

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia

Tese de doutorado

Efeito do estresse agudo, crônico e ambos combinados
na permeabilidade intestinal de ratos

Aluna: Adriana Lauffer

Orientador: Prof. Dr. Fernando Fornari

Co-orientador: Prof. Dr. Ricard Farré

Janeiro de 2015

DEDICATÓRIA

*Aos pacientes que sofrem com distúrbios gastrointestinais.
Este estudo é por eles e pelo meu amor pela barreira intestinal.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada, meu orientador Prof. Dr. Fernando Fornari, por acreditar na minha capacidade, por aceitar estudar comigo esse tema, que é a minha grande paixão, e não a sua paixão. Por me estimular a estudar fora do país e ter me proporcionado essa experiência, a mais marcante da minha vida. Obrigada pelo teu apoio e paciência nos momentos de ansiedade, angústia e frustração, tanto no Brasil quanto à distância, na Bélgica. Obrigada por sempre ter me considerado mais como sua colega do que sua aluna. Foi um prazer imenso ter te tido como meu orientador nessa caminhada!

Obrigada, Prof. Dr. Sérgio Gabriel Silva de Barros, pelo seu reconhecimento, apoio e estímulos!

Obrigada, grupo de pesquisa TARGID, da Universidade Católica de Leuven na Bélgica, especialmente ao Prof. Dr. Ricard Farré e ao Dr. Tim Vanuytsel, por terem me recebido, me acompanhado, e me ensinado tudo, absolutamente tudo. Obrigada, Joran Tóth e Shadea Salim, técnicos de laboratório, pelo auxílio nos experimentos e nas análises.

Obrigada a todo o laboratório TARGID pela recepção, amizade e aprendizado científico e pelo “choque cultural”! Amizades e momentos que ficarão sempre na lembrança e causando muita saudade.

Obrigada, meu avô Élio Oswino Lauffer! Meu grande incentivador a estudar. Como ele sempre dizia: “Conhecimento nunca é demais” (em memória).

Obrigada, meus pais e meu irmão, pelas intensas orações! Cá estou eu, doutora! Deus tudo certo!

Obrigada Marcos e amigos por compreenderem a minha ausência, que foi muita.

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Antiinflamatórios não esteroidais
CEI	Células epiteliais intestinais
Cld	Claudinas
CS	<i>Crowding stress</i>
cU	Câmaras de Ussing
DGF	Distúrbios gastrointestinais funcionais
DII	Doença inflamatória intestinal
ECI	Eixo cérebro-intestino
EHPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HLC	Hormônio liberador de corticotrofina
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
JF	Junções firmes
Ocl	Ocludinas
PI	Permeabilidade intestinal
PCR-RT	PCR em tempo real
RT	Resistência transepitelial
SII	Síndrome do intestino irritável
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
TGI	Trato gastrointestinal
ZO	<i>Zônulaoccludens</i>
5-HT	5-hidroxitriptamina

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 1. Camada de células epiteliais separando o hospedeiro da luz intestinal	11
Figura 2. Estrutura das junções firmes, com suas proteínas claudinas, ocludina e zonulaoccludens (ZO) -1, -2, -3	15
Tabela 1. Expressão de claudinas nos intestinos de mamíferos.....	17
Figura 3. Os mastócitos como alvos de fator de liberação de corticotropina e peptídeos relacionados.....	23
Figura 4. Eixo cérebro-intestino: as comunicações bidirecionais e seus efeitos no trato gastrointestinal	25
Figura 5. Desregulação do eixo cérebro-intestino, ativação de mastócitos e suas consequências no trato gastrointestinal	26
Figura 6. Modelo de interação entre a barreira epitelial e o sistema imune	28
Figura 7. Método Crowding stress	34
Figura 8. Câmaras de Ussing	37

SUMÁRIO

Resumo	08
Abstract	
Introdução	09
Revisão bibliográfica	11
1. Permeabilidade intestinal	11
1.1 Junções firmes e suas proteínas	14
1.2 Mastócitos	21
2. Estresse, eixo cérebro-intestino e permeabilidade intestinal	24
3. Estresse e distúrbios gastrointestinais	29
4. Protocolos de estresse animal	33
5. Câmaras de Ussing	36
6. PCR em tempo real	39
7. Imunohistoquímica	41
Justificativa	43
Questão de pesquisa	44
Hipótese	45
Objetivos	46
Metodologia	49
1. Peso dos animais	49
2. Protocolos de estresse	50
3. Peso dos animais	50
4. Eutanásia	50

5. Avaliação de corticosterona	50
6. Estudos de permeabilidade intestinal	51
7. PCR em tempo real	51
8. Histologia e imunohistoquímica	52
Referências bibliográficas da revisão	53
Artigo científico redigido em inglês	
<i>Target journal</i>	
Orçamento e fontes de financiamento	
Conclusões	
Perspectivas	

RESUMO

Introdução: o estresse psicológico aumenta a permeabilidade intestinal em roedores e humanos, potencialmente levando a inflamação de baixo grau e aos sintomas em distúrbios gastrintestinais funcionais. No entanto, o efeito do estresse agudo combinado ao estresse da vida crônica, que mimetiza potencialmente melhor a situação humana, é desconhecido. Além disso, há poucos dados disponíveis sobre os efeitos do estresse em intestino delgado *versus* cólon.

Métodos: ratos Wistar foram alocados em quatro protocolos de estresse: 1/ controles; 2/ estresse agudo (isolamento e movimentos limitados); 3/ *Crowding stress*: crônico e 4/ estresse agudo + estresse crônico. Amostras de jejuno e cólon foram colhidas para estudar a permeabilidade em câmaras de Ussing, a expressão gênica de moléculas de junção firmes e a densidade de mastócitos. Níveis de corticosterona no plasma foram medidos.

Principais resultados: corticosterona plasmática foi avaliada nas três condições de estresse, teve níveis mais altos na condição de estresse combinado. Permeabilidade do jejuno foi aumentada em todas as condições de estresse e correlacionada com os níveis de corticosterona. O aumento da expressão das claudinas 1, 5 e 8, da occludina e da ZO-1 foi detectado no estado de estresse agudo no jejuno. Em contraste, a permeabilidade do cólon foi aumentada no protocolo de estresse combinado, e a expressão de moléculas das junção firmes permaneceu inalterada. O aumento da densidade de mastócitos foi observado no cólon nos ratos submetidos aos estresses crônico e combinado.

Conclusão e inferências: os estresses agudo, crônico e combinado influenciam diferentemente a permeabilidade intestinal, a expressão de moléculas de junção firmes e a atividade dos mastócitos, no jejuno e no cólon. Estes resultados fornecem uma visão mais aprofundada dos mecanismos de hiperpermeabilidade intestinal relacionadas ao estresse.

PALAVRAS-CHAVE:

Eixo cérebro-intestino, corticosterona, permeabilidade intestinal, mastócitos, estresse psicológico, junção firme.

ABSTRACT

Background: Psychological stress increases intestinal permeability in rodents and humans, potentially leading to low-grade inflammation and symptoms in functional gastrointestinal disorders through disturbances in brain-gut axis. However, the effect of acute stress on the background of Chronic life stress, potentially better approaching the human situation, is unknown. Moreover, only limited information is available on the effects in small intestine versus colon in animal model.

Methods: Wistar rats were allocated to 4 stress protocols: 1/ sham; 2/ acute stress (isolation and limited movement); 3/ Chronic crowding stress and 4/ acute + Chronic stress (n = 8 per group). Jejunum and colon were harvested to study permeability in Ussing chambers, gene expression of tight junction molecules and mast cell density. Plasma corticosterone levels were measured.

Key Results: Plasma corticosterone was elevated in all three stress conditions, with the highest levels in the combined stress condition. Permeability of the jejunum was increased in all stress conditions and correlated with corticosterone levels. Increased expression of claudin 1, 5 and 8, occludin and ZO-1 was detected in the acute stress condition in the jejunum. In contrast, colonic permeability was increased in the acute on Chronic stress protocol only and the expression of tight junction molecules was unaltered. Increased mast cell density was observed in the Chronic and acute on Chronic stress condition in the colon only.

Conclusion and Inferences: Acute, Chronic and combined stress differentially affect intestinal permeability, expression of tight junction molecules and mast cells in the jejunum and the colon. These findings provide further insight in the mechanisms of stress-related intestinal hyperpermeability and barrier.

KEYWORDS:

Brain-gut axis, corticosterone, intestinal permeability, mast cells, psychological stress, tight junction

INTRODUÇÃO

“Estresse”, definido como um estado em que a homeostase de um organismo é ameaçado ou percebida como tal, é um problema comum na sociedade moderna (Chrousos 2009). O eixo hormonal do estresse, operante no sistema nervoso central (SNC) e em órgãos periféricos, serve para manter a homeostase na presença de um estressor físico ou psicológico. No entanto, quando a duração ou a magnitude do estressor excede a capacidade adaptativa do organismo, desordens relacionadas ao estresse podem acontecer (Gareau et al 2008, Chrousos 2009).

Distúrbios gastrointestinais funcionais (DGF), como a síndrome do intestino irritável (SII) (Bennett et al 1998, Gwee et al 1999, Faresjo et al 2007, Nicholl 2008), e doenças orgânicas, como as doenças inflamatórias intestinais (DII) (Bonaz& Bernstein 2013) têm seu curso e intensidade dos sintomas afetados pelo estresse psicológico. O exato mecanismo através do qual o estresse influencia as desordens gastrointestinais não está claro, mas o aumento de permeabilidade intestinal (PI), permitindo a passagem aumentada de antígenos luminiais tem sido sugerido como um mecanismo em potencial. De fato, a PI aumentada tem sido notada tanto em animais quanto em humanos, especialmente em um subgrupo de pacientes com DGF e DII (Salim & Soderholm 2010, Martínez et al 2013, Piche 2014, Vanheel et al 2014).

Modelos animais de estresse têm sido utilizados com o objetivo de reproduzir o estresse vivenciado pelos humanos para tentar desvendar os mecanismos fisiopatológicos que atuam no aumento da PI induzida pelo estresse (Gareau et al 2008, Caso et al 2008). Mastócitos e hormônio liberador de corticotrofina (HLC) têm sido identificados como mediadores chave no eixo cérebro-intestino (ECI) (Soderholm et al 2002a, Soderholm et al 2002b, Vicario et al 2010, Saunders et al 2002, Keita et al 2010, Vanuytsel et al 2014).

Os protocolos de estresse mais utilizados em animais reproduzem o estresse crônico ou o agudo e, tal como acontece na prática clínica, pacientes comumente estão sujeitos ao estresse crônico sobreposto a episódios de estresse agudo ou subagudos (Gareau et al 2008).

Não se sabe se o aumento da PI é causado por componentes do estresse agudo ou do estresse crônico ou se há um efeito sinérgico entre os dois. Além disso, há limitada informação sobre como os intestinos delgado e cólon são afetados frente aos diferentes tipos de estresse.

Portanto, o objetivo desse estudo foi determinar os efeitos do estresse agudo, do estresse crônico, e da combinação do estresse agudo e crônico PI de ratos e, ainda, se esses tipos de estresse afetam de maneira diferente o intestino delgado e o cólon.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Permeabilidade intestinal

A superfície do epitélio do trato gastrointestinal (TGI) é coberta por uma única camada de células epiteliais intestinais (CEI). As CEI são responsáveis por separar o hospedeiro do ambiente externo, exercendo um papel de barreira (DeMeo et al 2002, Soderholm et al 2002a, Schenk 2008, Gareau et al 2008, Ramiro-Puig et al 2008, Tana et al 2010, Cinova et al 2011, Bischoff et al 2014) (Figura 1).

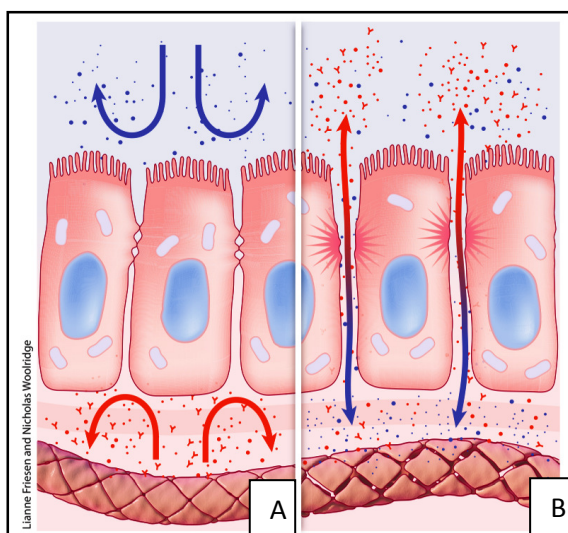


Figura 1. Camada de células epiteliais separando o hospedeiro da luz intestinal. A: permeabilidade paracelular normal. B: permeabilidade paracelular aumentada.

Além das funções absorptivas, secretórias e mecânicas, as CEI também são o primeiro ponto de contato do hospedeiro com a microbiota comensal e com uma grande variedade de antígenos, como bactérias, fungos, parasitas, vírus, que se encontram na luz intestinal e levam ao desenvolvimento de mecanismos de defesa especializados. Estes, por sua vez, regulam ou ativam o sistema imune da mucosa e a resposta imune adaptativa. Falhas na função de

barreira (como o aumento de PI) podem permitir entrada de antígenos pelas vias celulares ou paracelulares – as junções firmes (JF) – ou, ainda, através das células M e desencadear inflamação de baixo grau (DeMeo et al 2012, Soderholm et al 2012a, Schenk 2008, Gareau et al 2008, Ramiro-Puig et al 2008, Tana et al 2009, Cinova et al 2011, Bischoff et al 2014) (Figura 1).

As células M são conhecidas como células epiteliais especializadas do epitélio intestinal. O papel fisiológico primário dessas células parece ser a rápida absorção e apresentação de antígenos específicos e microrganismos para as células do sistema imunológico para induzir uma resposta imune eficaz. O baixo número de células M no TGI e o contato direto com as células imunes na lâmina própria geralmente previne a ocorrência de inflamação da mucosa. Durante a inflamação intestinal crônica, observa-se um aumento do número e de apoptose seletiva nessas células. Danos às células M parecem ser responsáveis pelo aumento da absorção de microrganismos, que é observado durante a inflamação intestinal (Kucharzik et al 2000).

Portanto, a barreira epitelial assume função nutricional de absorção, mas também de regulação da PI a antígenos e o seu acesso ao sistema imune, denominado “tolerância oral” (Caso et al 2008, Fasano et al 2008, Groschwitz & Hogan 2009, Marchiando et al 2010, Lu et al 2013; Bischoff et al 2014).

Nesse contexto, PI normal é definida como uma permeabilidade estável, encontrada em indivíduos saudáveis sem sinais de intoxicação, inflamação ou funções intestinais comprometidas. Já a PI alterada é aquela definida como perturbada, e não apenas transitoriamente, em comparação com a permeabilidade normal, levando a uma perda da homeostase intestinal, podendo resultar em deficiências funcionais e doenças (Bischoff et al 2014).

Mas, afinal, qual a diferença entre “permeabilidade intestinal” e “barreira intestinal”? Esses dois termos tem sido usados como sinônimos, embora eles não tenham o mesmo significado. Os termos “barreira intestinal” e “permeabilidade intestinal” descrevem dois aspectos da mesma estrutura anatômica: a parede intestinal, que possui quatro camadas (mucosa, submucosa, muscular e serosa). “Permeabilidade intestinal” é um termo criado preferencialmente por eletrofisiologistas e estudiosos da PI em câmaras de Ussing (cU) utilizando tecidos de animais ou humanos para fins de pesquisa (Bischoff et al 2014).

O termo “barreira intestinal” foi adotado por Cummings et al em 2004 para descrever a complexa estrutura que separa o ambiente interno da luz intestinal. A barreira física inclui componentes celulares consistindo no endotélio vascular, epitélio de revestimento e a camada de muco. Próximo a essa barreira física, substâncias químicas também participam da função de barreira. Elas consistem em secreções, moléculas imunes, produtos celulares como citocinas, mediadores inflamatórios e peptídeos antimicrobianos, principalmente produzidos pelas células de Paneth nas criptas do intestino delgado (Bischoff et al 2014).

Células de Paneth são células localizadas nas criptas do intestino delgado e por muitas décadas a função delas permaneceu obscura. Hoje é estabelecido que as células de Paneth produzem um amplo espectro de agentes antimicrobianos, controlando assim o número e conteúdo de população microbiana intestinal. São, portanto, uma parte importante dos mecanismos de defesa imune inata, contudo, através da interação com outras células, as células de Paneth participam em reações da imunidade adaptativa também, exercendo significativa função na manutenção da homeostase intestinal (Bikov 2014).

A microbiota intestinal está envolvida em processos metabólicos e modula a barreira, mas não representa a função barreira *per se*. Por outro lado, a microbiota contribui para a “saúde intestinal” – um termo muito utilizado, embora pobremente definido. Poderia ser descrito como “um estado de bem estar físico e mental na ausência de queixas gastrointestinais que

levem ao médico, ou na ausência de riscos ou confirmação para doença intestinal” (Bischoff et al 2014).

Portanto, de forma breve, “barreira intestinal” é uma entidade funcional do interior do lúmen intestinal, e consiste em elementos mecânicos (muco, camada epitelial), elementos humorais (defensinas, IgA), elementos imunológicos (linfócitos, células da imunidade inata), elementos musculares e neurológicos. Já a “permeabilidade intestinal” é definida como uma característica da barreira intestinal em determinados locais, mensurável por meio da taxa de fluxo através da parede intestinal como um todo ou através dos componentes da parede. Portanto, de acordo com as definições propostas, PI pode ser entendida como uma característica mensurável da barreira intestinal (Bischoff et al 2014).

1.1. Junções firmes e suas proteínas

Recentemente, diversas moléculas e mecanismos importantes da barreira intestinal puderam ser identificados. Desde a descoberta da primeira proteína associada às JF, em 1986, mais de 50 proteínas adicionais têm sido descritas. (Caso et al 2008, Fasano et al 2008, Marchiando et al 2009, Lu et al 2013, Bischoff et al 2014) (Figura 2).

As JF são estruturas dinâmicas compostas por um complexo de multiproteínas anatomicamente e funcionalmente conectadas com o anel de actina miosina subjacente (Fasano et al 2008, Bischoff et al 2014), cuja contração parece regular diretamente a PI paracelular (Lu et al 2013) (Figura 2).

As JF estão localizadas entre as CEI, e constituem um fator limitante, de vedação, da via paracelular. Assim, são responsáveis por selar o espaço entre as células epiteliais e por regular o fluxo de íons, água e pequenas moléculas através das claudinas (Cld) e outras proteínas do complexo juncional, através da formação de canais extracelulares em zigue-zague entre as

membranas laterais das células vizinhas (Caso et al 2008, Fasano et al 2008, Marchiando et al 2009, Lu et al 2013, Bischoff et al 2014, Krug et al 2014) (Figura 2).

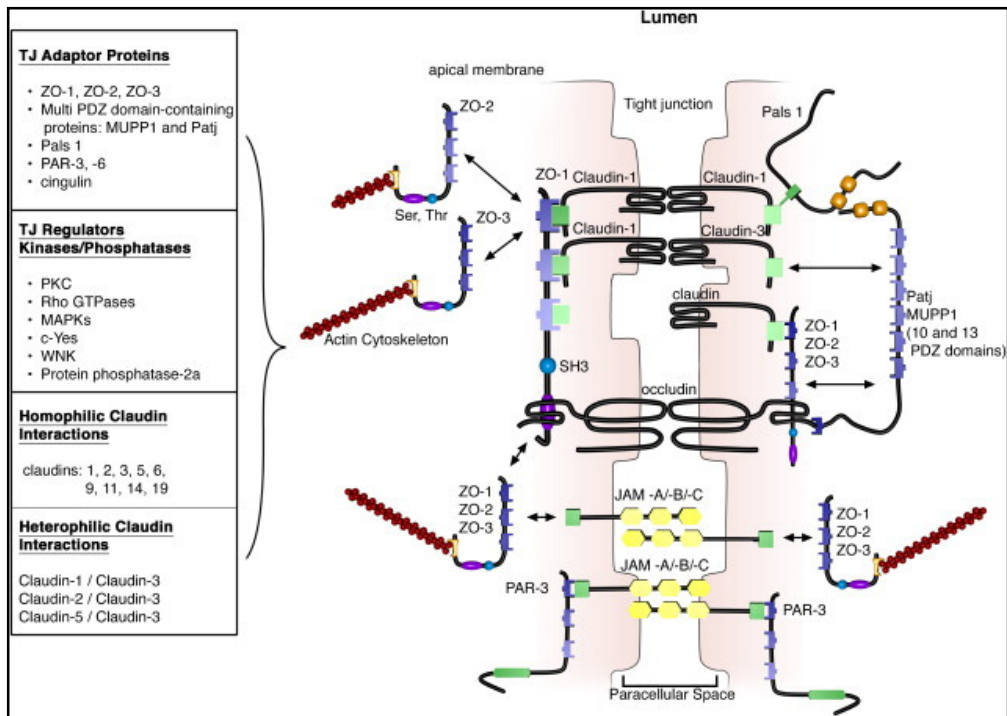


Figura 2. Estrutura das junções firmes e suas proteínas claudinas, ocludina e zonulaoccludens (ZO) -1, -2, -3 (Fonte: Groschwitz & Hogan 2009).

As JF estão envolvidas em uma série de funções chave do epitélio intestinal, tanto em circunstâncias fisiológicas quanto patológicas. Proteínas das JF são desreguladas ou podem ser geneticamente defeituosas em numerosas doenças, o que pode levar a três efeitos: (i) transporte paracelular diminuído causando, por exemplo, perda de magnésio pelos rins, (ii) transporte paracelular aumentado de solutos e água, causando diarreia, e (iii) permeabilidade aumentada para macromoléculas, ou seja, absorção indesejada de patógenos intestinais, xenobióticos e outros antígenos, gerando processos inflamatórios (Caso et al 2008, Fasano et al 2008, Marchiando et al 2009, Lu et al 2013, Bischoff et al 2014, Krug et al 2014).

Essas proteínas formadoras de canais – e inclusive algumas formadoras de barreira – exibem seletividade, o que significa que elas preferem determinadas substâncias a outras. Cada proteína formadora de canal exibe ao menos um dos três tipos de seletividade: para cátions (Cld-2, -10b, -15), para ânions (Cld-10a, -17) ou para água (Cld-2). Também algumas, não todas, Cld formadoras de barreira são carga-seletivas (Cld-4, -8, -14). Além do mais, as ocludinas (Ocl) e tricelulina se tornaram relevantes para a formação de barreira com passagem de macromoléculas (Krug et al 2014).

Como é possível perceber, um grande número de proteínas faz parte da estrutura das JF: i) as proteínas integrais de membrana, ou proteínas transmembranares, que incluem a família de proteínas das Cld e são associadas com outras proteínas transmembranares, as Ocl; ii) o complexo juncional de proteínas, que inclui a zonulaocludens (ZO)-1 e outras proteínas citoplasmáticas, como ZO-2 e ZO-3, fazem parte desse sistema; e iii) as estruturas do citoesqueleto da célula, como os microtúbulos e microfilamentos (Camilleri et al 2012) (Figura 2).

As Cld são as proteínas associadas às JF mais estudadas até o momento, e são as principais determinantes das propriedades de barreira das JF, ou seja, da barreira paracelular. Até o presente, ao menos 24 membros da família Cld foram indentificados. As Cld são proteínas transmembranas de 20 a 25-KDa e muitas delas possuem seletividade de carga distinta (Fasano et al 2008, Lu et al 2013).

As Cld determinam propriedades de barreira na via paracelular por que elas podem ajustar completamente o espaço paracelular a solutos, bem como podem formar poros iônicos. Ou seja, algumas Cld agem conectando caminhos paracelulares enquanto outras atuam como canais paracelulares. Padrões de expressão diferentes das Cld no TGI são passíveis de contribuir para a diversidade local de resistência elétrica transepitelial e fluxo celular de íons (Fasano et al 2008, Lu et al 2013).

Em humanos, a PCR em tempo real (PCR-TR) revela que Cld-2 e -15 são predominantemente expressas em partes proximais do TGI. Cld-1 é expressa principalmente no ápice das CEI com um padrão típico reticular no cólon. Cld-2 é detectada tanto em vilos quanto em criptas de células do intestino delgado e mais restritas em criptas de células não diferenciadas no cólon. Cld-3, -4, -7 e -8 são predominantemente expressas em partes distais (cólon, sigmóide e reto) do TGI. Cld-12 mostra um padrão de expressão uniforme em todo o TGI. Cld-4 e -7 são detectadas em ambas as membranas laterais da superfície de células e das JF (Lu et al 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Expressão de claudinas nos intestinos de mamíferos.

Segmento do intestino	Expressão de claudinas em humanos	Expressão de claudinas em camundongos
Duodeno	1, 2, 3, 4, 5, 7, 12, 15	2, 3, 7, 15
Jejuno	Não determinado	2, 3, 7, 12, 15
Íleo	2, 7, 8, 12, 15	1, 2, 3, 4, 7, 8, 12, 15
Cólon	1, 3, 4, 7, 8, 12, 15	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 12, 13, 15

Fonte: Lu et al 2013.

Em camundongos, mRNA de Cld 1-5, 7-15, 17 e 18 são todos detectados no TGI, sendo que Cld-2, -3, -7 e -15 são as mais expressas, enquanto que Cld-1, -5, -9, -10 e -11 são fracamente expressas. Tanto o mRNA quanto a proteína da Cld-7 são fortemente expressas no duodeno, jejuno, íleo e cólon. Já o mRNA da Cld-8 e sua proteína são moderadamente expressos no íleo e cólon, mas estão ausentes no duodeno e jejuno. O mRNA da Cld-12 e sua proteína estão altamente expressos no íleo, e moderadamente observados no jejuno e cólon, sendo escassamentedetectados no duodeno. O mRNA da Cld-13 e sua proteína foram observados no cólon, mas inexistentes em outras partes do TGI. A expressão de Cld-15 e sua proteína são altamente expressas no duodeno e jejuno, mas está diminuída do íleo ao cólon.

Perfis de expressão das Cld em humanos e camundongos estão resumidos na tabela 1 (Lu et al 2013) (Tabela 1).

Em termos de localização, a proteína Cld-2 está localizada na profundidade da cripta no cólon distal enquanto que a Cld-10 em toda a cripta. Cld-7 está expressa ao longo da superfície celular apical e basolateral de células epiteliais no intestino delgado, enquanto que Cld-8 está distribuída na membrana basolateral de células epiteliais no íleo e no cólon. Cld-12 está localizada na maioria das membranas laterais de células epiteliais no jejuno, íleo e cólon, mas não no duodeno. Cld-13 é distribuída na membrana apical de CEI, tanto no intestino delgado quanto no cólon (Lu et al 2013).

O cólon de ratos mostra a mais alta resistência epitelial, seguida do duodeno, jejuno e íleo. Duodeno e cólon possuem a mais forte expressão das Cld “de oclusão”: -1, -3, -4, -5 e -8 e a menor expressão das Cld mediadoras de permeabilidade de íons, principalmente: -2, -7 e -12, comparados com jejuno e íleo. Cld-3, -4 e -5 são todas detectadas no íleo, mas apenas -3 e -5 são detectadas no jejuno de ratos. Cld-4 é encontrada expressa também nos neurônios entéricos no cólon distal de ratos (Lu et al 2013).

A expressão de Cld em humanos mostra padrões de expressão distinta através do TGI, como a Cld-18 que é unicamente expressa no estômago, e a Cld-2 e -15 são predominantemente expressas em partes distais do TGI. Outras Cld, como Cld-3, -4, -7 e -8 são predominantemente expressas nas partes distais do TGI ou mostram uma expressão padrão uniforme em todo o TGI, como é o caso da Cld-12 (Lameris et al 2013).

A importância da localização dessas proteínas no TGI pode caracterizar e diferenciar algumas doenças. Por exemplo, mudanças na expressão da Cld em DII são dependentes da localização do TGI e da atividade inflamatória (Lameris et al 2013).

Análise dos níveis de expressão de Cld em pacientes com doença de Crhon e colite ulcerativa ativa ou inativa mostram que mudanças na expressão são limitadas a segmentos

intestinais específicos e fortemente dependentes da atividade inflamatória (Lameris et al 2013).

A função das Cld nos intestinos apenas começou a ser revelada recentemente. Espera-se que novas descobertas sejam feitas assim que mais e novos modelos de deleção genética se tornem disponíveis em futuro próximo (Lu et al 2013).

A Ocl é uma proteína transmembrana da JF que possui em torno de 65-KDa, expressa nas JF tanto de células epiteliais quanto endoteliais. A Ocl foi a primeira proteína transmembrana a ser descoberta, no entanto, sua função ainda não está totalmente elucidada. Apesar de ser um importante constituinte das JF, em animais com Ocl inativada geneticamente, a montagem e permeabilidade paracelular permaneceu inalterada. Uma detalhada caracterização sugeriu que a Ocl exerce uma função na regulação da integridade das JF, funcionando como uma molécula de adesão célula-célula. Ainda, dados *in vitro* sugerem que a integridade, resistência transepitelial e localização das Ocl nas JF são reguladas por fosforilação. Durante a ruptura das JF em resposta a vários estímulos a Ocl passa a ser fosforilada, o que pode atenuar a interação entre Ocl e proteínas da ZO, levando a ruptura das JF, pois a fosforilação resulta na redistribuição da proteína da membrana para o citoplasma (Fasano et al 2008, Groschwitz & Hogan 2009, Martínez et al 2012b, Bischoff et al 2014).

As proteínas *zonulaoccludens* (ZO), em língua portuguesa “zônula de oclusão” ou “junções de oclusão”, compreendem as proteínas ZO-1, -2, e -3. São importantes proteínas periféricas, localizadas em locais de junção, associadas às JF. Suas funções são estruturais, como promover ligação entre as proteínas integrais de membrana e os filamentos do citoesqueleto, e oferecer base estrutural para a montagem dos complexos multiprotéicos na superfície citoplasmática das junções intercelulares. Por isso, são chamadas de proteínas “andaime” (Bischoff et al 2014, Bauer et al 2010).

As proteínas ZO pertencem a uma grande família de proteínas chamada guanilato cinase associada à membrana (sigla MAGUK em inglês), compreendendo um número de subfamílias, baseado no conteúdo e na similaridade das proteínas. Apesar da função estrutural no contato célula-célula, proteínas ZO parecem participar na regulação do crescimento e proliferação celular (Bauer et al 2010) (Figura 2).

As proteínas ZO também associam-se às junções comunicantes, interagindo diretamente com as conexinas, o que aponta para um papel geral das proteínas ZO na adesão e comunicação intercelular (Bauer et al 2010). Além disso, uma importante função das ZO nos locais de junção é a regulação da polimerização das Cld em células epiteliais. Há evidências de que também estão envolvidas na transdução de sinal e a modulação transcricional, pois as ZO interagem diretamente com a maioria das proteínas transmembranares localizadas nas JF, como as Ocl, Cld, molécula de adesão juncional, entre outras (Bauer et al 2010) (Figura 2).

Desde a descoberta da ZO-1 a importância das proteínas de junção periférica tem se tornado cada vez mais reconhecida. Foi considerado um grande avanço quando se demonstrou que as proteínas ZO não só exerciam uma função de “andaimes” no local de junção, mas também estão envolvidas na sinalização intracelular e expressão genética. Até o momento, evidências experimentais convincentes sugerem que essas proteínas são capazes de se associar a moléculas reguladoras (proteínas adaptadoras, moléculas de sinalização, fatores de crescimento) modulando assim o progresso da célula através do ciclo celular (Bauer et al 2010).

1.2. Mastócitos

Os mastócitos constituem uma subpopulação de leucócitos mucosos, cujo envolvimento na imunidade inata contra antígenos alimentares e infecções parasitárias do TGI é bem

estabelecido. São residentes comuns nos intestinos, e parte do sistema imune inato, contribuindo para modular uma grande variedade de processos fisiopatológicos do TGI (Farhadi et al 2003, Caso et al 2008, Martínez et al 2012b, Lee et al 2013) (Figura 3).

Os mastócitos são considerados “peça chave” na modulação da PI e cruciais quando se trata de disfunção gastrointestinal induzida por estresse, tanto em ratos quanto em humanos. Estudos realizados com ratos deficientes de mastócitos têm sido úteis para determinar a função dessas células em processos biológicos (Farhadi et al 2003, Caso et al 2008, Martínez et al 2012b, Lee et al 2013).

A via clássica de ativação dos mastócitos é mediada através da ligação do alérgeno à IgE levando à degranulação celular e produção de eicoisanóides derivados do ácido araquidônico. Induz também ao aumento da expressão de genes pró-inflamatórios. No entanto, os mastócitos podem ser também ativados por estímulos independentes de IgE, como certos neurotransmissores, neuropeptídeos, e estimulação nervosa direta (Caso et al 2008).

Mediadores pré-sintetizados estocados nos grânulos dos mastócitos e liberados após ativação incluem histamina, serotonina (5-hidroxitamina em roedores), heparina e proteases; em adição, uma matriz de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF) α , interleucina (IL) -1, -3, -4, -5, -6, -8, assim como leucotrienos e prostaglandinas, entre outras substâncias, são sintetizadas e liberadas por mastócitos após ativação. Diversas citocinas e quimiocinas têm demonstrado alterar funções de barreira e funções secretórias epiteliais intestinais (Caso et al 2008) (Figura 3).

Substâncias liberadas pelos mastócitos durante a degranulação são responsáveis por mediar numerosos processos biológicos, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo, modulação da permeabilidade endotelial e epitelial em condições fisiológicas e patológicas, secreção de muco, motilidade gastrointestinal, reações imunológicas e angiogênese (Farhadi et al 2003).

Por exemplo, recentemente mostrou-se que a IL-6 aumenta a expressão de Cld-2, uma Cld formadora de poros, cátion seletiva, cuja expressão aumentada está relacionada com aumento de PI. Ou seja, a IL-6 consegue afligir a integridade da barreira intestinal (Suzuki et al 2011).

Entre todos esses mediadores, a triptase (também liberada pelos mastócitos, junto com a histamina em reações alérgicas mediadas por IgE) parece ser particularmente relevante, pois ela pode ativar o receptor 2 da protease ativada e aumentar a permeabilidade via paracelular no epitélio intestinal. Notadamente, expressão aumentada de triptase na mucosa e liberada no lúmen intestinal tem sido recentemente descrita em pacientes com SII (Martínez et al 2012b). Especula-se que a histamina liberada pelos mastócitos pode modificar o fluxo sanguíneo da mucosa e a permeabilidade endotelial (Farhadi et al 2003, Ortiz-Lucas et al 2010).

As primeiras pistas sobre o envolvimento dos mastócitos na disfunção gastrointestinal induzida por estresse surgiram em torno de 40 anos atrás, em modelos animais. Naquela época estudos realizados já suportavam a função chave do SNC através da liberação de histamina e proteases. Em paralelo demonstrou-se que os mastócitos da mucosa são localizados muito próximos aos nervos entéricos em condições normais, após testes de alergias e infecções parasitárias (Caso et al 2008, Ortiz-Lucas et al 2010) (Figura 3).

De fato, em pacientes com SII foi observado um aumento na densidade das fibras nervosas e mastócitos – em número e atividade. Ainda, no subgrupo SII tipo diarreia, a taxa de ativação dessas células é maior nas proximidades dos nervos entéricos em comparação aos locais mais distantes desses nervos, assim como a taxa de degranulação também foi alta. Esta concentração de mastócitos pode aumentar a sensibilidade retal nesse subgrupo de pacientes (Ortiz-Lucas et al 2010) (Figura 3).

Os mastócitos desempenham função importante na proteção contra infecções bacterianas através da liberação de citocinas, particularmente de TNF- α . Mas, como dito anteriormente, essas células não são ativadas apenas quando expostas a antígenos específicos através de

ligação à superfície da IgE, mas também são os operadores terminais do ECI (Farhadi et al 2003).

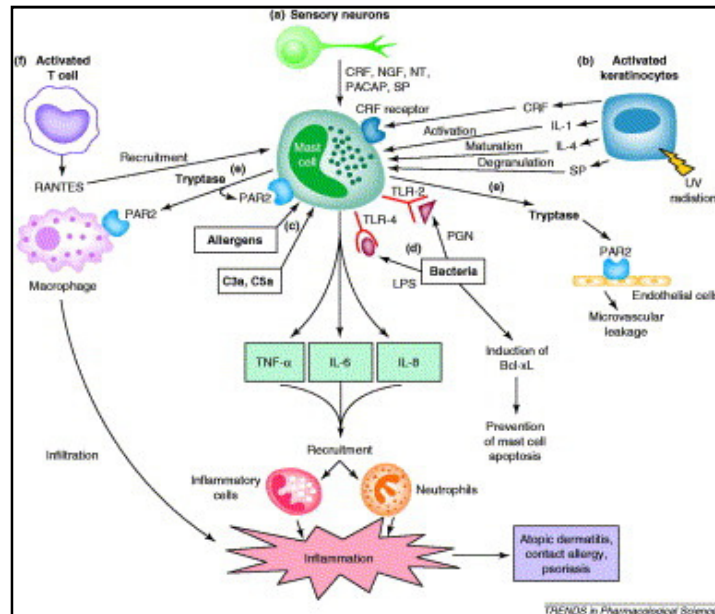


Figura 3. Os mastócitos como alvos de fator de liberação de corticotropina e peptídeos relacionados (Theoharis et al 2004).

Os mediadores dos mastócitos estão envolvidos na patogênese da permeabilidade anormal induzida pelo estresse, na alergia alimentar e nos processos inflamatórios intestinais. Tem sido demonstrado que esta população de células está aumentada em condições de alergia alimentar, na SII e após situações estressantes. Além disso, o estresse *per se* não foi capaz de aumentar a PI em ratos deficientes de mastócitos (Farhadi et al 2003).

Deve-se notar que o papel central dos mastócitos na disfunção gastrointestinal induzida por estresse tem sido confirmado em diferentes modelos animais de estresse: imobilização, *wateravoidance* (“evitação” de água), privação maternal precoce, entre outros. Ainda, tem sido também investigado em humanos voluntários saudáveis e pacientes com alergia alimentar e SII tipo diarreia, sendo um achado comum em todos esses cenários a presença de mastócitos ativados em todo o TGI (Caso et al 2008, Martínez et al 2012, Lee et al 2013).

2. Estresse, eixo cérebro-intestino e permeabilidade intestinal

Vários fatores podem danificar a barreira epitelial alterando a sua permeabilidade, tais como: o uso de antiinflamatórios não-esteroidais(AINES), estresse oxidativo, dieta, infecções, lesões, polimorfismos relacionados às JF e, claro, o estresse (McFarland 2000, DeMeo et al 2002, Schenk 2008, Zhou et al 2009).

“Estresse” é definido como “um estado no qual a homeostase é ameaçada, ou percebida como tal”. Todos os organismos vivos mantêm um complexo e dinâmico equilíbrio, o qual é constantemente desafiado por efeitos adversos internos e externos, denominados “estressores”. Os estressores podem ser físicos ou psicológicos e, tanto a magnitude quanto a cronicidade dos mesmos são importantes (Chrousos 2009).

Quando qualquer estressor excede uma determinada severidade ou limite temporal, o sistema homeostático adaptativo do organismo ativa respostas compensatórias que funcionalmente correspondem ao estressor. O eixo hormonal do estresse possui papel importante na coordenação desse processo, ativando funções do SNC (facilitação da excitação, alerta, vigilância, atenção, etc) e periféricas (aumento de oxigenação, nutrição cerebral, do coração e músculos, aumento do catabolismo, etc), portanto, mudanças acontecem no SNC e em vários órgãos periféricos e tecidos (Chrousos 2009).

Os estresses físico e psicológico são amplamente aceitos como disparadores e/ou modificadores do curso clínico de diversos distúrbios gastrointestinais. Na SII, por exemplo, o eixo cérebro-intestino (ECI) exerce uma função essencial na regulação da motilidade do TGI, absorção, transporte de íons e fluxo sanguíneo, na regulação do apetite, na patogênese da náusea e vômito, transporte epitelial, e na modulação da mucosa intestinal. Esta disfunção

parece ser a base da geração dos sintomas da SII (Kyrlagkitis&Karamanolis 2002, Andressen&Camilleri 2006, Caso et al 2008, Cryan&O'Mahony 2011, Bonaz 2013).

O termo “eixo cérebro-intestino” refere-se a interações bidirecionais entre o SNC e o TGI ou sistema nervoso entérico (SNE). Esta comunicação neuronal inclui o sistema nervoso autônomo, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (EHPA) e outras conexões (Caso et al 2008, Grenham et al 2011, Cryan&O'Mahony 2011) (Figura 4).

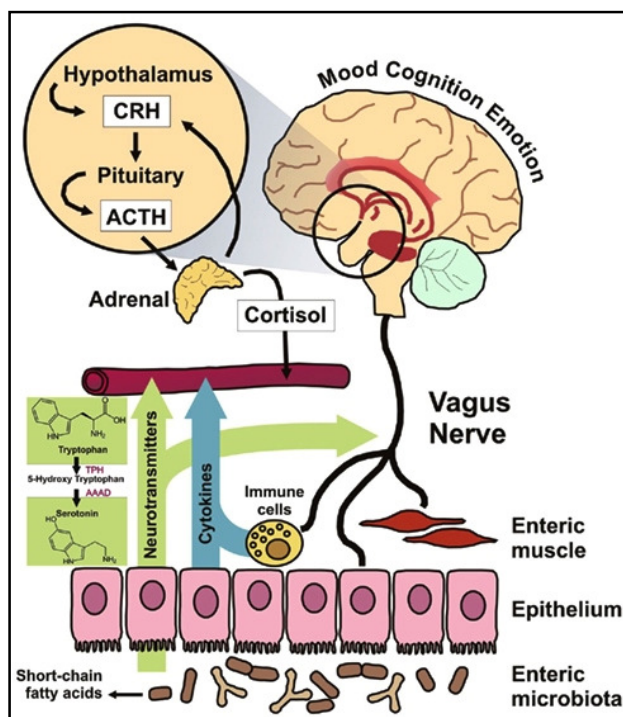


Figura 4. Eixo cérebro-intestino: as comunicações bidirecionais e seus efeitos no trato gastrointestinal (Fonte: Grenham et al 2011).

Os efeitos do estresse no TGI acontecem pela disfunção do ECI que, na fisiologia intestinal incluem: (1) alterações na motilidade gastrointestinal; (2) percepção visceral aumentada; (3) mudanças na secreção do TGI; (4) aumento na PI (via paracelular por JF disfuncionais e transcelular por células M); (5) efeitos negativos na capacidade de regeneração (*turn over* diminuído e menor captação de glicose por expressão de GLUT2 diminuída na borda em escova dos enterócitos) e no fluxo sanguíneo da mucosa do TGI; (6)

efeitos negativos na microbiota intestinal (Andresen&Camilleri 2006, Gareau et al 2008, Kontureck et al 2011, Bonaz 2013) (Figura 4).

Pode-se notar que todos os fatores citados levam, de alguma forma, a mudanças de PI e vice-versa, gerando a um sistema retro-alimentado que pode ser descrito da seguinte maneira: o estresse desregula o ECI e estimula a liberação de mastócitos, resultando em aumento de PI e maior exposição a antígenos, o que ativa o sistema imune local, levando ao recrutamento desordenado de células inflamatórias, com liberação de espécies reativas de oxigênio, que podem danificar as CEI, levando à mais aumento de PI (Figura 5).

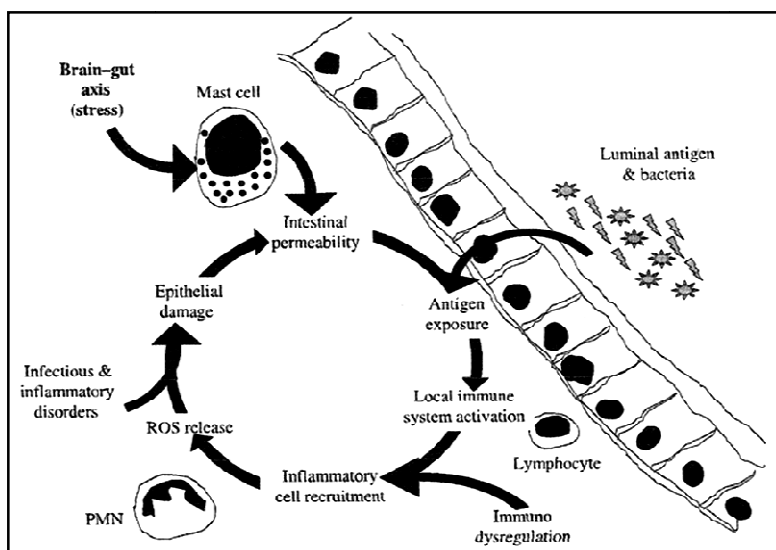


Figura 5. Desregulação do eixo cérebro-intestino, ativação de mastócitos e suas consequências no trato gastrointestinal (Fonte: Farhadi et al 2003).

De forma mais detalhada, em resposta ao estresse o SNC libera IL-1 e é sugerido que a mesma induza a produção do HLC e a síntese de histamina pelos mastócitos. O TNF- α e a IL-1 são bem conhecidos por induzir a síntese de óxido nítrico e ciclo-oxigenase 2 através da ativação da transcrição do fator NFkB nas CEI (Caso et al 2008, Schenk 2008). Além disso, especula-se que o próprio estresse induza à produção de óxido nítrico nas CEI pela passagem

de bactérias comensais pela barreira paracelular defeituosa (as JF) para a membrana basolateral (DeMeo et al 2002, Caso et al 2008).

Também o aumento da expressão do interferon (IFN)- γ na mucosa colônica – especificamente em linfócitos T da lâmina própria – constitui evento precoce em resposta a estímulo estressor em ratos e exerce função chave na alteração de PI, principalmente pela ativação da enzima miosina quinase de cadeia leve. Esta enzima regula a PI via fosforilação da miosina de cadeia leve, umas das moléculas reguladoras das JF e, conseqüentemente, da PI paracelular. Em adição, o IFN- γ altera a fisiologia das JF pela inibição da expressão genética das proteínas ZO e Ocl. Similarmente, o TNF- α inibe a atividade da Ocl e reduz a resistência transepitelial *in vitro* (Farhadi et al 2003, Caso et al 2008) (Figura 6).

Acredita-se que a SII seja uma desordem do ECI por uma exagerada resposta ao estresse. O maior mediador da resposta ao estresse no ECI, o HLC, é um candidato óbvio na fisiopatologia da SII. De fato, a administração de HLC tem mostrado agravar a resposta visceral em pacientes com a síndrome, e a administração de antagonistas do HLC parece aliviar os sintomas. A serotonina é outra candidata associada à função do ECI na SII, como antagonistas de 5-hidroxitriptamina (5-HT) 3, 5-HT4 e antidepressivos demonstraram regular a transmissão de 5-HT em pacientes portadores de SII (Fukudo 2013). Viu-se que sinalização alterada de 5-HT no SNC e no intestino contribui para a hipersensibilidade em SII, pois o efeito terapêutico dos agonistas e antagonistas de 5-HT são provavelmente devido também à capacidade de modular a nocicepção visceral no circuito central do estresse (Stasi et al 2014).

Embora a secreção de HLC seja principalmente localizada no SNC, produção colônica de HLC tem sido detectada em células da mucosa intestinal na base das criptas, e uma elevada expressão de HLC colônico tem sido observada em pacientes com colite ulcerativa. O HLC é conhecido por estar envolvido em anormalidades do TGI induzidas pelo estresse (Barreau et al 2007). O estresse estimula o ECI e então dispara a liberação de HLC, hormônio

adrenocorticotrópico e cortisol, que diretamente ou indiretamente afetam a função intestinal, a composição e crescimento da microbiota (Qin et al 2014).

Estes eventos alteram de alguma forma também a microbiota intestinal, que inclusive foi recentemente incluída na nova nomenclatura, atualmente definida como eixo cérebro-intestino-microbioma, devido ao crescente reconhecimento de sua importância (Konturek et al 2011, Grenham et al 2011, Bonaz 2013).

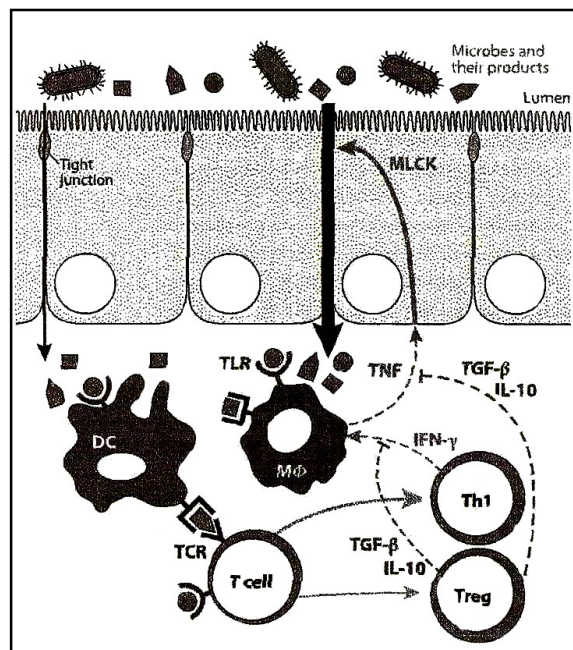


Figura 6. Modelo da interação entre a barreira epitelial e o sistema imune. A barreira epitelial normalmente restringe a passagem de conteúdo luminal, incluindo micróbios e seus produtos, mas uma pequena porção desses materiais atravessa a através das JF. Esse diagrama simplificado mostra como as células dendríticas (DC), macrófagos (MΦ) e células T reagem a esses materiais via receptores *tolllike* (TLR) e antígeno específico *tolllike* receptor (TCR). Os linfócitos T naive (células T) respondem ao antígeno na lâmina própria e se tornam uma célula Th1-polarizada, célula Th2 regulatória ou outros tipos de células T diferenciadas (não mostradas). Essas células da imunidade inata e adaptativa liberam citocinas que exercem efeitos pró-inflamatórios (TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). Se os sinais pró-inflamatórios dominarem e sinalizarem ao epitélio, MLCK (*miosin II regulatory light chain kinase*) pode ser ativada e causar disfunção da barreira, o que permitirá ao aumento da

entrada de material luminal, que será apresentado às células imunes. Na ausência de regulação imune adequada, essa ativação pode causar mais ativação imune, liberação de citocinas e perda da barreira, resultando em um ciclo retro-alimentado que pode resultar em doença (Fonte: Marchiando et al 2010).

3. Estresse e distúrbios gastrointestinais

Disfunção das JF intestinais ocorre em uma variedade de condições, incluindo alergias alimentares, infecções do TGI, doenças autoimunes e doenças inflamatórias intestinais (DII). A mucosa intestinal madura e saudável com suas JF intactas serve como a principal barreira à passagem de macromoléculas. Durante o estado saudável, pequenas quantidades de antígenos ativos imunologicamente atravessam a barreira intestinal do hospedeiro (Fasano et al 2008).

Esses antígenos são absorvidos pela mucosa através de pelo menos duas vias: transcelular e paracelular. Mais de 90% das proteínas absorvidas atravessa a barreira intestinal pela via transcelular, seguida de degradação lisossomal que converte as proteínas em peptídeos menores e não imunogênicos. Esses peptídeos residuais são transportados como proteínas intactas, através da via paracelular, o que envolve uma sutil, mas sofisticada, regulação intercelular das JF que conduz à tolerância antigênica. Quando a integridade do sistema das JF é comprometida, uma resposta imune deletéria aos antígenos do ambiente pode ocorrer. Diversas doenças autoimunes são caracterizadas pela perda da função de barreira intestinal, sugerindo um papel da PI alterada na patogênese das mesmas (Fasano et al 2008).

A doença celíaca, por exemplo, é o melhor representante dessa teoria. Trata-se de uma desordem complexa imunomediada, descrita pela primeira vez em 1887. O disparador ambiental da doença é o glúten, uma proteína complexa formada pela gliadina e glutenina, encontradas no trigo e espécies de grãos relacionados, como a cevada e o centeio. A doença

celíaca possui um forte componente genético, com múltiplos genes contribuintes (Fasano 2008, Jauregi-Miguel et al 2014, Calabrò et al 2014, Barakauskas et al 2014).

O componente ativador da doença é a gliadina com as frações α -, β -, γ -, e ω . Essas frações são ricas em prolina e glutamina e resistentes à ação de digestão enzimática. Grandes peptídeos ricos nesses aminoácidos acumulam-se no intestino delgado. Nesse contexto, dentre outros achados, expressão aumentada de IL-15 tem sido observada, bem como PI aumentada induzida por zonulina, cuja liberação é mediada pelo glúten (Calabrò et al 2014).

A perda de funcionalidade na barreira intestinal permite a passagem de peptídeos imunorreativos e outros antígenos vindos do lúmen intestinal para a lâmina própria, consequentemente disparando resposta imune inata e adaptativa anormal em indivíduos geneticamente predispostos (Calabrò et al 2014).

O mesmo pode acontecer na patogênese da DII, embora a etiologia ainda permaneça desconhecida, recentemente evidências convincentes mostraram que fatores genéticos, imunológicos e ambientais implicam no início desse processo autoimune. Diversos estudos, no entanto, sugerem que o aumento da PI possui papel central na patogênese da DII. Em pacientes com doença de Crhon assintomáticos clinicamente, a PI aumentada precede a recaída clínica em até um ano, sugerindo que defeitos de PI constituem um evento na exacerbação da doença. Essa hipótese de que a função da barreira intestinal anormal é um traço genético envolvido na patogênese da DII é mais sustentada pela observação de que parentes de primeiro grau de pacientes com doença de Crhon podem ter PI aumentada (Bischoff et al 2014).

A importância de JF intactas é demonstrada novamente em DII. Por exemplo, investigações em pacientes com doença de Crhon indicaram complexidade diminuída das JF em biópsias de cólon sigmoide, acompanhadas de redução da expressão das Cld seladoras -3, -5, -8 e Ocl, assim como a redistribuição de Cld -5 e -8 nas JF. Mudanças similares foram

observadas em retocolite ulcerativa quanto à regulação diminuída da Cld formadora de poro - 2 (Bischoff et al 2014).

Mas é sabido que não apenas as doenças autoimunes (onde há influência direta do sistema imune e da genética) cursam com aumento de PI. O estresse tem efeito complexo no sistema imune e influencia tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida. Durante o estresse, o TGI é inibido a nível do estômago pelo nervo vago, enquanto é estimulado a nível de cólon via sistema parassimpático sacral (Chrousos 2009).

A SII, por exemplo, é um dos DGF mais prevalentes e acredita-se que seja resultante do distúrbio da função neural ao longo do ECI. Os mecanismos ainda não estão claros, mas inflamação de baixo grau, alterações imunológicas e de função barreira intestinal diminuída são alterações importantes que se fazem presentes, provavelmente causadas pelo aumento de PI (Ohman&Simrén 2010, Mayer 2011, Grenham et al 2012, Martínez et al 2012b).

Mediadores liberados por células imunes agem amortecendo ou amplificando a atividade dos nervos do TGI. Número aumentado de linfócitos T e mastócitos associados à mucosa, assim como um nível aumentado de citocinasproinflamatórias (IL-10, IL12, sugerindo polarização de linfócitos Th1), a hipersensibilidade visceral causa percepção mesmo para uma mínima distensão abdominal (Catanzaro et al 2014, Hughes et al 2013).

Sob o ponto de vista emocional, a SII é um dos mais típicos exemplos de desordem psicossomática, condicionada ou agravada por fatores psicossociais e, em muitos casos, é associado em algum grau a sintomas depressivos ou outros distúrbios psiquiátricos, que incluem síndrome do pânico, ansiedade, distúrbios do sono, história de abuso na infância e somatização. A SII é um distúrbio complexo, pois sua etiologia é multifatorial e exige abordagem multidisciplinar (Kyrlagkitis&Karamanolis 2002, Andresen&Camilleri 2006, Longstreth et al 2006, Radziwillowicz& Gil 2007, Spiller 2007, Lee &Tack2010, Konturek et al 2011, Grenham et al 2011, Van Tilburg et al 2013, Man & Bustos 2013).

Já sob o aspecto fisiopatológico, existem evidências de que alterações na barreira intestinal podem favorecer a entrada desproporcional de antígenos. Somado a uma alteração na regulação do sistema imunológico, alterações na PI poderiam levar a desordens gastrointestinais inflamatórias (Farhadi et al 2003, Lee & Tack 2010, Konturek et al 2011, Grenham et al 2011, Martínez et al 2012b, Bonaz 2013).

Os estudos sobre PI em SII têm concluído que: (1) a PI é maior em pacientes com SII tipo diarreia não pós-infecciosa; (2) a permeabilidade no intestino delgado é frequentemente anormal em indivíduos com SII tipo diarreia (Dunlop et al 2006, Martínez et al 2012b); (3) o uso de AINES comprometem a PI em indivíduos com SII em comparação aos saudáveis (Kerckhoffs et al 2010); (4) existe um subgrupo de pacientes com SII tipo diarreica que apresenta PI aumentada, associada à menor qualidade de vida e maior hipersensibilidade visceral, podendo causar sintomas mais intensos (Zhou et al 2009, Martínez et al 2012b).

Além disso, estudos recentes sugerem que as alterações da integridade da barreira epitelial intestinal, em particular a PI aumentada em pacientes com SII, podem facilitar a translocação de agentes da microbiota bacteriana intestinal para o hospedeiro, podendo levar à inflamação de baixo grau, alteração da motilidade e maior sensibilidade gastrointestinal (Piche 2014). No entanto, ainda é desconhecido se a PI anormal é causa ou consequência destas desordens (Farhadi et al 2003, Martínez et al 2012b, Odenwald & Turner 2013).

De fato, um estudo realizado com pacientes portadores de SII de todos os tipos encontrou baixa expressão das proteínas Ocl e Cld-1, mas apenas naqueles com SII tipo diarreia, e de forma correlacionada com a duração dos sintomas. A Ocl foi relacionada especificamente com maior intensidade de dor abdominal. Os autores concluíram que a Ocl e a Cld-1 apareceram bastante afetadas em pacientes com SII tipo diarreia e que a alteração das proteínas JF pode ser envolvida na iniciação da SII e contribuir para a hipersensibilidade visceral (Bertiaux-Vandaele et al 2011).

A SII era até então fortemente considerada como um distúrbio intestinal funcional, definido por critérios diagnósticos baseados em sinais e sintomas, visto que não eram detectadas alterações orgânicas (estruturais, bioquímicas e inflamatórias) (Spiller 2007, WGO 2009, Lee & Tack 2010). Mas, esse conceito está mudando considerando que alterações de PI (Martínez et al 2012a e b, Vanuytsel et al 2014) e epigenéticas têm sido encontradas (Vaiopoulou et al 2014) e que, na SII pós infecção por exemplo, a infecção por *Salmonella* aumenta o risco de desenvolver SII em 8 vezes (Cataranzo et al 2014).

A SII é responsável por quase um terço das visitas a gastroenterologistas e por grandes gastos para diagnóstico, tratamento e perda de dias de trabalho (Man & Bustos 2013). A terapêutica tradicional da SII é basicamente baseada em sintomas e geralmente insatisfatória. Portanto, há necessidade e rogativa por novas estratégias de tratamentos. Novos conhecimentos sobre a fisiologia do ECI, mecanismos, neurotransmissores, participação da microbiota, receptores envolvidos na motilidade e na secreção GI têm levado à necessidade de desenvolvimento de novas abordagens (Andresen & Camilleri 2006; Brandt et al 2009, Grenham et al 2011, Krug et al 2012, Bonaz 2013).

4. Protocolos de estresse animal

O uso generalizado de modelos animais está levando à revelação progressiva dos mecanismos básicos da fisiologia mamífera. Uma grande variedade de modelos tem sido avaliada em uma série de espécies de animais de laboratório, como camundongos, ratos, coelhos, porcos, cachorros e macacos.

O resultado fisiológico da exposição ao estresse depende de: 1) duração do estímulo (exposição aguda ou crônica), 2) fase da vida (jovem ou adulto), 3) tipo de estresse (físico, psicológico ou químico). Contudo, dentre todos os métodos experimentais de indução de

estresse, aqueles caracterizados pela exposição de roedores a estresse físico são os mais extensivamente utilizados: imobilização, exposição a temperaturas extremas, imersão ou choques elétricos, entre outros. Modelos de estresse social ou emocional, como aglomeração ou isolamento social são menos utilizados por serem considerados de difícil interpretação (Gareau et al 2008, Caso et al 2008).

Crowding Stress (CS), ou “estresse por aglomeração” na língua portuguesa, é um modelo murino de estresse crônico social que pode refletir o estresse vivenciado pelos humanos. Diversos distúrbios metabólicos, endócrinos, do ECI, inclusive temperatura corporal, ingestão alimentar e perda de peso têm sido relatados em resposta ao CS (Vicário et al 2010, Vicário et al 2012). O método CS consiste em manter oito ratos numa mesma caixa preenchida pela metade com cerragem, enquanto que normalmente são mantidos 2 a 3 ratos por caixa, preenchida com 2 cm de serragem (Armario et al 1984a e 1984b, Vicário et al 2010 e 2012) (Figura 7).



Figura 7. Método *Crowding stress*. Foto A: caixa com 8 ratos preenchida pela metade com cerragem mostrada de lado. Foto B: caixa preenchida pela metade com cerragem sem os animais. Foto C: caixa da foto A vista de cima.

A superpopulação dentro da caixa gera competitividade por comida, água, espaço e hierarquias entre os animais dominantes ou subordinados do grupo (um ou dois animais são

os líderes e dois a três são os mais fracos do grupo) e causa perda de peso pela dificuldade de acesso à comida (Armario et al 1984a e 1984b, Vicário et al 2010 e 2012) (Figura 7).

Esse modelo começou a ser estudado na década de 80 por Armário e colaboradores (1984a e 1984b). É um modelo animal validado que reproduz o estresse psicossocial natural, cujas consequências na fisiologia intestinal permaneciam desconhecidas até que recentemente foi retomado e revalidado por Vicário e colaboradores (2010 e 2012).

Vicário et al (2010 e 2012) objetivaram provar que o estresse social crônico é indutor primário da disfunção intestinal e investigar a sinalização do HLC e dano mitocondrial como contribuintes chaves para os efeitos mediados pelo estresse. Para isso, utilizaram ratos wistar-kyoto e o método CS, como descrito anteriormente. Nesse estudo, o estresse psicossocial crônico ativou o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal(EHPA) e induziu inflamação da mucosa intestinal reversível. Permeabilidade intestinal e condutância foram aumentados em ratos submetidos ao CS, efeito que durou por 7 dias após a cessação do protocolo de estresse. Atividade mitocondrial foi perturbada ao longo do intestino, apesar de a resposta mitocondrial ao HLC ter permanecido preservada. A expressão colônica de receptores tipo 1 do HLC estava aumentada em ratos submetidos ao CS, e correlacionada negativamente com ganho de peso corporal. Concluíram que o estresse psicossocial crônico dispara inflamação, ainda que reversível, bem como disfunção epitelial persistente e hiperalgesiacolônica, e que esses achados tornam o CS um modelo animal adequado para desvendar a complexa fisiopatologia subjacente às desordens intestinais relacionadas ao estresse comuns, como a SII (Vicário et al 2012).

Outro estudo realizado por Vicário et al (2010), utilizando a mesma metodologia (ratos wistar-kyoto e CS), objetivou provar que o CS induz inflamação da mucosa e disfunção intestinal e avaliar a participação do estresse na ativação de mastócitos sobre a disfunção intestinal. Para isso, foram medidos os níveis de corticosterona no plasma dos animais. Foram

encontradas lesões mitocondriais induzidas pelo estresse e permeabilidade jejunal aumentada, ambos os eventos fortemente relacionados com ativação de mastócitos no 15º dia de experimento. Concluíram que longa exposição ao estresse psicossocial promove inflamação na mucosa intestinal e disfunção da barreira intestinal mediada pelos mastócitos. A notável semelhança desses achados com aqueles encontrados em um subgrupo de pacientes com SII reforça o interesse e a validade deste modelo experimental para a pesquisa de doenças intestinais sensíveis ao estresse, como a SII (Vicário et al 2010).

Portanto, Vicário et al (2012) puderam concluir que o estresse social crônico precede a disfunção intestinal, que se caracteriza por alteração da secreção epitelial de íons, atividade enzimática mitocondrial interrompida e hiperalgesiocolônica visceral, levando a crer que o método mimetiza a disfunção presente na SII tipo diarreia.

5. Câmaras de Ussing

A PI e sua integridade podem ser avaliadas de muitas maneiras e as técnicas utilizadas para isso variam dependendo do cenário (medidas *in vitro versus in vivo*), da espécie (humanos ou modelos animais), do marcador molecular usado para avaliação (íons, carboidratos de diferentes tamanhos, macromoléculas e antígenos, produtos bacterianos e bactérias), e dos compartimentos usados para os marcadores moleculares (sangue periférico, urina) (Hollander 1992, Bischoff et al 2014).

Os métodos não invasivos consistem na medição da excreção urinária de substâncias-teste administradas oralmente (Hollander 1992). Nesse caso, uma fração da substância-teste penetrará a barreira intestinal e atingirá a circulação sistêmica, sendo captada pelos rins e excretada pela urina em proporção direta à quantidade absorvida pelo TGI, de modo que sua excreção pela urina reflete a sua absorção intestinal (Bjarnason 1995). As substâncias-teste

mais comumente utilizadas são os açúcares (lactulose, manitol, D-xilose, L-rhamnose, sucralose, sucrose) e o ácido etileno diaminotetracético marcado com cromo⁵¹ (⁵¹Cr-EDTA) (Camilleri&Gorman 2007, Kerckhoffs et al, 2010).

Já o método Ussingchamber,ou câmaras de Ussing(cU) na língua portuguesa, é um método invasivo pois é realizado com amostras de tecido, *in vitro*, provenientes de humanos ou animais. É um valioso método para medir o transporte de eletrólitos, nutrientes e fármacos através dos tecidos epiteliais. Foi desenvolvido em torno de 50 anos atrás e tem sido aplicado praticamente a todos os tipos de epitélios (Clarke 2009) (Figura 8).

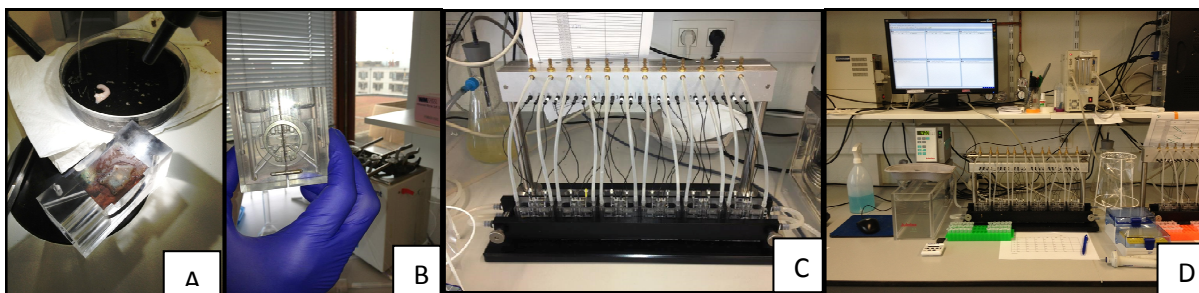


Figura 8. Câmaras de Ussing. Foto A: Montagem do tecido na metade da câmara, em cima do adaptador para amostras de tecidos animais. Foto B: fechamento da câmara e preenchimento com a solução de Krebs. Foto C: montagem das câmaras com os eletrodos e oxigênio no equipamento. Foto D: visão geral do equipamento com o monitor mostrando os resultados de resistência transepitelial captados de cada câmara.

Estudos de mucosa intestinal utilizando o método cU têm fornecido muitas das principais observações que beneficiaram o nosso entendimento sobre o processo de transporte transepitelial para a base molecular. Um dos epitélios mais estudados é o intestino, que tem fornecido diversas descobertashistóricassobre osmecanismos de transportede íons (Clarke 2009, Bischoff et al 2014).

A permeabilidade das JF varia conforme diferentes condições fisiológicas ou patológicas e de acordo com o segmento intestinal, no entanto, JF bem formadas são caracterizadas por alta

resistência elétrica transepitelial e baixa permeabilidade a solutos (Lu et al 2013, Krug et al 2014). Resistência elétrica transepitelial refere-se à medida de avaliação da integridade da mucosa (ou célula ou membrana). Ou seja: a medida de sua permeabilidade (Farré, et al, 2008).

Uma cU consiste em duas partes (ou metades), que são fixas em conjunto com o epitélio (folha de mucosa). As duas metades das câmaras são preenchidas com quantidades iguais de solução de Ringer. O transporte ativo de íons produz uma diferença de potencial (diferença de voltagem) através do epitélio. A diferença de tensão gerada é medida utilizando-se dois eletrodos de tensão que são colocados próximo do tecido/epitélio. Esta tensão é cancelada por outros dois eletrodos que são colocados na câmara, porém longe do epitélio. Esta quantidade de corrente injetada é chamada de corrente de curto-circuito (*I_{sc}* em inglês) e é a medida exata do transporte de íons ocorrendo em todo o epitélio (Clarke 2009, Bischoff et al 2014).

A medida da resistência transepitelial é obtida através do cálculo da lei de Ohm. A lei de Ohm mede a resistência elétrica de um condutor, e é dada pela fórmula:

$$R = \frac{V}{I} \quad \text{ou} \quad V = RI$$

Onde “V” é a diferença de potencial elétrico (ou tensão) medida em volt, “I” é a intensidade da corrente elétrica medida em amperes, e “R” é a resistência elétrica medida em ohm. Por isso que, quanto menor a resistência transepitelial, maior a PI (Clarke 2009).

As maiores limitações da técnica cU encontram-se na interpretação de um número relativamente pequeno de medidas para descrever o complexo sistema fisiológico da mucosa intestinal, por ser um método invasivo que necessita de tecido fresco para realização, e a falta de correlação entre os dados de uC e outras formas de análise, levantando a questão de quais aspectos da barreira intestinal podem ser avaliadas por essa abordagem. Apesar disso, a

técnica cU possui a vantagem de fornecer cultura de órgãos de curto prazo para a medição de transporte trans-membrana do epitélio intestinal polarizado (Clarke 2009, Bischoff et al 2014).

6. PCR em tempo real

A detecção e a quantificação do rearranjo de genes, amplificação, translocação e deleção constituem um problema significativo tanto na área da pesquisa quanto em diagnóstico clínico. “Reação em cadeia da polimerase em tempo real” ou “PCR em tempo real” (PCR-RT) é um procedimento bem estabelecido para quantificação da expressão gênica. Seu poder reside na habilidade de detectar, em “tempo real”, a cada ciclo do PCR, o acúmulo de material amplificado (*amplicons*) usando fluorescência (por meio da excitação de fluorocromos que marcam sondas sequência-específicas ou *primers* usados na reação). O uso da transcriptase reversa associada a PCR-RT tornou a quantificação do mRNA mais simples e precisa (Ponchel et al 2003, Almeida & Saddi, 2007, Logan et al 2009).

A PCR-RT requer uma plataforma de instrumentalização que contém um termociclador acoplado a um sistema ótico para excitação da fluorescência e captura da emissão, além de um computador para aquisição de resultados e análise final da reação. Várias tecnologias de PCR-RT estão disponíveis no mercado. Os sistemas mais usados são o SYBR Green® e o TaqMan®. O SYBR Green® é um corante que se liga ao sulco menor da fita dupla de DNA, tornando-o fluorescente. As vantagens de sua utilização incluem o fácil manuseio, baixo custo e o fato de que pequenas quantidades de amostras são suficientes (Ponchel et al 2003, Almeida & Saddi, 2007).

Durante os ciclos consecutivos de PCR-RT, a quantidade de DNA de fita dupla se eleva de maneira exponencial, aumentando assim a quantidade de SYBR Green® ligado e sua fluorescência. Entretanto, quando ocorre amplificação inespecífica ou amplificação de

dímeros de *primers*, estes também são detectados, interferindo na quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar se produtos de PCR inespecíficos foram formados na reação, uma curva de fusão é construída. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de fusão (Almeida & Saggi, 2007).

A PCR constitui em uma técnica muito eficaz para produzir grandes quantidades de fragmentos amplificados de DNA a partir de uma pequena concentração de um DNA molde presente em uma amostra inicial. O processo utiliza uma DNA-polimerase termoestável (Taq polimerase) e oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) que se ligam às extremidades 5' e 3' de cada uma determinada região do genoma a ser amplificado. A reação é baseada na incubação em vários ciclos constituídos essencialmente por 3 fases: 1) desnaturação do DNA da amostra, 2) anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao DNA desnaturado e 3) extensão das cadeias de DNA a partir de cada um dos iniciadores e sob a catálise da enzima Taq DNA Polimerase, sendo que tais fases ocorrem em diferentes temperaturas (Jackwood 1992).

O advento do método PCR-RT trouxe a possibilidade de se usar uma ferramenta diagnóstica ainda mais rápida do que a técnica de PCR convencional, com uma vantagem, ainda, de promover um aumento na sensibilidade e reprodutibilidade. O emprego dessa metodologia resulta, também, em uma redução no risco de contaminação do ambiente por manipulação de produtos amplificados, já que o PCR-RT permite a simultânea amplificação e detecção da sequência gênica alvo amplificada, através do uso de marcadores fluorescentes, além de evitar manipulações adicionais na técnica eletroforese, e a exposição ao brometo de etídeo (Niesters 2004, Ponchel et al 2003).

A diferença básica entre a reação de PCR convencional e a em tempo real é que esta última ocorre em um sistema fechado e é monitorada através de um programa computacional

que avalia a evolução da técnica por meio da detecção da fluorescência dos produtos amplificados a cada ciclo de amplificação (Mackay 2002).

7. Imuno-histoquímica

A técnica imuno-histoquímica (IHQ) surgiu com pesquisas em imunopatologia na década de 1940. A descrição como sendo “uma técnica de imunofluorescência para detecção de antígenos celulares em amostras de tecidos” marcou o início da IHQ. Desde então, esse método vem se tornando uma ferramenta valiosa tanto em diagnósticos quanto em pesquisas. A base da técnica é simples e baseia-se em três pilares: imunologia, histologia e química (Ramos-Vara 2005).

O conceito fundamental por trás da IHQ é a demonstração de antígenos em amostras de tecidos através de anticorpos específicos. Uma vez que a ligação antígeno-anticorpo acontecer, ela é demonstrada por meio de uma reação histoquímica colorida visível à luz do microscópio (Ramos-Vara 2005). Portanto, de maneira breve, “imuno-histoquímica” é a aplicação de um anticorpo específico marcado com uma enzima que permite a identificação de um antígeno específico, e a sua análise se dá por microscopia (Sun, 2012).

Apesar de conceitualmente simples, a metodologia tem se tornado cada vez mais complexa conforme metas mais rigorosas de sensibilidade e especificidade vão sendo estabelecidas. Inicialmente, eram utilizados métodos simples que produziam resultados rápidos, mas menos sensíveis (Werner et al 2005).

O método IHQ possui certas particularidades e o seu resultado é influenciado por diversos fatores. A começar pela fixação do espécime, passando pela escolha dos anticorpos a serem analisados em cada caso e pelas reações propriamente ditas, chegando até a interpretação das lâminas, podendo exigir prática e experiência (Werner et al 2005).

A qualidade da coloração da IHQ também depende de vários aspectos, incluindo fixação, lavagem, condições de incubação, assim como a montagem apropriada da célula ou das amostras na lâmina (Buchwalow&Bocker 2010).

JUSTIFICATIVA

Durante a década passada houve grande avanço no conhecimento da associação entre a disfunção da barreira da mucosa intestinal e o aumento de permeabilidade intestinal associadas ao desenvolvimento de doenças inflamatórias. Sabe-se que o estresse pode levar à alteração na PI e, por consequência, aos distúrbios gastrointestinais, como a SII. No entanto, não se sabe se o estresse afeta igualmente o intestino delgado e o cólon, e se suas respostas são diferentes frente a diversas categorias de estresse.

Considerando a importância da influência do estresse na saúde humana e a sua comprovada influência no aumento da permeabilidade intestinal, fator presente em grande parte dos distúrbios gastrointestinais, julgamos pertinente avaliar o efeito do estresse crônico, do estresse agudo e de ambos combinados na permeabilidade intestinal de ratos. Para tornar esse experimento factível, utilizamos um modelo murino para estudo da SII.

QUESTÕES DE PESQUISA

Qual intensidade de estresse causa mais dano (agudo, crônico ou combinado) ao intestino?

O intestino delgado e o cólon são afetados de maneiras distintas pelo estresse?

HIPÓTESES

1. O estresse combinado altera de maneira mais intensa a PI.
2. Intestino delgado e cólon têm a permeabilidade afetada na mesma proporção, pela ruptura das JF e pela infiltração dos mastócitos.

OBJETIVOS

Geral

Analisar os mecanismos de permeabilidade intestinal de ratos submetidos a diferentes tipos de estresse.

Específicos

1. Analisar o efeito dos diferentes tipos de estresse no peso corporal dos animais;
2. Analisar os níveis de corticosterona em ratos submetidos a estresse (agudo, crônico e combinado) e em ratos controle (nenhum estresse);
3. Analisar a resistência transepitelial do intestino delgado e do cólon em ratos estressados e controles;
4. Analisar a expressão genética de proteínas relacionadas às JF em ratos estressados e controles;
5. Analisar de que maneira a PI é afetada no intestino delgado e no cólon nos grupos de estresse;
6. Analisar qual porção intestinal é mais afetada pelo estresse através da expressão genética das proteínas constituintes das JF e da infiltração de mastócitos.

METODOLOGIA

1. Animais

Foram utilizados ratos wistar machos adultos (180-230g, Javier Labs, StBerthevinCedex, France), mantidos em temperatura ambiente controlada (20-22°C), em ciclo 13/11h claro/escuro, alimentados com ração padrão e água da torneira *ad libitum*. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Experimentos Animais da Universidade de Leuven, Bélgica.

2. Protocolos de estresse

Após uma semana de aclimatização alojados em pares em caixas de policarbonato (40 x 26 x 18 cm), os animais foram divididos em 4 grupos (n=8 por grupo) e mantidos assim por 14 dias, até o dia do sacrifício no 15º dia. Os grupos foram:

1-Grupo controle:

Os animais eram alojados aos pares nas caixas, preenchidas com 2 cm de cerragem.

2-Grupo de estresse agudo (estresse por isolamento/imobilização, 24 horas):

Os animais eram mantidos de forma idêntica ao grupo controle, porém 24 h antes do sacrifício eram submetidos ao estresse agudo, que consistia em transportá-los para uma pequena caixa metálica individual (20 x 12 x 10 cm). Esse método combina a tensão do isolamento (separação dos seus companheiros), do ambiente desconhecido (potencialmente desafiador) e de restrição parcial dos movimentos (dimensões reduzidas da gaiola).

3-Grupo de estresse crônico(Crowding stress, 14 dias):

Este método de estresse consiste em alojar, por 14 dias, 8 ratos por caixa, preenchida pela metade com cerragem.

4-Grupo de estresse combinado (crônico + agudo, 14 + 24h):

Os animais eram submetidos ao crowding stress por 14 dias e, após, ao estresse agudo.

3. Peso dos animais

O registro de peso dos animais era realizado a cada dois dias, sempre pelo mesmo investigador (o autor deste estudo) para minimizar estresse adicional pela manipulação.

4. Eutanásia

Após completar os protocolos de estresse, os animais sofriam eutanásia por deslocamento cervical e decapitação.

5. Avaliação de corticosterona

A avaliação para certificar-se de que os ratos estavam estressados foi realizada através da análise de corticosterona. Para isso, sangue truncanal era coletado em recipientes contendo heparina (Vacutainer, BD Benelux, Erembodegem, Belgium), processado em centrífuga para separação do plasma e armazenado a -80° graus. Para análise das amostras, ensaio imunoenzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

6. Estudos de permeabilidade intestinal

A coleta de amostras teciduais de jejuno e cólon distal para análise de PI e de integridade das JF foi realizada através de dissecação intestinal. As amostras eram mantidas em tampão de Krebs pré-oxigenado e geladas até a chegada ao laboratório *In Vivo* e durante a montagem dos tecidos nas câmaras.

Três segmentos de jejuno e colon distal de cada animal eram montados em câmaras de Ussing modificadas (MusslerScientificInstruments, Aachen, Germany) sob adaptadores com área de exposição 0.096 cm^2 . Os compartimentos mucoso e seroso eram preenchidos com tampão de Krebs, suplementados com 10mM de manitol e 10mM de glicose, respectivamente.

A diferença de potencial transmembrana era continuamente monitorada usando eletrodos Ag/AgCl. A resistência transepitelial (RT) foi calculada de acordo com a lei de Ohm a partir dos desvios de tensão induzidas por pulsos de corrente bipolar de $50\mu\text{A}$ a cada 60s, com uma duração de 200ms.

Os valores RT eram registrados para cada tecido em intervalos de 30 min. Foi utilizada a média da RT dos pontos de tempo 90 e 120 min para as 3 amostras de tecidos de cada animal. Foram selecionados esses pontos de tempo por que o platô estável da RT é atingida na maioria dos tecidos entre 90 e 120 min após a montagem do mesmo no equipamento.

7. PCR em tempo real

Amostras de tecido eram homogeneizadas em TRIzol (Invitrogen, Ghent, Belgium) e mantidas -80°C até o processamento. A extração e purificação do RNA (Kit High Pure RNA Isolation, Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para o c-DNA foram utilizadas $2\mu\text{g}$ de RNA – qScriptcDNASupermix kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA).

Para o PCR-RT foi utilizado o equipamento LightCycler480 system, SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium). Primers específicos para genes relacionados às JF foram desenhados (NCBI Primer-Blast).

Para o PCR-RT foi utilizado o seguinte programa:

1. 95°C por 10 min
2. 45 ciclos de amplificação (95°C por 10 s, 60°C por 15 s, 72°C por 10s)
3. programa de curva de fusão

Quantificação relativa da expressão de mRNA alvo foi realizada utilizando o gene housekeeping *Hprt1*, através do método $2\Delta\Delta Ct$.

8. Histologia e Imunohistoquímica

Seções de jejuno e colon distal foram fixadas durante a noite em paraformaldeído 3.7% e embebidas em parafina. Seções de 5µm eram cortadas com um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina (H&E).

As lâminas eram incubadas durante a noite com anti-ratmastcell protease 2 (RMCP2) (1:500; MoredunScientific, Penicuik, Scotland, United Kingdom) e mantidas por 1h em temperatura ambiente sob agitação, depois lavadas. Após, as lâminas eram incubadas com anticorpo secundário de cavalo anti-mousebiotinilado (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), mantidas por 1h em temperatura ambiente sob agitação e depois lavadas. Em seguida, as lâminas eram incubadas com substrato por 2 min (3,3'-diaminobenzidine, DAB kit, Vector Laboratories) e células positivas para RMCP2 na mucosa eram contadas em 10 campos de alta potência, não sobrepostos (HPF, x400, 0.233 mm²) por lâmina, de maneira cega. Os resultados eram expressos como o número de células RMCP2 positivas/HPF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

Almeida PR, Saddi VA. Monitoring minimal residual disease in Chronic myeloid leucemia by real time PCR. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2007; 29(4): 382-386.

Andresen V & Camilleri M. Irritable bowel syndrome. Recent and novel therapeutic approaches. *Drugs* 2006; 66(8): 1073-88.

Armario A, Ortiz R and Balash J. Effect of crowding on some psychological and behavioral variables in adult males rats. *Physiology & Behavior*, 1984a; 32:35-37.

Armario A, Ortiz R & Balasch J. Effect of crowding on some physiological and behavioral variables in adult male rats. *Physiology & Behavior* 1984b; 32:35-37.

Barakauskas VE, Lam GY, Estey MP. Digesting all the options: laboratory testing for celiac disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2014; 22:1-21.

Barreau F, Cartier C, Leveque M et al. Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. *J Physiol* 2007, 580(1):347-56.

Bauer H, Zweimueller-Mayer Z, Steinbacher P et al. The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010; 2010:1-11.

Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D. Intestinal permeability: an overview. *Gastroenterology* 1995; 108: 1566-81.

Bertiaux-Vandaele N, Youmba SB, Belmonte L et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(12): 2165-73.

Bennett EJ, Tennant CC, Piesse C, Badcock CA, Kellow JE. Level of Chronic life stress predicts clinical outcome in irritable bowel syndrome. *Gut* 1998; 43: 256-261.

Bikov VL. Paneth cells: history of discovery, structural and functional characteristics and the role in the maintenance of homeostasis in the small intestine. *Morfologija* 2014; 145(1): 67-80.

Bischoff SC, Barbara G, Buurman W et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology* 2014; 14(189):1-59.

Bonaz B. Inflammatory bowel diseases: a dysfunction of brain-gut interactions? *Minerva GastroenterolDietol*.2013;59(3):241-59.

Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*2013; 144: 36-49.

Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE et al. An evidence-based systematic review on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(1): S1-S40.

Buchwalow IB, Bocker W. *Immuno-histochemistry: basics and methods*. New York: Springer, 2010.

Calabrò A, Gralka E, Luchinat C. Metabolomic Perspective on Coeliac Disease. *Autoimmune Dis*. 2014; Article ID: 756138, 13 pages.

Camilleri M, Madsen K, Spiller R et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *NeurogastroenterolMotil* 2012; 24: 503-512.

Camilleri M, Gorman H. Intestinal permeability and irritable bowel syndrome. *NeurogastroenterolMotil* 2007; 19: 545-552.

Caso JR, Leza JC, Menchén L. The effects of physical and psychological stress on the gastrointestinal tract: lessons from animal models. *Current Molecular Medicine* 2008; 8: 299-312.

Catanzaro R, Occhipinti S, Calabrese F et al. Irritable bowel syndrome: new findings in pathophysiological and therapeutic field. *Minerv Gastroenterol Dietol* 2014; 60(2):151-63,

Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nature reviews Endocrinology* 2009; 5: 374-381.

Cinova J, De Palma G, Stepankova R. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *Plos One* 2011; 6(1): 1-10.

Clarke LL. A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009, 296(6): G1151-G1168.

Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 2011, 23: 187-92.

Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F et al. PASSCLAIM-gut health and immunity. *Eur J Nutr* 2004, 43 (Suppl 2): III118-III173.

DeMeo MT, Mutlu EA, Keshavarzian A et al. Intestinal permeation and gastrointestinal disease. *J Clin Gastroenterol*, 2002; 34(4):385-96.

Dunlop SP, Hedben J, Campbell E et al. Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(8):1295-98.

Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: an interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18(5): 479-97.

Farré R, Malenstein HV, De Vos R et al. Short exposure of esophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. *Gut* 2008, 57: 1366-74.

Faresjo A, Grodzinsky E, Johansson S, Wallander MA, Timpka T, Akerlind I. Psychosocial factors at work and in every day life are associated with irritable bowel syndrome. *Eur J Epidemiol* 2007; 22: 473-480.

Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation: living life on the edge of the wall. *Am J Pathol*. 2008;173(5):1243-52.

Fukudo S. Stress and visceral pain: focusing on irritable bowel syndrome. *Pain* 2013; 154 (1):S63-70.

Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Current Molecular Medicine* 2008; 8:274-281.

Grenham S, Clarke G, Cryan J et al. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology* 2011; 2:1-15.

Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124:3-20.

Gwee KA, Leong YL, Graham C, et al. The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 1999; 44: 400-406.

Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(9):721-6.

Hughes PA, Zola H, Penttila IA et al. Immune activation in irritable bowel syndrome: can neuroimmune interactions explain symptoms? *Am J Gastroenterol* 2013; 108(7): 1066-74.

Jackwood MW, Hilt DA, Callison AS. Detection of infectious bronchitis virus by real time reverse transcriptase reverse transcriptase-polymerase chain reaction and identification of a quasispecies in the Beaudette strain. *AvianDis* 2003; 47(3)718-724.

Jauregi-Miguel A, Fernandez-Jimenez N, Irastorza I et al. Alteration of tight junction gene expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58(6):762-7.

Keita AV, Soderholm JD, Ericson AC. Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 770-778.

Kerckhoffs AP, Akkermans LMA, de Smet MBM et al. Intestinal permeability in irritable bowel syndrome patients: effects of NSAIDs. *Dig Dis Sci*. 2010; 55:716-23.

Konturek PC, Brzozowski T, Konturek SJ. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J Physiol Pharmacol* 2011; 62(6):591-9.

Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 36C:166-176.

Kucharzik T, Lügering N, Rautenberg K et al. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915:171-83.

Kyrlagkitis I, Karamanolis DG. Pathophysiology of irritable bowel syndrome: the role of brain-gut axis and serotonergic receptors. *Annals of Gastroenterology* 2002; 5(3):248-252.

Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2013; 48(1):58-69.

Lee H, Park JH, Park DJ et al. Mucosal mast cell count is associated with intestinal permeability in patients with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil* 2013; 19(2):244-50.

Lee KJ, Tack J. Altered intestinal microbiota in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol&Motil* 2010; 22: 493-98.

Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006; 130:1480-91.

Lu Z, Ding L, Lu Q et al. Claudins in intestines. Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue Barriers* 2013; 1(3): e24978-1-e24978-14.

McFarland LV. Normal flora: diversity and functions. *Microbiol Ecology in Health and Disease* 2000; 12:193-207.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Survey and summary: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(6):1292-1305.

Man F, Bustos FLM. Irritable bowel syndrome: a functional disorder? *Acta Gastroenterol Latinoam* 2013; 43(4):321-34.

Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Ann Rev PatholMech Dis* 2010; 5:119-44.

Martínez C, Vicario M, Ramos L et al. The jejunum of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome shows molecular alterations in the tight junction signaling pathway that are associated with mucosal pathobiology and clinical manifestations. *Am J Gastroenterol* 2012a; 107: 736-46.

Martínez C, González-Castro A, Vicario M et al. Cellular and molecular basis of intestinal barrier dysfunction in the irritable bowel syndrome. *Gut and Liver* 2012b, 6:305-315.

Martínez C, Lobo B, Pigrau M, et al. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut* 2013; 62: 1160-1168.

Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nature* 2011; 12:453-467.

Nicholl BI, Halder SL, Macfarlane GJ et al. Psychosocial risk markers for new onset irritable bowel syndrome. *Pain* 2008; 137:147-55.

Niesters HGM. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(1):5-11.

Odenwald MA, Turner JR. Intestinal permeability defects: is it time to treat? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11(9): 1075-83.

Ohman L, Simrén M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7(3): 163-73.

Ortiz-Lucas M, Saz-Peiró P, Sebastián-Domingo JJ. Irritable bowel syndrome immune hypothesis. Part one: the role of lymphocytes and mast cells. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102(11):637-647.

Piche T. JF and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol Motil* 2014; 26: 296-302.

Ponchel F, Toomes C, Bransfield K et al. Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003, 3(18): 1-13.

Qin HY, Cheng CW, Tang XD et al. Impact of psychological stress on irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2014; 20(39): 14126-1431.

Radziwiłłowicz P, Gil K. Psychiatric aspects of the irritable bowel syndrome. *Psychiatr Pol.* 2007; 41(1):87-97.

Ramiro-Puig E, Pérez-Cano FJ, Castellote C et al. El intestino: pieza clave Del sistema inmunitario. *Rev Esp Enferm Dig* 2008; 100(1):29-34.

Ramos-Vara JA. Technical aspects of Immunocytochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42(4): 405-426.

Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 17: 362-381.

Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 208-215.

Schenk M. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2008;22(3):391-09.

Soderholm JD, Yang PC, Ceponis P, *et al.* Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology* 2002a; 123: 1099-1108.

Soderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, MacQueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002b; 283: G1257-1263.

Spiller R. Clinical Update: irritable bowel syndrome. *The Lancet* 2007, 369: 1586-1588.

Stasi C, Bellini M, Bassotti G *et al.* Serotonin receptors and their role in the pathophysiology and therapy of irritable bowel syndrome. *Tech Coloproctol* 2014; 18(7):613-21.

Sun T. Flow cytometry, immunohistochemistry and molecular genetics for hematologic neoplasms. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.

Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem* 2011; 286(36):31263-71.

Tana C, Umesaki Y, Imaoka A *et al.* Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 512-e115.

Theoharis CT, Donelan JM, Papadoupoulou N et al. Mast cells as target of corticotropin-releasing factor and related peptides. *Trends in Pharmacological Sci* 2004, 25(11): 563-68.

Vaiopoulou A, Karamanolis G, Psaltopoulou T et al. Molecular basis of the irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterology* 2014; 20(2):376-383.

Van Tilburg MA, Palsson OS, Whitehead WE. Which psychological factors exacerbate irritable bowel syndrome? Development of a comprehensive model. *J Psychosom Res.* 2013;74(6):486-92.

Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, *et al.* Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut* 2014; 63: 262-271.

Vanuytsel T, van Wanrooy S, Vanheel H, et al. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut* 2014; 63(8):1293-9.

Vicario M, Guilarte M, Alonso C, et al. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of Chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 1166-1175.

Vicario M, Alonso M, Guilarte M et al. Chronic psychological stress induces reversible mitochondrial damage and corticotropin-releasing factor type 1 upregulation in the rat intestine and IBS-like gut dysfunction. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37:65-77.

Werner B, Campos AC, Nadji M et al. Practical use of immunohistochemistry in surgical pathology. *J Bras Patol Med Lab* 2005; 41(5): 353-64.

Zhou QQ, Zhang B, Verne GN. Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 2009; 146(1-2): 41-6.

TARGET JOURNAL

Primeira opção: Stress

Segunda opção: Neurogastroenterology and Motility

Terceira opção: American Journal of Physiology

ORÇAMENTO E FONTES DE FINANCIAMENTO

Bolsa de doutorado ProUni.

Bolsa Ciências sem Fronteira para PhD Sandwich de 6 meses em Leuven, Bélgica.

Laboratório TARGID – Universidade Católica de Leuven, Bélgica.

CONCLUSÕES

Nós demonstramos maior suscetibilidade do jejuno em relação ao cólon para o estresse experimental agudo e crônico em ratos Wistar. A função de barreira colônica foi afetada apenas em ratos submetidos ao estresse agudo acompanhado de um episódio de estresse prolongado.

Nós descrevemos alterações na expressão das moléculas das JF no jejuno após estresse agudo e encontramos aumento da densidade de mastócitos no cólon distal após estresse crônico, sugerindo mecanismos diferentes de disfunção da barreira intestinal por estresse induzido no intestino delgado versus o cólon.

Nossos dados fornecem maior entendimento sobre a interação entre o estresse agudo e crônico e seus efeitos na função da barreira intestinal, conforme a porção intestinal, o que pode ter relevância funcional e terapêutica em distúrbios da barreira intestinal em desordens gastrointestinais humanas.

PERSPECTIVAS

Testar a *Spirulina platensis* como terapia nutricional para prevenir alterações de PI. A *Spirulina* é uma alga que possui efeitos antiinflamatórios, antioxidantes e probiótico. O tratamento da SII, por exemplo, é baseado em sintomas e geralmente insatisfatório. Os novos conhecimentos sobre ECI e seus mecanismos e neurotransmissores, e a participação da microbiota têm gerado essa necessidade. Portanto, há necessidade de novas abordagens terapêuticas, e que não causem efeitos adversos.

Subacute stress and chronic stress interact to decrease intestinal barrier function in rats.

Running title: Stress and intestinal barrier function

Adriana Lauffer^{1,2*}, Tim Vanuytsel^{1*}, Christophe Vanormelingen¹, Hanne Vanheel¹, Shadea Salim Rasool¹, Joran Tóth¹, Jan Tack¹, Fernando Fornari², Ricard Farré^{1,3}.

Affiliations:

1/ Translational Research Center for Gastrointestinal Disorders (TARGID), KU Leuven, Leuven, Belgium.

2/ Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

3/ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos II, Barcelona, Spain

* Contributed equally to the study.

Correspondence: Ricard Farré, PhD
University of Leuven
TARGID
Herestraat 49, box 701
3000 Leuven, Belgium
Tel.: +32 16 37 75 11
Fax: +32 16 34 59 39
E-mail: ricard.farre@med.kuleuven.be

KEYWORDS:

brain-gut axis, crowding stress, functional gastrointestinal disorders, intestinal permeability, mast cells, psychological stress.

ABSTRACT

Psychological stress increases intestinal permeability, potentially leading to low-grade inflammation and symptoms in functional gastrointestinal disorders. We assessed the effect of subacute, chronic and combined stress on intestinal barrier function and mast cell density. Male Wistar rats were allocated to 4 experimental groups (n=8/group): 1/ sham; 2/ subacute stress (isolation and limited movement for 24 h); 3/ chronic crowding stress for 14 days and 4/ combined subacute and chronic stress. Jejunum and colon were collected to measure: transepithelial electrical resistance (TEER; a measure of epithelial barrier function); gene expression of tight junction molecules; mast cell density. Plasma corticosterone concentration was increased in all three stress conditions vs. sham, with highest concentrations in the combined stress condition. TEER in the jejunum was decreased in all stress conditions, but was significantly lower in the combined stress condition than in the other groups. TEER in the jejunum correlated negatively with corticosterone concentration. Increased expression of claudin 1, 5 and 8, occludin and zonula occludens 1 mRNAs was detected after subacute stress in the jejunum. In contrast, colonic TEER was decreased only after combined stress, and the expression of tight junction molecules was unaltered. Increased mast cell density was observed in the chronic and combined stress condition in the colon only. In conclusion, our data show that chronic stress sensitizes the gastrointestinal tract to the effects of subacute stress on intestinal barrier function; different underlying cellular and molecular alterations are indicated in the small intestine vs. the colon.

INTRODUCTION

Stress, defined as a state in which the homeostasis of an organism is actually threatened or perceived to be so, is an increasingly common problem in human society (Chrousos, 2009). Psychological stress affects symptoms and disease course in functional gastrointestinal disorders (FGID) such as irritable bowel syndrome (IBS) (Nicholl et al., 2008; Faresjo et al., 2007), and organic gastrointestinal (GI) diseases such as inflammatory bowel disease (IBD) (Bonaz and Bernstein, 2013). The exact pathway through which stress influences GI disorders is unclear, but increased intestinal permeability, allowing increased transepithelial passage of luminal antigens, potentially initiating a low-grade immune activation, has been suggested to be a mechanistic link. Indeed, impaired intestinal barrier function has been observed in at least a subset of patients with FGID and IBD (Piche, 2014; Salim and Söderholm, 2010; Martinez et al., 2013; Vanheel et al., 2014; Zeissig et al., 2012). Moreover, we and others have demonstrated increased intestinal permeability after psychological stressors in both animals (Vanuytsel et al., 2011; Söderholm et al., 2002a; Vicario et al., 2010; Kiliaan et al., 1998; Saunders et al., 2002; Keita et al., 2010; Söderholm et al., 2002b) and healthy human volunteers (Vanuytsel et al., 2014b; Alonso et al., 2008).

Animal models of acute and chronic psychological stress have been instrumental in further elucidating the pathophysiological mechanisms behind stress-induced hyper-permeability. Mast cells and corticotropin-releasing factor (CRF) have been identified as key mediators in the stress-sensitive brain-gut axis (Söderholm et al., 2002a; Vicario et al., 2010; Vanuytsel et al., 2014b; Saunders et al., 2002; Keita et al., 2010; Söderholm et al., 2002b). The most common stress protocols used in these animal studies include water avoidance and (partial) restraint stress, as acute or chronic stressors, and crowding as a model for chronic psychosocial stress. However, in clinical practice, many patients are subject to chronic psychological stress with superimposed subacute episodes. It is unknown whether the stress

response of the gut is mainly determined by the subacute or chronic components of the stressor or whether they have a synergistic effect. Furthermore, only limited information is available on differential effects on the small intestine versus the colon.

The changes in permeability in human GI disorders have been linked to altered expression of the tight-junction related molecules claudin (Cln) 1, 2, 5, 8, zonula-occludens 1 (ZO-1), occludin (Ocln). We have recently demonstrated increased small intestinal permeability in an animal model of FGID, associated with changes in Cln1 and 2 (Vanuytsel et al., 2014a). Data on expression of tight-junction related molecules in stress-related conditions are limited.

The aim of the current study was to determine the effects of a subacute and a chronic stressor, alone and in combination on activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) stress axis and on intestinal barrier function in rats. Moreover, we investigated whether the influence of the stress protocols on intestinal barrier function differed in the small intestine and the colon, and whether alterations in expression of mRNAs for tight junction related molecules (Cln1, 2, 5, and 8, ZO-1 and Ocln), and mast cell infiltration were similar in both segments. We hypothesized that subacute stress on the background of chronic stress would interact in terms of reduction of the intestinal barrier capacity.

METHODS

Animals

Adult male Wistar rats (180-230g; Janvier Labs, St Berthevin Cedex, France) were housed in polycarbonate cages in a temperature-controlled environment (20-22°C) with artificial light exposure from 07:00h to 20:00h, and provided with standard rat food and tap water *ad libitum*. The experiments were approved by the ethics committee for animal experiments of the University of Leuven, Belgium, according to European guidelines.

Stress Protocols

A time line of the stress protocols is depicted in Figure 1. After one week of acclimatization, during which the rats were housed in pairs, the rats were divided into four groups until the time of euthanasia after 2 weeks (n=8 per group): 1/ Sham control rats; 2/ Small cage housing (subacute stress, 24h); 3/ Crowding stress (chronic stress, 14d); 4/ Crowding stress combined with small cage housing afterwards (chronic + subacute stress 14+1d respectively). The sham control group was housed in pairs in standard polycarbonate cages (40 x 26 x 18 cm) with 2 cm of bedding. In the subacute stress group, the rats were initially housed identically to the control group. However, during the last 24 hours before euthanasia, they were isolated (1 rat per cage) in a smaller metal cage (20 x 12 x 10 cm). This subacute stressor combines an unknown, potentially threatening environment with isolation stress due to separation from their cage mate and finally the dimensions of the cage also restrict movement to some extent (Gardiner et al., 1977; Gavrilovic et al., 2005; Perello et al., 2006). The crowding stress protocol was set up as described previously (Vicario et al., 2010). Briefly, eight rats were housed together in a standard polycarbonate cage, half filled with bedding, during 14 days. Crowding is a psychosocial stressor with competition for both space in the cage and access to food. Finally, the rats in the fourth group underwent the combination of the latter two protocols, i.e. after a period of 14 days of crowding stress, they were transferred singly to the

smaller cages for 24 hours. During the two week stress period, the weight of the rats was registered every two days by the same investigator (AL) to minimize additional stress through the manipulation. The rats were euthanized after completion of the protocol between 11:00h and 12:00h by cervical dislocation, without anaesthetic, and decapitation. Samples of mid-jejunum and distal colon were collected to perform permeability studies, real-time PCR (RT-PCR) and histology.

Hypothalamic-pituitary adrenal (HPA) axis activity

Trunk blood was collected immediately after decapitation in heparin-containing tubes (Vacutainer, BD Benelux, Erembodegem, Belgium) and processed to separate plasma. We were not able to collect a sufficient amount of trunk blood in 3 rats (1 in each of the sham, subacute stress combined stress groups). Plasma corticosterone concentrations were determined using an enzymatic immuno-assay (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. The limit of detection was 3×10^{-2} ng.mL⁻¹, the intra-assay was variation 8% and the inter-assay variation 9.8%. Plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) concentrations were measured using an ELISA assay (MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA). The limit of detection was 9.37 pg/mL and the coefficient of variation was less than 10%.

Ussing Chamber studies

Three segments of mid-jejunum and distal colon were mounted in modified Ussing chambers (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany) with an exposed area of 0.096 cm², without removal of the muscularis propria and the serosa. The mucosal and serosal compartments were filled with Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4 containing (in mM): 118 NaCl; 4.7 KCl; 1.2 CaCl₂; 1.2 MgSO₄; 1.2 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃), supplemented with 10mM mannitol and 10mM glucose respectively for the jejunum and with 10mM glucose in both compartments for the colon. Solutions were kept at 37°C and gassed with carbogen (95% O₂,

5%CO₂). Transmucosal potential difference was continuously monitored using Ag/AgCl electrodes. The transepithelial electrical resistance (TEER) was calculated according to Ohm's law (TEER=voltage/current) from the voltage deflections induced by bipolar current pulses of 50µA every 60s with a duration of 200ms. The TEER values were registered for each tissue at 30 min intervals during two hours. TEER was used as a read-out for intestinal barrier function with lower TEER indicating reduced barrier function. Tissues from just 6 out of the 8 rats of the subacute and combined stress groups were mounted in the Ussing Chambers because of limited availability of equipment and personnel. All rats of the sham and chronic stress groups were used in the Ussing Chamber experiments, but the data from one rat of the sham group were excluded because of a technical problem.

Real-time PCR

After separation of the mucosa and submucosa from the underlying layers by gentle dissection, the tissue was homogenized in TRIzol reagent (Invitrogen, Ghent, Belgium) and stored at -80°C until further processing. Total RNA was extracted and further purified using a High Pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium) according to the manufacturer's instructions. c-DNA was synthesized from 2µg RNA using the qScript cDNA Supermix kit (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD, USA). The RT-PCR reaction was performed on a LightCycler 480 system with SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Vilvoorde, Belgium).

Specific primers for tight junction-related mRNAs were designed using NCBI Primer-Blast (Table 1). A three-step amplification program was used: 95°C for 10 min followed by 45 cycles of amplification (95°C for 10 s, 60°C for 15 s, 72°C for 10s) and finally a melting curve program. Target mRNA expression was quantified relative to the housekeeping gene *Hprt1* using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Schmittgen and Livak, 2008).

Histology

Segments of mid-jejunum and distal colon were fixed overnight in paraformaldehyde 3.7% and embedded in paraffin. Transverse 5µm sections were cut with a microtome, mounted on standard, uncoated glass slides, deparaffinised with xylene, rehydrated with serial ethanol dilutions and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For immunohistochemistry, unstained sections mounted on coated slides were deparaffinised and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was inhibited with 5% H₂O₂ for 30 minutes and unspecific binding sites were blocked with Protein Blocking Solution (Dako, Glostrup, Denmark). Slides were incubated overnight with anti-rat mast cell protease 2 (RMCP2) (1:500; Moredun Scientific, Penicuik, Scotland, United Kingdom) at 4°C and 1 hour at room temperature with a secondary horse anti-mouse biotinylated antibody (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Finally, sections were incubated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB substrate development kit, Vector Laboratories) for 2 minutes. RMCP2-positive cells in the mucosa were counted in 10 non-overlapping high power fields (HPF, x40, 0.233 mm²) per slide in a blinded manner and expressed as the number of RMCP2 positive cells/HPF. The staining was not performed for the jejunum of 6 rats (2,2,1 and 1 in the sham, subacute, chronic and combined stress groups respectively) and the colon of 4 rats (2,1 and 1 in the sham, chronic and combined groups respectively) because of inappropriate tissue fixation and/or processing.

Statistical analysis

Two-way repeated measures ANOVA with a post-hoc test per time-point with Bonferroni correction for multiple testing was used to evaluate changes in body weight over time in the two groups when the ANOVA was statistically significant. For the comparisons of body weight, the data were analyzed in two groups depending on the presence ('chronic' and

‘combined’ stressor) or absence (‘sham’ and ‘subacute’ stressor) of the chronic stressor as the small cage housing for 24 hours did not alter body weight.

The TEER data over time for the 4 treatment groups were analyzed using a mixed model analysis in the SAS Enterprise Guide using TEER as the dependent variable. Time (minutes after mounting in the Ussing chamber), group (sham, subacute, chronic or combined stress) and an interaction term (time*group) were entered as fixed effects in the model. Time was also entered in the model as a repeated, ‘within-subject’ effect. In case of a significant treatment effect, post-hoc differences between the groups were tested with a Bonferroni post-hoc correction for multiple testing.

Differences in corticosterone and ACTH concentrations, gene expression of tight junction molecules and mast cell density between the 4 treatment groups were evaluated by a one-way ANOVA with post-hoc tests with Bonferroni correction for multiple testing between all possible pairs of groups when the ANOVA was statistically significant. If the data were not normally distributed (tested with a Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk test), a Kruskal Wallis test was used with a Dunn’s post-hoc comparison test.

Correlations were tested by computing Pearson’s or Spearman’s correlation coefficient. In order to test correlations between TEER and other parameters, the TEER values between 30 and 90 minutes were averaged to obtain a single TEER value per rat. These time points were selected because a stable TEER plateau is reached in most tissues between 30 and 90 minutes after mounting (Vanuytsel et al., 2014a). We performed a Bonferroni correction for multiple testing for the correlations tested.

Data are presented as mean±SEM. Data were analyzed using Prism 5.01 and SAS Enterprise Guide 6.100. A p-value < 0.05 was taken as indicative of statistical significance.

RESULTS

Effect of stress on body weight, and plasma corticosterone and ACTH concentrations

Rats subjected to crowding stress (chronic and combined stress protocol, n=16) gained significantly less weight compared to the sham and subacute stress groups (n=16) during the first 14 days of the experiment (factor time x group $F(7,210)=23.89$; $p<0.0001$) (Fig. 2A). Plasma corticosterone concentrations were significantly altered during the different stress protocols ($F(3,25)=22.7$; $p<0.0001$). Corticosterone concentration was greater in the subacute and combined stress condition compared to the sham condition (Fig. 2B), with the greatest concentrations measured in the combined stress condition. A negative correlation was found between the body weight gain and plasma corticosterone concentration (Spearman $r = -0.62$; $p<0.01$), after exclusion of the rats housed in the smaller cages afterwards because of the impact of the subacute stressor on corticosterone secretion. Plasma ACTH concentrations were unaffected by the stress conditions ($F(3,26)=1.168$; $p=0.34$) (Fig. 2C).

Stress and intestinal barrier function

In the jejunum, TEER was less in the three stress (subacute, chronic and combined) conditions compared to sham (factor group $F(3,23)=43.93$; $p<0.0001$) (Fig. 3A). Moreover, the combined stress condition resulted in significantly lower TEER values compared to the sham, subacute and chronic stress groups (Fig. 3A). In contrast, colonic TEER was only reduced in the combined stress compared to the sham condition (factor group $F(3,23)=3.90$; $p=0.02$) (Fig. 3B). A negative correlation was present between plasma corticosterone concentrations and jejunal TEER (Pearson $r = -0.56$; $p<0.01$), i.e. greater corticosterone concentrations corresponded to decreased small intestinal barrier function (Fig. 3C). In the colon no correlations between stress-related parameters and TEER were observed.

In the jejunum, significant differences were found in the expression of mRNAs for *Cln1* ($F(3,28)=4.323$; $p=0.01$), *Cln2* ($F(3,28)=4.145$; $p=0.02$), *Cln5* ($F(3,28)=3.815$; $p=0.02$), *Cln8* (Kruskal-Wallis statistic 10.68, $p=0.01$), *Ocln* ($F(3,28)=18.89$; $p<0.0001$) and *ZO-1* ($F(3,28)=3.357$; $p=0.03$) across the different stress conditions. In rats subjected to subacute stress, increased jejunal expression of *Cldn1*, *Cldn5*, *Cldn8*, *Ocln* and *ZO-1* mRNAs was found compared to the control condition (Fig. 4). Expression of *Cldn2* was lower in the combined stress condition compared to sham stress (Fig. 4B).

Jejunal TEER correlated negatively with the expression of mRNAs for *Cldn1* (Pearson $r = -0.60$; $p<0.001$), *Cldn5* (Pearson $r = -0.55$; $p<0.01$) *Cldn8* (Pearson $r = -0.67$; $p=0.0001$), *Ocln* (Pearson $r = -0.40$; $p=0.04$) and *ZO-1* (Pearson $r = -0.38$; $p=0.05$), but only the correlations with *Cldn1* ($p<0.01$), *Cldn5* ($p=0.02$) and *Cldn8* ($p<0.01$) persisted after correction for multiple testing. Also, a positive correlation was found between plasma corticosterone concentration and expression of mRNAs for *Cldn5* (Pearson $r = 0.41$; $p=0.02$; NS after multiple testing correction) and *Cldn8* (Pearson $r = 0.60$; $p<0.001$; $P<0.01$ after multiple testing correction).

No alterations in expression of colonic tight-junction related mRNAs were detected (Fig. 5). Additionally, no correlations between colonic expression of permeability-related genes and colonic TEER or plasma concentrations of corticosterone could be identified.

Mast cell infiltration

None of the stress conditions altered the number of mast cells, identified by positive immunostaining for RMCP2, in the mucosa of the jejunum (Fig. 6A). In contrast, a significant increase in the mast cell count was observed in both the chronic and combined stress conditions in the colon ($F(3,24)=7.569$; $p=0.01$) (Fig. 6B-D). No correlation between the

number of RMCP2 positive cells in the colonic mucosa and permeability and corticosterone concentrations could be demonstrated.

DISCUSSION

In the present study we demonstrated that both in the jejunum and the colon, subacute stress in chronically stressed rats reduced intestinal barrier function more than subacute or chronic stress alone. In the jejunum, TEER correlated with plasma corticosterone concentration and alterations in the gene expression of tight-junction molecules were observed. In the colon, increased mast cell counts were present in the chronic and combined stress conditions. Our data indicate that chronic stress sensitizes the gastrointestinal tract to the effects of subacute stress in terms of intestinal barrier function and suggest different underlying cellular and molecular alterations in the small intestine vs. the colon.

We showed that exposing the Wistar rats to a subacute stressor resulted in an increased plasma corticosterone concentration in chronically stressed rats in comparison to the stress-naïve rats. Our data confirm previously published data in rodents (Harris et al., 2004; Ferland et al., 2014; Nyuyki et al. 2012) showing HPA-axis sensitization through chronic stress. In a chronic subordinate colony housing model, another validated model of chronic psychosocial stress, Nyuyki et al. also reported unchanged corticosterone concentrations in chronically stressed animals and an increased plasma corticosterone response to an acute heterotypic stressor, in agreement with our findings (Nyuyki et al. 2012). Other groups have reported blunted HPA-responsiveness to acute stressors in the presence of chronic background stress which is at variance with our data (Chen et al., 2008; Roth et al., 2012). However, these and many other studies used repeated application of a homotypic stressors (e.g. restraint, cold stress, water-avoidance stress), which have been criticized for limited face validity in comparison to human chronic stress that involves a social context (Tamashiro et al., 2005). In contrast, crowding stress is a validated model for chronic social stress involving competition for food and space in the cage, potentially better representing chronic stress in humans (Vicario et al., 2010). We used pair-housed rats as a control group. We cannot exclude that in some cages this co-

habitation may have led to a hierarchical structure with one dominant and one subordinate rat, influencing the results. Corticosterone concentrations, however, were quite homogeneous within the cages, providing a counter-argument against the dominant-subordinate hypothesis. However, we did not perform behavioral studies to verify (absence of) stress induction which is a limitation of our study. Plasma ACTH concentrations were not changed at the end of the stress conditions, suggesting increased adrenal sensitivity to ACTH, as reported previously by other groups (Nyuyki et al. 2012).

All stress protocols (subacute, chronic and combined) resulted in increased jejunal permeability, but the lowest TEER values were found with the combined stress protocol, suggesting an interactive effect of subacute and chronic stress. Interestingly, grouping the data of all the treatment groups together revealed a negative correlation between jejunal TEER and the plasma corticosterone concentrations. In contrast, colonic barrier function was only affected in the combined stress group and no correlation between corticosterone and TEER was observed. To the best of our knowledge, this is the first report investigating the effect on intestinal barrier function of a subacute stressor in an animal with chronic background stress. Similar data have been reported in a maternal separation protocol, a model of neonatal trauma. Söderholm et al. showed that a mild acute stressor (30 minutes of water avoidance stress) in 3 months old rats induced colonic barrier dysfunction only in those rats that had been separated from the dams in the neonatal period (Söderholm et al. 2002b). Vicario *et al.* reported increased permeability in both the colon and jejunum after chronic crowding stress in the more stress-sensitive Wistar-Kyoto rats, which persisted until 7 days after termination of the stress protocol (Vicario et al., 2012). The reason for the disparate results may relate to the rat strain (O'Malley et al., 2014), environmental factors such as the microbiome (Xu et al., 2014) and housing. Our data are also at variance with the results of Zheng et al. in a chronic stress model using repeated water avoidance stress in Sprague Dawley rats (Zheng et al.,

2013). They reported that chronic water avoidance stress resulted in increased permeability in the colon, but not in the jejunum, and that this effect was mimicked by injection of corticosterone. However, permeability was measured by a single pass perfusion with a solution containing different sizes of polyethylene glycol (PEG) and only permeability to 400 Dalton PEG, but not to smaller or larger PEG molecules, was enhanced. Whether the different conclusions are related to the method of permeability measurements, the stress protocol or the strain of rats is unclear. Based on our results, we cannot distinguish whether the association between jejunal permeability and corticosterone concentrations represents a causative link and if so, whether it is related to a direct effect of corticosterone (Zheng et al., 2013) on the intestinal barrier or whether other molecules (e.g. CRF) or pathways (e.g. sympathetic nervous system) of the stress response are responsible for this effect. The majority of the data in the literature point towards a primary role for CRF in stress-induced intestinal permeability changes in jejunum (Smith et al., 2010), the distal ileum (Keita et al., 2010) and colon (Santos et al., 1999; Saunders et al., 2002; Wallon et al., 2008). Similarly, Reber et al. reported that the decreased colonic barrier function in the chronic subordinate colony housing model was largely unaffected after adrenalectomy, indicating that corticosterone was not the main causal factor in impaired colonic barrier function in this model (Reber et al. 2011).

A surprising finding was increased jejunal gene expression of the sealing claudins 1, 5 and 8, Occludin and ZO-1 in the subacute stress condition. Moreover, significant negative correlations between proximal small intestinal TEER and the expression of Cldn1, 5 and 8 mRNAs were demonstrated. Our data confirm earlier findings from our group showing increased gene expression of ZO-1 and Occludin after acute partial restraint stress (Vanuytsel et al., 2011). Data on expression of tight-junction related molecules in stress conditions is limited, especially in the small intestine. Decreased protein expression of ZO-1 and OCLN was reported in the terminal ileum after a single session of partial restraint stress in two studies by the same group

(Mazzon and Cuzzocrea, 2008; Mazzon et al., 2009). Demaude *et al.* described unaltered gene expression of Ocln and ZO-1 immediately after a single two hour session of mixed restraint and acoustic stress, but decreased expression of Ocln 72 hours after the stress protocol, together with a delayed increase in intestinal permeability (Demaude et al., 2006). We are not aware of other reports investigating small intestinal expression of tight junction molecules in models of (sub)acute and chronic psychological stress. Whether the increased jejunal gene (mRNA) expression of Cldn1, 5 and 8, Ocln and ZO-1 is also translated into increased protein expression or whether it is reactive to increased protein degradation or dislocation of the respective proteins, is unknown and a matter for future studies.

In the present study, intestinal barrier function was characterized by measuring TEER. The epithelial barrier function of the gastrointestinal tract consists of two separate but overlapping pathways: 1/ a high-capacity, charge-selective pore pathway which allows transepithelial passage of ions and small uncharged solutes (less than 4Å) and is mainly regulated by the claudin composition of the tight junction and 2/ a low-capacity leak pathway for larger molecules (Shen et al. 2011) which is regulated by myosin-light chain kinase (MLCK), ZO-1 and Ocln. TEER quantifies the combination of the pore and leak pathway and is a well-accepted readout for intestinal permeability, but does not directly assess the passage of antigen-sized molecules, which is a limitation of our study.

In agreement with the study of Vicario *et al.* (Vicario et al., 2010), we found increased presence of mast cells after crowding stress (chronic and subacute+chronic), but only in the distal colon. The finding that colonic barrier function was unchanged after chronic stress, while the mast cell count was higher compared to controls and similar to the combined stress condition, suggests the involvement of additional processes. In our study there was no correlation between TEER values and mast cell numbers in the colon. However, we did not

analyze mast cell degranulation or release of RMCP2 in our study, which was reported to be upregulated along the gastrointestinal tract (Vicario et al., 2010). Moreover, a positive correlation has been found between RMCP2 content of the jejunal mucosa and permeability (Vicario et al., 2010) suggesting that it is not the actual number of mast cells but rather the amount of proteases and/or other mast cell derived products that affect intestinal permeability. Mast cells have been suggested to play a central role in stress-induced hyper-permeability and visceral hypersensitivity through CRF-induced release of mediators like proteases and tumor necrosis factor α (TNF α) (Overman et al., 2012; Vanuytsel et al., 2013; Vicario et al., 2012; Vicario et al., 2010).

In conclusion, we demonstrated that subacute stress in a chronically stressed animal model reduced small intestinal and colonic barrier function more than either stressor alone in Wistar rats. Expression of mRNAs for tight junction molecules was altered in the jejunum after subacute stress and mast cell density increased in the distal colon after chronic stress, suggesting different underlying molecular and cellular alterations in the small intestine vs. colon. Our data provide further insight in the interaction between subacute and chronic stress and their regional effects on intestinal barrier function, which may have functional and future therapeutic relevance in stress-related barrier defects in human gastrointestinal disorders.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding was provided by a Methusalem grant from Leuven University to J. Tack and by the Research Foundation Flanders (Fonds Wetenschappelijk Onderzoek Vlaanderen, FWO) through doctoral (T. Vanuytsel and H. Vanheel) and post-doctoral (R. Farré) fellowships.

We are grateful to Dr. Maria Vicario (Digestive Disease Research Unit, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) for her advice on the crowding stress model.

DECLARATION OF INTEREST

No relevant disclosures for any of the authors.

REFERENCES

- Alonso C, Guilarte M, Vicario M, Ramos L, Ramadan Z, Antolin M, Martinez C, Rezzi S, Saperas E, Kochhar S, Santos J, Malagelada JR. Maladaptive intestinal epithelial responses to life stress may predispose healthy women to gut mucosal inflammation. *Gastroenterology*. 2008; 135: 163-172 e1
- Bonaz BL, Bernstein CN. Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2013; 144: 36-49
- Chen J, Young S, Subburaju S, Sheppard J, Kiss A, Atkinson H, Wood S, Lightman S, Serradeil-Le Gal C, Aguilera G. Vasopressin does not mediate hypersensitivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1148: 349-359
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5: 374-381
- Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A. Comparison of the effects of single and daily repeated immobilization stress on resting activity and heterotypic sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Stress*. 2014; 17: 176-185
- Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L. Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut*. 2006; 55: 655-661
- Faresjo A, Grodzinsky E, Johansson S, Wallander MA, Timpka T, Akerlind I. Psychosocial factors at work and in every day life are associated with irritable bowel syndrome. *Eur J Epidemiol*. 2007; 22: 473-480

Ferland CL, Harris EP, Lam M, Schrader LA. Facilitation of the HPA axis to a novel acute stress following chronic stress exposure modulates histone acetylation and the ERK/MAPK pathway in the dentate gyrus of male rats. *Endocrinology*. 2014; 155: 2942-2952

Gardiner SM, Bennett T. The effect of short-term isolation on systolic blood pressure and heart rate in rats. *Med Biol*. 1977; 325-329

Gavrilovic L, Dronjak S. Activation of rat pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary system in response to different stressors. *Neuro Endocrinol Lett*. 2005; 26: 515-520

Harris RB, Gu H, Mitchell TD, Endale L, Russo M, Ryan DH. Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol Behav*. 2004; 81: 557-568

Keita AV, Söderholm JD, Ericson AC. Stress-induced barrier disruption of rat follicle-associated epithelium involves corticotropin-releasing hormone, acetylcholine, substance P, and mast cells. *Neurogastroenterol Motil*. 2010; 22: 770-778

Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA, Perdue MH. Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *Am J Physiol*. 1998; 275: G1037-1044

Martinez C, Lobo B, Pigrau M, Ramos L, Gonzalez-Castro AM, Alonso C, Guilarte M, Guila M, De Torres I, Azpiroz F, Santos J, Vicario M. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut*. 2013; 62: 1160-1168

Mazzon E, Crisafulli C, Galuppo M, Cuzzocrea S. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- α in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297: G488-505

Mazzon E, Cuzzocrea S. Role of TNF- α in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294: G1268-1280

Nicholl BI, Halder SL, Macfarlane GJ, Thompson DG, O'Brien S, Musleh M, Mcbeth J. Psychosocial risk markers for new onset irritable bowel syndrome--results of a large prospective population-based study. *Pain.* 2008; 137: 147-155

Nyuyki KD, Beiderbeck DI, Lukas M, Neumann ID, Reber SO. Chronic subordinate colony housing (CSC) as a model of chronic psychosocial stress in male rats. *PLoS One* 2012; 7: e52371

O'malley D, Julio-Piepera M, Dinan TG, Cryan JF. Strain differences in stress-induced changes in central CRF1 receptor expression. *Neurosci Lett.* 2014; 561: 192-197

Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α . *PLoS One.* 2012; 7: e39935

Perello M, Chacon F, Cardinali DP, Esquifino A, Spinedi E. Effect of social isolation on 24-h pattern of stress hormones and leptin in rats. *Life Sci.* 2006; 78:1857-1862.

Petrella C, Giuli C, Agostini S, Bacquie V, Zinni M, Theodorou V, Broccardo M, Casolini P, Improta G. Maternal exposure to low levels of corticosterone during lactation protects against experimental inflammatory colitis-induced damage in adult rat offspring. *PLoS One* 2014; 9:e113389.

Piche T. Tight junctions and IBS--the link between epithelial permeability, low-grade inflammation, and symptom generation? *Neurogastroenterol Motil.* 2014; 26: 296-302

Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley Des Varannes S, Dainese R, Nano JL, Cremon C, Stanghellini V, De Giorgio R, Galmiche JP, Neunlist M. Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators. *Gut.* 2009; 58: 196-201

Reber SO, Peters S, Slattery DA, Hofmann C, Schölmerich J, Neumann ID, Obermeier F. Mucosal immunosuppression and epithelial barrier defects are key events in murine psychosocial stress induced colitis. *Brain Behav Immun* 2011, 25: 1153-1161.

Roth MK, Bingham B, Shah A, Joshi A, Frazer A, Strong R, Morilak DA. Effects of chronic plus acute prolonged stress on measures of coping style, anxiety, and evoked HPA-axis reactivity. *Neuropharmacology.* 2012; 63: 1118-1126

Salim SY, Söderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 17: 362-381

Santos J, Saunders PR, Hanssen NP, Yang PC, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Corticotropin-releasing hormone mimics stress-induced colonic epithelial pathophysiology in the rat. *Am J Physiol.* 1999; 277: G391-399

Saunders PR, Santos J, Hanssen NP, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci.* 2002; 47: 208-215

Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008; 3: 1101-1108.

Shen L, Weber CR, Raleigh DR, Yu D, Turner JR. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol.* 2011;73:283-309.

Smith F, Clark JE, Overman BL, Tozel CC, Huang JH, Rivier JE, Blikslager AT, Moeser AJ. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298: G352-363

Söderholm JD, Yang PC, Ceponis P, Vohra A, Riddell R, Sherman PM, Perdue MH. Chronic stress induces mast cell-dependent bacterial adherence and initiates mucosal inflammation in rat intestine. *Gastroenterology.* 2002a; 123: 1099-1108

Söderholm JD, Yates DA, Gareau MG, Yang PC, Macqueen G, Perdue MH. Neonatal maternal separation predisposes adult rats to colonic barrier dysfunction in response to mild stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002b; 283: G1257-1263

Tamashiro KL, Nguyen MM, Sakai RR. Social stress: from rodents to primates. *Front Neuroendocrinol.* 2005; 26: 27-40

Vanheel H, Vicario M, Vanuytsel T, Van Oudenhove L, Martinez C, Keita AV, Pardon N, Santos J, Söderholm JD, Tack J, Farre R. Impaired duodenal mucosal integrity and low-grade inflammation in functional dyspepsia. *Gut.* 2014; 63: 262-271

Vanuytsel T, Vanormelingen C, Vanheel H, Masaoka T, Salim Rasoel S, Toth J, Houben E, Verbeke K, De Hertogh G, Vanden Berghe P, Tack J, Farré R. From intestinal permeability to dysmotility: the biobreeding rat as a model for functional gastrointestinal disorders. *PLoS One.* 2014a; 9:e111132

Vanuytsel T, Van Wanrooy S, Vanheel H, Vanormelingen C, Verschueren S, Houben E, Salim Rasoel S, Toth J, Holvoet L, Farre R, Van Oudenhove L, Boeckxstaens G, Verbeke

K, Tack J. Psychological stress and corticotropin-releasing hormone increase intestinal permeability in humans by a mast cell-dependent mechanism. *Gut*. 2014b; 63: 1293-1299

Vanuytsel T, Vanheel H, Vanormelingen C, Salim Rasoel S, Masaoka T, Pardon N, Vicario M, Keita A, Vanden Berghe P, Farre R, Tack J. Partial restraint stress induces increased permeability and low grade inflammation in the rat ileum, but not in the jejunum. *Gastroenterology*. 2011; 140: S505

Vicario M, Alonso C, Guilarte M, Serra J, Martinez C, Gonzalez-Castro AM, Lobo B, Antolin M, Andreu AL, Garcia-Arumi E, Casellas M, Saperas E, Malagelada JR, Azpiroz F, Santos J. Chronic psychosocial stress induces reversible mitochondrial damage and corticotropin-releasing factor receptor type-1 upregulation in the rat intestine and IBS-like gut dysfunction. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37: 65-77

Vicario M, Guilarte M, Alonso C, Yang P, Martinez C, Ramos L, Lobo B, Gonzalez A, Guila M, Pigrau M, Saperas E, Azpiroz F, Santos J. Chronological assessment of mast cell-mediated gut dysfunction and mucosal inflammation in a rat model of chronic psychosocial stress. *Brain Behav Immun*. 2010; 24: 1166-1175

Vivinus-Nebot M, Dainese R, Anty R, Saint-Paul MC, Nano JL, Gonthier N, Marjoux S, Frin-Mathy G, Bernard G, Hebuterne X, Tran A, Theodorou V, Piche T. Combination of allergic factors can worsen diarrheic irritable bowel syndrome: role of barrier defects and mast cells. *Am J Gastroenterol*. 2012; 107: 75-81

Wallon C, Yang PC, Keita AV, Ericson AC, McKay DM, Sherman PM, Perdue MH, Söderholm JD. Corticotropin-releasing hormone (CRH) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut*. 2008; 57: 50-58

Xu D, Gao J, Gilliland M, 3rd, Wu X, Song I, Kao JY, Owyang C. Rifaximin alters intestinal bacteria and prevents stress-induced gut inflammation and visceral hyperalgesia in rats. *Gastroenterology*. 2014; 146: 484-496

Zeissig S, Bürger N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007; 56: 61-72.

Zheng G, Wu SP, Hu Y, Smith DE, Wiley JW, Hong S. Corticosterone mediates stress-related increased intestinal permeability in a region-specific manner. *Neurogastroenterol Motil*. 2013; 25: e127-139

TABLES

Table 1: Primer sequences for RT-PCR

Gene	Sense primer	Antisense primer
<i>Hprt1</i>	GCGAAAGTGGAAAAGCCAAGT	GCCACATCAACAGGACTCTTGTAG
<i>Cldn1</i>	ATTGGCATGAAGTGCATGAG	CCACTAATGTGCGCCAGACCT
<i>Cldn2</i>	GGCTATTAGGCACATCGAT	TGGCACCAACATAAGAACTT
<i>Cldn5</i>	TTTCATCGGTGAAGTAGCCA	TTCAGGTTAGCAGGTACCAC
<i>Cldn8</i>	TTCTAAAATGGTTCACGCGG	ATCGCAGCTTAAACCAACAG
<i>Ocln</i>	ATGTCTGTGAGGCCTTTTGA	TACATGTCATTGCTTGGTGC
<i>ZO-1</i>	CCCTCTGATCATTCCACACA	TTTAGACATGCGCTCTTCCT

Hprt1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1): the enzyme which catalyzes the conversion of hypoxanthine to inosine monophosphate and guanine to guanosine monophosphate. *Hprt1* is used as a housekeeping gene. *Cldn* (claudin) 1, 2, 5, 8: tight-junction related molecules, which are the main determinants of the pore pathway (see discussion) of intestinal barrier function. *Ocln* (Occludin) and *ZO-1* (Zonula-occludens 1): tight-junction related molecules, which are the main determinants of the leak pathway (see discussion) of intestinal barrier function.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Time line of the stress protocols

Figure 2

Effects of the stress protocols on body weight gain (n=16/group) (A), terminal corticosterone plasma concentrations (n=7-8/group) (B) and ACTH plasma concentrations (n=7-8/group) (C).

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ANOVA with Bonferroni-corrected post-hoc test. Each dot represents the data of a single rat (B and C). Mean \pm standard error of mean are indicated on the graphs.

Figure 3

Transepithelial electrical resistance (TEER) after stress in the jejunum (A) and colon (B) (n=6-8/group). TEER is plotted as a function of time after mounting the tissue in Ussing Chambers. Mean \pm standard error of mean are indicated on graphs (A) and (B). Post-hoc testing showed significant overall differences of the least square means between sham and subacute ($p < 0.0001$), sham and chronic ($p < 0.0001$), sham and combined ($p < 0.0001$), subacute and combined ($p < 0.01$) and chronic and combined ($p < 0.001$) stress in the jejunum; and between combined and sham ($p < 0.001$), combined and subacute ($p < 0.0001$) and combined and chronic ($p < 0.01$) stress in the colon. (C) In the jejunum, a significant correlation was found between TEER and plasma corticosterone concentration ($r = -0.56$; $p < 0.01$) (n=27; rats from all groups) Each dot represents the data for a single rat.

Figure 4

Effect of stress on the mRNA expression of tight junction related proteins in the jejunum (n=8/group).

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 ANOVA with Bonferroni-corrected post-hoc test. Each dot represents the data for a single animal. Mean \pm standard error of mean are indicated on the graph.

Figure 5

Effect of stress on the mRNA expression of tight junction related proteins in the colon (n=8/group). Each dot represents the data for a single rat. Mean \pm standard error of mean are indicated on the graph.

Figure 6

Mast cell density in the mucosa of the jejunum (n=6-7/group) (A) and colon (n=7-8/group) (B). Representative photomicrographs of immunostaining for rat mast cell protease 2 (RMCP2) identifying mast cells (arrowheads) in the colon of a control rat (C) and after acute on chronic stress (D).

* p < 0.05; ** p < 0.01 ANOVA with Bonferroni-corrected post-hoc test. Scale bar = 50 μ m. Each dot represents the data for a single rat. Mean \pm standard error of mean are indicated on the graph.

Figure 1

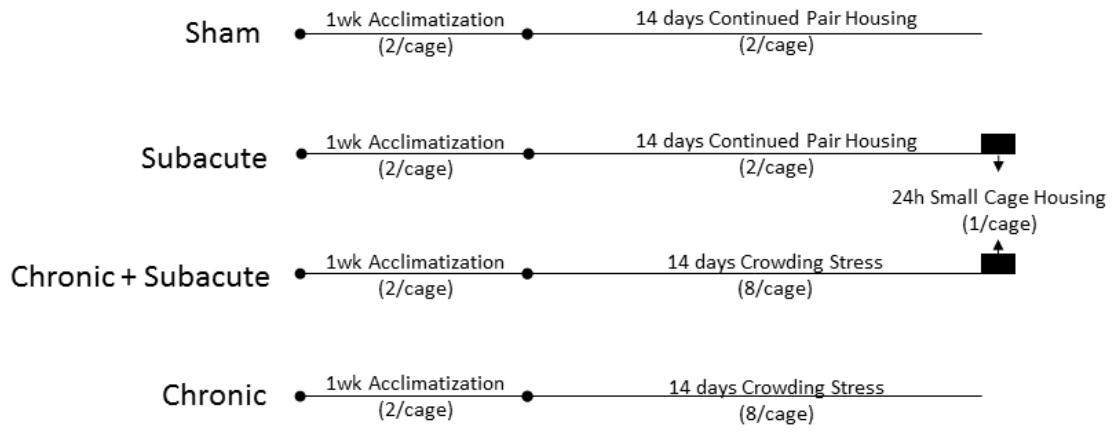


Figure 2

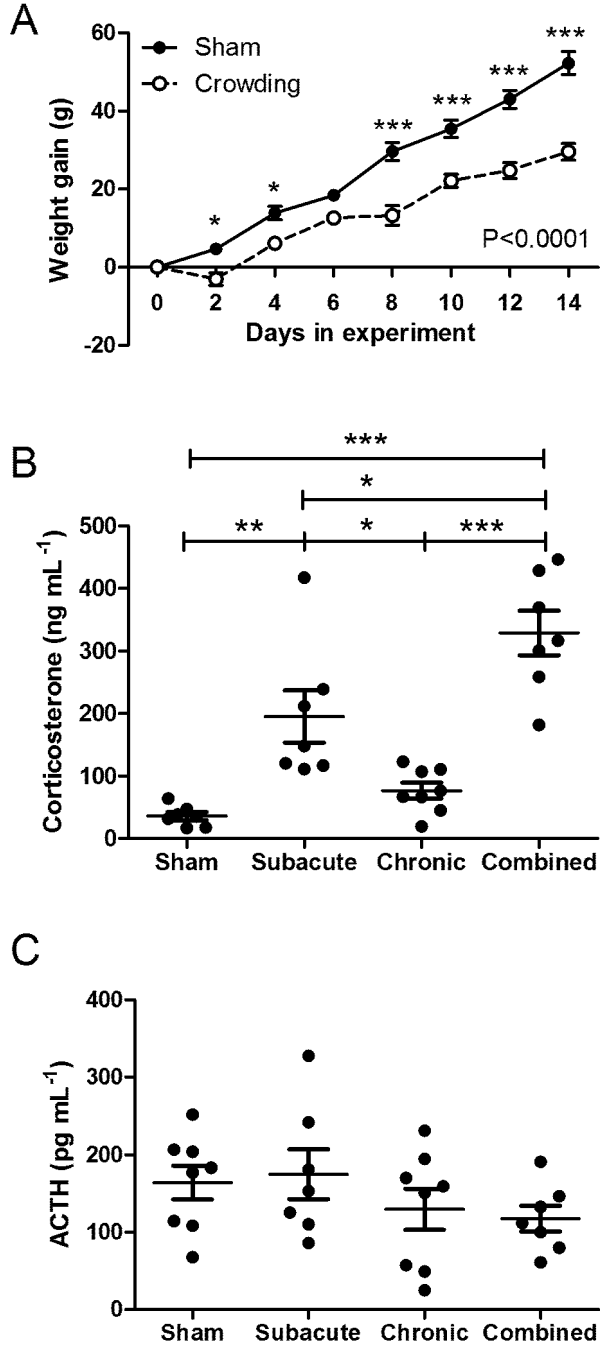


Figure 3

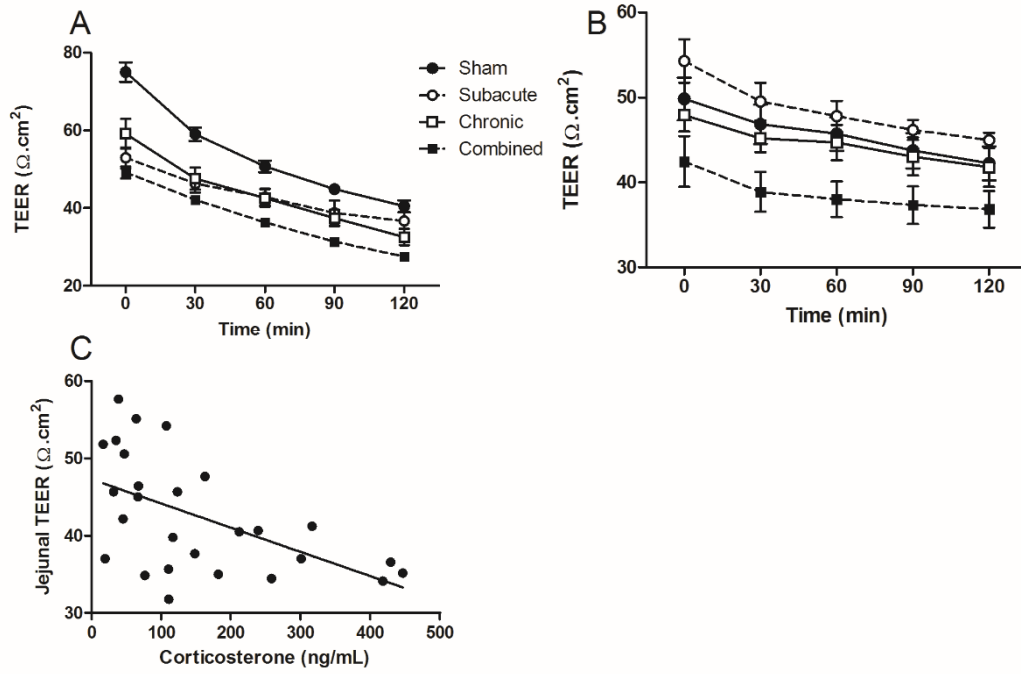


Figure 4

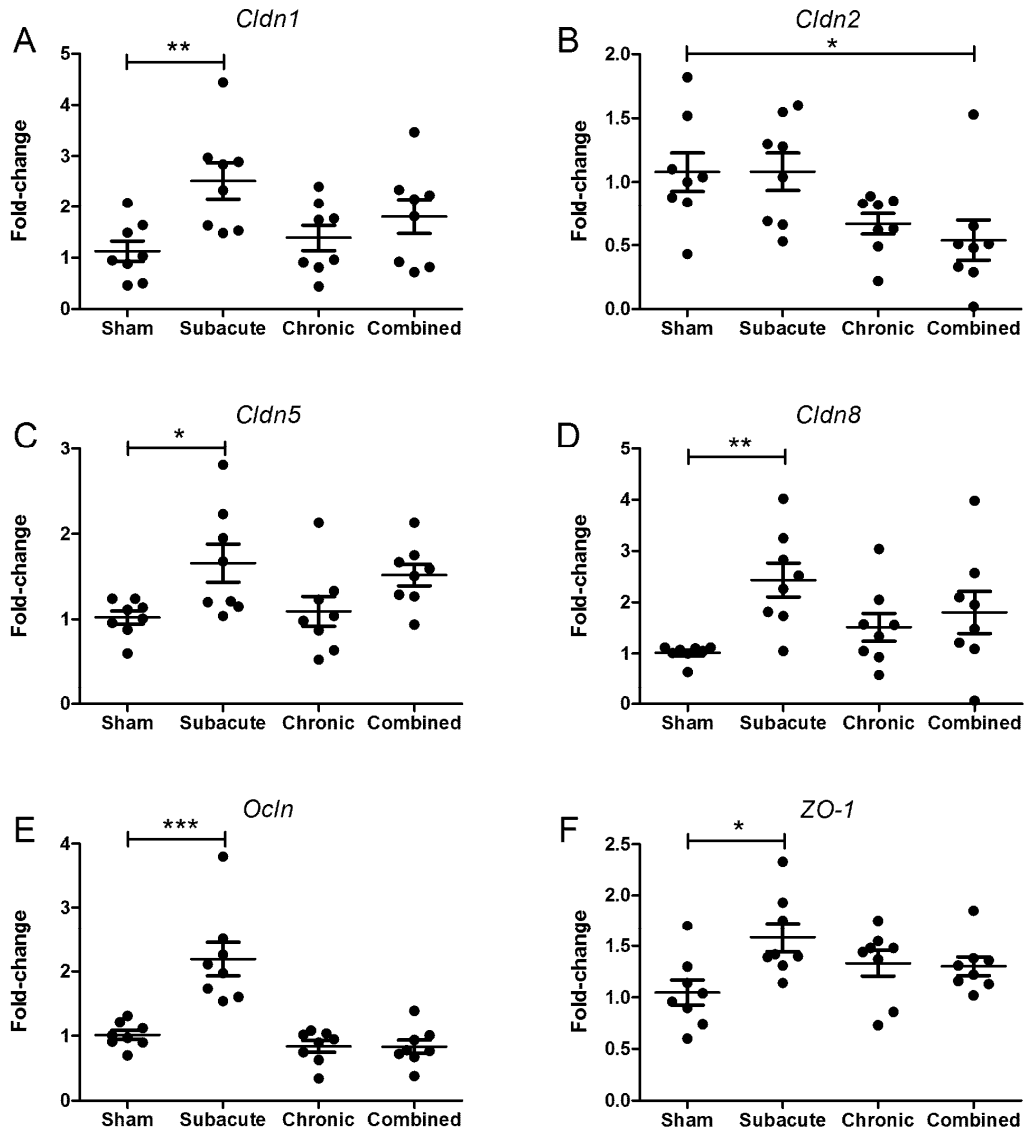


Figure 5

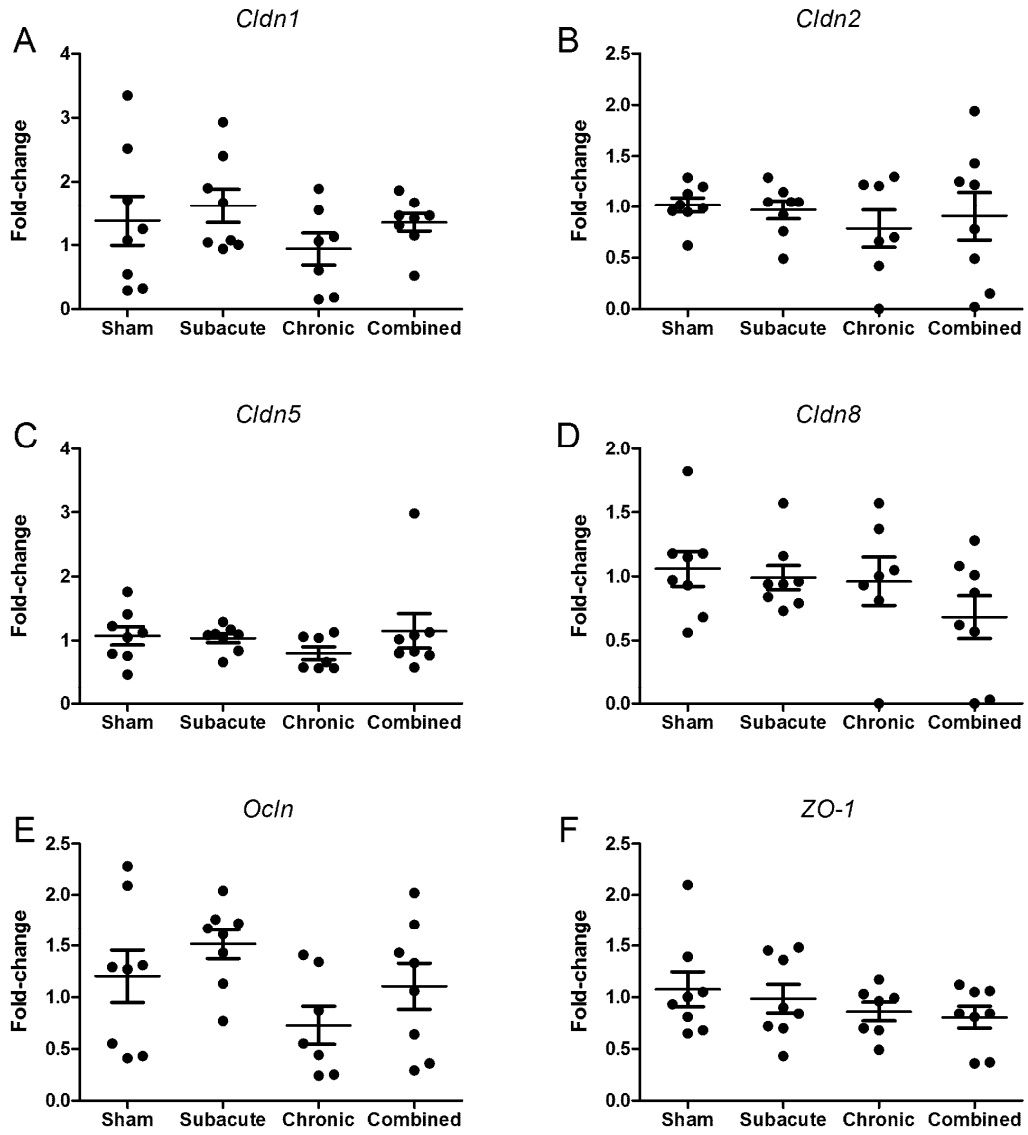


Figure 6

