopic dog: a model for food allergy. *Lab Anim Sci.* **47**, 40-49.
- FARGEAS M.J., FIORAMONTI J. & BUENO L. (1993) Involvement of capsaicin-sensitive afferent nerves in the intestinal motor alterations induced by intestinal anaphylaxis in rats. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **101**, 190-195.
- FARGEAS M.J., THEODOUROU V., FIORAMONTI J. & BUENO L. (1992) Relationship between mast cell degranulation and jejunal myoelectric alterations in intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology* **102**, 157-162.
- FERGUSON A. & SALLAM J. (1992) Mucosal immunity to oral vaccines. *Lancet* **339**, 179
- FOREMAN J.C. & PIOTROWSKI W. (1984) Peptides and histamine release. *J.Allergy Clin.Immunol.* **74**, 127-131.
- FRIEDMAN A. & WEINER H.L. (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 6688-6692.
- FRIEND D.S., GHILDYAL N., AUSTEN K.F., GURISH M.F., MATSUMOTO R. & STEVENS R.L. (1996) Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *J.Cell Biol.* **135**, 279-290.
- FURNESS J.B. & COSTA M. (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* **5**, 1-20.
- FURNESS J.B., KUNZE W.A., BERTRAND P.P., CLERC N. & BORNSTEIN J.C. (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog.Neurobiol.* **54**, 1-18.
- FURNESS J.B., KUNZE W.A. & CLERC N. (1999) Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut. II. The intestine as a sensory organ: neural, endocrine, and immune responses. *Am.J.Physiol* **277**, G922-G928
- GALLI S.J., TSAI M. & WERSHIL B.K. (1993) The c-kit receptor, stem cell factor, and mast cells. What each is teaching us about the others. *Am.J.Pathol.* **142**, 965-974.
- GAO C., LIU S., HU H.Z., GAO N., KIM G.Y., XIA Y. & WOOD J.D. (2002) Serine proteases excite myenteric neurons through protease-activated receptors in guinea pig small intestine. *Gastroenterology* **123**, 1554-1564.
- GARSIDE P. & MOWAT A.M. (1997) Mechanisms of oral tolerance. *Crit Rev.Immunol.* **17**, 119-137.
- GINAP T. & KILBINGER H. (1998) Inhibition by nitric oxide and cyclic GMP of 5-hydroxytryptamine release from the vascularly perfused guinea-pig small intestine. *Neurochem.Int.* **32**, 487-492.

- GLEICH G.J. (1980) IgE, allergy, and the gut. *Dig.Dis.Sci.* **25**, 321-322.
- GRANGER D.N., BARROWMAN J.A. & KVIETYS P.R. (1985) The small intestine. In *Clinical Gastrointestinal Physiology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A Ed. Anonymouspp. 189-201.
- GRANGER D.N. & KVIETYS P.R. (1985) Recent advances in measurement of gastrointestinal blood flow. *Gastroenterology* **88**, 1073-1076.
- GRIDER J.R. & JIN J.G. (1994) Distinct populations of sensory neurons mediate the peristaltic reflex elicited by muscle stretch and mucosal stimulation. *J.Neurosci.* **14**, 2854-2860.
- GROUX H., O'GARRA A., BIGLER M., ROULEAU M., ANTONENKO S., DE VRIES J.E. & RONCAROLO M.G. (1997) A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742.
- GURISH M.F. & AUSTEN K.F. (2001) The diverse roles of mast cells. *J.Exp.Med.* **194**, F1-F5
- GURISH M.F., TAO H., ABONIA J.P., ARYA A., FRIEND D.S., PARKER C.M. & AUSTEN K.F. (2001) Intestinal mast cell progenitors require CD49beta7 (alpha4beta7 integrin) for tissue-specific homing. *J.Exp.Med.* **194**, 1243-1252.
- GWEE K.A., LEONG Y.L., GRAHAM C., MCKENDRICK M.W., COLLINS S.M., WALTERS S.J., UNDERWOOD J.E. & READ N.W. (1999) The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* **44**, 400-406.
- HE S.H. (2004) Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* **10**, 309-318.
- HEAVEY D.J., ERNST P.B., STEVENS R.L., BEFUS A.D., BIENENSTOCK J. & AUSTEN K.F. (1988) Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. *J.Immunol.* **140**, 1953-1957.
- HEIMAN A.S. & CREWS F.T. (1984) Inhibition of immunoglobulin, but not polypeptide base-stimulated release of histamine and arachidonic acid by anti-inflammatory steroids. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **230**, 175-182.
- HELM R.M. (2002) Food allergy animal models: an overview. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **964**, 139-150.
- HELM R.M., ERMEL R.W. & FRICK O.L. (2003) Nonmurine animal models of food allergy. *Environ.Health Perspect.* **111**, 239-244.
- HERSHBERG R.M. & MAYER L.F. (2000) Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol.Today* **21**, 123-128.

- HOLT P.G. & TURNER K.J. (1985) Persistent IgE-secreting cells which are refractory to T-cell control. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **77**, 45-46.
- HUIZINGA J.D., THUNEBERG L., VANDERWINDEN J.M. & RUMESSEN J.J. (1997) Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol.Sci.* **18**, 393-403.
- HUSBY S., MESTECKY J., MOLDOVEANU Z., HOLLAND S. & ELSON C.O. (1994) Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J.Immunol.* **152**, 4663-4670.
- HYLKEMA M.N., HOEKSTRA M.O., LUINGE M. & TIMENS W. (2002a) The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin.Exp.Immunol.* **129**, 390-396.
- HYLKEMA M.N., TIMENS W., LUINGE M., VAN DER W.N. & HOEKSTRA M.O. (2002b) The effect of bacillus Calmette-Guerin immunization depends on the genetic predisposition to Th2-type responsiveness. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **27**, 244-249.
- HYLKEMA M.N., VAN DER D.M., PATER J.M., KAMPINGA J., NIEUWENHUIS P. & GROEN H. (2000) Single expression of CD45RC and RT6 in correlation with T-helper 1 and T-helper 2 cytokine patterns in the rat. *Cell Immunol.* **199**, 89-96.
- IBA Y., SUGIMOTO Y., KAMEI C. & MASUKAWA T. (2003) Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *Int.Immunopharmacol.* **3**, 485-491.
- IHKURA M., TAKAISHI T., HIRAI K., YAMADA H., IIDA M., KOSHINO T. & MORITA Y. (1998) Exogenous nitric oxide regulates the degranulation of human basophils and rat peritoneal mast cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **115**, 129-136.
- JARRETT E.E., HAIG D.M., MCDUGALL W. & MCNULTY E. (1976) Rat IgE production. II. Primary and booster reagenic antibody responses following intradermal or oral immunization. *Immunology* **30**, 671-677.
- JUANOLA C., GIRALT M., JIMENEZ M., MOURELLE M. & VERGARA P. (1998) Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am.J.Physiol* **275**, G63-G67
- KAGAN R.S. (2003) Food allergy: an overview. *Environ.Health Perspect.* **111**, 223-225.
- KAGNOFF M.F. & ECKMANN L. (1997) Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J.Clin.Invest* **100**, 6-10.
- KANTELE A., ZIVNY J., HAKKINEN M., ELSON C.O. & MESTECKY J. (1999) Differential homing commitments of antigen-specific T cells after oral or parenteral immunization in humans. *J.Immunol.* **162**, 5173-5177.

- KATAEVA G., AGRO A. & STANISZ A.M. (1994) Substance-P-mediated intestinal inflammation: inhibitory effects of CP 96,345 and SMS 201-995. *Neuroimmunomodulation*. **1**, 350-356.
- KAWAKAMI T. & GALLI S.J. (2002) Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat.Rev.Immunol.* **2**, 773-786.
- KIMBER I., ATHERTON K., KENNA J.G. & DEARMAN R.J. (2000) Predictive methods for food allergenicity: perspectives and current status. *Toxicology* **147**, 147-150.
- KIMBER I. & DEARMAN R.J. (2001) Food allergy: what are the issues? *Toxicol.Lett.* **120**, 165-170.
- KIMBER I., DEARMAN R.J., PENNINKS A.H., KNIPPELS L.M., BUCHANAN R.B., HAMMERBERG B., JACKSON H.A. & HELM R.M. (2003) Assessment of protein allergenicity on the basis of immune reactivity: animal models. *Environ.Health Perspect.* **111**, 1125-1130.
- KING S.J. & MILLER H.R. (1984) Anaphylactic release of mucosal mast cell protease and its relationship to gut permeability in Nippostrongylus-primed rats. *Immunology* **51**, 653-660.
- KING T., BIDDLE W., BHATIA P., MOORE J. & MINER P.B., Jr. (1992) Colonic mucosal mast cell distribution at line of demarcation of active ulcerative colitis. *Dig.Dis.Sci.* **37**, 490-495.
- KNIGHT P.A., WRIGHT S.H., LAWRENCE C.E., PATERSON Y.Y. & MILLER H.R. (2000) Delayed expulsion of the nematode *Trichinella spiralis* in mice lacking the mucosal mast cell-specific granule chymase, mouse mast cell protease-1. *J.Exp.Med.* **192**, 1849-1856.
- KNIPPELS L.M., HOUBEN G.F., SPANHAAK S. & PENNINKS A.H. (1999a) An oral sensitization model in Brown Norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods* **19**, 78-82.
- KNIPPELS L.M. & PENNINKS A.H. (2002) Assessment of protein allergenicity: studies in brown norway rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **964**, 151-161.
- KNIPPELS L.M. & PENNINKS A.H. (2003) Assessment of the allergic potential of food protein extracts and proteins on oral application using the brown Norway rat model. *Environ.Health Perspect.* **111**, 233-238.
- KNIPPELS L.M., PENNINKS A.H. & HOUBEN G.F. (1998a) Continued expression of anti-soy protein antibodies in rats bred on a soy protein-free diet for one generation: the importance of dietary control in oral sensitization research. *J.Allergy Clin.Immunol.* **101**, 815-820.
- KNIPPELS L.M., PENNINKS A.H., SMIT J.J. & HOUBEN G.F. (1999b) Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats: further characterization of a rat food allergy model. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **156**, 161-169.

- KNIPPELS L.M., PENNINKS A.H., SPANHAAK S. & HOUBEN G.F. (1998b) Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin.Exp.Allergy* **28**, 368-375.
- KNIPPELS L.M., PENNINKS A.H., VAN MEETEREN M. & HOUBEN G.F. (1999c) Humoral and cellular immune responses in different rat strains on oral exposure to ovalbumin. *Food Chem.Toxicol.* **37**, 881-888.
- KNIPPELS L.M., VAN DER KLEIJ H.P., KOPPELMAN S.J., HOUBEN G.F. & PENNINKS A.H. (2000) Comparison of antibody responses to hen's egg and cow's milk proteins in orally sensitized rats and food-allergic patients. *Allergy* **55**, 251-258.
- KOBAYASHI T., NAKANO T., NAKAHATA T., ASAI H., YAGI Y., TSUJI K., KOMIYAMA A., AKABANE T., KOJIMA S. & KITAMURA Y. (1986) Formation of mast cell colonies in methylcellulose by mouse peritoneal cells and differentiation of these cloned cells in both the skin and the gastric mucosa of W/W^v mice: evidence that a common precursor can give rise to both "connective tissue-type" and "mucosal" mast cells. *J.Immunol.* **136**, 1378-1384.
- KONTUREK S.J. & SIEBERS R. (1980) Role of histamine H1- and H2-receptors in myoelectric activity of small bowel in the dog. *Am.J.Physiol* **238**, G50-G56
- KRANEVELD A.D., MUIS T., KOSTER A.S. & NIJKAMP F.P. (1998) Role of mucosal mast cells in early vascular permeability changes of intestinal DTH reaction in the rat. *Am.J.Physiol* **274**, G832-G839
- LAKE A.M. (1983) Experimental models for the study of gastrointestinal food allergy. *Ann.Allergy* **51**, 226-228.
- LI X.M., SCHOFIELD B.H., HUANG C.K., KLEINER G.I. & SAMPSON H.A. (1999) A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity. *J.Allergy Clin.Immunol.* **103**, 206-214.
- LI X.M., SEREBRISKY D., LEE S.Y., HUANG C.K., BARDINA L., SCHOFIELD B.H., STANLEY J.S., BURKS A.W., BANNON G.A. & SAMPSON H.A. (2000) A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J.Allergy Clin.Immunol.* **106**, 150-158.
- LIN R.Y., SCHWARTZ L.B., CURRY A., PESOLA G.R., KNIGHT R.J., LEE H.S., BAKALCHUK L., TENENBAUM C. & WESTFAL R.E. (2000) Histamine and tryptase levels in patients with acute allergic reactions: An emergency department-based study. *J.Allergy Clin.Immunol.* **106**, 65-71.
- LIN X.P., MAGNUSSON J., AHLSTEDT S., DAHLMAN-HOGLUND A., HANSON L.L., MAGNUSSON O., BENGTSSON U. & TELEMO E. (2002) Local allergic reaction in food-hypersensitive adults despite a lack of systemic food-specific IgE. *J Allergy Clin.Immunol* **109**, 879-887.

- LINDSAY D.S., PARTON R. & WARDLAW A.C. (1994) Adjuvant effect of pertussis toxin on the production of anti-ovalbumin IgE in mice and lack of direct correlation between PCA and ELISA. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **105**, 281-288.
- LIU L.W., THUNEBERG L. & HUIZINGA J.D. (1994) Selective lesioning of interstitial cells of Cajal by methylene blue and light leads to loss of slow waves. *Am.J Physiol* **266**, G485-G496
- LIU S., HU H.Z., GAO N., GAO C., WANG G., WANG X., PECK O.C., KIM G., GAO X., XIA Y. & WOOD J.D. (2003) Neuroimmune interactions in guinea pig stomach and small intestine. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **284**, G154-G164
- LOCKE G.R., III, ZINSMEISTER A.R., TALLEY N.J., FETT S.L. & MELTON L.J. (2000) Risk factors for irritable bowel syndrome: role of analgesics and food sensitivities. *Am.J.Gastroenterol.* **95**, 157-165.
- LORENTZ A., SCHWENGBERG S., SELLGE G., MANNS M.P. & BISCHOFF S.C. (2000) Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J.Immunol.* **164**, 43-48.
- LUNDIN B.S., DAHLGREN U.I., HANSON L.A. & TELEMO E. (1996) Oral tolerization leads to active suppression and bystander tolerance in adult rats while anergy dominates in young rats. *Scand.J.Immunol.* **43**, 56-63.
- LUTZELSCHWAB C., PEJLER G., AVESKOGH M. & HELLMAN L. (1997) Secretory granule proteases in rat mast cells. Cloning of 10 different serine proteases and a carboxypeptidase A from various rat mast cell populations. *J.Exp.Med.* **185**, 13-29.
- MACQUEEN G., MARSHALL J., PERDUE M., SIEGEL S. & BIENENSTOCK J. (1989) Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* **243**, 83-85.
- MALAVIYA R., IKEDA T., ROSS E. & ABRAHAM S.N. (1996) Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**, 77-80.
- MARIC M., GALL D.G. & SCOTT R.B. (1989) The effect of food protein-induced intestinal anaphylaxis on rate of transit. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **67**, 1437-1441.
- MARSHALL J.S., GOMI K., BLENNERHASSETT M.G. & BIENENSTOCK J. (1999) Nerve growth factor modifies the expression of inflammatory cytokines by mast cells via a prostanoid-dependent mechanism. *J.Immunol.* **162**, 4271-4276.
- MARSHALL J.S., PROUT S.J., JAFFERY G. & BELL E.B. (1987a) Induction of an auto-anti-IgE response in rats. II. Effects on mast cell populations. *Eur.J.Immunol.* **17**, 445-451.

- MARSHALL J.S., STEAD R.H., MCSHARRY C., NIELSEN L. & BIENENSTOCK J. (1990) The role of mast cell degranulation products in mast cell hyperplasia. I. Mechanism of action of nerve growth factor. *J.Immunol.* **144**, 1886-1892.
- MARSHALL J.S., WELLS P.D. & BELL E.B. (1987b) Accelerated elimination of *N. brasiliensis* from the small intestine after auto-anti-IgE induction. *Immunology* **60**, 303-308.
- MARZIO L., BLENNERHASSETT P., CHIVERTON S., VERMILLION D.L., LANGER J. & COLLINS S.M. (1990) Altered smooth muscle function in worm-free gut regions of *Trichinella*-infected rats. *Am.J.Physiol* **259**, G306-G313
- MARZIO L., BLENNERHASSETT P., VERMILLION D., CHIVERTON S. & COLLINS S. (1992) Distribution of mast cells in intestinal muscle of nematode-sensitized rats. *Am.J.Physiol* **262**, G477-G482
- MCKAY D.M. & BIENENSTOCK J. (1994) The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. *Immunol.Today* **15**, 533-538.
- MELAMED D., FISHMAN-LOVELL J., UNI Z., WEINER H.L. & FRIEDMAN A. (1996) Peripheral tolerance of Th2 lymphocytes induced by continuous feeding of ovalbumin. *Int.Immunol.* **8**, 717-724.
- MELAMED D. & FRIEDMAN A. (1994) In vivo tolerization of Th1 lymphocytes following a single feeding with ovalbumin: anergy in the absence of suppression. *Eur.J.Immunol.* **24**, 1974-1981.
- METCALFE D.D. (1984) Mast cell mediators with emphasis on intestinal mast cells. *Ann.Allergy* **53**, 563-575.
- METCALFE D.D., BARAM D. & MEKORI Y.A. (1997) Mast cells. *Physiol Rev.* **77**, 1033-1079.
- MILLER A., LIDER O. & WEINER H.L. (1991) Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens. *J.Exp.Med.* **174**, 791-798.
- MILLER H.R. (1996) Mucosal mast cells and the allergic response against nematode parasites. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **54**, 331-336.
- MILLER H.R., WOODBURY R.G., HUNTLEY J.F. & NEWLANDS G. (1983) Systemic release of mucosal mast-cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* **49**, 471-479.
- MILLER L.J., MALAGELADA J.R. & GO V.L. (1978) Intestinal nutrient influence on the enteroinsular axis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **47**, 1009-1014.
- MONNIKES H., TEBBE J.J., HILDEBRANDT M., ARCK P., OSMANOGLU E., ROSE M., KLAPP B., WIEDENMANN B. & HEYMANN-MONNIKES I. (2001) Role of stress in functional gastrointestinal disorders. Evidence for stress-induced alterations in gastrointestinal motility and sensitivity. *Dig.Dis.* **19**, 201-211.

- MOWAT A.M., LAMONT A.G., STROBEL S. & MACKENZIE S. (1987) The role of antigen processing and suppressor T cells in immune responses to dietary proteins in mice. *Adv.Exp.Med.Biol.* **216A**, 709-720.
- NAGATA S., YAMASHIRO Y., OHTSUKA Y., SHIOYA T., OGUCHI S., SHIMIZU T. & MAEDA M. (1995) Quantitative analysis and immunohistochemical studies on small intestinal mucosa of food-sensitive enteropathy. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **20**, 44-48.
- NALIBOFF B.D., MUNAKATA J., FULLERTON S., GRACEY R.H., KODNER A., HARRAF F. & MAYER E.A. (1997) Evidence for two distinct perceptual alterations in irritable bowel syndrome. *Gut* **41**, 505-512.
- NEUTRA M.R. (1998) Current concepts in mucosal immunity. V Role of M cells in transepithelial transport of antigens and pathogens to the mucosal immune system. *Am.J.Physiol* **274**, G785-G791
- NILSSON G., FORSBERG-NILSSON K., XIANG Z., HALLBOOK F., NILSSON K. & METCALFE D.D. (1997) Human mast cells express functional TrkA and are a source of nerve growth factor. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2295-2301.
- NOLTE H., SPJELDNAES N., KRUSE A. & WINDELBORG B. (1990) Histamine release from gut mast cells from patients with inflammatory bowel diseases. *Gut* **31**, 791-794.
- O'SULLIVAN M.A., MAHMUD N., KELLEHER D.P., LOVETT E. & O'MORAIN C.A. (2000) Patient knowledge and educational needs in irritable bowel syndrome. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **12**, 39-43.
- OTSU K., NAKANO T., KANAKURA Y., ASAI H., KATZ H.R., AUSTEN K.F., STEVENS R.L., GALLI S.J. & KITAMURA Y. (1987) Phenotypic changes of bone marrow-derived mast cells after intraperitoneal transfer into W/W^v mice that are genetically deficient in mast cells. *J.Exp.Med.* **165**, 615-627.
- PARK C.H., JOO Y.E., CHOI S.K., REW J.S., KIM S.J. & LEE M.C. (2003) Activated mast cells infiltrate in close proximity to enteric nerves in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *J.Korean Med.Sci.* **18**, 204-210.
- PATRICK M.K., DUNN I.J., BURET A., MILLER H.R., HUNTLEY J.F., GIBSON S. & GALL D.G. (1988) Mast cell protease release and mucosal ultrastructure during intestinal anaphylaxis in the rat. *Gastroenterology* **94**, 1-9.
- PAUWELS R., VAN DER S.M., PLATTEAU B. & BAZIN H. (1983) The non-specific enhancement of allergy. I. In vivo effects of Bordetella pertussis vaccine on IgE synthesis. *Allergy* **38**, 239-246.
- PAYAN D.G., LEVINE J.D. & GOETZL E.J. (1984) Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J.Immunol.* **132**, 1601-1604.
- PEARCE F.L., BEFUS A.D. & BIENENSTOCK J. (1982a) Isolation and properties of mast cells from the small bowel lamina propria of the rat. *Agents Actions* **12**, 183-185.

- PEARCE F.L., BEFUS A.D., GAULDIE J. & BIENENSTOCK J. (1982b) Mucosal mast cells. II. Effects of anti-allergic compounds on histamine secretion by isolated intestinal mast cells. *J.Immunol.* **128**, 2481-2486.
- PENG H.J., TURNER M.W. & STROBEL S. (1989) The kinetics of oral hyposensitization to a protein antigen are determined by immune status and the timing, dose and frequency of antigen administration. *Immunology* **67**, 425-430.
- PENNINKS A.H. & KNIPPELS L.M. (2001) Determination of protein allergenicity: studies in rats. *Toxicol.Lett.* **120**, 171-180.
- PERDUE M.H. & GALL D.G. (1985) Transport abnormalities during intestinal anaphylaxis in the rat: effect of antiallergic agents. *J.Allergy Clin.Immunol.* **76**, 498-503.
- PERDUE M.H. & GALL D.G. (1986) Intestinal anaphylaxis in the rat: jejunal response to in vitro antigen exposure. *Am.J.Physiol* **250**, G427-G431
- PERDUE M.H., MARSHALL J. & MASSON S. (1990) Ion transport abnormalities in inflamed rat jejunum. Involvement of mast cells and nerves. *Gastroenterology* **98**, 561-567.
- PERDUE M.H., MASSON S., WERSHIL B.K. & GALLI S.J. (1991) Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J.Clin.Invest* **87**, 687-693.
- PERDUE M.H., RAMAGE J.K., BURGET D., MARSHALL J. & MASSON S. (1989) Intestinal mucosal injury is associated with mast cell activation and leukotriene generation during *Nippostrongylus*-induced inflammation in the rat. *Dig.Dis.Sci.* **34**, 724-731.
- PETERSON J.D., KARPUS W.J., CLATCH R.J. & MILLER S.D. (1993) Split tolerance of Th1 and Th2 cells in tolerance to Theiler's murine encephalomyelitis virus. *Eur.J.Immunol.* **23**, 46-55.
- PILIPONSKY A.M., GLEICH G.J., BAR I. & LEVI-SCHAFFER F. (2002) Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol.Immunol.* **38**, 1369
- PILIPONSKY A.M., PICKHOLTZ D., GLEICH G.J. & LEVI-SCHAFFER F. (2001) Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *J.Allergy Clin.Immunol.* **107**, 993-1000.
- PLANCHON S.M., MARTINS C.A., GUERRANT R.L. & ROCHE J.K. (1994) Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J.Immunol.* **153**, 5730-5739.
- PLOURDE V., LEMBO T., SHUI Z., PARKER J., MERTZ H., TACHE Y., SYTNIK B. & MAYER E. (1993) Effects of the somatostatin analogue octreotide on rectal afferent nerves in humans. *Am.J.Physiol* **265**, G742-G751

- PULLERITS T., LUNDIN S., CUI Z.H., DAHLGREN U., TELEMOS E. & LOTVALL J. (1998) Bystander suppression of occupational hapten sensitization in rats made tolerant to ovalbumin. *Eur.Respir.J.* **12**, 889-894.
- RAITHEL M., SCHNEIDER H.T. & HAHN E.G. (1999) Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* **34**, 496-503.
- REED D.E., BARAJAS-LOPEZ C., COTTRELL G., VELAZQUEZ-ROCHA S., DERY O., GRADY E.F., BUNNETT N.W. & VANNER S.J. (2003) Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *J.Physiol* **547**, 531-542.
- RENZI R.M. (1996) Lower extremity amputations of US elderly population on the rise. *J.Am.Podiatr.Med.Assoc.* **86**, 176-179.
- RODRIGUEZ-MEMBRILLA A., MARTINEZ V. & VERGARA P. (1995) Peripheral and central cholecystokinin receptors regulate postprandial intestinal motility in the rat. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **275**, 486-493.
- RUCKEBUSCH Y. (1977) [Electromyographic analysis of small intestinal motility in domestic animals]. *Zentralbl.Veterinarmed.A* **24**, 1-12.
- SAKANE T. & SUZUKI N. (1998) The role of somatostatin in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Clin.Exp.Rheumatol.* **16**, 745-749.
- SANTOS J., SAPERAS E., NOGUEIRAS C., MOURELLE M., ANTOLIN M., CADAHIA A. & MALAGELADA J.R. (1998) Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* **114**, 640-648.
- SANTOS J., SAUNDERS P.R., HANSSSEN N.P., YANG P.C., YATES D., GROOT J.A. & PERDUE M.H. (1999) Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am.J.Physiol* **277**, G391-G399
- SAUNDERS P.R., HANSSSEN N.P. & PERDUE M.H. (1997) Cholinergic nerves mediate stress-induced intestinal transport abnormalities in Wistar-Kyoto rats. *Am.J.Physiol* **273**, G486-G490
- SCHWARTZ L.B. (1994) Mast cells: function and contents. *Curr.Opin.Immunol.* **6**, 91-97.
- SCHWARTZ L.B., METCALFE D.D., MILLER J.S., EARL H. & SULLIVAN T. (1987) Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N.Engl.J.Med.* **316**, 1622-1626.
- SCOTT R.B., DIAMANT S.C. & GALL D.G. (1988) Motility effects of intestinal anaphylaxis in the rat. *Am.J.Physiol* **255**, G505-G511
- SCOTT R.B., GALL D.G. & MARIC M. (1990) Mediation of food protein-induced jejunal smooth muscle contraction in sensitized rats. *Am.J.Physiol* **259**, G6-14.

- SCOTT R.B. & MARIC M. (1993) Mediation of anaphylaxis-induced jejunal circular smooth muscle contraction in rats. *Dig.Dis.Sci.* **38**, 396-402.
- SCOTT R.B. & TAN D.T. (1996) Mediation of altered motility in food protein induced intestinal anaphylaxis in Hooded-Lister rat. *Can.J.Physiol Pharmacol.* **74**, 320-330.
- SCUDAMORE C.L., THORNTON E.M., MCMILLAN L., NEWLANDS G.F. & MILLER H.R. (1995) Release of the mucosal mast cell granule chymase, rat mast cell protease-II, during anaphylaxis is associated with the rapid development of paracellular permeability to macromolecules in rat jejunum. *J.Exp.Med.* **182**, 1871-1881.
- SESTINI P., DOLOVICH M., VANCHERI C., STEAD R.H., MARSHALL J.S., PERDUE M., GAULDIE J. & BIENENSTOCK J. (1989) Antigen-induced lung solute clearance in rats is dependent on capsaicin-sensitive nerves. *Am.Rev.Respir.Dis.* **139**, 401-406.
- SHANAHAN F., DENBURG J.A., FOX J., BIENENSTOCK J. & BEFUS D. (1985) Mast cell heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J.Immunol.* **135**, 1331-1337.
- SKAPER S.D., POLLOCK M. & FACCI L. (2001) Mast cells differentially express and release active high molecular weight neurotrophins. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **97**, 177-185.
- SMOUT A., AZPIROZ F., COREMANS G., DAPOIGNY M., COLLINS S., MULLER-LISSNER S., PACE F., STOCKBRUGGER R., VATN M. & WHORWELL P. (2000) Potential pitfalls in the differential diagnosis of irritable bowel syndrome. *Digestion* **61**, 247-256.
- STEAD R.H. (1992a) Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Reg Immunol.* **4**, 91-99.
- STEAD R.H. (1992b) Nerve remodelling during intestinal inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **664**, 443-455.
- STEAD R.H., DIXON M.F., BRAMWELL N.H., RIDDELL R.H. & BIENENSTOCK J. (1989) Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* **97**, 575-585.
- STEAD R.H., TOMIOKA M., QUINONEZ G., SIMON G.T., FELTEN S.Y. & BIENENSTOCK J. (1987) Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 2975-2979.
- STEINMANN J., WOTTGE H.U. & MULLER-RUCHHOLTZ W. (1990) Immunogenicity testing of food proteins: in vitro and in vivo trials in rats. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* **91**, 62-65.

- STENTON G.R., VLIAGOFTIS H. & BEFUS A.D. (1998) Role of intestinal mast cells in modulating gastrointestinal pathophysiology. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* **81**, 1-11.
- STROBEL S. & FERGUSON A. (1987) Persistence of oral tolerance in mice fed ovalbumin is different for humoral and cell-mediated immune responses. *Immunology* **60**, 317-318.
- STROBEL S. & MOWAT A.M. (1998) Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol.Today* **19**, 173-181.
- SUTTON B.J. & GOULD H.J. (1993) The human IgE network. *Nature* **366**, 421-428.
- TAYLOR S.L. & LEHRER S.B. (1996) Principles and characteristics of food allergens. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **36 Suppl**, S91-118.
- THEOHARIDES T.C., BONDY P.K., TSAKALOS N.D. & ASKENASE P.W. (1982) Differential release of serotonin and histamine from mast cells. *Nature* **297**, 229-231.
- THEOHARIDES T.C. & SANT G.R. (1991) Bladder mast cell activation in interstitial cystitis. *Semin.Urol.* **9**, 74-87.
- TRYPHONAS H., ARVANITAKIS G., VAVASOUR E. & BONDY G. (2003) Animal models to detect allergenicity to foods and genetically modified products: workshop summary. *Environ.Health Perspect.* **111**, 221-222.
- TURNER M.W., BARNETT G.E. & STROBEL S. (1990) Mucosal mast cell activation patterns in the rat following repeated feeding of antigen. *Clin.Exp.Allergy* **20**, 421-427.
- TURNER M.W., BOULTON P., SHIELDS J.G., STROBEL S., GIBSON S., MILLER H.R. & LEVINSKY R.J. (1988) Intestinal hypersensitivity reactions in the rat. I. Uptake of intact protein, permeability to sugars and their correlation with mucosal mast-cell activation. *Immunology* **63**, 119-124.
- VENIER A., DE SIMONE C., FORNI L., GHIRLANDA G., UCCIOLI L., SERRI F. & FRATI L. (1988) Treatment of severe psoriasis with somatostatin: four years of experience. *Arch.Dermatol.Res.* **280 Suppl**, S51-S54
- VERGARA P., SAAVEDRA Y. & JUANOLA C. (2002) Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions. *Neurogastroenterol.Motil.* **14**, 35-42.
- VERMILLION D.L., ERNST P.B., SCICCHITANO R. & COLLINS S.M. (1988) Antigen-induced contraction of jejunal smooth muscle in the sensitized rat. *Am.J.Physiol* **255**, G701-G708
- VERMILLION D.L., HUIZINGA J.D., RIDDELL R.H. & COLLINS S.M. (1993) Altered small intestinal smooth muscle function in Crohn's disease. *Gastroenterology* **104**, 1692-1699.

- WANG Y.Z., PALMER J.M. & COOKE H.J. (1991) Neuroimmune regulation of colonic secretion in guinea pigs. *Am.J.Physiol* **260**, G307-G314
- WASTLING J.M., KNIGHT P., URE J., WRIGHT S., THORNTON E.M., SCUDAMORE C.L., MASON J., SMITH A. & MILLER H.R. (1998) Histochemical and ultrastructural modification of mucosal mast cell granules in parasitized mice lacking the beta-chymase, mouse mast cell protease-1. *Am.J.Pathol.* **153**, 491-504.
- WEINER H.L. (1997) Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol.Today* **18**, 335-343.
- WELLS H.G. (1911) Studies on the chemistry of anaphylaxis: experiments with isolated proteins, especially those of hen's egg. *J Infect Dis* **8**, 147(abstract)
- WERSHIL B.K., FURUTA G.T., WANG Z.S. & GALLI S.J. (1996) Mast cell-dependent neutrophil and mononuclear cell recruitment in immunoglobulin E-induced gastric reactions in mice. *Gastroenterology* **110**, 1482-1490.
- WESTON A.P., BIDDLE W.L., BHATIA P.S. & MINER P.B., Jr. (1993) Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig.Dis.Sci.* **38**, 1590-1595.
- WILLIAMS R.M., BIENENSTOCK J. & STEAD R.H. (1995) Mast cells: the neuroimmune connection. *Chem.Immunol.* **61**, 208-235.
- WILSON L.M. & BALDWIN A.L. (1999) Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation.* **6**, 189-198.
- WOODBURY R.G., MILLER H.R., HUNTLEY J.F., NEWLANDS G.F., PALLISER A.C. & WAKELIN D. (1984) Mucosal mast cells are functionally active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature* **312**, 450-452.
- WRIGHT K.A. (1979) *Trichinella spiralis*: an intracellular parasite in the intestinal phase. *J.Parasitol.* **65**, 441-445.
- WU N.Z. & BALDWIN A.L. (1992) Transient venular permeability increase and endothelial gap formation induced by histamine. *Am.J.Physiol* **262**, H1238-H1247
- YANG P.C., BERIN M.C., YU L. & PERDUE M.H. (2001) Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am.J.Pathol.* **158**, 681-690.
- YOSHINO S., QUATTROCCHI E. & WEINER H.L. (1995) Suppression of antigen-induced arthritis in Lewis rats by oral administration of type II collagen. *Arthritis Rheum.* **38**, 1092-1096.
- YU L.C. & PERDUE M.H. (2001) Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol.Rev.* **179**, 61-73.

ZAR S., KUMAR D. & KUMAR D. (2002) Role of food hypersensitivity in irritable bowel syndrome. *Minerva Med.* **93**, 403-412.

Neuroendocrine control of intestinal mucosal mast cells under physiological conditions

P. VERGARA, Y. SAAVEDRA & C. JUANOLA

Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Abstract Mast cells are involved in the pathogenesis of both allergies to food and inflammatory bowel disorders. In addition, there are several lines of evidence suggesting that mucosal mast cells also respond to intraluminal stimuli. Our aim was to identify neuroendocrine stimuli that could modify mucosal mast cell activity in the rat. Anaesthetized rats were prepared for duodenal perfusion and mast cell activation was measured by analysis of RMCP II concentration in the duodenal perfusate. Either buffered saline solution or a 5% ovalbumin hydrolysate (OVH) solution was infused into the duodenum. Subdiaphragmatic vagotomy or afferent ablation by intraluminal treatment with capsaicin diminished RMCP II concentration in basal conditions and significantly reduced the response to OVH, which in control animals induced a three-fold increase of the protease. The noradrenergic blockers phentolamine and propranolol significantly diminished RMCP II concentration in basal conditions and completely blocked the response to OVH. Intravenous infusion of cholecystokinin-related peptides also induced a response of mast cells. However, the response was different depending on the peptide. CCK-8 induced a slight increase of RMCP II, whereas both CCK-33 and gastrin induced a significant decrease in mast cell activity. These results show that intraluminal content modulates mucosal mast cell activity by complex mechanisms involving both nervous and endocrine pathway.

Keywords CCK release, cholecystokinin, food allergy, RMCP II, vagal afferents.

Address for correspondence

Patri Vergara, PhD, Unitat de Fisiologia, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain.

Tel.: + 34 93 5811848; fax: + 34 93 5812006;
e-mail: patri.vergara@uab.es

Received: 2 July 2001

Accepted for publication: 3 September 2001

INTRODUCTION

The gastrointestinal (GI) tract constitutes the largest barrier of a living organism, being exposed not only to a considerable number of organisms (bacteria, parasites, etc.) but also to foreign proteins. To maintain its physiology, the GI tract possesses complex control mechanisms where both neuroendocrine and immune responses are integrated.

The amount of literature showing how intraluminal stimuli induce both neuronal and endocrine responses is considerable. However, only recently has it been considered that the immune system could also influence GI responses.

Mast cells are well known for their involvement in the pathogenesis of allergy to food as well as inflammatory disorders in humans.^{1–3} This has been corroborated by several experimental models.^{4–8} In addition, intestinal mucosal mast cells are also activated by psychological stimuli such as stress, in both humans and animals.^{9–11}

Recently, it has been established that mast cells are in close contact with afferent vagal fibres and that both afferent fibres and mast cells proliferate during inflammation.¹² In addition, several studies have demonstrated that mast cells respond to central evoked reflexes.^{13,14} Some functional differences between mucosal mast cells and connective-type mast cells have also been established. One of these differences is that whereas Substance P degranulates connective-type mast cells, mucosal mast cells are unresponsive to this peptide.¹⁵

We already demonstrated that mast cells could be involved in the motor responses induced by endogenous CCK released by peptones.¹⁶ However, relatively little is known about the response of mast cells to endocrine stimuli.

Activated mast cells release large quantities of both preformed and newly generated biologically active molecules. Among them, rat mast cell protease II (RMCP II) is an abundant specific neutral protease of

rat mucosal mast cells that can be measured and thus serve as a useful marker of mast cell activation.^{17,18}

Our objective was to discover the extent to which mast cells are controlled by the nervous and endocrine stimuli that control responses to food in the GI system. We used an *in vivo* model in which the intestine was infused with a peptone (ovalbumin hydrolysate, OVH) and the following mechanisms were studied: (i) the role of the vagus nerves in controlling mast cells; (ii) the role of capsaicin-sensitive afferents; (iii) the involvement of adrenergic pathways; and (iv) the effect of CCK-related peptides on mast cell activity.

By understanding the physiological regulation of mast cells we hoped to increase understanding of the alterations occurring during inflammation and food-induced allergy.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All experimental protocols were carried out under the supervision and regulations of the Ethical Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. In this study, male Sprague–Dawley rats, 8–10 weeks old and weighing 300–350 g, were used. Animals had free access to water and a standard pellet diet containing (% total weight) 17.6% protein, 43.3% starch, and 2.5% fat (A-04 Panlab, Barcelona, Spain). This diet did not contain any trace of ovalbumin or any other egg derivative. Rats were specific pathogen-free when purchased, and from reception to their use in a protocol (between 7 and 21 days), they were kept in clean standard conditions. The absence of intestinal parasites was systematically checked. They were maintained in an environmentally controlled room (temperature 20–21 °C, humidity 60%, on a 12-h light/dark cycle) in groups of 3–4 animals until surgery. The night before the experiment, food was removed and the animal caged individually.

Perfusion studies and measurement of rat mast cell protease II (RMCP II)

Rats were anaesthetized by inhalation of halothane to allow cannulation of the right jugular vein with a polyethylene tube. Stage III anaesthesia was maintained with bolus infusions of sodium pentothal into the jugular vein as required. A tracheotomy was performed in order to avoid the respiratory problems of anaesthesia. The intestine was exposed through an abdominal midline incision, and a polyvinyl tube was inserted into the duodenal lumen through an incision in the stomach wall and passed through the pylorus.

Another plastic tube was inserted at the end of the duodenum next to Treitz's ligament to allow drainage and perfusate collection. The total length of the duodenum exposed to perfusion was 7–8 cm. After surgery, the abdomen was covered with a gauze soaked in liquid Vaseline to avoid tissue dryness and loss of heat. Animals were killed at the end of the experiment with an overdose of anaesthetic. A subdiaphragmatic vagotomy was performed by cutting of the nerves just below the diaphragm muscle.

Both buffered saline solution and albumin chicken egg hydrolysate (OVH) were perfused at a speed of 12 mL h⁻¹. Samples were collected every 15 min in ice-chilled tubes for measurement of RMCP II. This protocol has been previously validated to measure mucosal mast cell activity.^{14,16}

RMCP II concentration in the duodenal perfusate was measured by ELISA. A monoclonal antibody against RMCP II raised in mice was diluted to a concentration of 2 µg mL⁻¹ in a 0.1 mol L⁻¹ carbonate buffer (pH 9.6). Coated plates were incubated with the antibody at 4 °C for 21–24 h before use. A 30-min incubation with 4% (w/v) bovine serum albumin at 37 °C was carried out before loading of a standard and the samples, in order to avoid unspecific reaction. The samples were incubated at 37 °C for 30 min. A sheep anti-RMCP II antibody and a horseradish peroxidase conjugate were then added and incubated for 1 h at 37 °C. Plates were developed using *o*-phenylenediamine as substrate and read at 450 nm after the reaction was stopped with 0.25 mol L⁻¹ sulphuric acid solution. RMCP II concentration was quantified against a RMCP II standard curve. All these products were obtained from Moredun Animal Health (Edinburgh, UK).

Materials

OVH was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) solution (5% w/v). Capsaicin was dissolved in 5% dimethylsulphoxide (DMSO) and 5% Tween 80, and then diluted in PBS. Phentolamine and propranolol were dissolved in saline. All these products were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Atropine (Merck, Darmstadt, Germany) was dissolved in saline solution. Cholecystokinin octapeptide (CCK-8), sulphated form, was dissolved in 1% NaHCO₃ solution to a concentration of 10⁻⁴ mol L⁻¹, with further dilutions in saline solution. CCK-33 was diluted in saline solution. Both of these were purchased from Peptide Institute Inc. (Osaka, Japan). Gastrin (G17; rat little gastrin) was purchased from Peninsula Laboratories Inc. (Belmont, California) and diluted in saline solution.

Experimental protocols

In all these experiments, mast cell activation was measured through RMCP II concentration analysis of the perfusate. The following experimental groups were established:

- 1 A group in which only saline solution was infused during the experiment.
- 2 An OVH group in which, after 45 min, saline infusion was replaced by OVH solution.
- 3 Two vagotomized groups, on which an acute subdiaphragmatic vagotomy was performed to evaluate vagal involvement on mast cell activation, and on which RMCP II analysis was performed during either saline or OVH perfusion.
- 4 Two groups (capsaicin groups) where the ablation of afferent C-fibres by the selective neurotoxin capsaicin (600 mol L^{-1} given intraduodenally for 1 h) was carried out. Following this, buffered saline perfusion was continued for 45 min, and then the perfusate was changed to OVH perfusion for 1 h in one of the groups, while in the other group, saline perfusion continued until the end of the experiment.
- 5 Phentolamine and propranolol were given together as an intravenous (i.v.) bolus at a dose of 1 mg kg^{-1} each in order to evaluate the involvement of adrenergic pathways in mast cell activation. OVH perfusion was started 45 min after the phentolamine and propranolol bolus and lasted for 1 h.
- 6 CCK-8 ($3 \times 10^{-9} \text{ mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), CCK-33 ($3 \times 10^{-9} \text{ mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$), gastrin ($3 \times 10^{-9} \text{ mol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) were infused i.v. in different groups of animals while saline solution was continuously perfused intraluminally.

Controls

The following controls were performed:

- 1 Sham vagotomy; four animals received similar manipulation to vagotomized rats except for the cutting of the vagus nerves.
- 2 Effect of nerve cutting; in another two animals cutting of vagus nerves was performed once the beginning of sample collection had started.
- 3 Capsaicin solvents; perfusion of capsaicin solvent was infused in five animals. The experimental protocol was the same as in the capsaicin groups.
- 4 To discard an osmolar effect of OVH in the intestinal lumen, the osmolarity of OVH solution was measured (628 mOsm) and a glucose solution of the same osmolarity was infused in two animals without any effect either on the RMCP II concentration or on the volume of perfusate. In addition, the volume of perfusate was carefully controlled. However, no signi-

ficant changes in volume due to the experimental protocols were observed.

Statistics

All data are expressed as mean \pm SE of ng mL^{-1} of RMCP II. Statistical analysis for significant differences was performed by means of Student's *t*-test for paired or unpaired data (basal conditions vs. OVH; adrenergic blockers), ordinary one-way ANOVA (vagotomy, responses to OVH in all experimental conditions) or repeated measures ANOVA (capsaicin). ANOVA test was followed by a *post hoc* Bonferroni test as appropriate. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

In control conditions, while saline solution was perfused in the duodenal lumen, duodenal RMCP II concentration remained stable during the duration of experiment ($n=5$, Fig. 1). Duodenal perfusion of ovalbumin hydrolysate (OVH) ($n=5$) significantly increased RMCP II concentration when compared to RMCP II levels during buffered saline infusion (Fig. 1).

Neural control of mast cell activity

Effect of subdiaphragmatic vagotomy. In those animals in which a vagotomy was undertaken, basal RMCP II concentration was lower than in control animals (Fig. 2). Although RMCP II concentration slightly increased after OVH infusion, the enzyme concentration was significantly lower compared to those observed in control animals ($n=5$). In fact, RMCP II concentration during OVH perfusion in vagotomized rats was not different from basal levels in control animals (Fig. 2). In order to discard the possibility that surgical manipulation or the cutting of the vagus nerves could induce the degranulation of mucosal mast cells and that this could be the cause for the low levels observed afterwards, we performed vagotomy in two rats 30 min after sample collection had been started. The analysis of these samples also showed a decrease of RMCP II concentration. No increase in RMCP II concentration was observed at any time (data not shown).

Role of afferent fibres on mast cell stimulation. The protocol used in the experiments with capsaicin was designed to allow observation of the stimulatory effect of capsaicin application and of the withdrawal of the functionality of afferent fibres after capsaicin ($n=4$). Firstly, we observed that application of capsaicin induced an important decrease in RMCP II concentra-

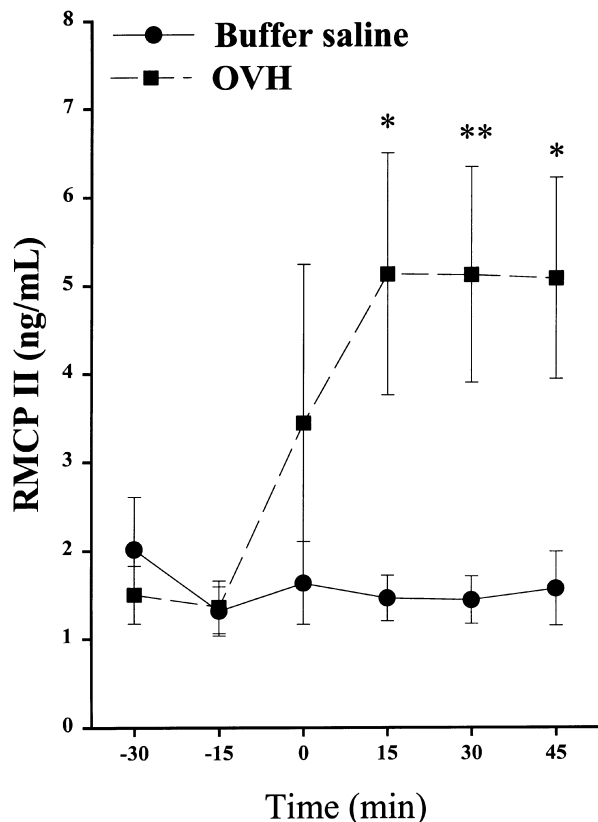


Figure 1 RMCP II concentration (ng mL^{-1}) in the duodenal perfusate during buffered saline solution or ovalbumin hydrolysate (OVH) perfusion. Time 0 = beginning of OVH perfusion. Before time 0, the duodenum was perfused with buffered saline solution in both groups. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

tion (Fig. 3A). We did not observe any stimulatory effect of capsaicin. To ensure that capsaicin was not having a brief stimulatory effect, we collected RMCP II samples at 5-min intervals during capsaicin application in two animals. We did not observe any stimulatory effect in either of them. Secondly, capsaicin solvent application induced a transient decrease of RMCP II concentration. This effect only lasted during solvent infusion, after which RMCP II returned to basal levels. Thirdly, low levels of RMCP II concentration were maintained after capsaicin application. When OVH was applied in these conditions ($n=4$) there was an increase in RMCP II (Fig. 3B), but this increased response was significantly lower compared with the OVH response in control animals.

Effect of adrenergic blockade on mast cell activity. Simultaneous infusion of phentolamine and propranolol induced important changes in mast cell responses. Infusion of adrenergic antagonists induced a decrease of basal concentration of RMCP II. This effect

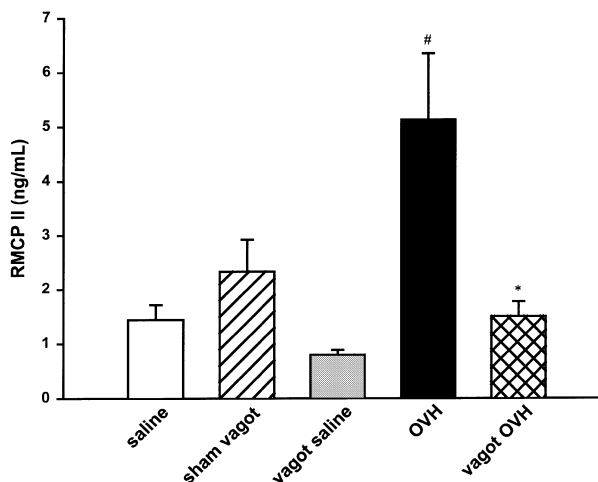


Figure 2 Differences between RMCP II concentration (ng mL^{-1}) in the duodenal perfusate during buffered saline solution or ovalbumin hydrolysate (OVH) perfusion in vagotomized animals compared to control groups. * $P < 0.05$ between OVH groups; # $P < 0.05$ between buffered saline and OVH groups.

was more striking when the rats had a basal RMCP II concentration higher than 2 ng mL^{-1} (Table 1). The posterior perfusion of OVH did not induce any increase in RMCP II concentration ($n=5$; Fig. 4).

Endocrine stimuli

Intravenous infusion of CCK-8 slightly increased RMCP II concentrations (Fig. 5). However, responses were very variable between animals and the significant increase was only obtained after a considerable number of experiments ($n=10$). CCK-33 ($n=6$) and gastrin ($n=4$) induced significant decreases in basal concentration of RMCP II. In these cases, all the animals responded in a similar way. Figure 5 summarizes responses to CCK-related peptides.

DISCUSSION

Most studies regarding the regulation of the GI immune system are performed under inflammation or anaphylaxis. However, our study focused on the physiological control of intestinal mucosal mast cell population. Our results indicate that under physiological conditions, intestinal mucosal mast cells are extensively regulated both by nervous reflexes and by endocrine responses induced by intraluminal stimuli. We now discuss the mechanisms involved as well as the possible correlation between them and the pathophysiology of some GI disorders.

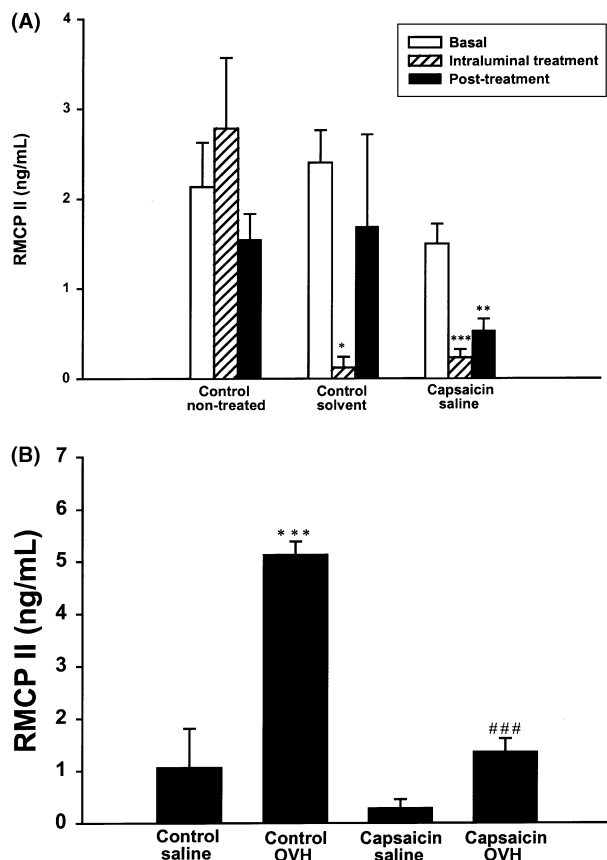


Figure 3 Bar diagram showing the effect of intraduodenal capsaicin treatment on RMCP II concentration (ng mL^{-1}). (A) Effect of capsaicin on RMCP II concentration. There were three experimental groups: (i) control nontreated, in which saline solution was perfused intraduodenally during the whole experiment; (ii) control solvent, in which the solvents used to dissolve the capsaicin were perfused for 1 h; (iii) capsaicin-saline, in which capsaicin was applied for 1 h. Basal: RMCP II concentrations before any treatment; intraluminal treatment: after 45 min from the beginning of the experiment saline (control nontreated), solvents (control solvent) or capsaicin (capsaicin-saline) were perfused intraduodenally for 1 h; post-treatment: RMCP II concentration 45 min after treatment while saline solution was perfused intraduodenally. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ in relation to the control nontreated group. (B) Comparison of RMCP II concentration in the capsaicin-treated groups: (1) capsaicin saline: saline solution was perfused intraduodenally; capsaicin-OVH: OVH was perfused 45 min after capsaicin treatment. RMCP II concentration in nontreated animals (saline control and OVH control) is shown for comparison purposes. *** $P < 0.05$, comparison between OVH groups; ### $P < 0.05$, comparison between capsaicin groups.

As we previously showed,¹⁶ OVH, a product of ovalbumin enzymatic digestion, is able to stimulate intestinal mucosal mast cells. This response is blocked by the mast cell stabiliser ketotifen and was not the consequence of a previous sensitization of the animal

Table 1 RMCP II concentration (ng mL^{-1}) before and after phentolamine and propranolol treatment (1 mg kg^{-1} each, intravenous)

	Before	After	<i>P</i> value
	1.45	0.54	
	1.34	0.90	
	1.14	0.89	
	1.80	1.72	
	7.50	0.32	
	3.70	1.15	
	2.94	0.38	
	1.34	0.70	
	1.52	0.77	
	1.06	1.15	
	5.14	0.25	
Mean \pm SEM	2.63 ± 0.62	0.80 ± 0.13	$P < 0.05$

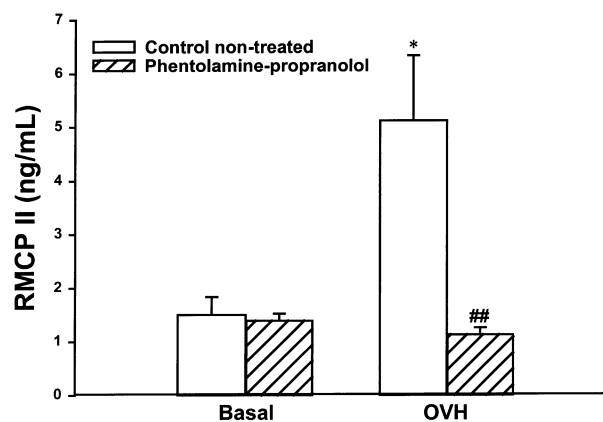


Figure 4 Lack of effect of OVH perfusion on RMCP II concentration (ng mL^{-1}) after intravenous infusion of phentolamine and propranolol. * $P < 0.05$ comparison in control nontreated group; ## $P < 0.01$ comparison between OVH groups.

to the peptone, as the foodstuff given to the animals did not contain any ovalbumin derivatives.¹⁶ On the contrary, it indicates the response of mast cells to food contents. Peptones in the intestinal lumen are able to stimulate several neuroendocrine reflexes. For instance, they stimulate pancreatic secretion through the stimulation of CCK release¹⁹ and induce motor changes in both the stomach and small intestine through the release of several hormones²⁰ and the activation of nervous reflexes.²¹

Our first hypothesis was that IMMC activity could depend on neuroendocrine reflexes induced by food, in which innervation could have an important role. Several authors have postulated IMMC activation by extrinsic nervous stimulation.^{13,14} In agreement with these studies, our results in vagotomized animals indicate the following: firstly, that vagal pathways modulate the basal IMMC activity shown in our

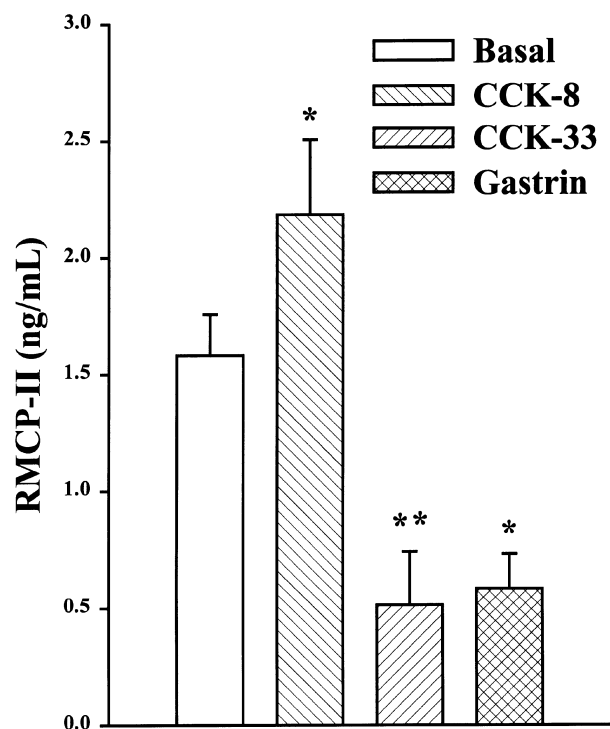


Figure 5 Bar diagram showing the effect of intravenous infusion of CCK agonists. Basal indicates RMCP II concentration before peptide infusion. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ in relation to basal.

experimental conditions; secondly, that the IMMC activation induced by OVH is, to a large extent, vagally mediated. This demonstrates that, as part of the complex neuroendocrine response to a meal, there is also a modulation of the GI immune system through mast cell activation. These results also corroborate that there is a vagal tone regulating IMMC basal activity and that vagal pathway activation further activates IMMCs. However, IMMC activation by OVH is not only vagally mediated, as demonstrated by the fact that there was still an increase in RMCP II concentration when OVH was infused into vagotomized animals. This result indicates that OVH is also acting by other mechanisms and that both endocrine mechanisms and a direct action on IMMCs cannot be discounted.

Once the role of vagus nerves had been demonstrated, the next step was to see if afferent pathways at the duodenal mucosal level have a role in the control of mast cells. The rationale for this was the extensive knowledge of the role of capsaicin-sensitive afferents in the mechanisms involved in both anaphylaxis and inflammation.^{22,23} In addition, several studies demonstrate that more than 50% of mucosal mast cells in the rat jejunum are in close contact with mucosal nerve fibres,¹² giving support to our hypothesis.

When we applied capsaicin to the duodenal lumen, we observed similar results to vagotomy. Previously, it has been demonstrated that afferent nerves are responsible for several responses to intraluminal stimuli.^{24–26} These responses are mediated by vagal afferents, which have been found in the duodenum.²⁷ Furthermore, the similarities between the vagotomy and capsaicin results indicate that vagal influence is due to vagal afferent pathways. Our results also show that both basal activation of IMMC and the response to OVH are mediated by stimulation of mucosal afferents.

There are several studies that suggest that afferent fibres retrogradely modulate mast cells.²⁸ Our results do not support this hypothesis. We did not observe any stimulatory response to the application of capsaicin, but the fact that capsaicin caused a transitory decrease of RMCP II could be masking a transient excitatory response to capsaicin. However, several other studies agree with our result. For instance, there is some evidence showing that mucosal mast cells are relatively insensitive to substance P, in contrast to connective-tissue mast cells.¹⁵ In addition, we found in our model that substance P at a concentration of 10^{-7} mol L⁻¹ does not induce any significant effect on RMCP II concentration (data not shown). However, there is evidence that mast cell products such as 5-hydroxytryptamine (5-HT; serotonin) can modify afferent activity,²⁹ thus a bi-directional mechanism cannot be rejected. The study by Castex *et al.*³⁰ is a good example of the coexistence of several mechanisms that could be mediated by mast cells.

We have previously reported that OVH infused in the small intestine activates sympathetic pathways,²⁰ and in consequence, we considered it necessary to evaluate the implication of adrenergic pathways in mast cell regulation. Several studies have suggested that mast cells can be activated by physical stress or by psychological distress.^{10,11} There is also a study that demonstrates that stress induced by pain can modify mast cell activity in humans,⁹ and it has also been shown that psychological factors can aggravate GI inflammatory disorders.³¹ Therefore, to establish if the sympathetic pathways could have a role in the response of mast cells to OVH, we infused phentolamine and propranolol together and obtained two interesting findings: (i) that sympathetic pathways modulate basal mast cell activity; and (ii) that they also mediate OVH response. In addition, the results clearly demonstrate a correlation between the tone of adrenergic pathways and the level of activation of mast cells. The fact that adrenergic blockers were more effective than vagotomy or capsaicin on blocking OVH effect shows the key role of adrenergic pathways in the control of mast cell

activity. These results help to explain why stress or other psychological factors modify mast cell activity and why these factors aggravate certain pathological problems, such as irritable bowel syndrome, coeliac disease and others in which mast cells have been implicated.³²

As previously shown,³³ OVH in the rat released CCK in the current experimental conditions. We have also demonstrated previously¹⁶ that CCK is involved in the response of mast cells to OVH by using CCK-specific antagonists. Therefore, we considered it necessary to ascertain if CCK could reproduce the effects of OVH. Our results confirm that CCK modulates mast cell activity in a complex way. While a stimulatory effect predominated with CCK-8, both CCK-33 and gastrin clearly induced a stabilizing effect on mast cells. However, among the CCK family, CCK-8 is the smallest form that can reproduce all the effects of CCK, by stimulating both CCK-A and CCK-B receptors. In addition, CCK actions have been described in both the central nervous system and the periphery.³⁴ In addition, CCK-8 is the predominant form in the blood whereas in the intestine most of the CCK is CCK-33/39.³⁵ Therefore, CCK-8 is probably acting in other areas including the brain, while CCK-33 action is predominant in the intestine. It has also been reported that longer forms of CCK have different affinities for CCK receptors. Longer forms have less affinity for CCK-A pancreatic receptors.³⁶ Furthermore, CCK longer forms have been suggested as biologically more relevant than CCK-8.³⁷ All these facts could explain the differences observed between CCK-33 and CCK-8 responses on IMMC activity. The fact that gastrin, a CCK-B agonist, reproduces CCK-33 effects also indicates that endogenous gastrin/CCK peptides could have a role in preventing mast cell degranulation by food proteins.

In summary, all these results show the complex regulation of mast cells, their response to intraluminal stimuli and some of the mechanisms involved in the interplay between the lumen, the neuroendocrine system and the immune response of the gut.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Acosta for skilful technical assistance and A.C. Hudson for editorial revision of the manuscript. This work was supported by Dirección General de Investigación en Ciencia y Tecnología Grants PM95-0121 and PM98-0171 and by Comissionat per a Universitats i Recerca, Generalitat de Catalunya, Grant 1999SGR 00272. We are also grateful to Generalitat de Catalunya and Universitat Autònoma de Barcelona for the financial support of C. Juanola and Y. Saavedra, respectively.

REFERENCES

- 1 Crowe SE, Perdue MH. Gastrointestinal food hypersensitivity: basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* 1992; **103**: 1075–95.
- 2 Crowe SE, Luthra GH, Perdue MH. Mast cell mediated ion transport in intestine from patients with and without inflammatory bowel disease. *Gut* 1997; **41**: 785–92.
- 3 Santos J, Bayarri C, Saperas E, Nogueiras C, Antolín M, Mourelle M, Cadahia A, Malagelada JR. Characterization of immune mediator release during the immediate response to segmental mucosal challenge in the jejunum of patients with food allergy. *Gut* 1999; **45**: 553–8.
- 4 Fargeas MJ, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Relationship between mast cell degranulation and jejunal myoelectric alterations in intestinal anaphylaxis in rats. *Gastroenterology* 1992; **102**: 157–62.
- 5 Furuta GT, Schmidt-Choudhury A, Wang MY, Wang ZS, Furlano RI, Wershil BK. Mast cell-dependent tumor necrosis factor (production participates in allergic gastric inflammation in mice. *Gastroenterology* 1997; **113**: 1560–9.
- 6 Patrick MK, Dunn IJ, Buret A, Miller HRP, Huntley JF, Gibson S, Gall DG. Mast cell protease release and mucosal ultrastructure during intestinal anaphylaxis in the rat. *Gastroenterology* 1988; **94**: 1–9.
- 7 Pothoulakis C, Karmeli F, Kelly CP *et al.* Ketotifen inhibits *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis in rat ileum. *Gastroenterology* 1993; **105**: 701–7.
- 8 Wershil BK, Furuta GT, Wang ZS, Galli SJ. Mast cell-dependent neutrophil and mononuclear cell recruitment in immunoglobulin E-induced gastric reactions in mice. *Gastroenterology* 1996; **110**: 1482–90.
- 9 Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolín M, Cadahia A, Malagelada JR. Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 1998; **114**: 640–8.
- 10 Wilson LM, Baldwin AL. Environmental stress causes mast cell degranulation, endothelial and epithelial changes, and edema in the rat intestinal mucosa. *Microcirculation* 1999; **6**: 189–98.
- 11 Santos J, Benjamin M, Yang P-C, Prior T, Perdue MH. Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol* 2000; **278**: G847–54.
- 12 Stead RH, Tomioka M, Quinonez G, Simon GT, Felten SY, Bienenstock J. Intestinal mucosal mast cells in normal and nematode-infected rat intestines are in intimate contact with peptidergic nerves. *Proc Natl Acad Sci* 1987; **84**: 2975–9.
- 13 MacQueen G, Marshall J, Perdue MH, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosa mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 1989; **243**: 83–5.
- 14 Santos J, Saperas E, Mourelle M, Antolín M, Malagelada JR. Regulation of intestinal mast cells and luminal protein release by cerebral thyrotropin-releasing hormone in rats. *Gastroenterology* 1996; **111**: 1465–73.
- 15 Shanahan F, Denburg JA, Fox J, Bienenstock J, Befus D. Mast cells heterogeneity: effects of neuroenteric peptides on histamine release. *J Immunol* 1985; **135**: 1331–7.
- 16 Juanola C, Giralt M, Jiménez M, Mourelle M, Vergara P. Mucosal mast cells are involved in CCK disruption of MMC in the rat intestine. *Am J Physiol* 1998; **275**: G63–7.

- 17 Miller HRP, RG.Woodbury JF, Huntley GFJ, Newlands. Systemic release of mucosal mast cell protease in primed rats challenged with *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunology* 1983; **49**: 471–9.
- 18 Tsai M, Shih L, Newlands GFJ *et al.* The rat *c-kit* ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells *in vivo*: Analysis by anatomical distribution, histochemistry and protease phenotype. *J Exp Med* 1991; **174**: 125–31.
- 19 Li Y, Owyang C. Peptone stimulates CCK-releasing peptide secretion by activating intestinal submucosal cholinergic neurons. *J Clin Invest* 1996; **97**: 1463–70.
- 20 Giralt M, Vergara P. Glucagonlike peptide-1 (GLP-1) participation in the ileal break induced by intraluminal peptones in the rat. *Dig Dis Sci* 1999; **44**: 322–9.
- 21 Giralt M, Vergara P. Both afferent and efferent nerves are implicated in cholecystokinin motor actions in the small intestine of the rat. *Reg Pep* 1999; **81**: 73–80.
- 22 Castex N, Fioramonti J, Fargeas MG, Bueno L. *c-fos* expression in specific rat brain nuclei after intestinal anaphylaxis: involvement of 5-HT₃ receptors and vagal afferent fibers. *Brain Res* 1995; **688**: 149–60.
- 23 Eliakim R, Karmeli F, Okon E, Rachmilewitz D. Ketotifen ameliorates capsaicin-augmented acetic acid-induced colitis. *Dig Dis Sci* 1995; **40**: 503–9.
- 24 Li Y, Owyang C. Endogenous cholecystokinin stimulates pancreatic enzyme secretion via vagal afferent pathways in rats. *Gastroenterology* 1994; **107**: 525–31.
- 25 Raybould HE. Capsaicin-sensitive vagal afferents and CCK in inhibition of gastric motor function induced by intestinal nutrients. *Peptides* 1991; **12**: 1279–83.
- 26 Rodriguez-Membrilla A, Vergara P. Endogenous CCK disrupts the MMC pattern via capsaicin-sensitive vagal afferent fibers in the rat. *Am J Physiol* 1997; **272**: G100–105.
- 27 Berthoud HR, Kressel M, Raybould H, Neuhuber WL. Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by *in vivo* DiI-tracing. *Anat Embryol* 1995; **191**: 202–12.
- 28 Sharkey KA. Substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in gastrointestinal inflammation. *Ann New York Acad Sci* 1992; **664**: 425–42.
- 29 Blackshaw LA, Grundy D. Effects of 5-hydroxytryptamine on discharge of vagal mucosal afferent fibres from the upper gastrointestinal tract of the ferret. *J Auton Nerv Syst* 1993; **45**: 41–50.
- 30 Castex N, Fioramonti J, Fargeas MG, More J, Bueno L. Role of 5-HT₃ receptors and afferent fibers in the effects of mast cell degranulation on colonic motility in rats. *Gastroenterology* 1994; **107**: 976–84.
- 31 Dapoigny M, Coremans G, Julé Y, Müller-Lissner S, Pace F, Smout A, Stockbrügger RW, Whorwell PJ. Neurophysiology and neuropsychiatry of the IBS. *Digestion* 1997; **58**: 1–9.
- 32 Wershil BK. Role of mast cells, basophils in gastrointestinal inflammation. In: (Marone G, ed). *Human Basophils and Mast Cells: Clinical Aspects. Chemistry and Immunology* Basel: Karger. 1995; **62**: 187–203.
- 33 Giralt M, Vergara P. Intraduodenal ovalbumin hydrolysate infusion: effects on intestinal motility and plasma CCK levels. *Neurogastroenterol Motil* 1998; **10**: 448 (Abstract).
- 34 Rodríguez-Membrilla A, Martínez V, Vergara P. Peripheral and central CCK receptors regulate postprandial intestinal motility in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; **275**: 486–93.
- 35 Lindén A, Carlquist M, Hansen S, Uvnäs-Moberg K. Plasma concentrations of cholecystokinin, CCK-8, and CCK-33,39 in rats, determined by a method based on enzyme digestion of gastrin before HPLC and RIA detection of CCK. *Gut* 1989; **30**: 213–22.
- 36 Reeve JR, Eysselein VE, Rosenquist G, Zeeh J *et al.* Evidence that CCK-58 has structure that influences its biological activity. *Am J Physiol* 1996; **270**: G860–8.
- 37 Kreis ME, Zittel TT, Raybould HE, Reeve JR Jr, Grundy D. Prolonged intestinal afferent nerve discharge in response to cholecystokinin-58 compared to cholecystokinin-8 in rats. *Neuroscience Lett* 1997; **230**: 89–92.