

EVOLUÇÃO DOS PERFIS ELÉTRICOS E MECÂNICOS DA MOTILIDADE COLÔNICA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada, Área de
concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional.

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2017**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EVOLUÇÃO DOS PERFIS ELÉTRICOS E MECÂNICOS DA
MOTILIDADE COLÔNICA EM MODELO ANIMAL DE DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL

MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI

JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área
de concentração Biologia Celular Estrutural e
Funcional.

José Ricardo de Arruda Miranda

**BOTUCATU – SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Calabresi, Marcos Felipe de Freitas.

Evolução dos perfis elétricos e mecânicos da motilidade colônica em modelo animal de doença inflamatória intestinal / Marcos Felipe de Freitas Calabresi. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda
Capes: 20903006

1. Biosusceptometria de Corrente Alternada. 2. Intestinos - Inflamação. 3. Sistema gastrointestinal. 4. Cólon (Anatomia) - Motilidade.

Palavras-chave: Biosusceptometria de Corrente Alternada; Contratilidade colônica; Doença inflamatória intestinal; Motilidade colônica; TNBS.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 20 dias do mês de fevereiro do ano de 2017, às 08:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA - Orientador(a) do(a) Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. FERNANDO GOMES ROMEIRO do(a) Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. ARMÊNIO DOS SANTOS AGUIAR do(a) Departamento de Fisiologia e Farmacologia / Faculdade de Medicina - UFC, Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI do(a) Departamento de Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. JOEL MESA HORMAZA do(a) Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de MARCOS FELIPE DE FREITAS CALABRESI, intitulada **Evolução dos perfis elétricos e mecânicos da motilidade colônica em modelo animal de doença inflamatória intestinal**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

José Ricardo de Arruda Miranda

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

Fernando Gomes Romeiro

Prof. Dr. FERNANDO GOMES ROMEIRO

Armênio dos Santos Aguiar

Prof. Dr. ARMÊNIO DOS SANTOS AGUIAR

Luiz Claudio Di Stasi

Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO DI STASI

Joel Mesa Hormaza

Prof. Dr. JOEL MESA HORMAZA

Agradecimentos

À minha noiva Emília, pela inspiração de todos os dias. Sua atenciosa correção, força, paciência, cumplicidade e amor foram fundamentais para o sucesso nessa jornada.

À minha mãe, Deucelia, que sempre apoiou minhas escolhas, me mostrou o mundo e ensinou a vivê-lo. Por todo carinho, dedicação, incentivo, paciência, confiança e amor.

Aos meus irmãos, Henrique e Flávia, meus eternos exemplos de vida, idoneidade, cumplicidade e amizade.

Aos meus amigos-irmãos, novos e velhos, distantes ou não vocês sempre serão parte dos alicerces de tudo o que foi e será construído.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biomagnetismo e do Laboratório de Física Aplicada ao Radiodiagnóstico pelo ótimo ambiente de trabalho, convivência, conselhos e cafés.

Ao Prof. José Ricardo, pela orientação, dedicação, paciência, confiança e amizade.

Ao Prof. Luiz Claudio Di Stasi e ao Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia pela parceria e apoio na concepção e desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, ao Instituto de Biociências de Botucatu, ao Departamento de Física e Biofísica e aos professores, pela infraestrutura e pela formação, sem as quais este trabalho não teria sido escrito.

À FAPESP, pelo financiamento deste projeto (Processo nº 2013/09095-4).

Resumo

A doença inflamatória intestinal (DII) é uma doença idiopática do trato gastrointestinal que acomete grande parcela da população mundial e tem seus sintomas relacionados com alterações na motilidade do cólon. No entanto, a evolução dessas alterações não é completamente compreendida, e pode estar relacionada com sintomas que aparecem em fases quando a doença é aparentemente controlada. O objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação a longo prazo dos aspectos mecânicos e elétricos da contratilidade colônica durante o modelo de modelo de inflamação induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos.

Este trabalho aplicou uma metodologia eficiente e de baixa invasividade associando informações mecânicas, elétricas, químicas e histológicas. A contratilidade e parâmetros inflamatórios foram adquiridos no mesmo animal em seis momentos diferentes: antes da indução de TNBS (controle) e 2, 5, 8, 11 e 14 dias depois. As atividades mecânicas foram adquiridas pela Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) e subdivididas em Ondulações de Propagação Rítmica (RPR) e no Complexo Motor Propulsivo Rítmico (RPMC). Registramos a atividade elétrica por eletromiografia (EMG) e avaliamos os processos de inflamação determinando a atividade da mieloperoxidase (MPO) nas fezes. Adicionalmente, comparamos a espessura de camadas de cólon ao longo da inflamação por meio de análises histopatológicas.

Nossos resultados mostraram alterações transitórias nos níveis de atividade da MPO e na frequência de contração de RPMC, enquanto RPR e atividade elétrica sofreram alterações permanentes. Além disso, a associação desses resultados com a análise da espessura da camada tecidual revelou a possível influência da fibrose e a profundidade de lesão nos diferentes tipos de Células Intersticiais de Cajal (ICCs).

A análise geral dos resultados mostrou uma clara relação entre os diferentes perfis das alterações contráteis, graus de inflamação intestinal, morfologia dos danos teciduais e sintomas clássicos das DIIs. A abordagem aqui desenvolvida, abre horizontes para que novos trabalhos explorem a interdependência entre diferentes tipos de modelo inflamatório, aplicação de drogas e suas consequências motoras.

Palavras-chave: motilidade colônica, doença inflamatória intestinal, TNBS, contratilidade colônica, biosusceptometria de corrente alternada.

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is an idiopathic gastrointestinal tract disease that affects a large part of the world population and has its symptoms related to changes in colon motility. However, the evolution of these changes is not completely understood, and may be related to symptoms that appear in stages when the disease is apparently controlled. The objective of this work was to perform a long-term evaluation of the mechanical and electrical aspects of colonic contractility during the model of inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) in rats.

This work applied an efficient and low invasive methodology associating mechanical, electrical, chemical and histological information. The contractility and inflammatory parameters were acquired in the same animal at six different times: before induction of TNBS (control) and at 2, 5, 8, 11 and 14 days thereafter. The mechanical activities were acquired by Alternating Current Biosusceptometry (ACB) and subdivided in Rhythmic Propagation Ripples (RPR) and Rhythmic Propulsive Motor Complex (RPMC). We recorded the electrical activity by electromyography (EMG) and evaluated the inflammation processes determining the myeloperoxidase activity (MPO) in the feces. Additionally, we compared the thickness of colon layers throughout the inflammation by histopathological analyzes.

Our results showed transient changes in MPO activity levels and frequency of RPMC contraction, while RPR and electrical activity underwent permanent changes. In addition, the association of these results with tissue layer thickness revealed the possible influence of fibrosis and depth of lesion on the different types of Cajal Interstitial Cells (ICCs).

The general analysis of the results showed a clear relationship between the different profiles of the contractile alterations, degrees of intestinal inflammation, tissue damage morphology and classic IBD symptoms. The approach developed here opens new horizons for new work exploring the interdependence between different types of inflammatory model, drug application and its motor consequences.

Key words: colonic motility, inflammatory bowel disease, TNBS, colonic contractility, alternating current biosusceptometry.

Lista de Abreviaturas

BAC – Biosusceptometria de Corrente Alternada

CMMC – Complexo Motor Migratório Colônico

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

EMG – Eletromiografia

FFT – Transformada Rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform*)

GMC – Contrações Migratórias Gigantes (Giant Migration Contractions)

Hz – Hertz (ciclos por segundo)

ICC – Células Intersticiais de Cajal (*Interstitial Cells of Cajal*)

ICC-MI – Células Intersticiais de Cajal Intra Musculares

ICC-MY – Células Intersticiais de Cajal associadas ao Plexo Mioentérico

ICC-SM – Células Intersticiais de Cajal associadas ao plexo Submucoso

IL – Interleucina

MPO – Mieloperoxidase

RCU – Retocolite Ulcerativa

RPMC – Complexo Motor Propulsivo Rítmico (Rhythmic Propulsive Motor Complex)

RPR – Ondulações de Propagação Rítmica (Rhythmic Propagating Ripples)

SNE – Sistema Nervoso Entérico

TGI – Trato Gastrintestinal

TNBS – Ácido Trinitro Benzenosulfônico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α (Tumor Necrosis Factor- α)

Lista de Figuras

Figura 1: Camadas e estruturas do cólon e indicação (em vermelho) da posição da ICC-SM e ICC-MY. Adaptado de http://fisiologiadadigestao.blogspot.com.br/	18
Figura 2: Configuração de um sistema BAC mono sensor.	22
Figura 3: Cronograma do experimento, no qual observa-se o dia de cada medida (M1, M2, M3, M4, M5 e M6) tendo como base o momento da indução do modelo de inflamação (dia 0).....	26
Figura 4: Posicionamento do sensor BAC para aquisição dos sinais, dos implantes cirúrgicos e da lesão no cólon do animal.....	27
Figura 5: Exemplo de sinais simulados e seus respectivos espectros de Fourier (FFT). (A) Sinal com frequência de 100 mHz. (B) Sinal com frequência de 20 mHz. (C) Soma dos sinais A e B, contendo ambas as frequências, 100 e 20 mHz.....	29
Figura 6: Exemplo de sinal de atividade mecânica colônica. As flechas vermelhas indicam os complexos motores propulsivos rítmicos (RPMC), e as chaves amarelas indicam as ondulações de propagação rítmica (RPR).	30
Figura 7: Relação entre os dias de medida e os dias de análise histopatológica. Onde: “IND”, indica o momento da indução; “M”, indica os momentos de medida; e “FM”, indica os momentos das fotomicrografias.	31
Figura 8: Massa corporal dos animais ao longo das seis medidas. A indução do processo inflamatório está demarcada pelo traço vermelho. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	33
Figura 9: Atividade de MPO medida durante o experimento. O traço vermelho mostra o momento a indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	34
Figura 10: Exemplos de sinais magnéticos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) relativos à atividade mecânica do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).	35
Figura 11: Frequência da contração mecânica RPCM ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	36
Figura 12: Frequência da contração mecânica RPR ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.	36

Figura 13: Exemplos de sinais elétricos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).....	38
Figura 14: Frequências da atividade elétrica ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório * $p < 0,05$, em comparação com M1.....	39
Figura 15: Fotomicrografias do cólon de ratos em 4 situações do experimento. (A) Controle, sem indução de inflamação intestinal. (B) 2 dias após a indução da inflamação intestinal. (C) 7 dias após a indução da inflamação. (D) 14 dias após a indução da inflamação. Símbolos: * indica infiltrado de leucócitos; & indica formação de tecido conjuntivo frouxo e denso; e # indica edema.	40
Figura 16: Espessuras das camadas do cólon ao longo da duração do experimento: (A) mucosa; (B) muscular da mucosa; (C) submucosa; e (D) muscular externa. Quando houve pontos de ulceração visíveis, foram quantificadas áreas (E). * $p < 0,05$, em comparação com o Controle. Em (E), a comparação foi feita entre o 2º e o 7º dias após a indução.	41

Sumário

Introdução	9
Fundamentos Teóricos.....	14
I. Motilidade Colônica	14
II. Marcadores Inflamatórios	20
III. Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)	21
IV. Eletromiografia (EMG).....	23
Objetivos.....	24
Metodologia.....	25
I. Planejamento experimental.....	25
II. Animais	25
III. Cronograma do experimento	25
IV. Implante dos marcadores	26
V. Indução e avaliação de processo inflamatório colônico	27
VI. Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	28
VII. Medidas da motilidade colônica	28
VIII. Definição das contrações.....	30
IX. Análises histopatológicas.....	30
X. Análise Estatística.....	32
Resultados.....	33
Discussão	42
Conclusão	48
Referências	49
APÊNDICE A – Testes preliminares de motilidade colônica em ratos	56
APÊNDICE B – Artigo	63

Introdução

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são caracterizadas por inflamação crônica do trato intestinal associada a um desequilíbrio da microbiota intestinal. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são os tipos mais conhecidos de DII e têm sido foco de atenção devido à sua incidência crescente [1]. Crônicas, recidivantes e idiopáticas, essas DIIs possuem características clínicas e patológicas sobrepostas e distintas [2, 3]. A RCU típica é a inflamação superficial limitada à mucosa do cólon, enquanto que a DC é caracterizada por lesões transmurais descontínuas que ocorrem em qualquer parte do trato gastrintestinal (TGI) [4].

Ambas se caracterizam por inflamação do intestino, com períodos de exacerbação seguidos de intervalos de remissão dos sintomas, e são marcadas também por ulceração e infiltração de neutrófilos na mucosa, desconforto ou dor abdominal com hábitos intestinais alterados tais como diarreia e constipação [5, 6].

As DIIs acometem grande parcela da população mundial, tendo prevalência maior nos países desenvolvidos, atingindo cerca de 1,4 milhões de pessoas nos Estados Unidos e 2,2 milhões na Europa [7]. No Brasil, devido às dificuldades diagnósticas e reduzido número de amostras, os dados disponíveis são restritos, mas pode-se afirmar que há uma tendência crescente no número de casos no país [8]. Segundo um recente estudo realizado na região centro-oeste do estado de São Paulo, as doenças inflamatórias intestinais apresentam baixa incidência, igualando-se aos países da América Latina e do sul da Europa, entretanto sua crescente prevalência torna necessária a abordagem desse problema através de estudos detalhados e políticas de saúde [9].

O ambiente e estilo de vida ocidentalizado, como o tabagismo, dietas ricas em gordura e açúcar, uso de medicamentos e estresse, estão ligados ao aparecimento de DII [10]. A causa precisa da doença inflamatória intestinal é desconhecida, entretanto

indivíduos geneticamente suscetíveis parecem ter uma resposta imune desregulada em relação à microbiota intestinal comensal, o que resulta em inflamação [11]. Estudos genéticos indicam variações, específicas e não específicas, associadas com as DIIs. Entretanto, devido ao grande número de genes implicados e o pequeno efeito referente a cada um deles, o mapeamento genético não é indicado para avaliar o risco do desenvolvimento dessas doenças [12].

O intestino, principalmente o cólon, é o órgão que detém o maior e mais diverso número de microrganismos do corpo humano. O sistema imune do intestino é geralmente tolerante a esta carga microbiana, e uma quebra nessa tolerância é postulada como fator importante para a patogênese da doença inflamatória intestinal [13]. Alterações na composição da flora intestinal, defeitos de imunidade das mucosas, ou os dois fatores combinados podem levar a DII. No entanto, as evidências que fundamentam essa afirmação ainda são escassas [12].

Pacientes com DII apresentam diarreia, tenesmo, ou urgência em defecar. A patogênese desses sintomas ainda não é completamente compreendida. Discrepâncias entre os sintomas e o grau de inflamação, acessado via endoscopia, sugerem que os sintomas podem, em parte, serem atribuídos a outros mecanismos, como perturbações motoras ou sensoriais [14]. De fato, Collins (1996) descreveu que a inflamação da mucosa altera as funções dos nervos e músculos em modelos animais de RCU [15]. A DII tem sido associada com um aumento de tonicidade e redução da complacência colônica. Alterações na distribuição, absorção, armazenamento ou eliminação do conteúdo do cólon e nos padrões contrácteis do músculo liso podem ser manifestadas clinicamente como sinais de perturbações intestinais, dor abdominal, ou ambos [16, 17].

A diarreia na DII ocorre principalmente devido à liberação de fluidos e muco, sangramento e absorção debilitada, entretanto, motilidade e trânsito alterados também

devem ser considerados. Connel *et al.* (1962) foram os primeiros a propor que o cólon, em estado avançado de retocolite ulcerativa, pode se comportar como um tubo semirrígido, além disso, é bem reconhecido clinicamente que as contrações segmentares são ausentes na fase tardia da doença [18, 19].

Existe uma relação bastante complexa e não bem elucidada entre distúrbios funcionais da motilidade gastrointestinal e DII [20]. Entre esses distúrbios funcionais temos entre outros: refluxo gastroesofágico; gastroparesia; dispepsia funcional; síndrome do intestino irritável; doença celíaca; e doenças anorretais [21].

Vários modelos animais já foram utilizados para investigar a patogênese das DIIs, sendo um dos principais o modelo de ácido 2,4,6-trinitrobenzenossulfônico (TNBS) [22, 23]. Normalmente, no modelo de TNBS, a lesão da mucosa e a infiltração de células inflamatórias são observados dentro de 2 horas após a exposição ao TNBS, enquanto que as características de inflamação crônica e infiltração celular linfocítica ocorrem 48 h após a exposição e persistem ao longo de várias semanas [24]. As alterações nas propriedades neurofisiológicas de neurônios mioentéricos persistem após controle da inflamação e provavelmente contribuem para a dismotilidade [25].

A atividade motora do cólon é frequentemente anormal em pacientes com DII, mesmo quando o processo inflamatório é leve ou moderado. Em geral, os dados disponíveis mostram que a doença ativa causa trânsito rápido e aumento da atividade de propulsão [26]. É crescente o número de estudos que descrevem anormalidades motoras relacionadas a DII, entretanto os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por essas anormalidades ainda permanecem obscuros devido à complexidade dos mecanismos envolvidos no controle da motilidade do intestino grosso [26].

O estudo da motilidade colônica pode ser definido como a compreensão do fluxo do conteúdo intraluminal, os movimentos da parede colônica que induzem esse fluxo, e

o sistema de controle que integra e regula esses processos. Em geral a função motora é muito menos estudada no cólon do que no trato gastrointestinal superior devido à ausência da dependência clara em relação ao alimento, aos complexos motores interdigestivos e a relativa inacessibilidade do órgão [18].

Registros de sinais mioelétricos do cólon humano mostram sinais elétricos que iniciam e controlam as contrações musculares. Os eletrodos podem ser inseridos diretamente na serosa do órgão ou de maneira intraluminal associado a tubos flexíveis [27]. Os registros mais seguros são os oriundos dos eletrodos fixos na serosa, pois sua localização é conhecida e próxima aos estímulos elétricos produzidos. Alterações na passagem, absorção, ou na eliminação do conteúdo do cólon e os padrões contráteis do músculo liso podem ser manifestadas clinicamente como alterações de hábito intestinal, dor abdominal, ou ambos [28]. De maneira geral, a eletromiografia é uma técnica eficiente para estudar, do ponto de vista elétrico, as contrações musculares que darão origem à motilidade colônica [29, 30].

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma eficiente técnica biomagnética para acessar e analisar diferentes parâmetros relacionados ao estudo do TGI e suas funções motoras. Desenvolvida na década de 1990 por Baffa, Miranda e colaboradores para avaliar a fisiologia do trato gastrointestinal de humanos, tem grande precisão ao avaliar o esvaziamento gástrico, trânsito orocecal e atividade de contração gástrica em humanos [31-33], cães [34] e animais de pequeno porte [35, 36].

Através do uso de marcadores acoplados às paredes dos órgãos, a BAC possibilita a investigação das propriedades mecânicas resultantes de atividade de contração de determinado órgão/tecido. Quando associada às técnicas usuais para o registro elétrico - como a Eletromiografia (EMG) – proporciona um modelo capaz de detalhar o perfil elétrico e mecânico dessas contrações, abrindo caminho para avaliações

de condições normais e alteradas, seja por doença, procedimento cirúrgico ou tratamentos farmacológicos [37, 38].

A associação dos registros elétricos e mecânicos, em experimentação animal, pode ajudar a elucidar a atividade característica do cólon e evidenciar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nos distúrbios gastrintestinais observados na motilidade colônica durante a doença inflamatória intestinal.

Apesar de vários estudos na área, a grande maioria foi desenvolvida com cólons removidos do corpo, *in vitro*, trazendo assim informações desprovidas de situações fisiológicas reais, como controle neural, reflexos sensoriais e liberação de substâncias [39-41]. A contribuição desta pesquisa está centrada no estudo *in vivo* de alterações fisiológicas e funcionais da motilidade colônica de animais ao longo de modelo experimental de inflamação intestinal. Neste sentido, este trabalho buscou meios para fornecer maior compreensão das consequências da DII nas atividades motoras do cólon e a relação destas com os principais sintomas dessa doença.

Fundamentos Teóricos

I. Motilidade Colônica

A principal função da motilidade colônica é misturar e transportar o conteúdo. Os padrões motores são importantes para proporcionar contato eficaz do conteúdo colônico com a superfície absorviva, otimizando assim sua digestão e homeostase bacteriana. Vários padrões motores são observados, incluindo os padrões motores peristálticos (Tabela 1). A maior parte da atividade peristáltica não leva à evacuação do conteúdo, mas à mistura e ao transporte lento na direção aboral. [42]

Fatores que controlam a motilidade do intestino grosso são complexos e pobremente entendidos. Como no estômago e intestino delgado, a motilidade do intestino grosso é influenciada por, pelo menos, quatro fatores: propriedades dos músculos lisos; nervos entéricos, nervos extrínsecos; e liberação local ou circulatória de substâncias reguladoras [43]. Os dois principais controladores, células intersticiais de Cajal (Interstitial Cells of Cajal – ICC) e o sistema nervoso entérico (SNE), são essenciais para o padrão motor normal ocorrer, porém suas estruturas e funções estão interligadas tornando assim o controle da motilidade e a fisiopatologia da dismotilidade muitas vezes difícil de decifrar [42].

O cólon é anatomicamente dividido em: cólon ascendente, cólon transversal, cólon descendente e cólon sigmoide. Cada região possui diferentes funções e, portanto, mostram diferentes padrões motores dominantes sob condições fisiológicas e patológicas. Esses padrões, seus mecanismos de controle e em particular a interação entre eles são mais adequadamente observados em estudos com cólons inteiros [44].

As redes neurais entéricas são circuitos intrincados de neurônios sensoriais e motores que são sequencialmente ativados para criar um padrão motor complexo com *feedback* de conteúdo ou do estado contrátil do cólon. Isto contrasta com um reflexo

simples, onde um estímulo evoca uma contração ascendente e uma inibição descendente [45]. Chen *et al.* mostraram que uma distensão/contração sustentada desencadeia contrações propulsivas [44]. Anéis sustentados de constrição ocorrem com frequência, e alguns estudos preliminares mostram que estes são comuns em cólons inflamados com TNBS. Todas essas constrições ocorreram entre o cólon médio e distal. [44]

Nos últimos anos, estudos em contrações propulsivas do cólon em várias espécies têm agrupado essas contrações e chamando-as de: complexo motor migratório colônico (*colonic migrating motor complexes - CMMCs*) [46-48], contrações gigantes [49], contrações haustrais [50], peristaltismo em massa [50] ou complexo motor propulsivo rítmico (*rhythmic propulsive motor complexes – RPMC*) [42]. Outros trabalhos reportaram que ocorrem diferentes padrões motores no cólon de rato, em estudo com cólon preenchido por fluído, que não podem ser caracterizados com um único termo [44]. (Tabela 1)

Os complexos motores migratórios colônicos (CMMCs) são um dos principais padrões motores que ocorrem no intestino grosso, documentados em inúmeros mamíferos tanto *in vivo* [51, 52] como *in vitro* [53, 54]. Embora a função dos CMMCs não seja totalmente clara, é provável que, ao menos em parte, ela seja a base da propulsão dos conteúdos sólidos e semissólidos pelo intestino grosso [55].

No cólon canino, a atividade de ondas lentas (*slow wave*) ocorre em 80 – 100 mHz [56, 57] e está associada com as contrações da camada muscular circular de mesma frequência, porém essa regra *in vivo* e sua relação com o trânsito dos conteúdos não foram totalmente elucidadas. Picos de baixa frequência (17 mHz) ocorrem em salvas (*bursts*), semelhante à atividade da camada muscular longitudinal do cólon [58]. Quando essas rajadas foram estudadas *in vivo*, identificadas como “salvas de picos longos” (*long spike bursts*), ela foram associadas com a propulsão do conteúdo [59]. A ocorrência dessas

rajadas de picos longos foi claramente estímulo-dependente. Quando o alimento seco substituiu o enlatado, sua frequência subiu nitidamente junto com o aumento da evacuação [42].

Em tiras de músculo de cólon de rato sob estiramento moderado, duas atividades motoras rítmicas aparecem: uma com relativa alta amplitude e frequência de 8 – 25 mHz associada com prolongadas despolarizações; e outra em alta frequência (200 – 250 mHz) e amplitude bem menor, associada com a atividade de onda lenta [60].

Huizinga et al. [42] identificaram esses padrões motores colônicos como: a atividade de baixa frequência, “complexo motor propulsivo rítmico” (*rhythmic propulsive motor complexes – RPMC*); e a atividade de alta frequência, “ondulações de propagação rítmica” (*rhythmic propagating ripples – RPR*). (Tabela 1)

No cólon de rato, as ondas lentas ocorrem em 200 – 250 mHz e são relacionadas com as células intersticiais de Cajal, associadas ao plexo submucoso (ICC-SM) [60] e relacionadas *in vitro* com contrações de baixa amplitude. Essas contrações são identificadas como ondulações (*ripples*) no mapa espaço-temporal quando estas ocorrem por conta própria [46, 61]. Mais proeminentes no cólon proximal, elas ocorrem no cólon todo e possuem direção de propagação variável, favorecendo assim a absorção. Essas contrações também são vistas como sendo parte das fortes contrações propulsivas, o complexo motor propulsivo rítmico (RPMCs) [42, 44].

O RPMC no cólon de rato ocorre *in vivo*, em 10 mHz, e é inibido por atropina ou hexametônio para ~0,8 mHz no cólon proximal; no cólon distal eles ocorrem em 3 mHz e desaparecem com essas drogas [49].

Em outro estudo recente, através de monitoramento da motilidade colônica de ratos por gravação de vídeo e posterior reconstrução de mapa espaço-temporal, foram identificados também os mesmos dois principais padrões motores: (i) Complexo Motor

Propulsivo Rítmico (RPMCs) e (ii) Ondulações de Propagação Rítmica [42]. O primeiro padrão é caracterizado por ser grande, contrações propulsivas, direção aboral com baixa frequência (20 mHz no cólon proximal e 8 mHz no cólon medial). O segundo mostra maior frequência (aproximadamente 160 mHz) com menor amplitude de contração, se propagando nas duas direções (oral e aboral) [42].

Padrões motores similares têm sido descritos em experimentos usando transdutores *strain-gage* [49]. Estes sugerem que esses padrões dependem de modulação neural e são simultaneamente mediados pela atividade de células marca-passo (ICCs) [42]. *In vitro*, experimentos eletrofisiológicos em cólons de ratos relevaram que ICC associadas com o plexo submucoso (ICC-SM) medeiam a atividade da onda lenta, a qual é relacionada com a contração de alta frequência. Por outro lado, ICC associada com o plexo mioentérico (ICC-MY) realizam despolarizações cíclicas, relacionadas com as contrações de baixa frequência [60]. A Figura 1 ilustra as camadas do cólon e indica a posição das ICCs acima mencionadas.

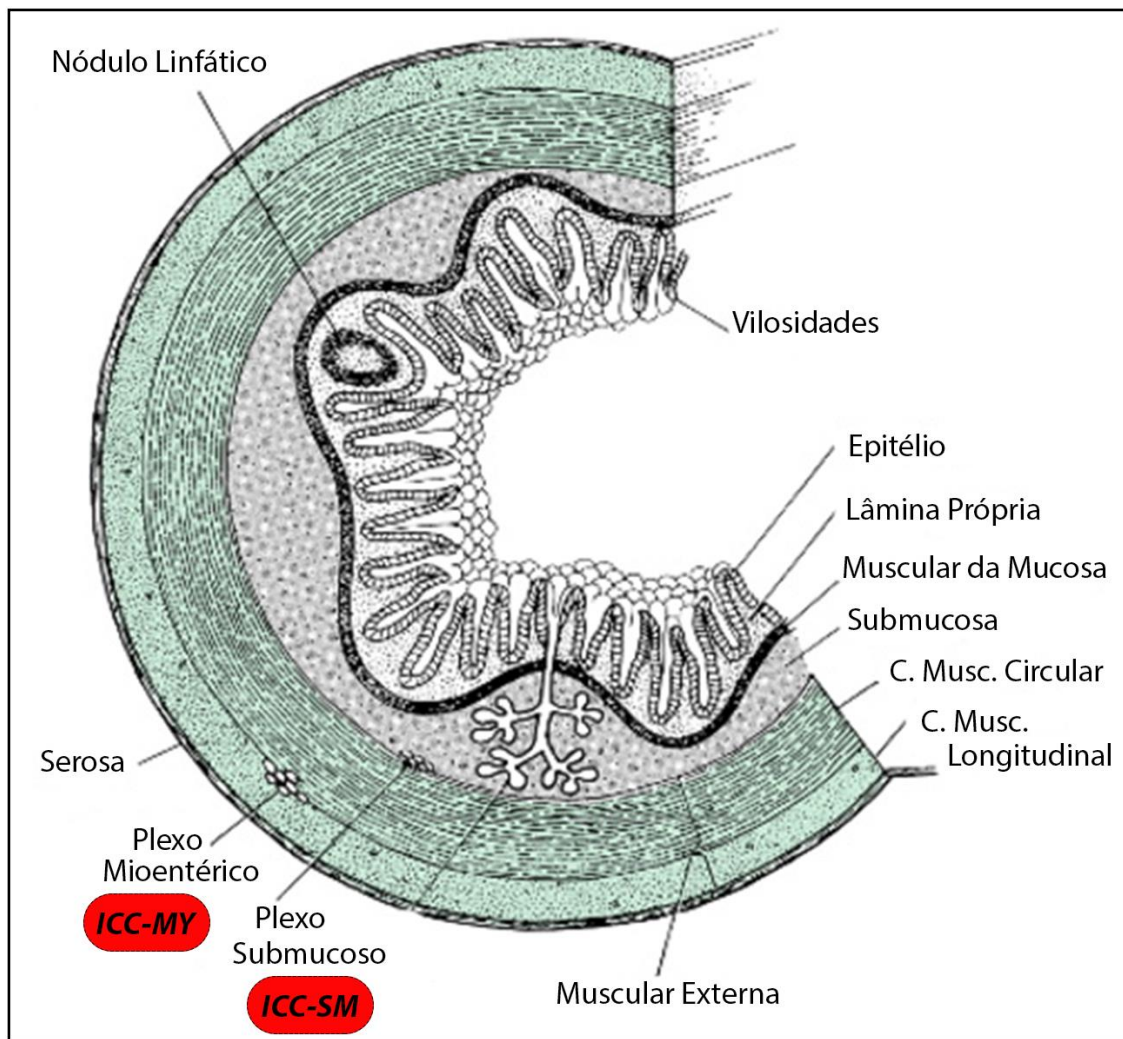


Figura 1: Camadas e estruturas do cólon e indicação (em vermelho) da posição da ICC-SM e ICC-MY. Adaptado de <http://fisiologiadadigestao.blogspot.com.br/>.

Tabela 1: Abreviações e explicação dos termos

Termos	Explicação	Comentários
<i>Rhythmic propulsive motor complex</i> (RPMC)	Baixa frequência, contração de propagação anal (rato), associado com grande aumento na pressão intraluminal	Idêntica à CMMCs (abaixo)
<i>Rhythmic propagating ripple</i> (RPR)	Alta frequência, baixa amplitude de contração no cólon, propagação anal e oral.	
ICC-MY	ICC associada ao plexo mioentérico	Também chamada de ICC-AP ou ICC-MP
ICC-SM	ICC associada ao plexo submucoso no cólon	
<i>Slow wave</i> (onda lenta)	Atividade elétrica de origem proposta nas ICC-SM [60]	Similar em outras espécies, incluindo humanos
<i>Colonic migrating complex</i> (CMMC)	Complexo motor migratório colônico, descrito no cólon de camundongo [48]	Idêntica a RPMC, descrita aqui. Esse termo não será usado devido a semelhança ao Complexo motor migratório (CMM).
<i>Giant migrating contractions</i> (GMC) "Contrações de migração gigantes"	Raramente ocorrem, contrações de propulsão que antecedem a defecação. [62]	Termo confuso uma vez que também é utilizado para descrever outros padrões motores, tais como os complexos motores propulsores rítmicos no cólon de ratos que não estão associados com a defecação. [63]
<i>Peristaltic reflex</i> (reflexo peristáltico)	Um reflexo de que é evocado pela distensão local e envolve neurônios aferentes sensoriais, interneurônios e neurônios motores. [64]	Erroneamente utilizado para descrever uma ampla variedade de padrões motores peristálticos. Em livros e artigos de jornal, "reflexo peristáltico" e "peristaltismo" é muitas vezes erroneamente utilizado alternadamente
<i>Peristalses</i> (Peristaltismo)	A contração muscular circular em forma de anel que se propaga e provoca o movimento do conteúdo em direção anal	O RPMCs preenche o critério para um padrão motor peristáltico

*Tabela adaptada de Huizinga *et al.* [42]

II. Marcadores Inflamatórios

O organismo enfrenta, ininterruptamente, agentes estressores físicos, químicos e biológicos através de barreiras: físicas, como a pele e muco; químicas, como os antioxidantes e pH gástrico; e biológicas, como a resposta imunológica celular e a produção de mediadores inflamatórios [65, 66].

A complexa resposta imune observadas na DIIs e em seus modelos animais é mediada principalmente pelo aumento da atividade de lipoxigenase e cicloxigenase que geram tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos, que induzem a quimiotaxia de polimorfonucleados, macrófagos e linfócitos, os quais desencadeiam intensa síntese e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (eicosanoides, fator de agregação plaquetária, TNF- α , IL-1 β , IL-17 e IL-23) e pró-oxidantes como as enzimas mieloperoxidase (MPO) e a óxido nítrico sintase tipo II (iNOS) presentes no cólon, e seus produtos como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, peroxinitrito, radical hidroxila, peroxicarboxilato nitroso, dióxido de nitrogênio e óxido nítrico [65].

A detecção e quantificação desses mediadores tem importante papel na constatação da presença e do grau da inflamação. No acompanhamento das DIIs e seus modelos experimentais, estas substâncias podem ser detectadas no próprio tecido colônico, no soro sanguíneo ou nas fezes [4]. Em crescente ascensão, a identificação de marcadores nas fezes possui certas vantagens no acompanhamento da inflamação gastrointestinal tais como: não invasividade, simplicidade, baixo-custo, sensibilidade e especificidade [67].

Citada acima como um dos mediadores inflamatórios, a mieloperoxidase (MPO) é uma enzima abundantemente expressa nos neutrófilos e tem importante ação anti-microbiana [68]. Em exacerbação aguda de inflamação, os neutrófilos migram e

degranulam substâncias como mieloperoxidase (MPO), lactoferrina, fatores quimiotáticos e eosinofílicos. Desse modo, os níveis de MPO indicam a ativação de neutrófilos ao longo da mucosa intestinal durante a exacerbação da inflamação. Estas substâncias são estáveis nas fezes durante 3 dias e a sua medição gera indícios indiretos de inflamação colônica [67, 69, 70]. Em comparação aos diferentes produtos granulares de neutrófilos, a MPO tem melhor relação com a atividade inflamatória e a resposta da doença a tratamento [67].

III. Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC)

A Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC) é uma técnica biomagnética que consiste na aplicação de um campo magnético alternado em um meio biológico e na detecção dessa interação através do uso de traçadores/marcadores magnéticos no tecido. Os sensores magnéticos podem ser considerados, basicamente, um par de transformadores com núcleo de ar, onde as bobinas externas funcionam como excitadoras e as internas como detectoras (arranjo coaxial). Cada par é separado por uma distância (linha de base) e dispostas em uma configuração gradiométrica de primeira ordem, ou seja, enroladas em sentidos contrários de modo que os fluxos magnéticos concatenados em cada bobina detectora sejam subtraídos, eliminando os ruídos ambientais e tornando-as mais sensíveis [71] (Figura 2).

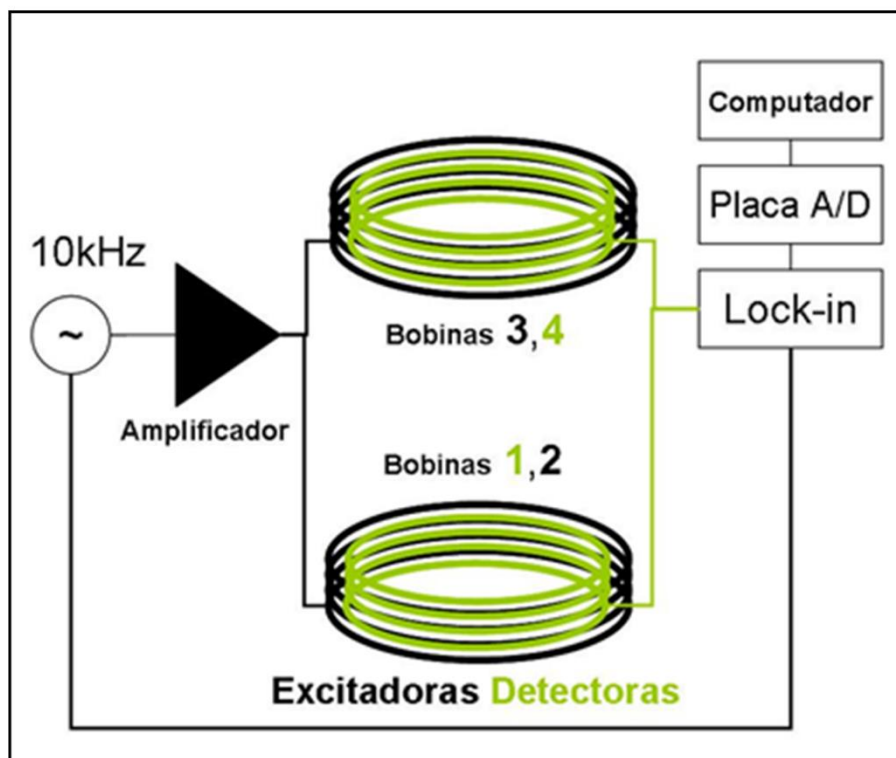


Figura 2: Configuração de um sistema BAC mono sensor.

A BAC diferencia e detecta estruturas através da variação da susceptibilidade magnética inerente a cada material. A técnica emprega como traçadores ou marcadores, materiais com alta susceptibilidade magnética, como o óxido de ferro com manganês (ferrita, MnFe_2O_4 - 50 – 100 μm), que proporciona alta resposta no sistema e não necessita de magnetização prévia do material. Considerada inerte no organismo, a ferrita possui vantagens em sua utilização como traçador magnético, como a sua não toxicidade e insolubilidade natural [35, 72, 73].

Ao posicionar o sensor próximo a um material com alta susceptibilidade magnética, como os traçadores magnéticos, é gerada uma corrente induzida na bobina detectora. Por sua vez, essa corrente é medida através do monitoramento da tensão do sistema de medida. Desta forma é adquirido um valor de tensão proporcional à susceptibilidade magnética, à posição e à quantidade de material magnético presente na região analisada.

Por princípio, as contrações mecânicas do cólon afastam o conteúdo intraluminal do sensor posicionado na superfície da pele, reduzindo a força eletromotriz registrada. Do mesmo modo, o relaxamento aproxima o marcador magnético dos sensores, o que, conseqüentemente, aumenta a força eletromotriz. Nas avaliações de trânsito, leva-se em consideração que a intensidade do sinal é proporcional a quantidade de material no interior do órgão.

IV.Eletromiografia (EMG)

A eletromiografia (EMG) é o estudo dos potenciais de ação e representa a soma das atividades elétricas de várias unidades motoras ativas no músculo. Assim, o sinal de EMG é uma forma de manifestação da ativação elétrica neuromuscular associada aos músculos e pode ser adquirido em qualquer órgão que represente uma variável física de interesse [29]. Este sinal é normalmente uma função de tempo e é descritível em termos de sua amplitude, frequência e fase. O método consiste no registro das alterações bioelétricas dos músculos por meio de eletrodos inseridos diretamente na musculatura [29]. Para captação dos sinais são utilizados eletrodos do tipo agulha, que conduzem sinais elétricos correspondentes a trocas iônicas ocorridas a nível celular e podem registrar a atividade de unidades motoras isoladas em repouso ou em atividade [74].

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi compreender as consequências da inflamação intestinal na motilidade colônica em modelo animal induzido por TNBS e avançar no entendimento da fisiopatologia da doença inflamatória intestinal.

Os objetivos específicos foram:

- Estabelecer uma nova abordagem metodológica para avaliação funcional da motilidade colônica (região terminal) com baixa invasividade.
- Aplicar estratégia de avaliação de parâmetros em um mesmo animal, acompanhando o processo inflamatório por 14 dias após indução;
- Medir a atividade da mieloperoxidase (MPO) em amostras de fezes;
- Medir as atividades mecânica e elétrica do cólon;
- Quantificar a frequência de contração das atividades mecânica e elétrica do cólon;
- Realizar análise histopatológica de fotomicrografias de cólons adjacentes à lesão coletados ao longo do processo inflamatório;
- Quantificar a espessura das camadas do cólon (mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular externa) e a área da lesão.

Metodologia

I. Planejamento experimental

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biomagnetismo – Departamento de Física e Biofísica, e no Laboratório de Fitomedicamentos, Farmacologia e Biotecnologia – Departamento de Farmacologia, ambos sediados no Instituto de Biociências de Botucatu (IBB-UNESP).

II. Animais

Foram utilizados 12 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus* – linhagem Wistar), com peso entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), umidade (50 ± 10 %), e ciclo claro/escuro (12 h), com água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos e manipulações foram realizados de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu - sob protocolo 502-CEUA.

III. Cronograma do experimento

Com o intuito de avaliar os parâmetros em diferentes estágios da inflamação, elaboramos um cronograma com seis medidas para cada animal num total de 12 ratos. A cirurgia para os implantes foi realizada cinco dias antes do início das medidas, sendo a primeira delas antes da indução da inflamação (controle) e as seguintes a cada três dias, como está explícito na Figura 3.

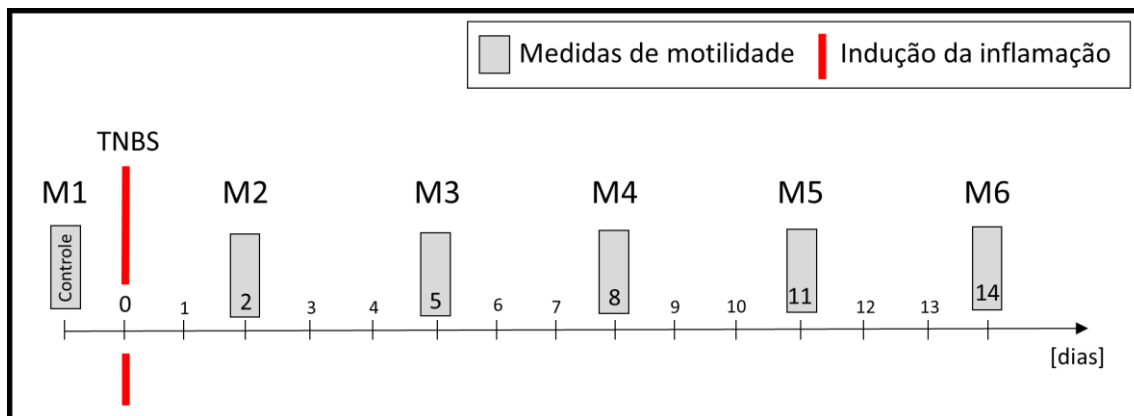


Figura 3: Cronograma do experimento, no qual observa-se o dia de cada medida (M1, M2, M3, M4, M5 e M6) tendo como base o momento da indução do modelo de inflamação (dia 0).

IV. Implante dos marcadores

Através de cirurgia, foram implantados um marcador magnético e um eletrodo diretamente na parede do cólon. Os ratos foram anestesiados com ketamina/xilazina (0,1 mg/Kg – via intraperitoneal) e tiveram a parede abdominal aberta por meio de laparotomia medial. Um conjunto (eletrodo e marcador magnético) foi implantado na serosa do cólon, de modo que o conjunto ficasse posicionado sobre o local onde a lesão será posteriormente induzida. Cada conjunto foi constituído de um eletrodo tipo marca-passo cardíaco (Ethicon - Johnson & Johnson) e um núcleo de 0,15 g de ferrita (marcador magnético - MnFe_2O_4). O fio do eletrodo foi conduzido por meio de tunelamento subcutâneo e exteriorizado através da pele por uma incisão no topo da cabeça. A Figura 4 mostra o posicionamento dos implantes no cólon do animal e do sensor durante a aquisição.

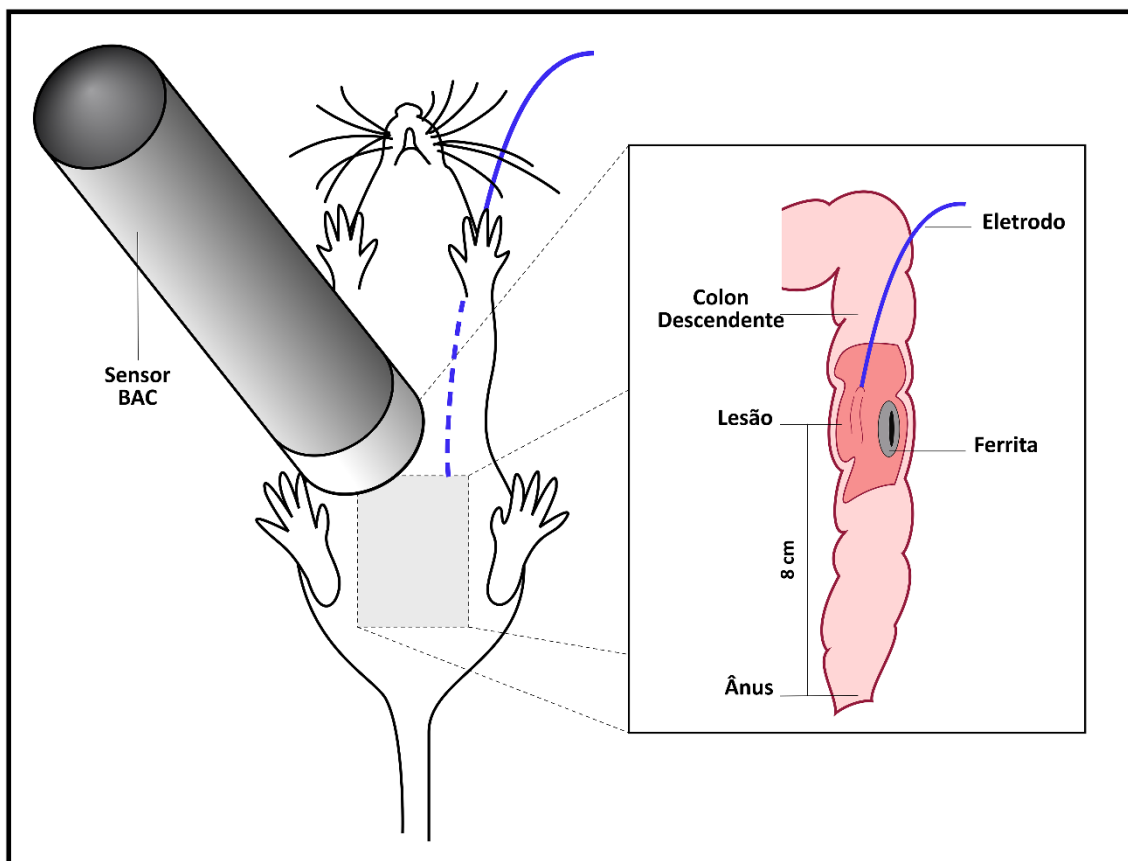


Figura 4: Posicionamento do sensor BAC para aquisição dos sinais, dos implantes cirúrgicos e da lesão a ser induzida no cólon do animal.

V. Indução e avaliação de processo inflamatório colônico

A indução do processo inflamatório foi realizada pelo método descrito por Morris *et al* [23], com modificações descritas a seguir. Os animais foram submetidos a 12h de jejum e anestesiados imediatamente antes da indução. Em seguida, foi realizada a administração intracolônica de 0,25 mL de solução de 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em etanol 50 % (v/v). A administração foi realizada com a ajuda de um cateter de 2 mm de diâmetro, que foi introduzido pelo ânus até uma distância de 8 cm. Os animais foram mantidos de cabeça para baixo desde o momento da instilação do TNBS até a recuperação da anestesia. Durante o período de experimentação, os animais foram avaliados quanto a evolução do peso corpóreo e presença de diarreia ou presença de sangue nas fezes.

Imediatamente antes de cada medição da motilidade colônica (Figura 3), uma amostra de fezes foi coletada com o auxílio de gaiola metabólica para a determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).

VI. Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A determinação da atividade da enzima mieloperoxidase em amostras de fezes foi realizada pelo método de Krawisz, Sharon e Stenson [75]. As fezes foram homogeneizadas em uma solução de brometo de hexadeciltrimetilamônio e submetidas a um triplo congelamento/descongelamento para a determinação da atividade de mieloperoxidase através da oxidação de o-dianisidina na presença de um halogênio e peróxido de hidrogênio, cuja coloração é detectada à 450 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em unidades de mieloperoxidase por grama de fezes (U/g de fezes), onde 1 unidade de MPO é definida como aquela que degrada 1 μ mol de peróxido de hidrogênio por minuto a 25 °C. A atividade da mieloperoxidase é utilizada como marcador de neutrófilos ativados.

VII. Medidas da motilidade colônica

Devido a difícil acessibilidade do cólon, de sua relação não clara com processos digestivos do trato gastrointestinal superior e ciclo circadiano, foram feitas diversas medidas a fim de se padronizar o procedimento experimental. Um breve relato dessa padronização está disponível no Apêndice A.

Em todas as medidas de motilidade, cada animal foi monitorado simultaneamente por BAC e EMG para aquisição de padrões contráteis. Trinta minutos após a ingestão de 2 g de ração, os animais foram anestesiados com Isoflurano (Cristália, Itapira, SP, Brasil) e mantidos em posição supina durante um período de aquisição de

aproximadamente 60 minutos. Os sinais adquiridos com taxa de amostragem de 20Hz foram digitalizados utilizando um gravador multicanal (MP100 System; BIOPAC, Santa Barbara, CA, EUA) e armazenados para posterior análise.

Todos os sinais foram analisados em ambiente MatLab® (Mathworks, Natick, MA, EUA) por inspeção visual e, posteriormente, utilizando filtros de média móvel e Savitzky Golay [36, 76]. O principal parâmetro analisado, tanto na atividade elétrica quanto na mecânica, foi a frequência de contração, quantificada por transformada rápida de Fourier (*Fast Fourier Transform* - FFT) [77]. O resultado da transformada rápida de Fourier é um novo gráfico da intensidade espectral em função da frequência. Neste gráfico, a frequência dominante no sinal aparece como pico bem definido, como mostra o exemplo a seguir (Figura 5). Quando há mais de uma frequência presente simultaneamente no sinal, nota-se a presença de mais picos (Figura 5C).

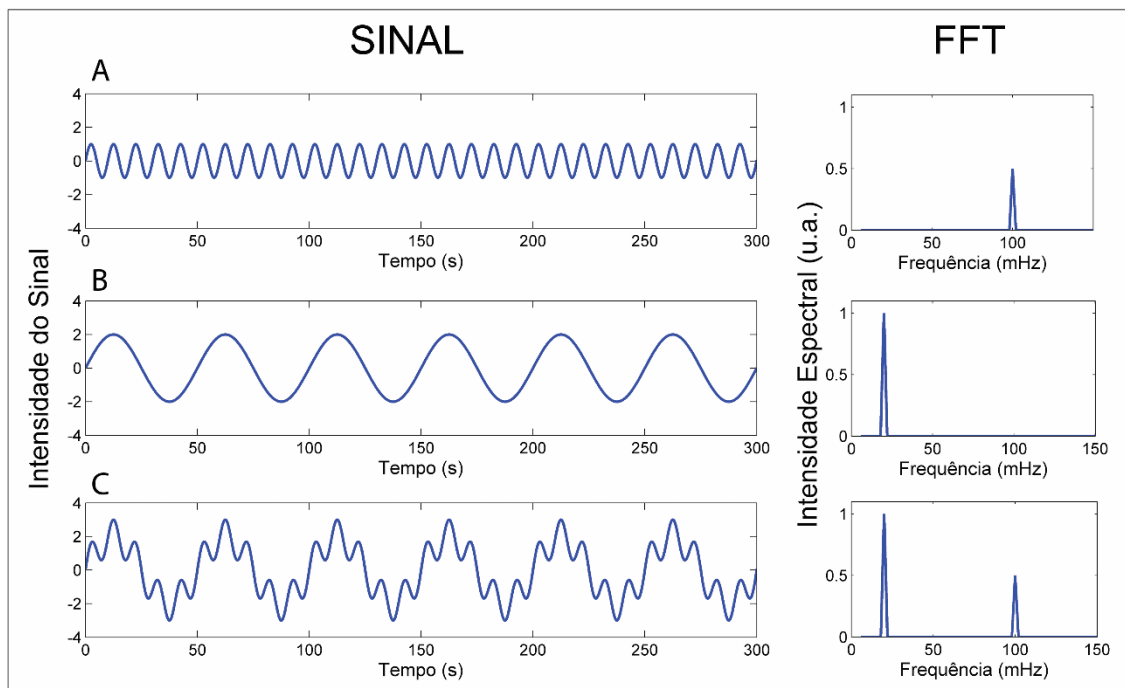


Figura 5: Exemplo de sinais simulados e seus respectivos espectros de Fourier (FFT). (A) Sinal com frequência de 100 mHz. (B) Sinal com frequência de 20 mHz. (C) Soma dos sinais A e B, contendo ambas as frequências, 100 e 20 mHz.

VIII. Definição das contrações

Julgando os mais atuais conceitos e relacionando-os com nossos dados, neste trabalho foram utilizadas as seguintes definições e nomenclaturas: RPMCs (*rhythmic propulsive motor complexes*, “complexo motor propulsivo rítmico”), para as fortes contrações propulsivas, de baixa frequência e alta amplitude; e RPR (*rhythmic propagating ripples* – “ondulações de propagação rítmica”), para a oscilação constante, de alta frequência e baixa amplitude [42].

A Figura 6 é um fragmento de sinal da atividade mecânica do cólon onde se pode notar claramente a presença dos dois tipos de contração.

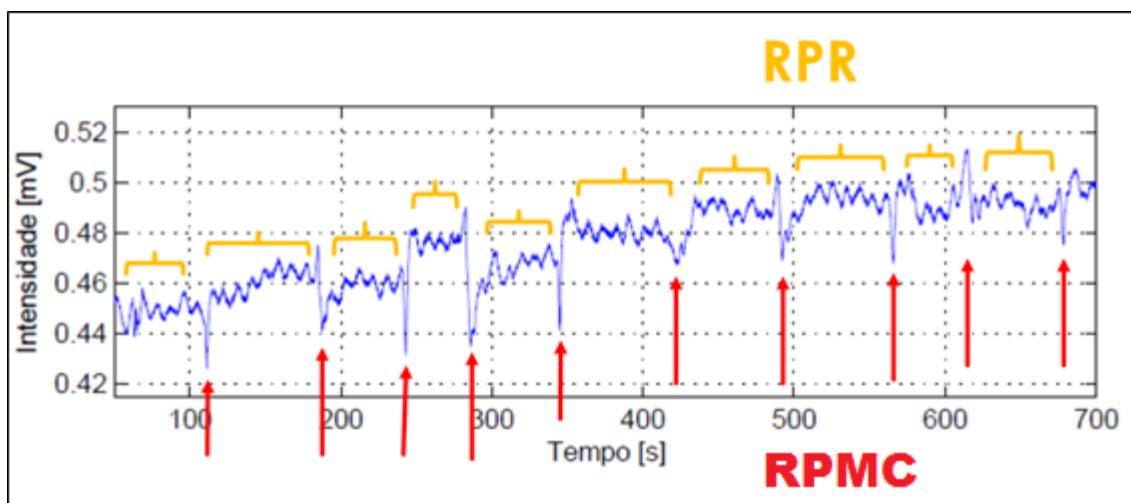


Figura 6: Exemplo de sinal de atividade mecânica colônica. As flechas vermelhas indicam os complexos motores propulsivos rítmicos (RPMC), e as chaves amarelas indicam as ondulações de propagação rítmica (RPR).

IX. Análises histopatológicas

Para esclarecer a relação entre danos nos tecidos, camadas musculares e alterações na motilidade, avaliamos as secções histológicas utilizando um microscópio óptico (Zeiss Discovery V8, Thornwood, NY, EUA). Amostras de tecido (0,5 mm de espessura) adjacentes à área de lesão foram coletadas de 4 grupos de 10 animais para processamento histológico. Cada grupo teve o cólon removido nos dias 0 (saudável, antes

da indução), 2, 7 e 14 após indução, de acordo com o grau de inflamação colônica, bem definido por avaliações macroscópicas e microscópicas [78]. A relação entre os dias das análises histopatológicas e dos dias de medida está ilustrada na Figura 7.

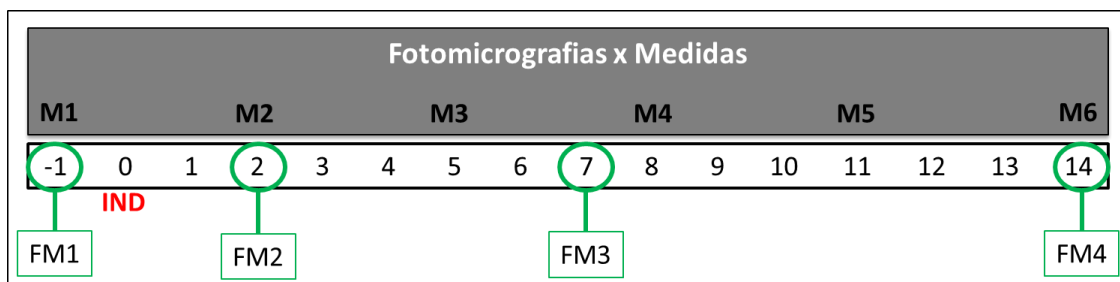


Figura 7: Relação entre os dias de medida e os dias de análise histopatológica. Onde: “IND”, indica o momento da indução; “M”, indica os momentos de medida; e “FM”, indica os momentos das fotomicrografias.

As amostras foram fixadas em ALFAC (álcool 80%, formaldeído 38% e ácido acético, 9:1:0,5 (v, v, v)) por 48 horas. Após este período as amostras foram lavadas e mantidas em álcool 80%, para a seguir ser realizada desidratação em série alcoólica etílica crescente. Após a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol e, posteriormente, incluídas em parafina Histosec-Pastilhas (Merck-11609). Os cortes (6 µm de espessura) foram desparafinizados em estufa a 50 °C e reidratados utilizando série etílica decrescente. A seguir, as amostras foram submetidas à coloração em hematoxilina-eosina para a análise histopatológica das lesões no microscópio óptico Zeiss Discovery V8. As imagens foram adquiridas por câmera MRc5 e pelo software AxioVision LE.

Nas micrografias, quantificamos a espessura das camadas de tecido (mucosa, muscular da mucosa, submucosa, muscular externa) e área da úlcera, se presente. Na sequência, avaliamos a presença de edema, infiltração de leucócitos e formação de tecido conjuntivo. As imagens foram adquiridas e analisadas por AxioCam MRc 5 e pelo software AxioVision LE.

X. Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A avaliação estatística dos dados relacionados às atividades mecânica, elétrica, MPO e massa corporal foi realizada por meio de Análise de Variância de uma via (ANOVA – *One Way*) para medidas repetidas seguido pelo teste *a posteriori* de múltiplas comparações de Dunnett. Para analisar as espessuras das camadas do cólon, foi utilizada ANOVA de uma via ordinária seguida pelo teste *a posteriori* de comparação múltipla de *Dunnett*. Na análise da área de úlcera, usamos o teste t de *Student* para amostras não pareadas. Todas as análises foram feitas pelo software GraphPad Prism® com nível de significância mínimo de $p < 0,05$ comparados ao grupo controle (M1, animal saudável antes da indução).

Resultados

A Figura 8 mostra a variação de massa corporal dos animais submetidos ao experimento. Logo após a indução (traço vermelho), houve diminuição do peso, porém a partir de M3 os valores voltam a aumentar gradativamente, como é esperado de um animal com eficiente recuperação do processo inflamatório.

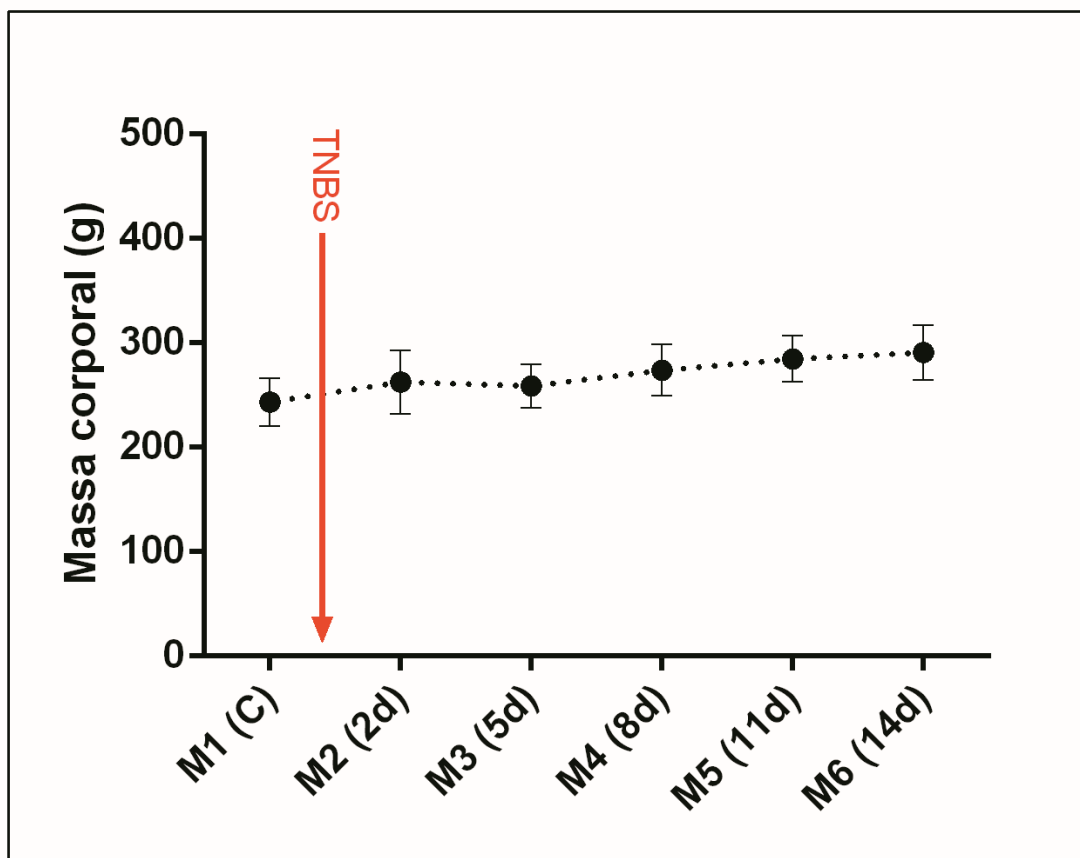


Figura 8: Massa corporal dos animais ao longo das seis medidas. A indução do processo inflamatório está demarcada pelo traço vermelho.

A Figura 9 mostra o resultado da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas fezes. Observando esses dados, na medida subsequente à indução nota-se um aumento significativo da atividade dessa enzima. Já nas próximas medidas (M3, M4, M5 e M6),

os níveis da atividade de MPO diminuem e voltam a não apresentar diferença estatística em comparação com a medida pré indução (M1).

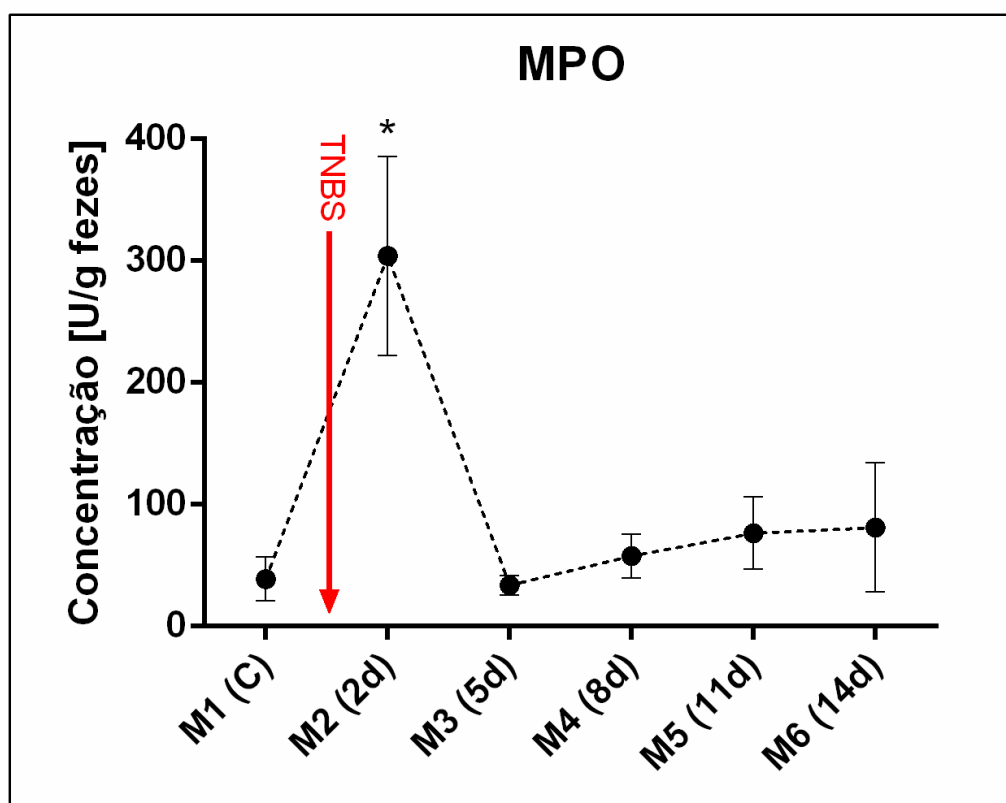


Figura 9: Atividade de MPO medida durante o experimento. O traço vermelho mostra o momento a indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.

Com relação às medidas da atividade mecânica da motilidade colônica, na Figura 10 estão apresentados trechos de 10 minutos de sinal para exemplificar cada um dos momentos de aquisição. Juntamente com o sinal previamente filtrado para eliminar ruídos como respiração e oscilações de rede elétrica, está apresentado também o espectro das frequências do respectivo sinal. Cada pico do espectro representa uma frequência contida no sinal. É possível observar diferenças morfológicas no sinal ao longo das medidas, principalmente em M3. Nota-se, atentando-se ao espectro de frequências, que existem dois picos mais destacados em todas as medidas, esses picos representam as contrações RPCM, baixa frequência, e RPR, alta frequência. No decorrer das medidas, fica nítido o

deslocamento desses picos, denotando uma variação de frequência, muito provavelmente, pelo processo inflamatório.

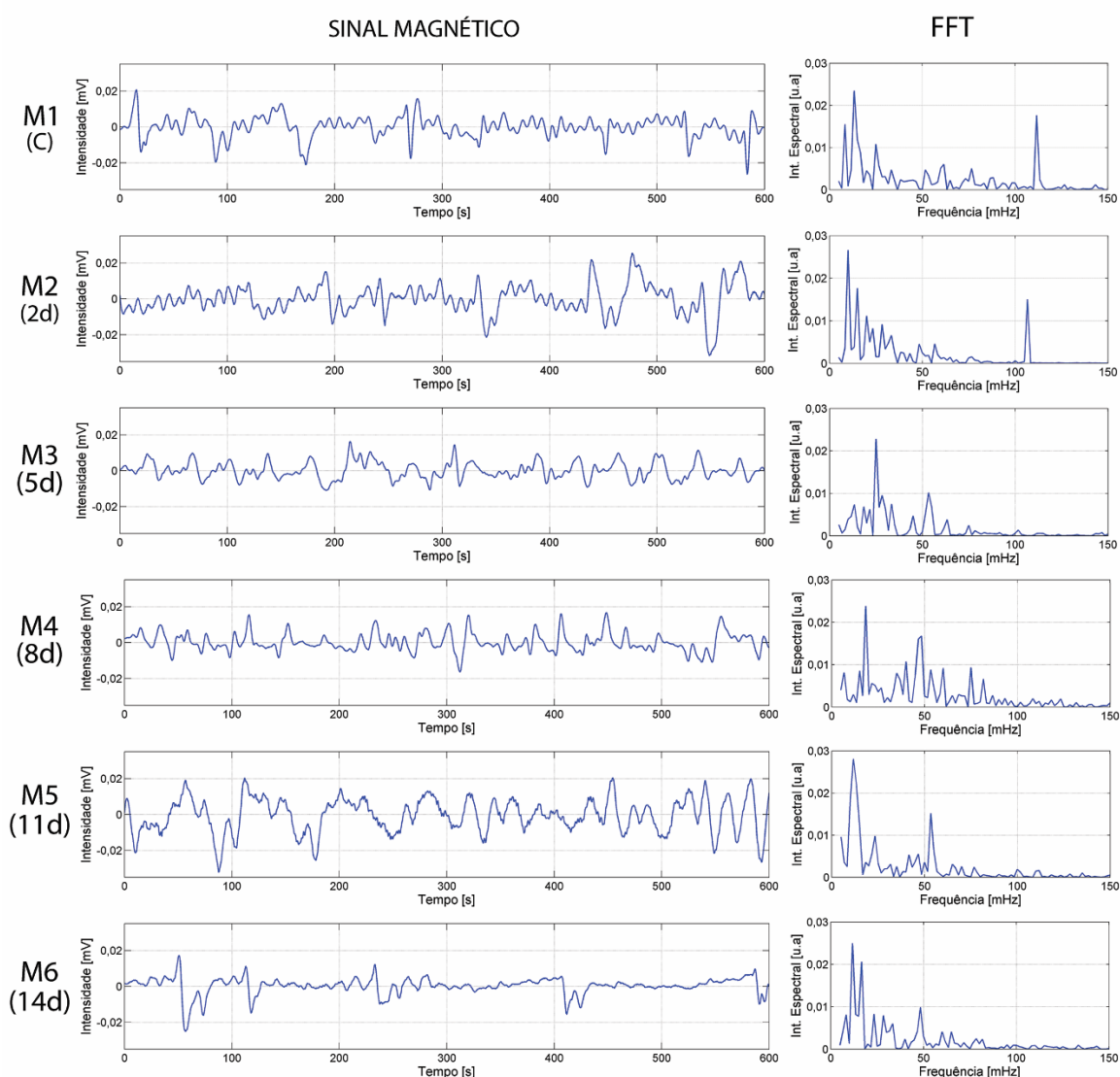


Figura 10: Exemplos de sinais magnéticos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) relativos à atividade mecânica do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).

Os registros magnéticos adquiridos em cada situação foram quantificados em relação à frequência e estão apresentados nas Figuras 11 e 12. As contrações mecânicas RPMC e RPR foram quantificadas separadamente.

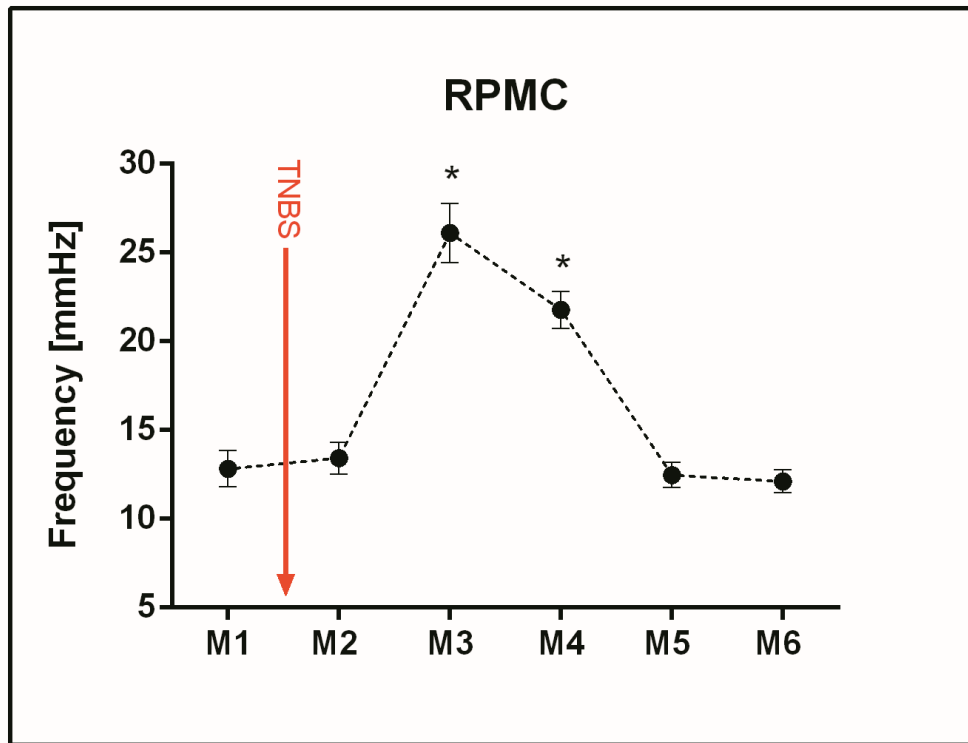


Figura 11: Frequência da contração mecânica RPMC ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.

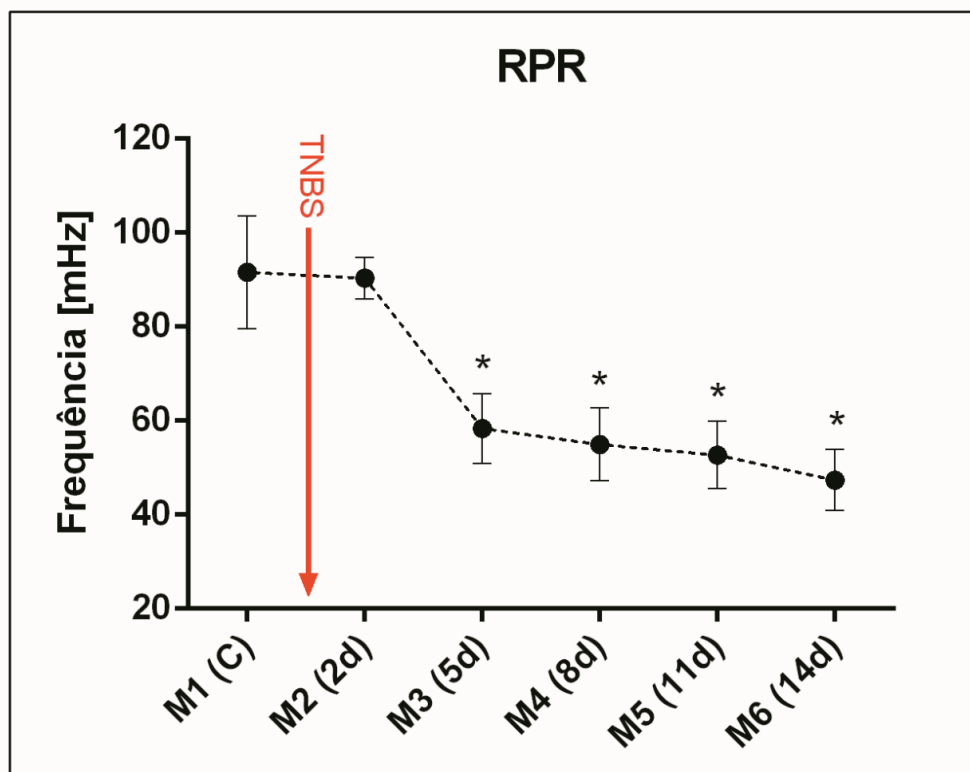


Figura 12: Frequência da contração mecânica RPR ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório. * $p < 0,05$, em comparação com M1.

Em RPMC, nota-se claramente um aumento de frequência nas medidas 3 e 4, seguido de uma diminuição em M5 e M6, quando a frequência atinge valores estatisticamente iguais aos da medida controle (M1). Em RPR, tem-se um comportamento distinto, onde os valores dessa frequência diminuem significativamente em M3, porém esses valores mantêm-se diferentes dos valores de M1 até o fim do experimento.

De forma análoga aos registros mecânicos, trechos de sinais elétricos adquiridos por EMG em todas as fases do experimento estão apresentados na Figura 13. Os respectivos espectros de frequências estão apresentados de forma a evidenciar a frequência contida em cada trecho de sinal, neste caso (atividade elétrica) apenas uma frequência destaca-se. Observa-se claramente mudanças morfológicas no sinal ao longo do experimento, bem como deslocamento no pico de frequência na análise espectral.

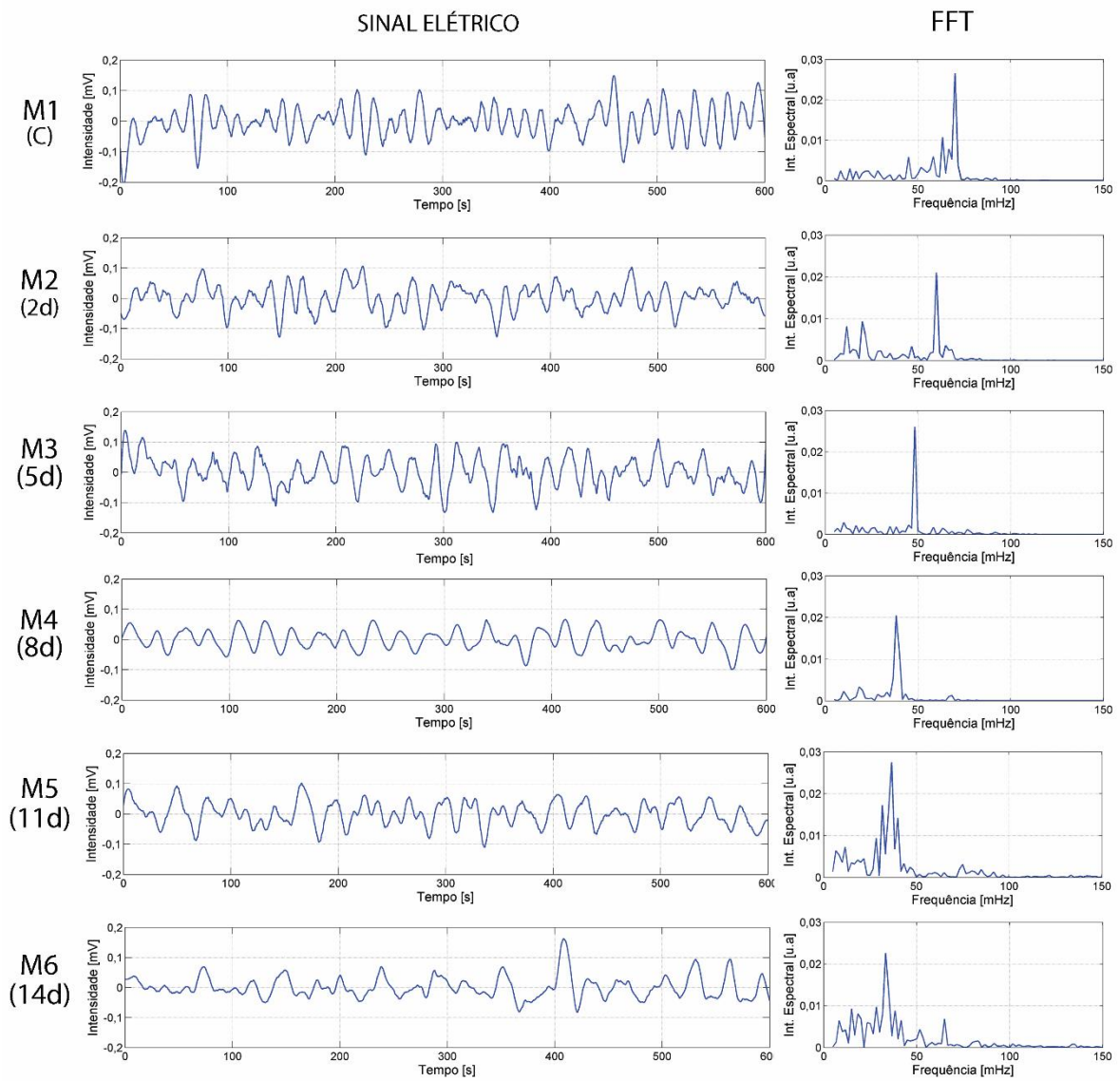


Figura 13: Exemplos de sinais elétricos e seus respectivos espectros de frequência (FFT) do cólon ao longo do experimento (M1, M2, M3, M4, M5 e M6).

Os dados referentes à avaliação da atividade elétrica estão apresentados na Figura 14. A frequência da atividade elétrica tem uma diminuição nos valores a partir de M2, a qual volta a aumentar em M6, mas não retornando a valores estatisticamente iguais aos de M1.

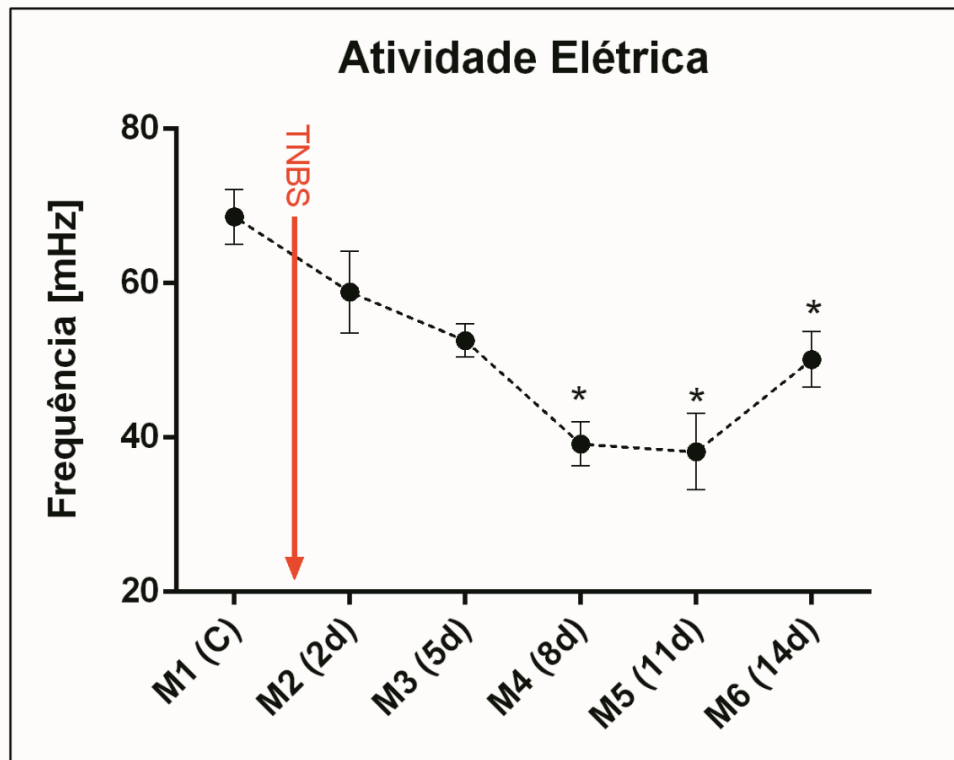


Figura 14: Frequências da atividade elétrica ao longo do experimento. O traço vermelho mostra o momento da indução do processo inflamatório * $p < 0,05$, em comparação com M1.

Para esclarecer a relação entre danos aos tecidos e às camadas musculares e alterações da motilidade, foram realizadas imagens de cortes histológicos (fotomicrografias) de cólons de animais nas seguintes condições: rato saudável, 48 horas após a indução, 7 dias após a indução e 14 dias após a indução. A Figura 15 traz as fotomicrografias dos cortes histológicos no decorrer da inflamação.

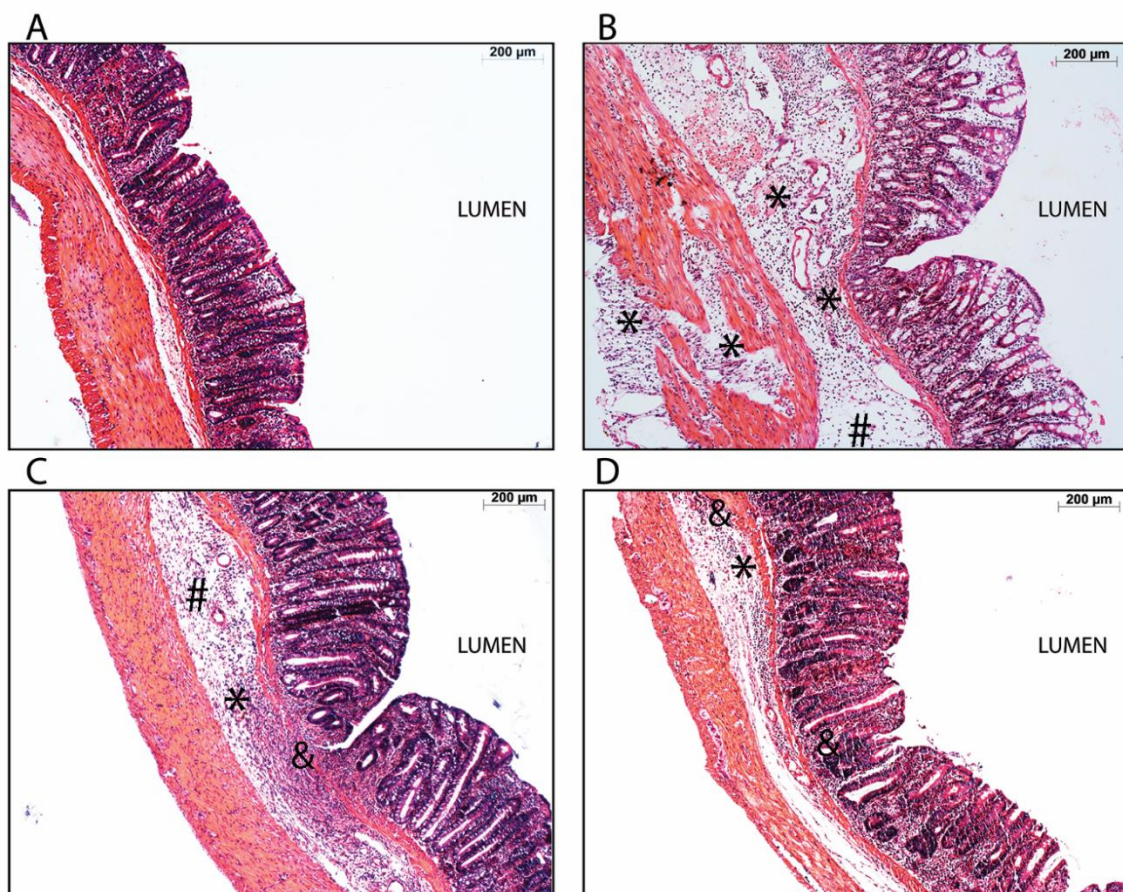


Figura 15: Fotomicrografias do cólon de ratos em 4 situações do experimento. (A) Controle, sem indução de inflamação intestinal. (B) 2 dias após a indução da inflamação intestinal. (C) 7 dias após a indução da inflamação. (D) 14 dias após a indução da inflamação. Símbolos: * indica infiltrado de leucócitos; & indica formação de tecido conjuntivo frouxo e denso; e # indica edema.

A Figura 16 mostra a variação da espessura da mucosa, muscular da mucosa, submucosa e muscular externa, obtida pela quantificação da análise histopatológica. A camada mucosa aumentou em espessura 2 dias após a indução, o que durou até o final do experimento. A espessura da submucosa e da muscular externa também aumentou no dia 2, porém começou a diminuir nos dias 7 e 14. A área de úlcera também está apresentada na mesma figura, exibindo seus valores mais altos no dia 2, começando a diminuir no dia 7. 14 dias após indução. Não se observaram pontos de ulceração nas imagens.

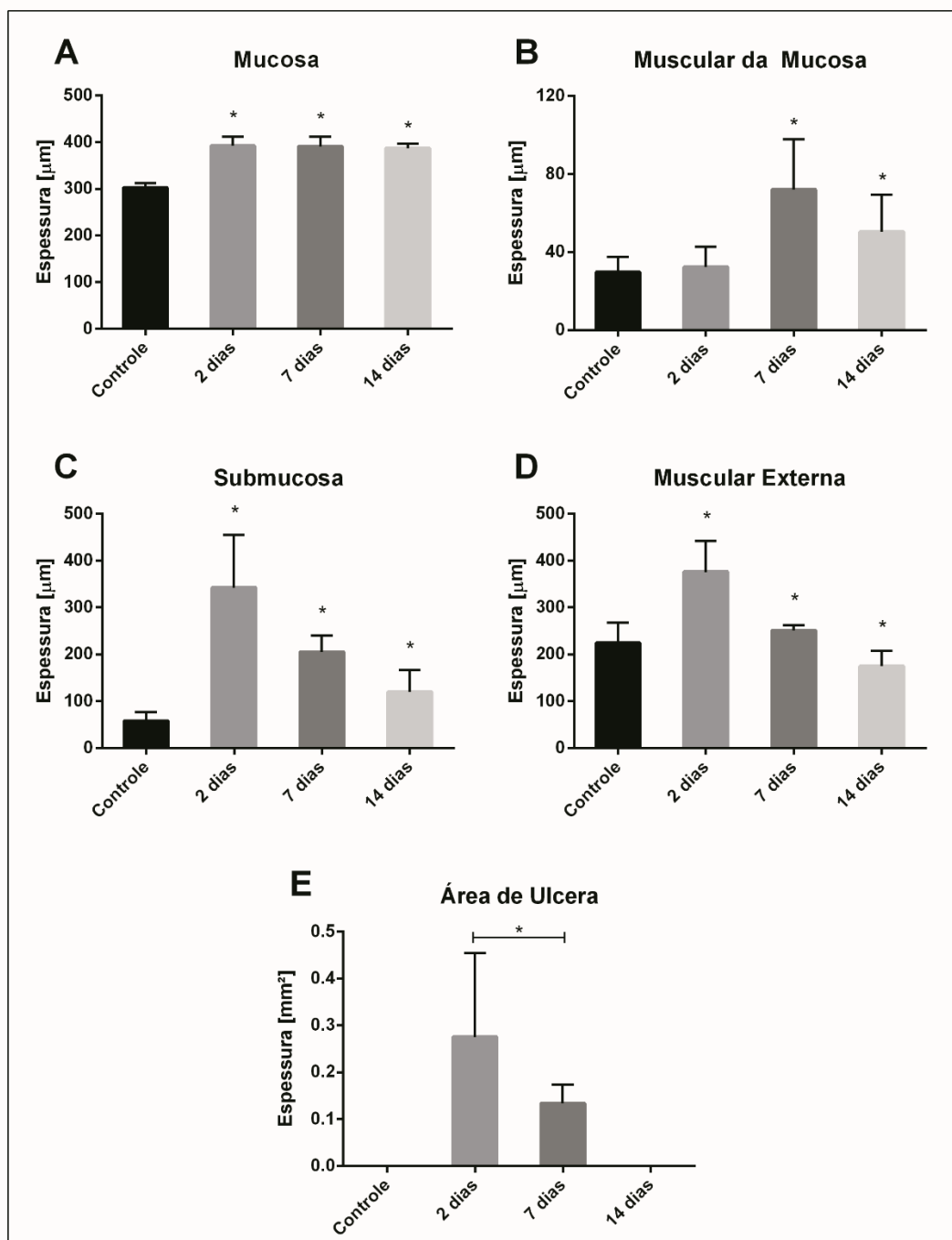


Figura 16: Espessuras das camadas do cólon ao longo da duração do experimento: (A) mucosa; (B) muscular da mucosa; (C) submucosa; e (D) muscular externa. Quando houve pontos de ulceração visíveis, foram quantificadas áreas (E). * $p < 0,05$, em comparação com o Controle. Em (E), a comparação foi feita entre o 2º e o 7º dias após a indução.

Com os principais resultados, foi elaborado um artigo para publicação em periódico de destaque na área. O texto referente ao artigo está disponível nesse documento no Apêndice B.

Discussão

O objetivo deste estudo foi determinar o comportamento da contratilidade do cólon, atividade elétrica e grau de inflamação após o modelo de inflamação TNBS. Os principais resultados ao longo dos 14 dias após a indução foram alterações transitórias nos níveis de atividade da MPO e frequência de contração RPMC,; bem como mudanças mais duradouras na frequência de contração RPR e da atividade elétrica. Estes resultados foram associados às informações da análise histopatológica em diferentes momentos do processo inflamatório.

A massa corporal dos animais não apresentou alterações preocupantes ao longo do experimento, sendo a diminuição imediatamente pós indução e o subsequente aumento constatado considerado normal para o período de tempo do experimento [79, 80].

Várias alterações histológicas já foram observadas em pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) e em modelos experimentais de inflamação intestinal, incluindo os danos ao sistema nervoso, a ruptura das células intersticiais de Cajal (ICC), e hiperplasia e hipertrofia de células de músculo liso [81].

A administração de TNBS resulta em uma lesão do tipo transmural, pode atingir da camada mucosa à serosa, como podemos observar na Figura 15. Na análise histopatológica, observamos que 2 dias após a indução do processo inflamatório, há danos na citoarquitetura da mucosa, edema na submucosa e infiltração de leucócitos na submucosa, muscular da mucosa, muscular da submucosa e na serosa (Figura 15B). Após 7 dias da instilação do TNBS, pode-se observar diminuição no infiltrado de leucócitos e no edema da submucosa; porém há um grande acúmulo de tecido conjuntivo próximo à muscular da mucosa e ainda pode-se observar pontos de ulceração da mucosa e muscular da mucosa (Figura 15C). O cólon, depois de 14 dias da indução da inflamação, apresentou citoarquitetura semelhante à de um cólon sem inflamação, apesar do edema discreto e do

acúmulo leve de tecido conjuntivo na mucosa e na submucosa adjacente à muscular da mucosa (Figura 15D).

Os resultados da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas fezes dos animais apresentaram ótimo comportamento, mostrando um pico significativamente diferente na M2 (Figura 9). Como M2 é considerado o momento onde o cólon está em seu maior grau de inflamação [82], somado a avaliação histológica e a diarreia observada em todos os animais (dados não apresentados), é possível assegurar a presença de inflamação grave no cólon dos animais e em que momento essa inflamação foi crítica. Como o procedimento tradicional de avaliação desse marcador é a dosagem direta no tecido [75], este resultado, do ponto de vista de mediadores inflamatórios, é extremamente importante, pois é diretamente proporcional à migração de polimorfonucleados ativos e mantém o animal vivo, possibilitando diferentes tipos de abordagem. Além do mais, nossos resultados são corroborados pela atividade de mieloperoxidase em fezes de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal [69].

A RPCM mostra um aumento significativo em sua frequência de contração em M3 que perdura até M4 (Figura 11). Porém em M5, a frequência de contração regride aos valores sem diferença significativa com M1 (controle). A RPMC está relacionada, principalmente, com a propulsão das fezes, tem longas despolarizações e é estímulo-dependente. As redes neurais entéricas são circuitos intrincados de neurônios sensoriais e motores, que são sequencialmente ativados para criar um padrão motor complexo com *feedback* de conteúdo ou do estado contrátil do cólon [45]. Esse tipo de contração é relacionado com despolarizações oriundas de Células Intersticiais de Cajal, relacionadas ao plexo mioentérico (ICCs-MY), situadas entre as camadas musculares longitudinal e circular [60]. É possível que, por se tratar de camadas mais externas, a lesão não tenha prejudicado de maneira mais grave e duradoura este tipo de atividade motora.

Uma explicação para o fato da frequência ter aumento em M3 e M4, é que nesse período há recorrentes episódios de fezes diarreicas. A diarreia se caracteriza como um mecanismo de defesa do organismo para limpar os conteúdos que estão irritando o TGI, e se dá, entre outros artifícios, por um aumento de motilidade e transito gastrointestinal [83, 84]. No modelo de inflamação por TNBS é relatado a ocorrência de fezes diarreicas na fase aguda [80, 85]. Como a RPMC é a contração que tem por função a propulsão das fezes, essa, por sua vez, aumentaria sua frequência. Entretanto, em M5, o cólon já estava visivelmente recuperado (Figura 15D), e a ocorrência de fezes diarreicas já tinha cessado. Nesse momento a frequência de contração RPMC tenderia a voltar a frequência normal.

A frequência da RPR demonstrou significativa queda a partir de M3 (Figura 12). Porém, diferentemente da RPMC, essa alteração se manteve até M6. Já foi relatado que a retocolite altera a atividade elétrica espontânea assim como a contratilidade do músculo liso, em resposta a estímulos farmacológico e nervoso [86]. Experimentos eletrofisiológicos *in vitro* em cólons de ratos relevaram que a RPR é diretamente relacionada as ICCs que medeiam a atividade de *slow wave*, presente em todo TGI com diferentes frequências em cada parte [60]. Essas células marca-passo do cólon distal são associadas com o plexo submucoso (ICC-SM), localizadas ao longo da superfície da submucosa da camada muscular circular. Ao observar as Figuras 15 e 16, podemos comparar a condição e a espessura da camada submucosa dos cólons. Nem após 14 dias, essa camada ficou totalmente restituída, sugerindo que o dano pode ter sido mais grave do que nas camadas musculares externas (circular e longitudinal). A frequência da atividade elétrica (Figura 14) diminui analogamente à RPR. No entanto, a atividade elétrica começa a diminuir sua frequência já em M2, sugerindo assim um dano direto às ICCs-SM, o qual também permaneceu até o fim do experimento.

Uma situação que ocorre em determinadas partes do TGI, como o estômago [37, 87], é a existência de gradientes de frequência das ICCs. Alguns estudos em diferentes modelos animais mostram a existência e inter-relação entre a origem e propagação dos estímulos elétricos [88-90]. Quando determinadas células marca-passo são retiradas, ou sofrem danos irreversíveis/morrem, outras ICCs, localizadas próximas, se tornam dominantes, fazendo com que as contrações na região passem a ter a frequência de contração da nova ICC dominante. Assim, aplicando essa situação ao cólon, é possível que, se as ICCs-SM forem danificadas permanentemente, as ICCs-SM da vizinhança passem a coordenar o ritmo de contração naquele lugar, dessa maneira justificando a alteração de frequência da RPR.

Os resultados obtidos no âmbito das contrações mecânicas (RPMC e RPR) e elétricas foram muito interessantes e conclusivos. As frequências quantificadas para cada uma delas sofreram uma variação significativa em M3. Convém destacar a diferença do tempo de resposta para o mediador inflamatório MPO e as contrações mecânicas RPMC e RPR. Enquanto na MPO a mudança ocorre em M2, para as contrações mecânicas essa variação ocorre em M3, ou seja, três dias depois. Esse “atraso” pode ter relação com tempo em que a lesão química demora para se tornar estrutural em termos de reflexo mecânico. Visto que, diferentemente da atividade mecânica, a atividade elétrica começa a mudar significativamente já na M2. Logo que ocorre a lesão, existe a formação de fibrose. Outros dados da literatura indicam que a administração de TNBS, em diversas doses, causa fibrose em diversos modelos animais [91, 92]. Os resultados deste estudo são importantes, pois podem explicar os sintomas de constipação, diarreia e dor abdominal em pacientes com DII, apesar das análises macroscópicas de colonoscopia não mostrarem indícios de doença ativa [93].

Como já foi citado, a DII é uma inflamação, crônica, recidivante, incapacitante e que não apresenta cura. A restauração da citoarquitetura dos tecidos é resultado natural do dano tecidual; contudo, na inflamação crônica a gravidade e a extensão da lesão excedem a regeneração intrínseca e o organismo se defende através da fibrogênese [94]. Tal processo pode ser observado, em nossas fotomicrografias, com o acúmulo de tecido conjuntivo em 7 e 14 (Figura 15C e 15D) dias após a indução da inflamação, e também com o aumento de espessura da mucosa, a partir do dia 2, e muscular da mucosa, a partir do dia 7 (Figura 16A e B, respectivamente).

As alterações observadas na análise histopatológica (Figura 15B), nas frequências RPMC (Figura 11), elétrica (Figura 14) e RPR (Figura 12) 2 dias após a lesão, indicam que, além da alteração morfológica, há alteração do peristaltismo colônico. Além disso, a diminuição nas frequências elétrica e RPR permanece por todo o período do experimento, o que pode ser explicado pelo acúmulo de tecido conjuntivo denso e frouxo em regiões adjacentes à muscular da mucosa (& na Figura 15C e 15D) e, consequentemente, indicar o comprometimento do peristaltismo devido à fibrogênese.

Nesse processo inflamatório intenso, a lesão ultrapassa a capacidade intrínseca de regeneração (Figura 16), sendo a fibrogênese um dos mecanismos de defesa contra tais danos [94]. Numerosos dados da literatura indicam que a administração de TNBS a várias doses provoca fibrose no tecido colônico em vários modelos animais [91, 92].

Essa reação frente à inflamação por TNBS, onde uma das contrações se alteram transitoriamente enquanto a outra mantém a alteração, definitivamente foi obtida também *in vitro* em estudo de cólons isolados de ratos [24]. Neste estudo, foi sugerida possibilidade de haver diferentes susceptibilidades da restauração da ritmicidade espontânea e contração miogênica, especialmente na fase de cura da inflamação.

De maneira geral, os principais controladores da atividade motora colônica são: as propriedades dos músculos lisos (ICCs); Nervos intrínsecos (Sistema Nervoso Entérico), Nervos Extrínsecos (Simpático e Parassimpático); e substâncias químicas liberadas no órgão ou na circulação [43]. Dois destes, ICCs e nervos intrínsecos, essenciais para o padrão motor normal ocorrer, estão nas camadas do tecido subjugadas com maior ou menor gravidade aos danos da lesão (Figura 15). No cólon, bem como em todo TGI, são encontradas diversos tipos de ICCs principalmente como: ICC-SM (associadas ao plexo submucoso), ICC-MI (intra musculares) e ICC-MY (associadas ao plexo mioentérico), entre outros [95]. Cada um deles localizados em diferentes lugares do tecido e com funções na motilidade gastrointestinal. Dessa forma, é muito importante atentar à extensão da lesão a nível de camadas musculares e profundidade.

Os resultados apresentados neste trabalho podem explicar a constipação, diarreia e dor abdominal, que são os principais sintomas incapacitantes observados em pacientes com DII [65, 96, 97]. Do ponto de vista experimental, o controle do grau de inflamação a partir da coleta de fezes, simultaneamente com o monitoramento motilidade *in vivo*, pode ser útil e não-invasivo para avaliar o estado da doença em diversos modelos de estudos.

Além disso, este estudo pode contribuir com dados cruciais para uma melhor compreensão da etiologia, progressão e remissão das doenças inflamatórias intestinais (DII). A elucidação dos mecanismos das DIIs é essencial para a medicina moderna humana, uma vez que a DII é uma de um conglomerado de doenças inflamatórias auto-imunes, tais como artrite, psoríase, espondiloartropatias e erythematousus lúpus sistêmico [79].

Conclusão

Esse estudo obteve bons resultados na avaliação *in vivo* das alterações da motilidade em resposta ao modelo de DII induzido por TNBS. A investigação dessas consequências contráteis apontou para uma clara relação grau de inflamação, dano tecidual, que por sua vez teve correspondência com características da fisiopatologia da doença inflamatória intestinal.

Todos parâmetros avaliados demonstraram resultados coerentes com a literatura atual e também proporcionaram um novo ângulo para abordagens e discussões em torno de mecanismos diretamente relacionados à patogênese, sintomas e danos causados pela DII.

A principal resposta que obtivemos foram os diferentes perfis temporais da alteração contrátil das duas atividades mecânicas, RPMC (estímulo-dependente, propulsão) e RPR (*slow wave*, mistura). Respectivamente, essas alterações sugerem fortemente ligações com a diarreia (temporária no modelo) e a formação de fibrose no tecido (permanente).

O fato das medidas biomagnéticas, bioelétricas e químicas serem conduzidas em um mesmo animal, devido à eficiência da dosagem do marcador inflamatório nas fezes e às técnicas físicas não invasivas, agregou para este estudo um grande potencial metodológico.

Por fim, acreditamos que este trabalho irá contribuir para o esclarecimento de questões na área de intersecção entre motilidade e doenças inflamatórias intestinais. Ademais, este estudo permitirá o desenvolvimento de novos projetos dando continuidade ao uso dessa metodologia associada a diferentes delineamentos experimentais, como, por exemplo, outros modelos de inflamação ou a implementação de drogas.

Referências

1. de Mattos, B.R.R., et al., *Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments*. Mediators of Inflammation, 2015. **2015**: p. 493012.
2. Gearry, R.B., *IBD and Environment: Are There Differences between East and West*. Dig Dis, 2016. **34**(1-2): p. 84-9.
3. Zhai, H., et al., *Increasing rate of inflammatory bowel disease: a 12-year retrospective study in NingXia, China*. BMC Gastroenterol, 2016. **16**: p. 2.
4. Judd, T.A., et al., *Update of fecal markers of inflammation in inflammatory bowel disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26**(10): p. 1493-9.
5. Rosenstiel, P., et al., *Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease*. Semin Immunol, 2009. **21**(6): p. 334-45.
6. Singh, V.P., et al., *Effect of nimesulide on acetic acid- and leukotriene-induced inflammatory bowel disease in rats*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2003. **71**(3-4): p. 163-75.
7. Loftus, E.V., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-1517.
8. SOUZA, M.T., LE; RODRIGUES, CM; VIANA, CF; ONOFRE, PH; MONTEIRO, RA; PASSOS, AD; MARTINELLI, AL; MENEGHELLI, UG *Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil*. Arquivos de Gastroenterologia, 2002. **39**(2): p. 7.
9. Victoria, C.R., L.Y. Sassak, and H.R. Nunes, *Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of Sao Paulo State, Brazil*. Arq Gastroenterol, 2009. **46**(1): p. 20-5.
10. Danese, S., M. Sans, and C. Fiocchi, *Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors*. Autoimmunity Reviews, 2004. **3**(5): p. 394-400.
11. Ordas, I., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2012. **380**(9853): p. 1606-19.
12. Danese, S. and C. Fiocchi, *Medical Progress Ulcerative Colitis*. New England Journal of Medicine, 2011. **365**(18): p. 1713-1725.
13. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-1359.

14. Coulie, B., et al., *Colonic motility in chronic ulcerative proctosigmoiditis and the effects of nicotine on colonic motility in patients and healthy subjects*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2001. **15**(5): p. 653-663.
15. Collins, S.M., *The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders*. *Gastroenterology*, 1996. **111**(6): p. 1683-99.
16. Hosseini, J.M., et al., *Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats*. *Neurogastroenterol Motil*, 1999. **11**(5): p. 347-56.
17. Wells, R.W. and M.G. Blennerhassett, *Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis*. *Pflugers Arch*, 2004. **448**(5): p. 515-24.
18. O'Brian, M.P., SF, *Colonic motility in health and disease*. *Gastrointestinal Motility in Clinical Practice*, 1996. **25**(1): p. p147-163.
19. Connell, A.M., *The motility of the pelvic colon. II. Paradoxical motility in diarrhoea and constipation*. *Gut*, 1962. **3**: p. 342-8.
20. Bassotti, G., et al., *Gastrointestinal motility disorders in inflammatory bowel diseases*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(1): p. 37-44.
21. Abdalla, S.M., G. Kalra, and B. Moshiree, *Motility Evaluation in the Patient with Inflammatory Bowel Disease*. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2016. **26**(4): p. 719-38.
22. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1995. **109**(4): p. 1344-67.
23. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. *Gastroenterology*, 1989. **96**(3): p. 795-803.
24. Kiyosue, M., et al., *Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis*. *Neurogastroenterol Motil*, 2006. **18**(11): p. 1019-30.
25. Lomax, A.E., et al., *Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **292**(2): p. G482-91.
26. Bassotti, G., et al., *Colonic motility in ulcerative colitis*. *United European Gastroenterol J*, 2014. **2**(6): p. 457-62.
27. Latour, A., L. Bueno, and J. Fioramonti, *Quantitative measurement of human colonic electrical activity by a micro-computerized system*. *International Journal of Bio-Medical Computing*, 1983. **14**(1): p. 7-16.
28. Bueno, L., et al., *Colonic Myoelectrical Activity in Diarrhea and Constipation*. *Hepato-Gastroenterology*, 1980. **27**(5): p. 381-389.

29. Raez, M.B.I., M.S. Hussain, and F. Mohd-Yasin, *Techniques of EMG signal analysis: detection, processing, classification and applications*. Biological Procedures Online, 2006. **8**: p. 11-35.
30. Nozu, T., et al., *Water avoidance stress induces visceral hyposensitivity through peripheral corticotropin releasing factor receptor type 2 and central dopamine D2 receptor in rats*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(4): p. 522-31.
31. Miranda, J.R., et al., *An AC biosusceptometer to study gastric emptying*. Med Phys, 1992. **19**(2): p. 445-8.
32. Baffa, O., et al., *Analysis and development of AC biosusceptometer for oro-caecal transit time measurements*. Med Biol Eng Comput, 1995. **33**(3): p. 353-7.
33. Miranda, J.R., et al., *A novel biomagnetic method to study gastric antral contractions*. Phys Med Biol, 1997. **42**(9): p. 1791-9.
34. Moraes, R., et al., *Measurement of gastric contraction activity in dogs by means of AC biosusceptometry*. Physiol Meas, 2003. **24**(2): p. 337-45.
35. Quini, C.C., et al., *Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats*. J Biol Eng, 2012. **6**(1): p. 6.
36. Americo, M.F., et al., *Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(12): p. 1340-4, e374.
37. Calabresi, M.F., et al., *Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study*. Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(11): p. 1613-20.
38. Americo, M.F., et al., *Electrical and mechanical effects of hyoscine butylbromide on the human stomach: a non-invasive approach*. Physiol Meas, 2009. **30**(4): p. 363-70.
39. Bossone, C., et al., *Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G949-57.
40. Jamontt, J.M., et al., *The effects of Delta-tetrahydrocannabinol and cannabidiol alone and in combination on damage, inflammation and in vitro motility disturbances in rat colitis*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(3): p. 712-23.
41. Krauter, E.M., et al., *Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(12): p. 990-1000.
42. Huizinga, J.D., et al., *Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 93.

43. Johnson, L.R., *Gastrointestinal Physiology*. 8^a ed. Mosby's Physiology Monograph, ed. Elsevier. 2014, Philadelphia.
44. Chen, J.H., et al., *Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60474.
45. Tonini, M., et al., *Dissociation of the ascending excitatory reflex from peristalsis in the guinea-pig small intestine*. Neuroscience, 1996. **73**(1): p. 287-97.
46. Roberts, R.R., et al., *Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(3): p. G930-8.
47. Dinning, P.G., et al., *Neurogenic and myogenic motor patterns of rabbit proximal, mid, and distal colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(1): p. G83-92.
48. Fida, R., et al., *Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon*. Neurogastroenterol Motil, 1997. **9**(2): p. 99-107.
49. Li, M., et al., *Cholinergic and nitrergic regulation of in vivo giant migrating contractions in rat colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **283**(3): p. G544-52.
50. Lentle, R.G., et al., *High-definition spatiotemporal mapping of contractile activity in the isolated proximal colon of the rabbit*. J Comp Physiol B, 2008. **178**(3): p. 257-68.
51. Sarna, S.K., *Physiology and pathophysiology of colonic motor activity* (2). Dig Dis Sci, 1991. **36**(7): p. 998-1018.
52. Morita, H., et al., *Effects of denervation at ileocecal junction and ileocecal resection in dogs*. Neurogastroenterol Motil, 2012. **24**(1): p. 86-93, e14.
53. Heredia, D.J., et al., *Localized release of serotonin (5-hydroxytryptamine) by a fecal pellet regulates migrating motor complexes in murine colon*. Gastroenterology, 2009. **136**(4): p. 1328-38.
54. Copel, C., et al., *The Nav1.9 channel regulates colonic motility in mice*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 58.
55. Spencer, N.J., *Characteristics of colonic migrating motor complexes in neuronal NOS (nNOS) knockout mice*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 184.
56. Smith, T.K., J.B. Reed, and K.M. Sanders, *Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon*. Am J Physiol, 1987. **252**(2 Pt 1): p. C215-24.
57. Barajas-Lopez, C. and J.D. Huizinga, *Different mechanisms of contraction generation in circular muscle of canine colon*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 1): p. G570-80.

58. Chow, E. and J.D. Huizinga, *Myogenic electrical control activity in longitudinal muscle of human and dog colon*. J Physiol, 1987. **392**: p. 21-34.
59. Fioramonti, J., et al., *Colonic myoelectrical activity and propulsion in the dog*. Dig Dis Sci, 1980. **25**(9): p. 641-6.
60. Pluja, L., et al., *Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G255-66.
61. Gil, V., et al., *Effects of hydrogen sulphide on motility patterns in the rat colon*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(1): p. 34-50.
62. Karaus, M. and S.K. Sarna, *Giant migrating contractions during defecation in the dog colon*. Gastroenterology, 1987. **92**(4): p. 925-33.
63. Gonzalez, A. and S.K. Sarna, *Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G546-54.
64. Spencer, N.J. and T.K. Smith, *Simultaneous intracellular recordings from longitudinal and circular muscle during the peristaltic reflex in guinea-pig distal colon*. J Physiol, 2001. **533**(Pt 3): p. 787-99.
65. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 521-33.
66. Panossian, A., G. Wikman, and H. Wagner, *Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action*. Phytomedicine, 1999. **6**(4): p. 287-300.
67. Masoodi, I., et al., *Biomarkers in the management of ulcerative colitis: a brief review*. GMS German Medical Science, 2011. **9**: p. Doc03.
68. van der Veen, B.S., M.P. de Winther, and P. Heeringa, *Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2899-937.
69. Masoodi, I., et al., *Evaluation of fecal myeloperoxidase as a biomarker of disease activity and severity in ulcerative colitis*. Dig Dis Sci, 2012. **57**(5): p. 1336-40.
70. Peterson, C.G., et al., *A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(7): p. 1755-62.
71. Cora, L.A., et al., *AC biosusceptometry in the study of drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(8): p. 1223-41.
72. Belikov, V.G.K., A.G., *Generation and Medicobiological Application of Magnetic Fields and Carriers (Review)*. Pharmaceutical Chemistry Journal, 2001. **35**(2): p. 7.

73. Cora, L.A., et al., *Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research*. Pharm Res, 2011. **28**(3): p. 438-55.
74. Taylor, A.D., R. Bronks, and A.L. Bryant, *The relationship between electromyography and work intensity revisited: a brief review with references to lacticacidosis and hyperammonia*. Electromyogr Clin Neurophysiol, 1997. **37**(7): p. 387-98.
75. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
76. Paskaranandavadivel, N., et al., *Comparison of filtering methods for extracellular gastric slow wave recordings*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(1): p. 79-83.
77. Reddy, S.N., S.M. Collins, and E.E. Daniel, *Frequency analysis of gut EMG*. Crit Rev Biomed Eng, 1987. **15**(2): p. 95-116.
78. Randhawa, P.K., et al., *A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(4): p. 279-88.
79. Di Stasi, L.C., C.A. Costa, and A. Witaicenis, *Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013 - 2014)*. Expert Opin Ther Pat, 2015. **25**(6): p. 629-42.
80. Witaicenis, A., L.N. Seito, and L.C. Di Stasi, *Intestinal anti-inflammatory activity of esculetin and 4-methylesculetin in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis*. Chem Biol Interact, 2010. **186**(2): p. 211-8.
81. Ohama, T., M. Hori, and H. Ozaki, *Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced?* J Smooth Muscle Res, 2007. **43**(2): p. 43-54.
82. Yamada, Y., et al., *A comparative analysis of two models of colitis in rats*. Gastroenterology, 1992. **102**(5): p. 1524-34.
83. Camilleri, M., et al., *Pharmacologic, Pharmacokinetic, and Pharmacogenomic Aspects of Functional Gastrointestinal Disorders*. Gastroenterology, 2016. **150**(6): p. 1319-1331.e20.
84. Aranda-Michel, J. and R.A. Giannella, *Acute diarrhea: a practical review*. Am J Med, 1999. **106**(6): p. 670-6.
85. Witaicenis, A., et al., *Suppression of TNBS-induced colitis in rats by 4-methylesculetin, a natural coumarin: comparison with prednisolone and sulphasalazine*. Chem Biol Interact, 2012. **195**(1): p. 76-85.
86. Poli, E., et al., *Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis*. Neurochem Res, 2001. **26**(8-9): p. 1085-93.

87. Egbuji, J.U., et al., *Origin, propagation and regional characteristics of porcine gastric slow wave activity determined by high-resolution mapping*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(10): p. e292-300.
88. Lammers, W.J. and B. Stephen, *Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine*. Exp Physiol, 2008. **93**(3): p. 334-46.
89. Kim, Y.C., S.D. Koh, and K.M. Sanders, *Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine*. J Physiol, 2002. **541**(Pt 3): p. 797-810.
90. Mane, N., et al., *Dynamics of inhibitory co-transmission, membrane potential and pacemaker activity determine neuromyogenic function in the rat colon*. Pflugers Arch, 2014. **466**(12): p. 2305-21.
91. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(10): p. 995-9.
92. Rieder, F., et al., *Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(7): p. G786-801.
93. Choi, Y.S., et al., *A case of Crohn's disease with improvement after azathioprine-induced pancytopenia*. Case Rep Gastroenterol, 2011. **5**(2): p. 344-9.
94. Rieder, F. and C. Fiocchi, *Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 228-35.
95. Sanders, K.M., S.M. Ward, and S.D. Koh, *Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function*. Physiological Reviews, 2014. **94**(3): p. 859-907.
96. Nolan, J.D., et al., *Diarrhea in Crohn's Disease: Investigating the Role of the Ileal Hormone Fibroblast Growth Factor 19*. Journal of Crohn's and Colitis, 2015. **9**(2): p. 125-131.
97. Fiocchi, C., *IBD: advances in pathogenesis, complications, diagnosis, and therapy*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(4): p. 297-300.
98. Bharucha, A.E., J.H. Pemberton, and G.R. Locke, 3rd, *American Gastroenterological Association technical review on constipation*. Gastroenterology, 2013. **144**(1): p. 218-38.

APÊNDICE A – Testes preliminares de motilidade colônica em ratos

A primeira fase das medidas consistiu na aplicação do novo sensor em medidas de contração colônica em animais com o implante do marcador magnético e do eletrodo na serosa do cólon. O objetivo principal dessa etapa foi assegurar que os registros elétricos e mecânicos adquiridos eram seguramente originados no cólon, garantir a viabilidade da cirurgia e implantes (descritos no projeto), bem como padronizar detalhes metodológicos e, principalmente, obter um perfil da atividade colônica em ratos saudáveis.

Detecção e identificação da atividade de contração colônica

Foram utilizados 2 ratos machos Wistar com o peso de aproximadamente 300 gramas. As medidas foram feitas utilizando o anestésico pentobarbital sódico (40 mg/kg).

Com o animal em decúbito dorsal, o sensor foi posicionado na região abdominal. O ajuste fino do posicionamento foi feito mediante ao maior sinal captado pelo sistema BAC. Nesse momento, o fio de eletrodo, juntamente com a “referência” e o “terra”, também foram conectados ao sistema de aquisição (Biopac®).

As aquisições tiveram duração de aproximadamente 60 minutos, tempo escolhido de acordo com a duração do efeito em que o anestésico é efetivo.

Em um segundo momento, foi utilizada a neostigmina (0,1 mg/kg, Intraperitonal) com o objetivo de aumentar a motilidade colônica e assim identificar as drásticas alterações causadas garantindo que nossos dados estavam sendo adquiridos coerentemente.

Resultados

Foram selecionados trechos de 20 a 30 minutos de cada medida para serem apresentados. Os registros elétricos e mecânicos estão simultaneamente agrupados.

Neste teste os animais são saudáveis e não tiveram alimentação controlada. A

Figura 1 mostra os registros elétricos e mecânicos de dois ratos saudáveis.

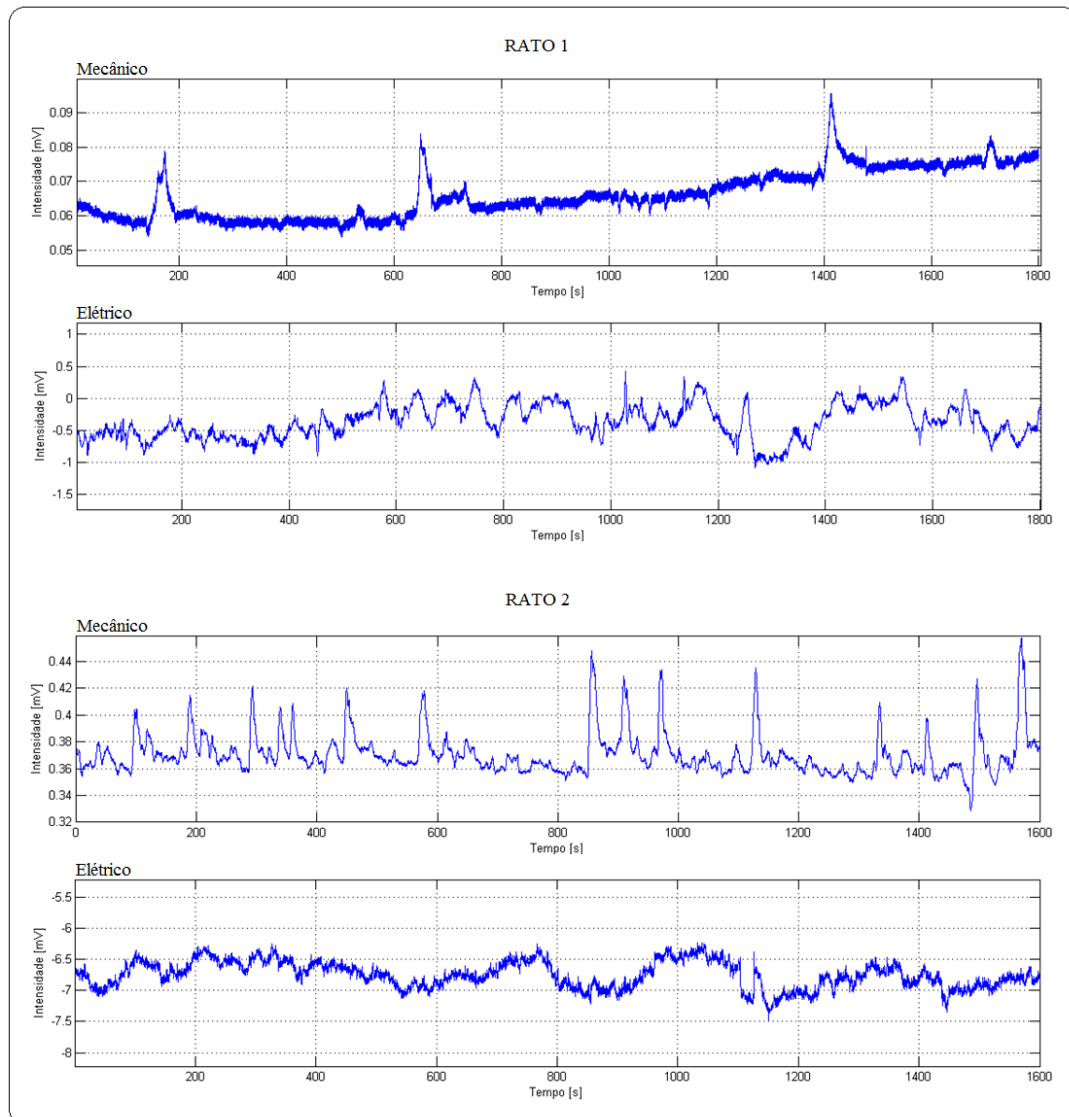


Figura 1: Medidas elétricas e mecânicas de dois ratos saudáveis sem controle de ingestão.

Na figura 2, também para um rato saudável, foi aplicada uma dose de Neostigmina (0.1 mg/kg) como indicado no gráfico.

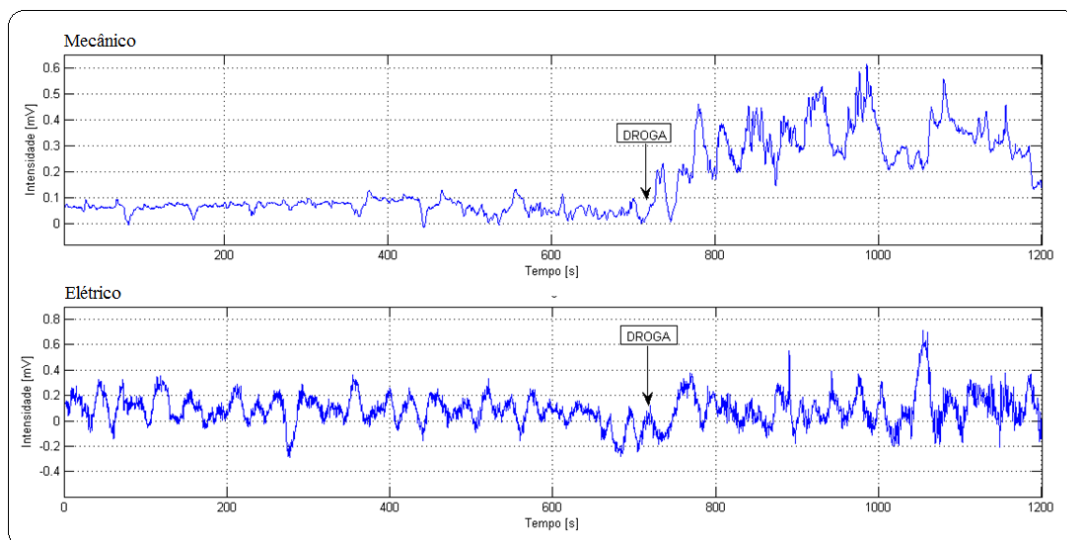


Figura 2: Medida elétrica e mecânica de rato saudável com aplicação de neostigmina conforme indicado.

Observa-se contrações mais fortes e localizadas, porém em períodos maiores. Nota-se também atividade mais repetitivas e de menor intensidade, observadas também nos sinais elétricos. É nítido o efeito da droga, sabidamente excitatória, observada principalmente no sinal de BAC. Existe uma razoável relação eletromecânica para as atividades mais tênues.

Padronização da atividade elétrica e mecânica de cólon de ratos saudáveis

A segunda etapa de medidas *in vivo* objetivou criar um padrão em relação à alimentação dos animais no período anterior à medida. Pois o estado prandial e o jejum resultam diversas diferenças no comportamento de várias partes do TGI.

Dessa maneira, estruturamos experimentos similares aos acima descritos, porém agora com variações no intervalo entre a ingestão de determinada quantidade de ração e o início da medida. De forma a garantir que o rato tivesse apetite para ingerir a quantidade de ração determinada (2 gramas), o animal ficou 12 horas de jejum em gaiola metabólica com livre acesso à água. Estabelecemos três intervalos entre alimentação e medida para

comparar os resultados: 30 minutos; 6 horas; e 10 horas. Definido este parâmetro, procuramos padronizar o tipo de contração encontrada para o rato saudável.

O anestésico, posicionamento, instrumentação e duração das medidas foram exatamente iguais aos descritos primeiramente.

Resultados

As figuras 3, 4 e 5 são sinais elétricos e mecânicos adquiridos nos mesmos 3 animais com intervalos entre a ingestão e a medida diferenciados (30 min., 6 h e 10 h após ingestão).

Nota-se que os registros elétricos apresentados na figura 3 possuem mais atividades periódicas. Os registros mecânicos de maneira geral são semelhantes. Para um controle mais fino da resposta a alimentação, escolheu-se padronizar os futuros experimentos com alimentação 30 minutos antes da avaliação.

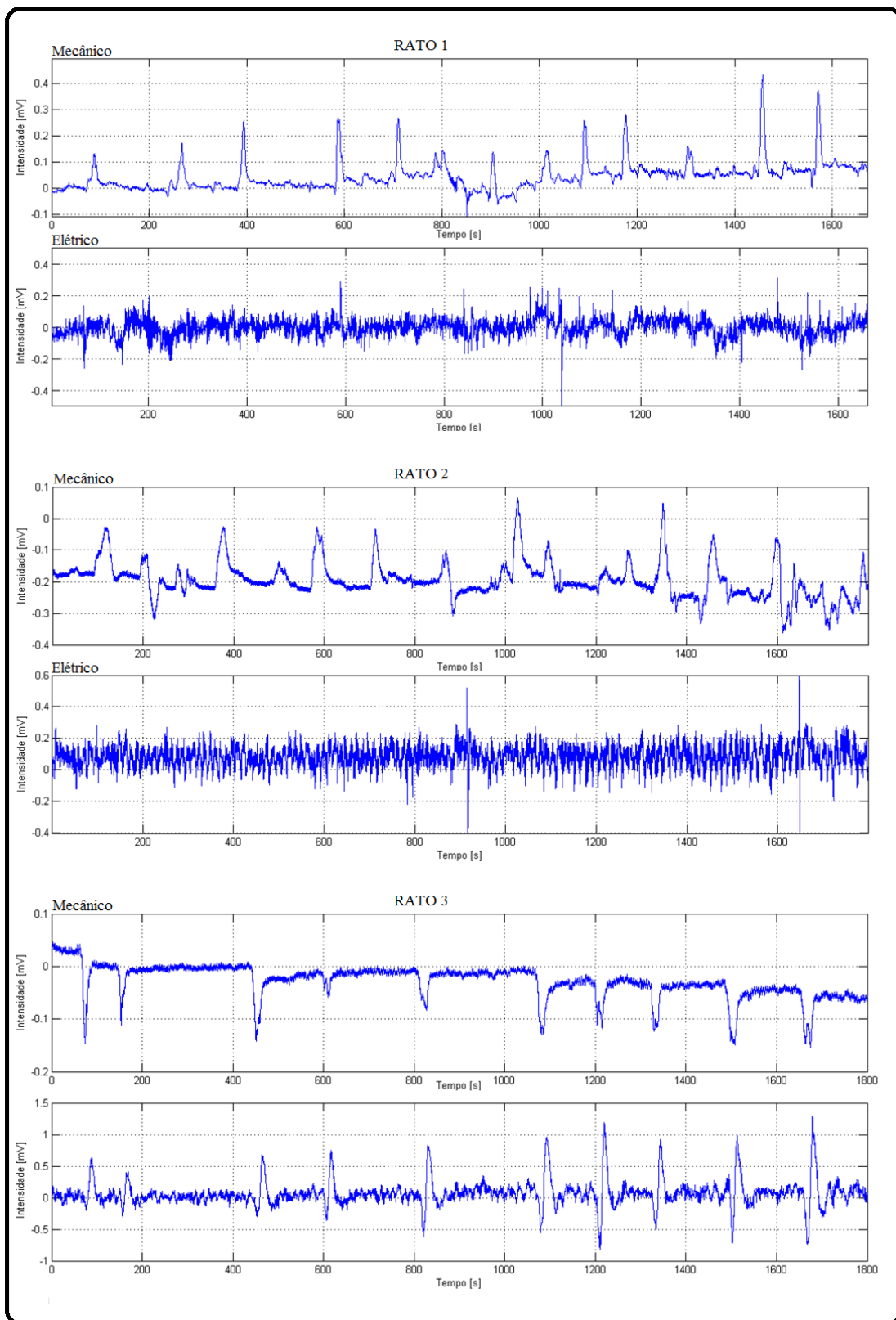


Figura 3: Sinais Mecânicos e elétricos com intervalo entre ingestão em aquisição igual a 30 minutos.

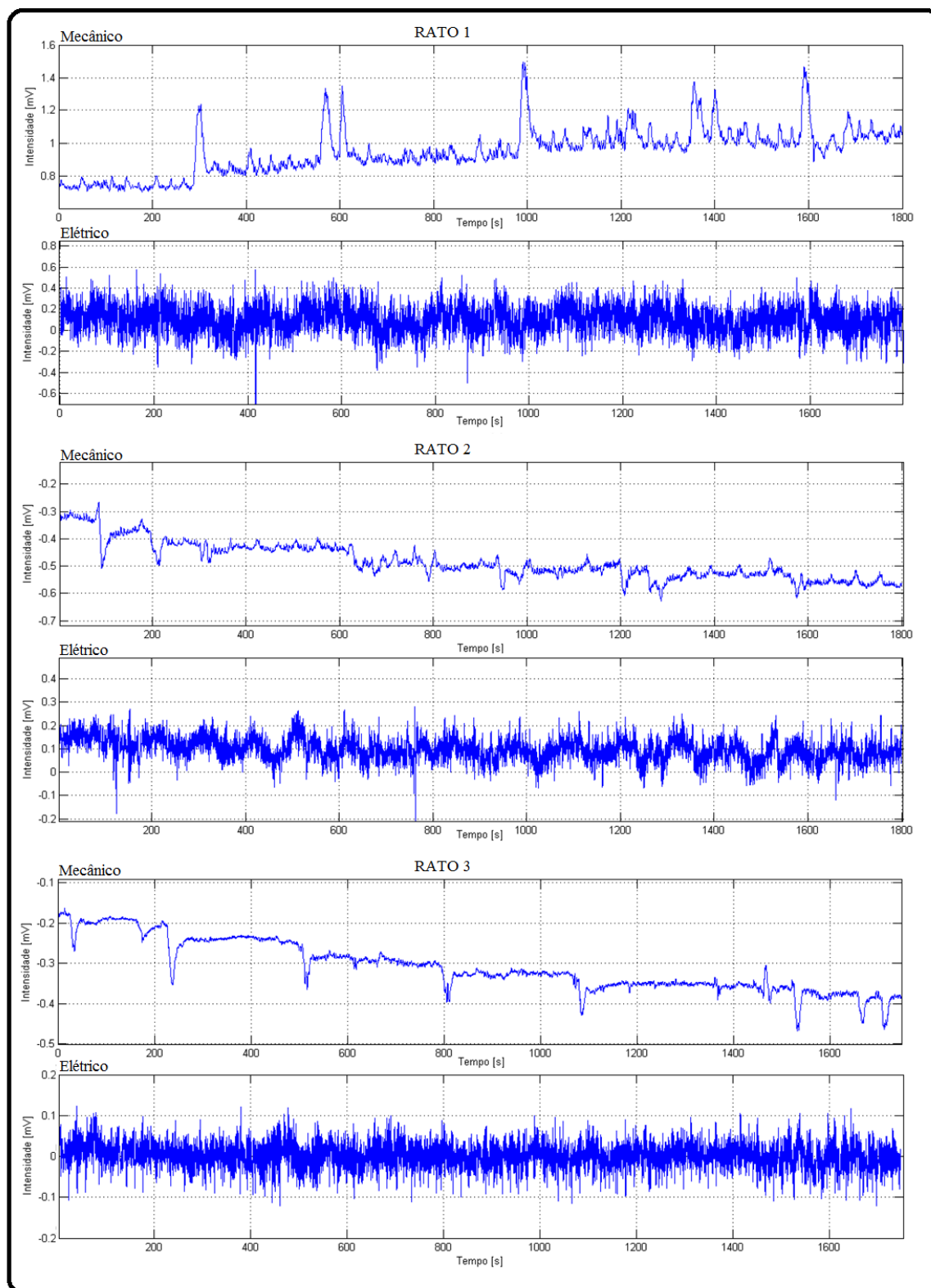


Figura 4: Sinais mecânicos e elétricos com intervalo entre ingestão em aquisição igual a 6 horas.

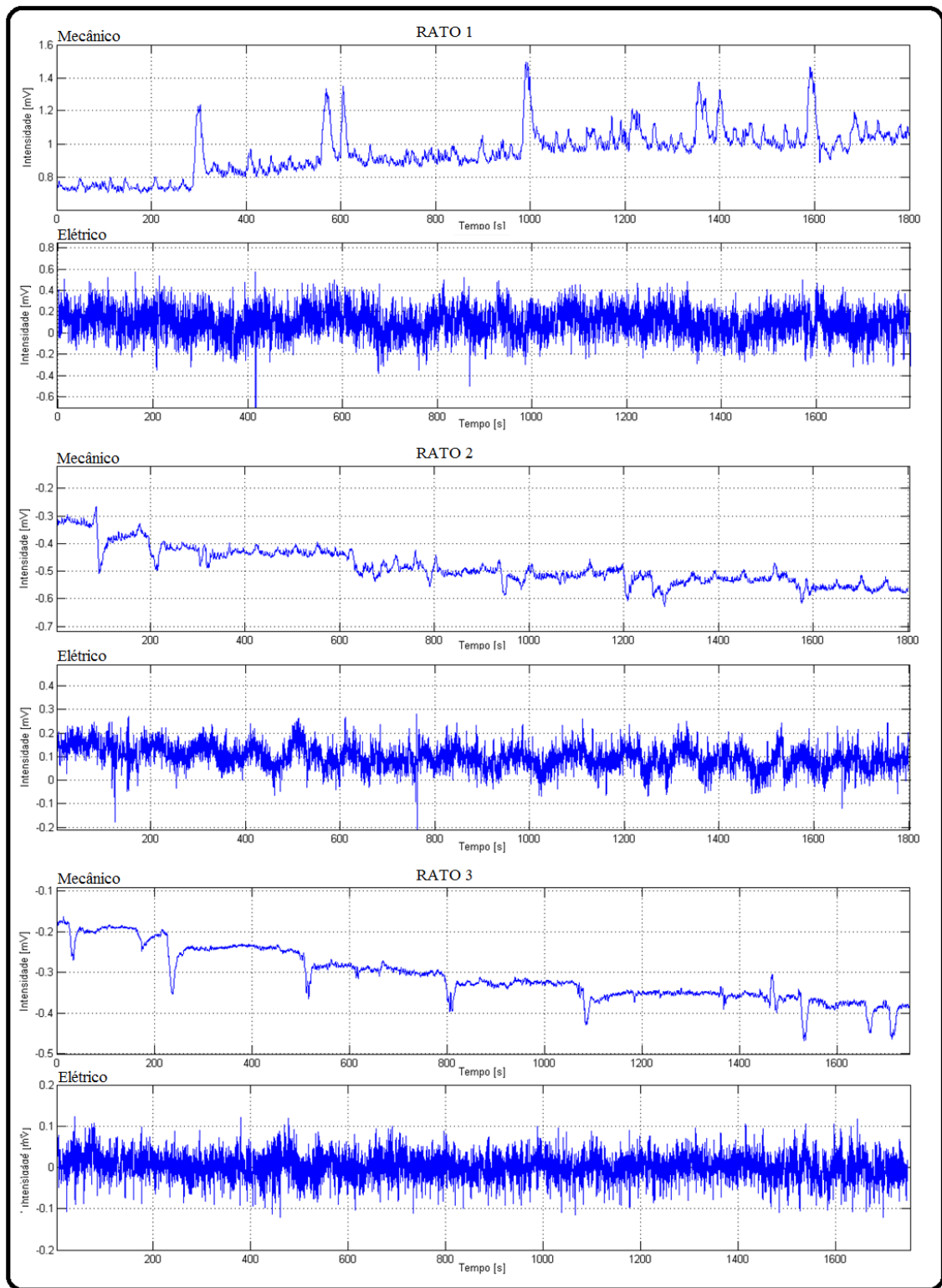


Figura 5: Sinais Mecânicos e elétricos com intervalo entre ingestão em aquisição igual a 10 horas.

APÊNDICE B – Artigo

O artigo a seguir reúne os principais resultados deste trabalho, construído com o intuito de contribuir com a área de pesquisa básica em doenças inflamatórias intestinais. Esse texto foi submetido para o periódico *Journal of Inflammatory Bowel Disease* da editora *Wolters Kluwer Health*.

Changes in colonic contractility in response to inflammatory bowel disease: long-term assessment in a TNBS-induced rat model

Abstract

(250 words)

Background: Inflammatory bowel disease (IBD) is a serious illness that affects the gastrointestinal tract and promotes several changes in colonic motility. However, the evolution of these changes is not completely understood, and may be related with symptoms that appear in phases when the disease is apparently controlled. The aim of this work was to perform a long-term assessment on both mechanical and electrical aspects of colonic contractility during the model of TNBS-induced inflammation model in rats.

Methods: Contractility and inflammatory parameters were acquired in the same animal in six different time points: before TNBS induction (control) and 2, 5, 8, 11 and 14 days thereafter. Mechanical activities were acquired by Alternating Current Biosusceptometry (ACB) and subdivided in Rhythmic Propagating Ripples (RPR) and Rhythmic Propulsive Motor Complex (RPMC). We recorded the electrical activity by Electromyography (EMG) and assessed the inflammation processes by determining myeloperoxidase (MPO) activity in stools. Additionally, we compared thickness of colons layers along the inflammation by histopathological analyzes.

Results: Our results showed transient changes in MPO activity levels and in RPMC contraction frequency, while RPR and electrical activity suffered permanent changes. Furthermore, the association of these results with the analysis of the tissue layer thickness revealed the influence of fibrosis and the depth of damage to different types of Interstitial Cells of Cajal (ICCs).

Conclusions: We performed a detailed temporal *in vivo* analysis of the intestinal inflammation consequences on colonic contractility, elucidating the changes promoted in colonic motor functions over time. This *in vivo* approach enables the further assessment of different factors, linked with different injury mechanisms, duration, remission,

symptoms and motor consequences, as well as the evaluation of treatment protocols in general.

Key words: Inflammatory Bowel Disease, Colonic Motility, TNBS, Colonic contractility, Alternating Current Biosusceptometry.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic, relapsing and severe inflammatory process of the gastrointestinal tract. [1, 2] The pathogenesis of IBD is not fully understood and there is no definitive cure available, neither pharmacological nor surgical. [1, 2] Pain, diarrhea, blood in stool and loss of peristaltic function are common clinical features and complications of IBD. [98]

Several studies have been performed in different animal models, to investigate the pathogenic profile of IBD. Most of these employ the hapten 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) model. [4, 5] Typically, mucosal injury and inflammatory cell infiltration are observed shortly after exposure to TNBS, while chronic inflammation and lymphocytic cell infiltration usually occur 48 h after exposure, persisting for few weeks. [6] However, the changes promoted by the disease in the neurophysiological properties of myenteric neurons persist, even after the resolution of inflammation, contributing to the dysmotility profile detected. [7]

All those symptoms are observed in the animal models for intestinal inflammation [8], which indicates that such studies might be useful to elucidate the changes in intestinal motility promoted by IBD. Several studies have reported the influence of IBD on intestinal motility [9-12], associating the intestinal inflammation with impairment of the local motor function. [13, 14] Motility disorders of the gastrointestinal tract are of critical clinical importance. [2] They can lead to failure of microbiota, thus inducing translocation of bacteria and/or bacterial products through impaired mucosal barrier [2], increasing the severity of intestinal injury. [6]

There are several *ex vivo* studies analyzing correlations between inflammation and smooth muscle function. [6, 13, 15] However, most of these fail to provide *in vivo* information regarding this complex relationship between inflammatory responses and motility disorders.

Here, we characterized the contraction changes in colonic motility promoted by TNBS-induced inflammation in a rat model, correlated with inflammatory levels, obtained by monitoring the stools for specific biomarkers. We monitored all animals up to 14 days after induction, when the animals started to recover, according to the inflammatory markers. Thereby, the study presented here describes how and how much IBD progression and its recovery influence the colonic motor activity.

Methods

Animals and Ethical Considerations

Male Wistar rats (180 – 250 g; ANILAB, Paulínia/SP – Brazil) were kept in standard environmental conditions at $21\pm1^{\circ}\text{C}$, 12h light/dark cycle and constant air filtration. Experiments and manipulation were performed in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). All experimental protocol was reviewed and approved by the Institute of Biosciences – Ethics Committee for Animal Research (CEEA) under protocols no. 042/04-CEEA and 502-CEUA.

Induction of colonic inflammation and assessment of inflammatory process

2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS, 40 mg/mL, 0.25 mL) was administered through a Teflon cannula inserted into the anus of anesthetized rats, as described by Morris et al. [5] The animals were fastened for 12h before the induction of the inflammatory process, which occurred on the 2nd day (figure 1).

We used the MPO activity as a marker of activated neutrophils. Stools were collected immediately prior to each colonic motility measurement for determination of myeloperoxidase enzyme activity (MPO) according to the method described by Krawisz, Sharon and Stenson. [16]

Colonic Motility Measurement

The magnetic marker (MnFe_2O_4 - ferrite nucleus of 0.15g and $\phi = 4.2\text{mm}$) and the electrode (Ethicon[®], Johnson and Johnson, São Paulo, Brazil) were surgically fixed in the colon serosa at the lesion region (Figure 1A). The electrode wire was subcutaneously driven by tunneling through the skin and exteriorized through an incision on the top of the head. The experiments were conducted according to the schedule showed (Figure 1B), in which after 5 days of implantation, the assessment of colonic motility began and was repeated every 3 days, totaling 6 measurements.

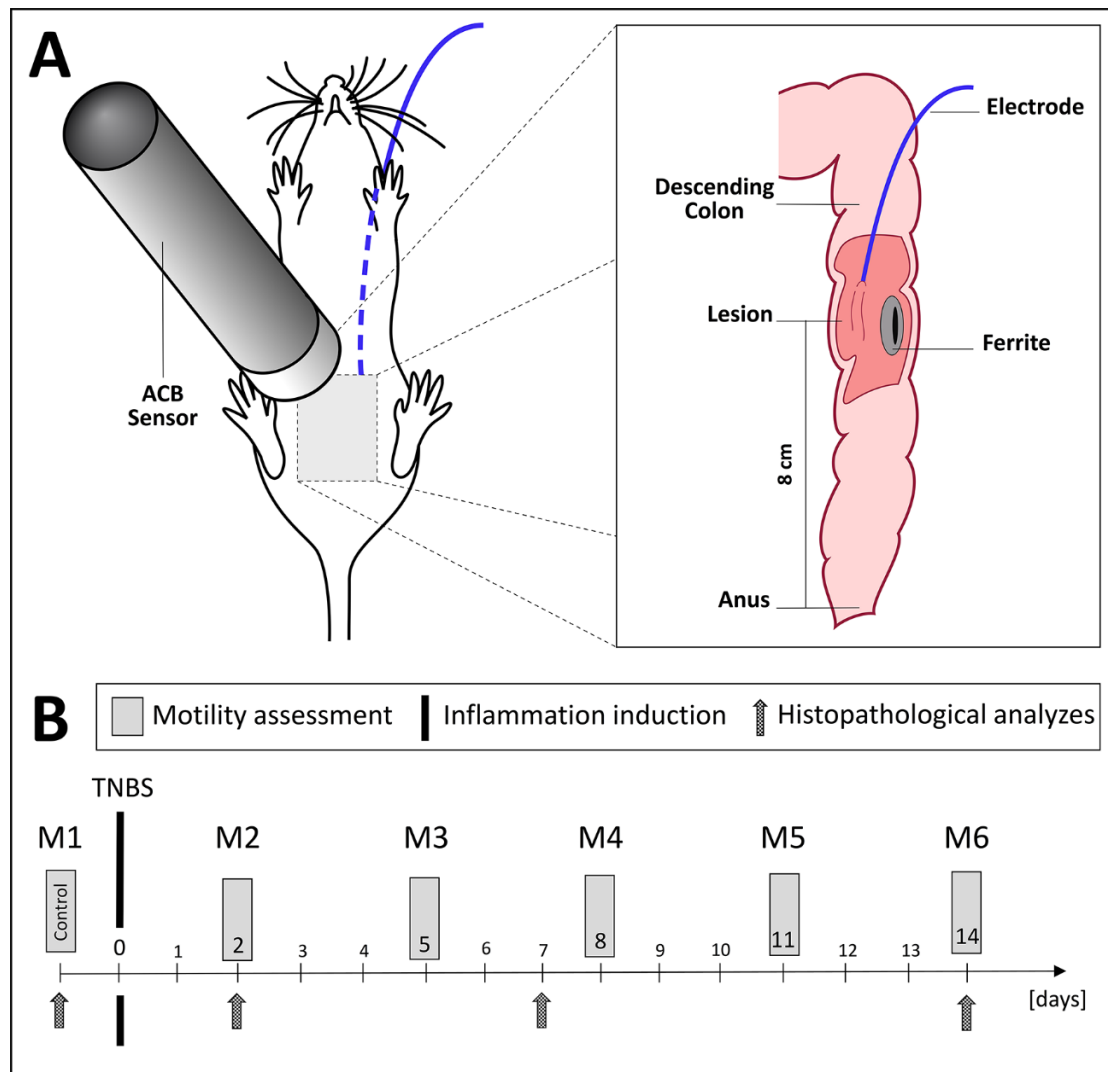


Figure 1: A) Experimental setup for animal preparation, illustrating lesion site, electrode and ferrite implantation in the lesion, with the sensor positioned on the abdominal surface of the animal; B) Experiment schedule, indicating motility assessment, inflammation induction and histopathological analyzes.

In all motility measurements, each animal was monitored simultaneously by ACB and EMG to acquire the contractile pattern after feeding. 30 minutes after ingestion of 2 g of chow, the animals were anesthetized with isoflurane (ISOFORINE[®], Cristalia, Itapira, SP, Brazil) and kept in a supine position for a 60-min recording period. The acquired signal was digitized using a multichannel recorder (MP100 System; BIOPAC, Santa Barbara, CA, USA) and stored for further analysis at a sampling rate of 20 Hz per channel.

All signals were analyzed and processed in MatLab (Mathworks, Natick, MA, USA) by visual inspection and by Moving Average and Savitzky Golay filters. [17, 18] The main parameter assessed were the contraction frequency of colonic activities, which were quantified by Fast Fourier Transform. [19]

Alternating Current Biosusceptometry (ACB)

The ACB system detects structures by monitoring the magnetic susceptibility near the sensor probe. The technique employs materials with high magnetic susceptibility as tracers or labels, such as iron manganese oxide (ferrite, MnFe_2O_4 , 50 - 100 μm), which provide high response in the system and does not require prior magnetization. Considered inert in the body, the ferrite has advantages in its use as magnetic tracer, as its non-toxicity and natural insolubility. [20-22]

During the contraction process, the organ moves the marker away from the sensor, attached to the organ external wall, decreasing the magnetic signal recorded. Similarly, the relaxation process brings the magnetic marker near the ACB sensor, which increases the signal. [18, 23-27] Thus making it possible to acquire the mechanical movements of organs of interest, such as the colon.

Electromyography (EMG)

This classic method consists in recording the bioelectric changes of muscles through electrodes inserted directly into the muscles. To capture the signals, we used needle electrodes, which conduct electrical signals corresponding to ion exchange occurring at the cellular level and can record the activity of motor units during rest or activity. [28] This traditional technique is widely used to access the myoelectric activity of GIT organs (e.g., stomach [29-31], small intestine [32, 33] and colon [34, 35]).

Histopathological analyzes

To clarify the relationship between tissue damage, muscle layers and changes in motility, we evaluated histological sections using an optical microscope (Zeiss Discovery V8, Thornwood, NY, USA). Tissue samples (0.5 mm thick) adjacent to the lesion area were collected from 4 groups of 10 animals for histological processing. The injured colon was removed on days 0 (healthy, before induction), 2, 7 and 14 after induction, according with the degree of colonic inflammation, assessed by macroscopic and microscopic techniques. [36] In the micrographs, we quantified the thickness of tissue layers (mucosa, muscularis mucosae, submucosa, muscularis externa) and ulcer area, if present. Sequentially, we assessed the presence of edema, leukocyte infiltration and connective tissue formation. The images were acquired and analyzed by an AxioCam MRc 5 and by AxioVision LE software.

Contractions definition

In order to characterize the two main motor colonic activities, we followed the standard protocol defined by Huizinga in 2011, employing an *ex vivo* approach using pressure transducers and spatiotemporal map images. [37] The motor activity patterns studied were: the "rhythmic propulsive motor complexes" (RPMC); and "rhythmic ripples

propagating" (RPR). In Figure 2A (control fragment), it is possible to note clearly both patterns.

The RPR is a constant oscillation, with high frequency and low amplitude. Characterized by spontaneous motor patterns, their functions are related with food mixture and absorption. This activity is characteristic of the so-called "slow waves", which are associated with the contraction pattern promoted by the circular muscle layers of same frequency, ubiquitous throughout the TGI. This contraction pattern is generated by pacemaker cells, called Interstitial Cajal Cells, which are associated with submucosal plexus (ICC-SM). [37-39]

The RPMC is characterized by strong contractions of low frequency and high amplitude. With function associated to stool propulsion through bursts, the RPMC motor patterns are evoked by distension. RPMC activity is similar to the electrical activity of the longitudinal muscle layer and related with stimulus-dependent pacemaker activity of the ICC-MY (*associated with myenteric plexus*). Furthermore is a dependent stimulus and electrically characterized by prolonged depolarization. [37, 40, 41]

Statistical Analysis

All results were expressed as means $\pm$ SEM. Statistical evaluation of the data related to mechanical, electrical and MPO activities were performed by repeated measurements one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test. They are presented as the differences from M1 (healthy animal), which represents the control. To analyze the thick layers of the colon, we used an ordinary one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison test. In ulcer area analysis, we use Student's t-test for non-paired samples. For all evaluations, P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Figure 2 present 10-minute signal excerpt to exemplify mechanical activity of each of the acquisition moments (M1, M2, M3, M4, M5 and M6). Each signal is shown its respective spectrum of frequencies, where it is possible to note the predominant frequencies contained in the signal (peaks). Gradual morphological differences are evident between all moments, especially in M3. There are two more prominent peaks in all instants. First peak, with lower frequency, represents RPMC, while the second, with higher frequency, represents RPR. Throughout all of the measurements, we observed a displacement in both peaks, denoting a frequency variation, triggered by the inflammatory process.

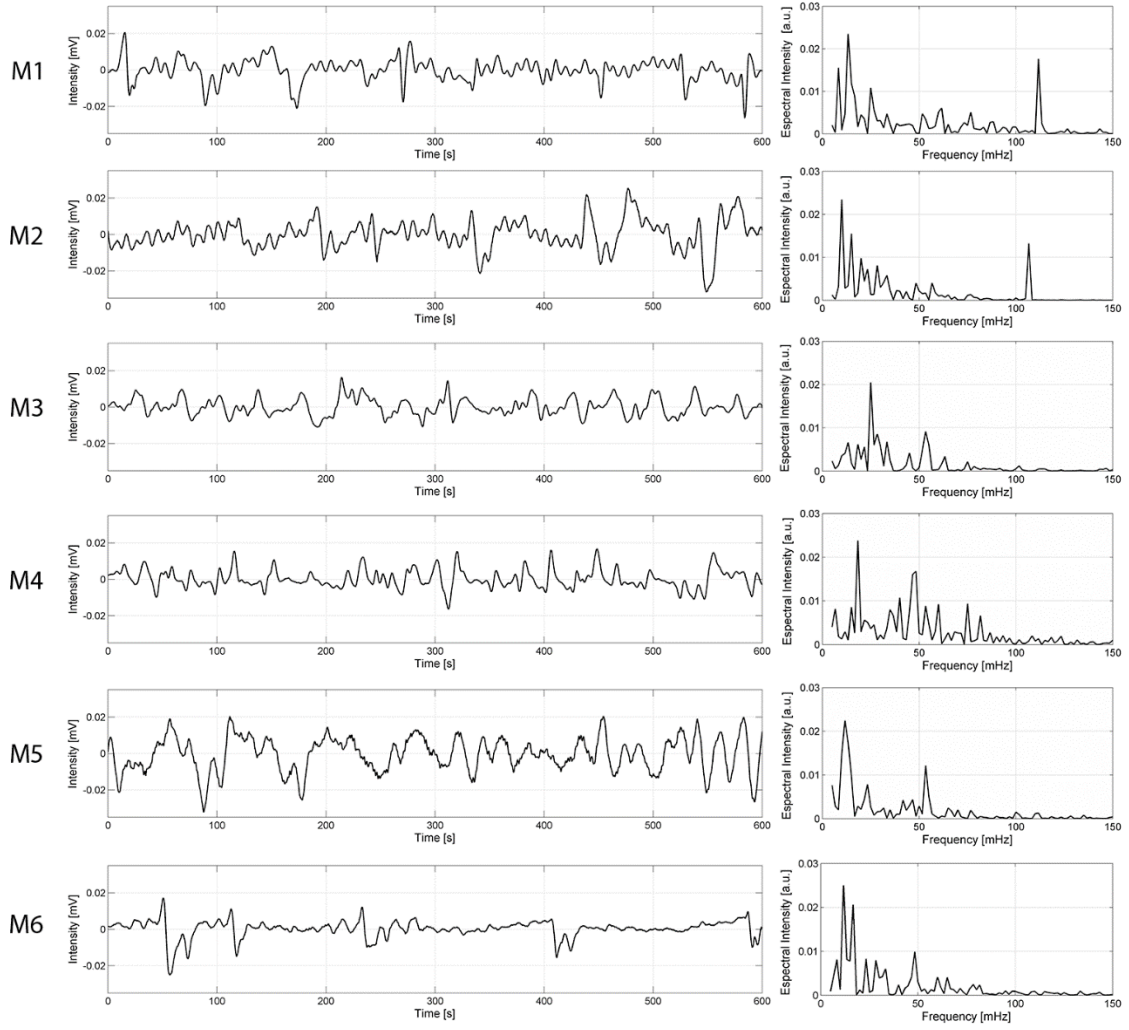


Figure 2: Mechanical signals of all stages monitored and its respective frequency spectrum.

Similar to the mechanical recordings, electrical signals acquired by EMG at all stages of the experiment are shown in Figure 3. In this case, the frequency spectrum presented for each signal has only one dominant peak. Analogous to the mechanical pattern analysis, we observed morphological changes and frequency peak displacement in the electrical profile along all moments.

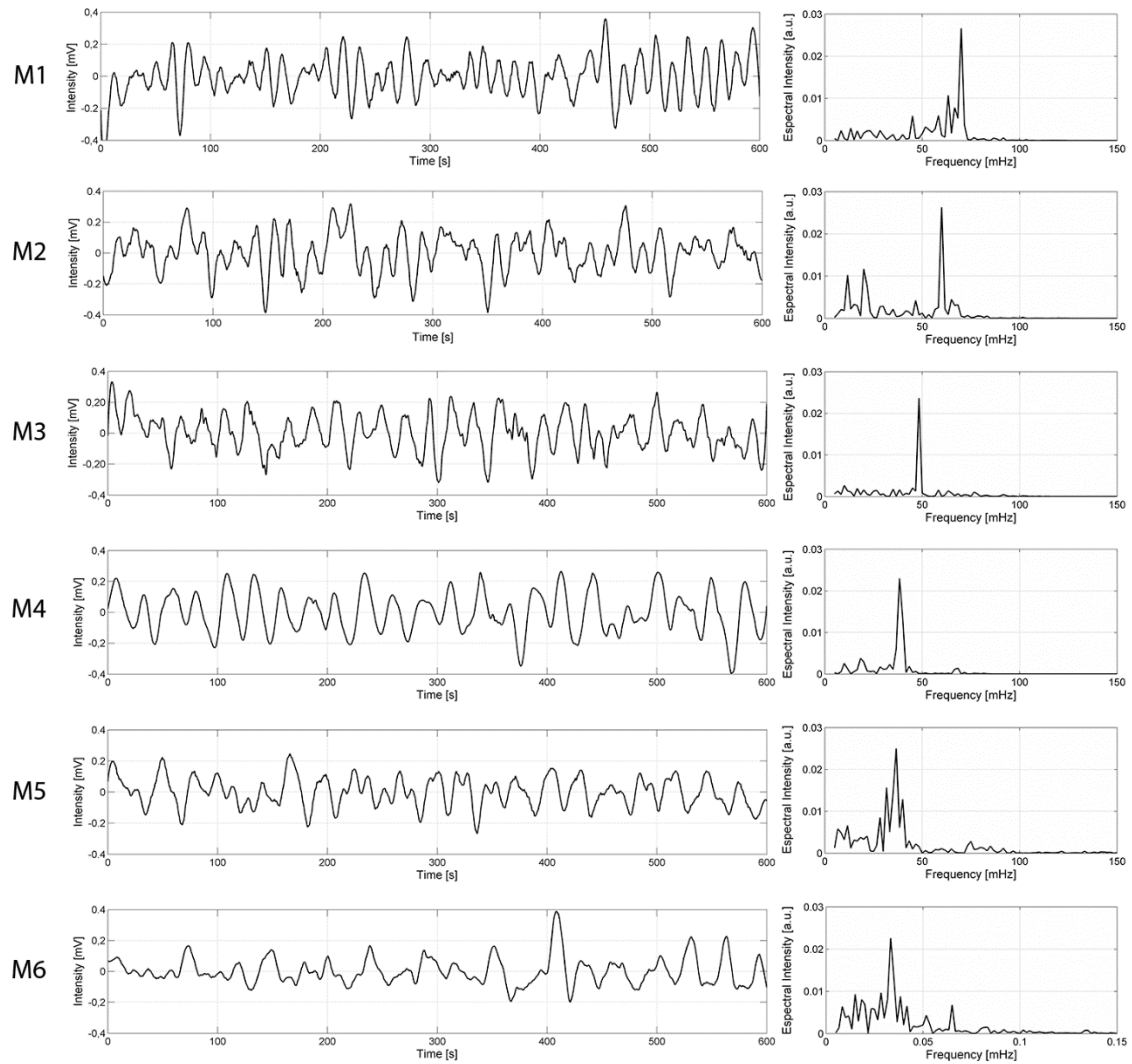


Figure 3: Electrical signals in all stages monitored and its respective frequency spectrum.

Figure 4 shows mechanical wave patterns, the electrical profile and the MPO activity for all stages. The mechanicals (RPR and RPMC) and electrical activities were analyzed through its respective dominant frequencies. The frequency intervals used to quantify each of the contraction patterns were: 40 - 110 mHz (RPR); 10 - 30 mHz (RPMC); and 30 - 80 mHz (electrical activity). The RPMC increases in M3 and in M4, returning to control values in M5 and M6. We observed a distinct behavior in the RPR, where its frequency values decrease in M3 and remain statistically smaller until the M6 stage. The frequency parameter for the electric activity decreased in M2, and remained low until the M6 stage, which showed a slightly increase, although it was still statistically different from M1. Figure 4 also shows the results for myeloperoxidase activity (MPO) in feces. Soon after the induction process (M2), there was a significant increase in the

enzyme activity. However, all following stages (M3, M4, M5 and M6) showed values statistically similar to the pre induction moment (M1).

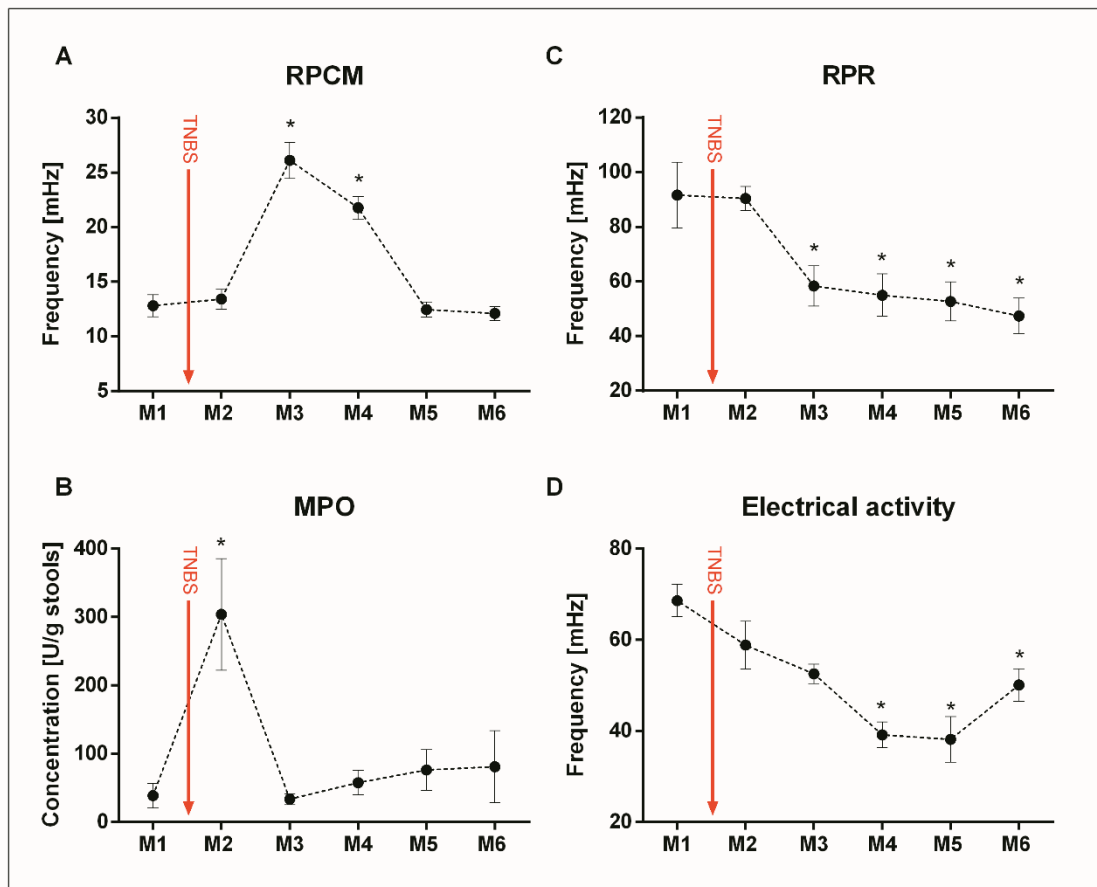


Figure 4: Frequency variations among the experiment in mechanical contractions (A – RPCM and B – RPR) and electric activity (C). In D, is activity of myeloperoxidase (MPO). In all graphs, x axis represents timeline of experiment, where: animal is healthy in M1 (control); and 2 (M2), 5 (M3), 8 (M4), 11 (M5) and 14 (M6) days after induction protocol. The red line highlight the moment of TNBS instillation. * $p < 0.05$

Figure 5 shows the micrographs of the histological sections of the inflammation model before induction and 2, 7 and 14 days thereafter. Clearly, it is possible to observe the effects of inflammation, which are more drastic 2 days after induction, followed by gradual recovery in the following steps (7 and 14 days after induction). 2 days after induction (Figure 5B), we can notice the presence of leukocyte infiltration in submucosal and muscularis externa layers, which is accordance with elevated MPO activity. Edema appears markedly in submucosal layer, increasing its thickness at 2 and 7 days after

induction. Connective tissue formation emerge 7 days the inflammation induction mainly in the muscularis mucosae and mucosa layers.

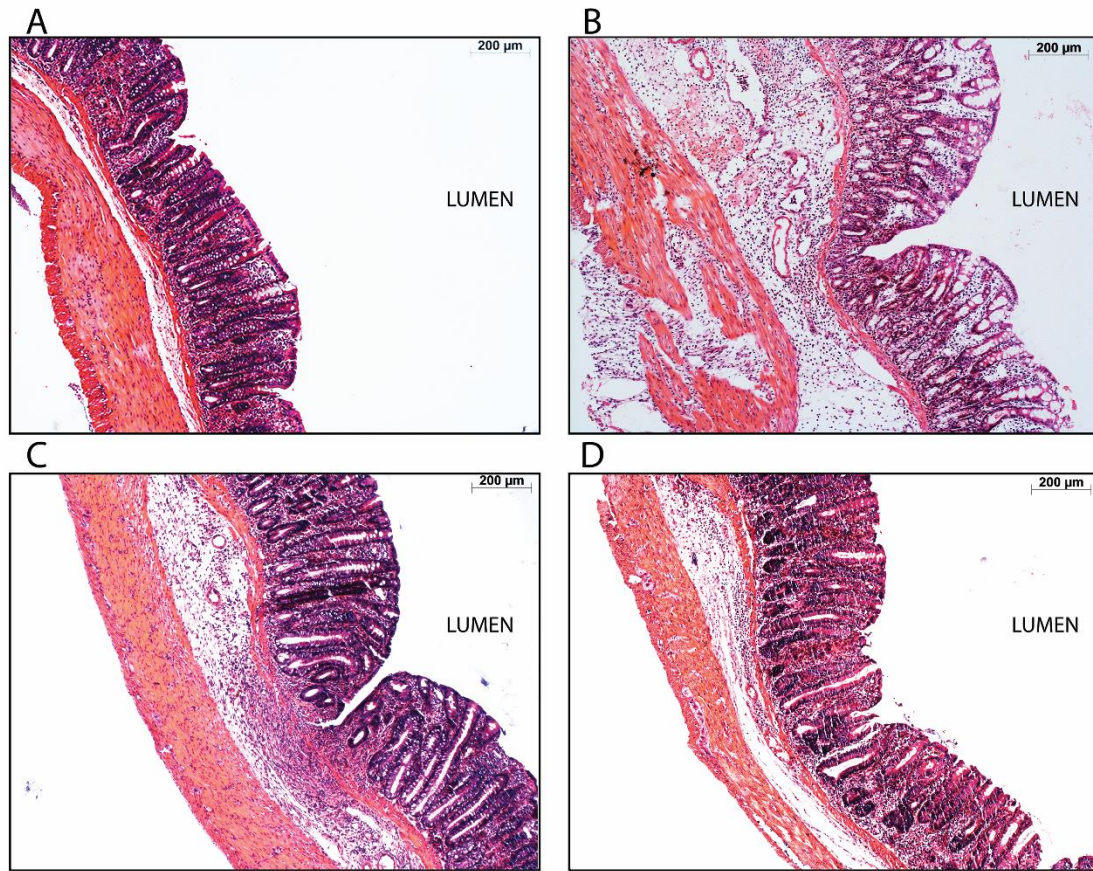


Figure 5: Micrographs of colon tissue sample throughout the inflammatory process: A) control; B) 2 days post-induction; C) 7 days post induction; and D) 14 days post-induction.

Figure 6 shows thickness variation of the mucosa, muscularis mucosae, submucosa and muscularis externa, obtained by quantification of histopathological analysis. The mucosal layer increased in thickness 2 days post-induction, which lasted until the end of the experiment. The thickness of submucosa and external muscle also increased at day 2, however it started decreasing on days 7 and 14. Ulcer area was also present in the same figure, exhibiting its highest values in day 2, starting to decrease in day 7. 14 days after induction, no ulceration spots were visible in the images.

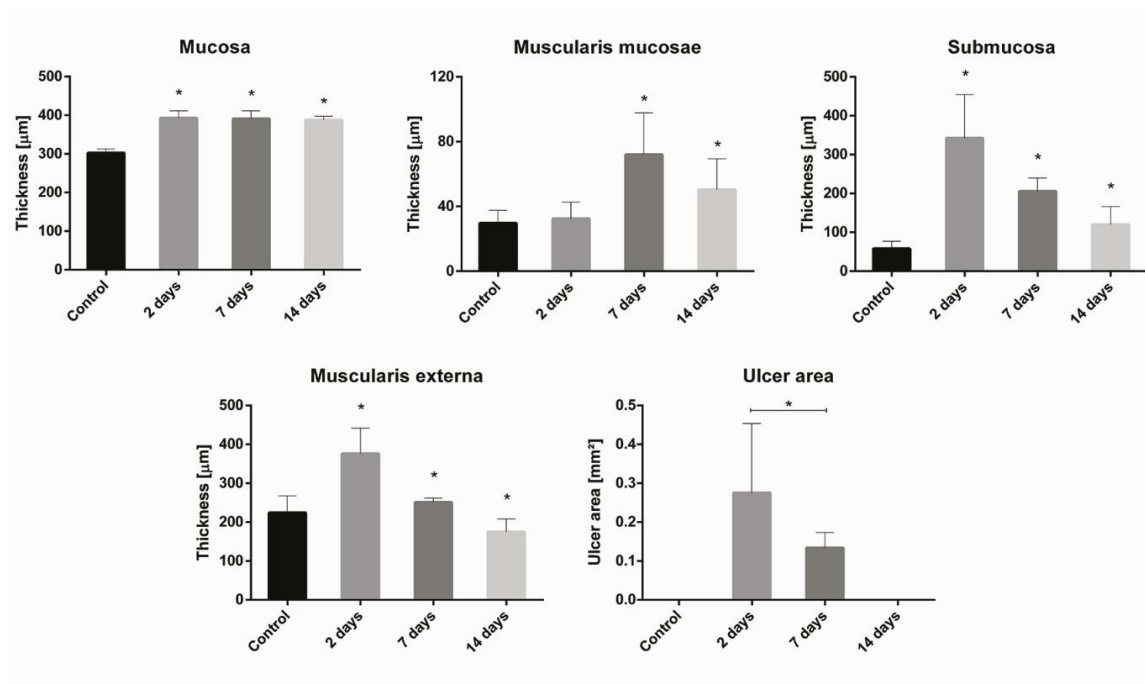


Figure 6: Thickness of colon tissue layers and ulcer area along the inflammation process. * $p < 0.05$

Discussion

The aim of this study was to characterize the behavior of colon contractility, electrical activity and how these parameters respond to chemically induced intestinal inflammation. We assessed all of these patterns and their modifications throughout 14 days after inflammation induction by TNBS model. Our results showed transient changes in MPO activity levels and in RPMC contraction frequency, and permanent changes in both RPR frequency and electrical activity. Furthermore, these results were associated with the tissue layer thickness, obtained from the histopathological analyzes at different times points.

Several histological abnormalities have been observed in IBD patients and also in experimental models of intestinal inflammation, which include damage to the enteric nervous system, disruption of the ICCs network, with hyperplasia and hypertrophy of smooth muscle cells. [42]

In general, the main controllers of the colonic motor activity are the properties of the smooth muscles (ICCs); intrinsic (Enteric Nervous System) and extrinsic nerves (sympathetic and parasympathetic); and chemicals released in the body or in the circulation. [43] Two of these, ICCs and intrinsic nerves, are damaged, although differently, by the intestinal inflammation (Figure 5).

On regards to ICCs network in the colon, we mainly find the ICC-SM (associated with submucosal plexus), the ICC-IM (intra muscular) and ICC-MY (associated with myenteric plexus). [44] Each of these has different functions in colonic motility, making it critically important to understand the different extension damage caused to the tissue.

The two pacemakers propagate independently. The strong propulsive contractile activity is propagated at the same frequency and velocity of the ICC-MY pacemaker. This propulsive motor pattern occurs in a rectal direction and it is associated with an increase in intraluminal pressure, related with outflow. The contraction force is stronger when the two pacemaker activities are superimposed at the level of smooth muscle, which explains discrepancies in the literature regarding the myogenic or neurogenic nature of the rhythmic propulsive motor complexes. [37]

Administration of TNBS (trinitrobenzenesulfonic acid) in 50% (v/v) ethanol resulted in a delayed hypersensitivity reaction, in which infiltration of inflammatory cells was observed within 2 h and the inflammation developed after 48 h of TNBS instillation. [36] The influence of intestinal inflammation is not restricted to the mucosa but extends to the submucosa and muscularis externa (Figure 5B), thus influencing neurotransmission and muscle contractility. [45] The IBD is associated with progressive and selective alterations in myenteric plexus structure and function, with consequent reduction of cholinergic neurotransmission and abnormality in colonic contractility. The reversibility of myenteric plexus disruption is a clear indication of neuronal plasticity within enteric nervous system as an adaptive mechanism against inflammatory challenges. [46]

TNBS administration induces an intense transmural inflammation and diffuse necrosis, polymorphonuclear cells infiltration and inflammatory granulomas in all colon layers (Figure 5B). [8] Moreover, TNBS-induced intestinal inflammation mimics both acute and chronic phases of IBD due to similar Th1- and Th2-type cytokine mediated inflammation. [8] Two days after TNBS instillation, damage in the cytoarchitecture of mucosa, muscularis mucosae, submucosa, muscularis externa and even in the serosa can be observed (Figure 5B). Seven days after the inflammation induction process, histological analyses show leucocyte infiltration, accumulation of connective tissue adjacent to muscularis mucosa and few ulceration spots (Figure 5C). Despite the discrete edema and slightly larger connective tissue layer present close to both mucosa and submucosa layers (Figure 5D), the colons cytoarchitecture is similar to a healthy colon.

The histological analyses indicate an intense and severe inflammatory process, allowing the injury to overcome intrinsic regeneration capacity (Figure 5). Therefore, fibrogenesis is one of the defense mechanisms against such harm. [47] Numerous literature data indicate that administration of TNBS at various doses causes fibrosis in colonic tissue in several animal models. [48, 49]

In addition to the morphological changes, frequency of RPMC, electrical and RPR indicate motility impairment (Figure 4). RPR and electrical frequencies decreased after induction of the inflammatory process and were not restored until the end of the experiment (Figure 4B and 4C). This behavior observed corroborates previous report pointing to dependence between damage and restoration of neural factors and spontaneous colon motility after administration of TNBS. [45]

MPO activity was augmented in animal feces in M2 (Figure 4D), which is considered the moment where the colon is at its highest degree of inflammation. [50] From increased MPO activity in feces, histological assessment, and diarrhea observed in

all animals (data not shown), it is possible to ensure the presence of severe inflammation in the colon of the animals and at which time this inflammation was critical. These results also corroborate the myeloperoxidase activity in feces of patients with IBD. [51] As the traditional procedure for MPO assessment is performed in tissue biopsy [16], we presented a valuable alternative evaluation method using feces as sample, with direct proportional to the migration of polymorphonuclear leukocytes, although keeps the animal alive, thus enabling continuous experimental approaches, such as the one employed in here.

Data on motility frequency might also determine the presence of fibrosis and neural damage near the intestinal complex muscular layers and, therefore, contribute to analyses of IBD, inflammatory bowel syndrome, diarrhea, constipation, megacolon and peristalsis.

Throughout the experiment, we noticed clear changes in the frequencies of all contraction patterns monitored, either mechanical or electrical. Under the mechanical aspect, the RPR showed significant drop from M3 (Figure 4B), which remained until M6. The RPMC however, showed transient increase in M3 that lasted until M4 (Figure 4A) returning to control levels (M1) in M5. The electrical activity frequency showed similar behavior for the RPR contraction, although decreasing in M2, closer to the time of induction and maximum inflammation instant, according with the MPO results.

Regarding RPR contraction, electrophysiological experiments *in vitro* in colons of rats revealed that the RPR is directly related to the ICCs that mediate slow wave activity, present in all TGI with different frequencies in each part. [39] These pacemaker cells of the distal colon are associated with the submucosal plexus (ICC-SM) located along the submucosal surface of the circular muscle layer. In Figure 5, we can compare the condition of the submucosal layer. Even after 14 days of inflammation induction, the layer is not fully restored yet, suggesting that the damage was more severe than that in the external muscle layers (circular and longitudinal).

The RPMC is related mainly with the propulsion of stool, presenting stimulus-dependent depolarizations. [52] This contraction pattern is associated with depolarizations originating from ICC-MY located between the circular and longitudinal muscle layers, farther from the lesion site (Figure 5). [39] Therefore, it is possible that the injury has not affected this motor activity in a severe and irreversible way.

An explanation for the increased frequency at M3 and M4 is the recurrent episodes of diarrhea at this time point. Diarrhea is characterized as a body's defense mechanism to clear contents of the TGI, and it is related, among other mechanisms, with increased motility and gastrointestinal transit. [53, 54] In M5, the colon is already notably recovered (Figure 5), and the occurrence of diarrheal stool has ceased the RCMP contraction frequency has decreased back to normal.

Thus, applying this idea to the colon, it is possible that, if the ICC-SM are damaged irreversibly, the neighborhood ICC-SM start to coordinate the contraction rate in that place, therefore justifying the change in RPR frequency.

On regards to the electrical activity behavior, it showed a contraction pattern similar to RPR, although its frequency change in response to the inflammation was faster (*i.e.* responded instantly to induction, in M2). This response suggests a direct damage to ICC-SM, therefore, also irreversible. It has been reported by others that IBD might change spontaneous activity and smooth muscle contractility in response to pharmacological and nerve stimulation. [46]

In many parts of the GIT such as the stomach, there are gradients of ICCs frequency. [55, 56] Some studies in different animal models show the existence and interrelation between the source and spread of electrical stimuli. [57-60] When certain pacemaker cells are removed, or suffer irreversible damage, the other ICCs, located near become dominant, causing the contraction frequency to change permanently. [55]

The results obtained for the mechanical contractions RPMC and RPR were very interesting, where both frequency patterns quantified undergone a significant change in M3, while the MPO peak occurs in M2, showing the moment of greatest level of inflammation. This delay may be related to the time that the chemical injury takes to become structural in terms of mechanical reflex, since the electrical activity begins to change significantly already in M2.

Previous studies in a mouse model of post-infectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) have implicated the enteric nervous system (ENS) and/or interstitial cells of Cajal (ICC) as the sites likely responsible for the changes involving dysmotility.[61, 62] Long-term changes to the sensitivity of the extrinsic innervation have also been reported [61, 62] and these could also contribute to dysmotility through changes in the reflex sensitivity.

Dramatic changes occur in the electrical and synaptic properties of myenteric neurons of the inflamed colon, which are likely to contribute to the dysmotility that is associated with IBD. [63] Alterations at the cellular level could be the main responsible for the development of altered contractility of intestinal smooth muscle. [64] Also, disturbance of L-type Ca^{2+} channel activity has been reported as one of the causes of decreased intestinal motility. [65, 66]

Alternatively, the dysmotility could be due to changes in smooth muscle activity. For instance, in a rat model of post-inflammatory colitis, inflammation affects the ICC and contractility of smooth muscle, however alterations of myogenic contractions of smooth muscle persisted after the resolution of inflammation. [42, 64]

The persistent changes found in RPR and in electrical activity can be associated with the submucosal plexus, which regulates secretion [7], indicating that prior inflammation can lead to continuous changes in gut function and could contribute to colonic dysfunction, which is reported during remission from IBD. [67] It is likely that both the neural and myogenic activity contribute to the persistent dysmotility after the resolution of inflammation. [67]

The TNBS inflammatory response, where there are different ways to restoration of spontaneous rhythmicity and myogenic contraction, especially at the healing stage of

inflammation, was also obtained in *ex vivo* studies on isolated rat colon. [6] Specifically in the cited study, spontaneous rhythmicity dysfunction, related with RPR, may improve more rapidly than myogenic contractility dysfunction, which is related with RPMC. This apparent contradiction may be strongly related with the fact that the study was carried out *ex vivo*, outside the physiological environment, with no contact to nervous regulation.

The results presented here might add important physiological explanations and relations with constipation, diarrhea and bariatric pain, which are the major incapacitating symptoms observed in patients with IBD. [3, 68, 69] Therefore, simultaneous feces and motility monitoring might be a useful and non-invasive tool to assess disease status. Furthermore, this study might bring crucial data to better understanding of IBD pathophysiology. Elucidation of IBD mechanisms is essential to human modern medicine, since IBD is one of a conglomeration of immune-mediated inflammatory diseases, such as arthritis, psoriasis, spondyloarthropathies and systemic lupus erythematosus. [1]

Summarizing, the results obtained in this study were based on a detailed temporal analysis on the consequences of this type of inflammation in colonic motility of rats. The use of robust measurement techniques associated with the monitoring of inflammation by fecal samples allowed an *in vivo* approach in the same animal for 14 days. The perceived changes in the different contraction frequencies showed a clear relation with the evolution of the degree of the lesion. New studies should be conducted to explore this interdependence among different factors, namely types of injury, duration, remission, symptoms and motor consequences, as well as the evaluation of treatments in general.

References

1. Di Stasi, L.C., C.A. Costa, and A. Witaicenis, *Products for the treatment of inflammatory bowel disease: a patent review (2013 - 2014)*. Expert Opin Ther Pat, 2015. **25**(6): p. 629-42.
2. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.
3. Bouma, G. and W. Strober, *The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 521-33.
4. Elson, C.O., et al., *Experimental models of inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 1995. **109**(4): p. 1344-67.
5. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
6. Kiyosue, M., et al., *Different susceptibilities of spontaneous rhythmicity and myogenic contractility to intestinal muscularis inflammation in the hapten-induced colitis*. Neurogastroenterol Motil, 2006. **18**(11): p. 1019-30.
7. Lomax, A.E., et al., *Persistent alterations to enteric neural signaling in the guinea pig colon following the resolution of colitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **292**(2): p. G482-91.

8. Goyal, N., et al., *Animal models of inflammatory bowel disease: a review*. Inflammopharmacology, 2014. **22**(4): p. 219-33.
9. Annese, V., et al., *Gastrointestinal motility disorders in patients with inactive Crohn's disease*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(11): p. 1107-17.
10. Rao, S.S. and N.W. Read, *Gastrointestinal motility in patients with ulcerative colitis*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1990. **172**: p. 22-8.
11. Reddy, S.N., et al., *Colonic motility and transit in health and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1991. **101**(5): p. 1289-97.
12. Vermillion, D.L., et al., *Altered small intestinal smooth muscle function in Crohn's disease*. Gastroenterology, 1993. **104**(6): p. 1692-9.
13. Bossone, C., et al., *Alterations in spontaneous contractions in vitro after repeated inflammation of rat distal colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(5): p. G949-57.
14. Koch, T.R., et al., *Spontaneous contractions and some electrophysiologic properties of circular muscle from normal sigmoid colon and ulcerative colitis*. Gastroenterology, 1988. **95**(1): p. 77-84.
15. Shubair, M., M.A. Oriowo, and I. Khan, *Expression of alternatively spliced variants of Na-Ca-exchanger-1 in experimental colitis: role in reduced colonic contractility*. Mol Cell Biochem, 2012. **370**(1-2): p. 15-21.
16. Krawisz, J.E., P. Sharon, and W.F. Stenson, *Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models*. Gastroenterology, 1984. **87**(6): p. 1344-50.
17. Paskaranandavadivel, N., et al., *Comparison of filtering methods for extracellular gastric slow wave recordings*. Neurogastroenterol Motil, 2013. **25**(1): p. 79-83.
18. Americo, M.F., et al., *Validation of ACB in vitro and in vivo as a biomagnetic method for measuring stomach contraction*. Neurogastroenterol Motil, 2010. **22**(12): p. 1340-4, e374.
19. Reddy, S.N., S.M. Collins, and E.E. Daniel, *Frequency analysis of gut EMG*. Crit Rev Biomed Eng, 1987. **15**(2): p. 95-116.
20. Cora, L.A., et al., *Biomagnetic methods: technologies applied to pharmaceutical research*. Pharm Res, 2011. **28**(3): p. 438-55.
21. Cora, L.A., et al., *AC biosusceptometry in the study of drug delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 2005. **57**(8): p. 1223-41.
22. Quini, C.C., et al., *Employment of a noninvasive magnetic method for evaluation of gastrointestinal transit in rats*. J Biol Eng, 2012. **6**(1): p. 6.
23. Agostinho, M., et al., *AC Biosusceptometry as a method for measuring gastric contraction*. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2010. **2010**: p. 5740-3.
24. Americo, M.F., et al., *The ACB technique: a biomagnetic tool for monitoring gastrointestinal contraction directly from smooth muscle in dogs*. Physiol Meas, 2010. **31**(2): p. 159-69.
25. Americo, M.F., et al., *Scintigraphic validation of AC Biosusceptometry to study the gastric motor activity and the intragastric distribution of food in humans*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(10): p. 804-11.
26. Romeiro, F.G., et al., *A novel biomagnetic approach to study caecocolonic motility in humans*. Neurogastroenterol Motil, 2006. **18**(12): p. 1078-83.
27. Teixeira, M.C., et al., *Assessment of gastrointestinal motility in renal transplant recipients by alternate current biosusceptometry*. Transplant Proc, 2012. **44**(8): p. 2384-7.
28. Taylor, A.D., R. Bronks, and A.L. Bryant, *The relationship between electromyography and work intensity revisited: a brief review with references to*

- lacticacidosis and hyperammonia*. Electromyogr Clin Neurophysiol, 1997. **37**(7): p. 387-98.
29. Tümer, C., et al., *Effect of ghrelin on gastric myoelectric activity and gastric emptying in rats*. Regulatory Peptides, 2008. **146**(1–3): p. 26-32.
 30. Huang, Y.M., et al., *Involvement of sympathetic function in the sleep-related change of gastric myoelectrical activity in rats*. J Sleep Res, 2010. **19**(1 Pt 2): p. 192-200.
 31. Matos, J.F., et al., *Role of sex hormones in gastrointestinal motility in pregnant and non-pregnant rats*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(25): p. 5761-8.
 32. Tropaskaya, N.S., E.A. Kislyakova, and T.S. Popova, *Effect of Tributyrin on Electrical Activity in the Small Intestine during Early Postoperative Period*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2015. **160**(2): p. 219-222.
 33. Ouyang, X., et al., *Hyperglycemia-induced small intestinal dysrhythmias attributed to sympathovagal imbalance in normal and diabetic rats*. Neurogastroenterol Motil, 2015. **27**(3): p. 406-15.
 34. Salcedo, L., et al., *Long-term effects on pressure and electromyography in a rat model of anal sphincter injury*. Dis Colon Rectum, 2010. **53**(8): p. 1209-17.
 35. Gil, D.W., et al., *Role of sympathetic nervous system in rat model of chronic visceral pain*. Neurogastroenterol Motil, 2016. **28**(3): p. 423-31.
 36. Randhawa, P.K., et al., *A Review on Chemical-Induced Inflammatory Bowel Disease Models in Rodents*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(4): p. 279-88.
 37. Huizinga, J.D., et al., *Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns*. Front Neurosci, 2011. **5**: p. 93.
 38. Barajas-Lopez, C. and J.D. Huizinga, *Different mechanisms of contraction generation in circular muscle of canine colon*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 1): p. G570-80.
 39. Pluja, L., et al., *Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **281**(1): p. G255-66.
 40. Chen, J.H., et al., *Neurogenic and myogenic properties of pan-colonic motor patterns and their spatiotemporal organization in rats*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60474.
 41. Copel, C., et al., *The Nav1.9 channel regulates colonic motility in mice*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 58.
 42. Ohama, T., M. Hori, and H. Ozaki, *Mechanism of abnormal intestinal motility in inflammatory bowel disease: how smooth muscle contraction is reduced?* J Smooth Muscle Res, 2007. **43**(2): p. 43-54.
 43. Johnson, L.R., *Gastrointestinal Physiology*. 8^a ed. Mosby's Physiology Monograph, ed. Elsevier. 2014, Philadelphia.
 44. Sanders, K.M., S.M. Ward, and S.D. Koh, *Interstitial Cells: Regulators of Smooth Muscle Function*. Physiological Reviews, 2014. **94**(3): p. 859-907.
 45. Gurung, Y.B., et al., *Impairment and restoration of spontaneous contractile activity of longitudinal smooth muscles in the TNBS-inflamed hamster distal colon*. Biomed Res, 2007. **28**(6): p. 301-8.
 46. Poli, E., et al., *Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis*. Neurochem Res, 2001. **26**(8-9): p. 1085-93.
 47. Rieder, F. and C. Fiocchi, *Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 228-35.

48. te Velde, A.A., M.I. Verstege, and D.W. Hommes, *Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2006. **12**(10): p. 995-9.
49. Rieder, F., et al., *Animal models of intestinal fibrosis: new tools for the understanding of pathogenesis and therapy of human disease*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012. **303**(7): p. G786-801.
50. Yamada, Y., et al., *A comparative analysis of two models of colitis in rats*. *Gastroenterology*, 1992. **102**(5): p. 1524-34.
51. Masoodi, I., et al., *Evaluation of fecal myeloperoxidase as a biomarker of disease activity and severity in ulcerative colitis*. *Dig Dis Sci*, 2012. **57**(5): p. 1336-40.
52. Tonini, M., et al., *Dissociation of the ascending excitatory reflex from peristalsis in the guinea-pig small intestine*. *Neuroscience*, 1996. **73**(1): p. 287-97.
53. Camilleri, M., et al., *Pharmacologic, Pharmacokinetic, and Pharmacogenomic Aspects of Functional Gastrointestinal Disorders*. *Gastroenterology*, 2016. **150**(6): p. 1319-1331.e20.
54. Aranda-Michel, J. and R.A. Giannella, *Acute diarrhea: a practical review*. *Am J Med*, 1999. **106**(6): p. 670-6.
55. Calabresi, M.F., et al., *Alternate current biosusceptometry for the assessment of gastric motility after proximal gastrectomy in rats: a feasibility study*. *Neurogastroenterol Motil*, 2015. **27**(11): p. 1613-20.
56. Egbuji, J.U., et al., *Origin, propagation and regional characteristics of porcine gastric slow wave activity determined by high-resolution mapping*. *Neurogastroenterol Motil*, 2010. **22**(10): p. e292-300.
57. Lammers, W.J. and B. Stephen, *Origin and propagation of individual slow waves along the intact feline small intestine*. *Exp Physiol*, 2008. **93**(3): p. 334-46.
58. Lammers, W.J., et al., *Origin and propagation of the slow wave in the canine stomach: the outlines of a gastric conduction system*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. **296**(6): p. G1200-10.
59. Kim, Y.C., S.D. Koh, and K.M. Sanders, *Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine*. *J Physiol*, 2002. **541**(Pt 3): p. 797-810.
60. Mane, N., et al., *Dynamics of inhibitory co-transmission, membrane potential and pacemaker activity determine neuromyogenic function in the rat colon*. *Pflugers Arch*, 2014. **466**(12): p. 2305-21.
61. Bercik, P., et al., *Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 179-87.
62. Coldwell, J.R., et al., *Increased responsiveness of rat colonic splanchnic afferents to 5-HT after inflammation and recovery*. *J Physiol*, 2007. **579**(Pt 1): p. 203-13.
63. Linden, D.R., K.A. Sharkey, and G.M. Mawe, *Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon*. *J Physiol*, 2003. **547**(Pt 2): p. 589-601.
64. Wells, R.W. and M.G. Blennerhassett, *Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis*. *Pflugers Arch*, 2004. **448**(5): p. 515-24.
65. Akbarali, H.I., C. Pothoulakis, and I. Castagliuolo, *Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes in an experimental colitis model*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(2): p. 637-42.

66. Kinoshita, K., et al., *Decrease in activity of smooth muscle L-type Ca²⁺ channels and its reversal by NF-kappaB inhibitors in Crohn's colitis model*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(3): p. G483-93.
67. Krauter, E.M., et al., *Changes in colonic motility and the electrophysiological properties of myenteric neurons persist following recovery from trinitrobenzene sulfonic acid colitis in the guinea pig*. Neurogastroenterol Motil, 2007. **19**(12): p. 990-1000.
68. Nolan, J.D., et al., *Diarrhea in Crohn's Disease: Investigating the Role of the Ileal Hormone Fibroblast Growth Factor 19*. Journal of Crohn's and Colitis, 2015. **9**(2): p. 125-131.
69. Fiocchi, C., *IBD: advances in pathogenesis, complications, diagnosis, and therapy*. Curr Opin Gastroenterol, 2012. **28**(4): p. 297-300.