Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Memòria justificativa de recerca de les convocatòries BCC, BE, BP, CTP-AIRE, DEBEQ, FI, INEFC, NANOS i PIV

La memòria justificativa consta de les dues parts que venen a continuació:
1.- Dades bàsiques i resums
2.- Memòria del treball (informe científic)

Tots els camps són obligatoris

1.- Dades bàsiques i resums

Nom de la convocatòria

FI

Llegenda per a les convocatòries:

BCC	Convocatòria de beques per a joves membres de comunitats catalanes a l'exterior
BE	Beques per a estades per a la recerca fora de Catalunya
BP	Convocatòria d'ajuts postdoctorals dins del programa Beatriu de Pinós
CTP-AIRE	Ajuts per accions de cooperació en el marc de la comunitat de treball dels Pirineus. Ajuts de mobilitat de personal investigador.
DEBEQ (Modalitat A3)	Beques de Cooperació Internacional i Desenvolupament
FI	Beques predoctorals per a la formació de personal investigador
INEFC	Beques predoctorals i de col·laboració, dins de l'àmbit de l'educació física i l'esport i les ciències aplicades a l'esport
NANOS	Beques de recerca per a la formació en el camp de les nanotecnologies
PIV	Beques de recerca per a professors i investigadors visitants a Catalunya

Títol del projecte: ha de sintetitzar la temàtica científica del vostre document.
Paper del sulfur d'hidrogen com a neurotransmissor a nivell del sistema nerviós entèric

Dades de l'investigador o beneficiari

Nom	Cognoms
Víctor	Gil Folch

Correu electrònic
victor.gil@uab.cat

Dades del centre d'origen

Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Unitat de Fisiologia (Facultat de Veterinaria)
Edifici V. Bellaterra (Cerdanyola del Vallès). CP: 08193

Agència
de Gestió d'Ajuts
Universitaris
i de Recerca

Número d'expedient
2008FI_B 00266

Paraules clau: cal que esmenteu cinc conceptes que defineixin el contingut de la vostra memòria.
Còlon, sistema nerviós entèric, neurotransmissió inhibitòria, sulfur d'hidrogen, cèl·lules intersticials de Cajal (ICC)

Data de presentació de la justificació

Nom i cognoms i signatura
del/de la investigador/a

Visttiplau del/de la responsable de la
sol·licitud

Generalitat de Catalunya
Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa

Resum del projecte: cal adjuntar dos resums del document, l'un en anglès i l'altre en la llengua del document, on s'esmenti la durada de l'acció

Resum en la llengua del projecte (màxim 300 paraules)
Al llarg dels últims anys l'òxid nítric (NO) i el monòxid de carboni (CO) han estat investigats com dos neurotransmissors gasosos del tracte gastrointestinal. Algunes dades demostren que el sulfur d'hidrogen (H2S) podria ser el tercer neurotransmissor gasos a nivell central i perifèric. Objectiu: valorar si el H2S compleix els requisits per ser considerat com el tercer neurotransmissor gasos a nivell del sistema nerviós entèric. Mètodes: la motilitat espontània de preparacions de múscul llis circular de mostres de còlon sigma humà i còlon mig de rata es van determinar in vitro mitjançant la tècnica de banys d'òrgans. El hidrogensulfur de sodi (NaHS) va ser utilitzat com donador de H2S. Resultats: 1- El NaHS va inhibir de forma concentració depenent la motilitat espontània en presència de bloqueig neural amb Tetrodotoxina (TTX 1 µM) (IC50 101±18 µM rata n=10; 329±86 µM humà n=18). 2- Aquesta relaxació es va veure reduïda per ODQ 10 µM, un inhibidor de la guanilat ciclasa, en còlon mig de rata (n=5). En humà a més de ser reduïda per ODQ 10µM (n=6), també ho va ser per SQ 22,536 100 µM (n=10), un inhibidor de l'adenilat ciclasa, i per L-NNA 1 mM (n=8), un inhibidor de la sintesi de NO. 3- En còlon de rata la incubació amb D,L-Propargilglicina 2 mM (PAG), un inhibidor de la síntesi de H2S, va incrementar la motilitat tant en situació control (10,05±2,06 vs 17,46±3,37 g•min-1 AUC, P<0,001, n=10) com en presència de TTX 1µM (14,45±7,28 vs 21,67±10,05 g•min-1 AUC, P<0,01, n=7). Conclusió: el H2S compleix part dels criteris per ser considerat un neurotransmissor gasos inhibitori en el tracte gastrointestinal: la inhibició de la seva síntesi incrementa la motilitat intestinal i la seva addició exògena produeix relaxació de la musculatura llisa intestinal.

Resum en anglès (màxim 300 paraules)
Nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) have been researched as two gaseous neurotransmitters in the gastrointestinal tract for years. Recently, it has been shown that hydrogen sulphide (H2S) might be the third gaseous neurotransmitter in central and peripheral nervous system. The aim of this study was to investigate whether H2S fulfils the criteria to be considered the third gaseous neurotransmitter in the enteric nervous system. Methods: spontaneous motility of circular smooth muscle samples of specimens of human sigmoid colon and rat mid colon were measured in vitro using the organ bath technique. Sodium hydrogen sulphide (NaHS) was used as H2S donor. Results: 1- NaHS inhibited the spontaneous contractions in a concentration dependent manner in presence of neural blocking with Tetrodotoxin (TTX 1 µM) (IC50 101±18 µM rat colon n=10 and 329±86 µM human colon n=18). 2- NaHS induced relaxation was reduced by ODQ 10 µM, a guanylate cyclase inhibitor, in rat mid colon (n=5). However, in human colon, it was reduced by ODQ 10 µM (n=6), SQ 22,536 100 µM (n=10), an adenylate cyclase inhibitor, and by L-NNA 1 mM (n=8), an inhibitor of NO synthesis. 3- In rat colon D,L-Propargylglycine, an inhibitor of the enzyme cystathionine gamma-lyase (CSE) which is responsible of H2S synthesis, increased the motility in control (10.05±2.06 vs 17.46±3.37 g•min-1 AUC, P<0.001, n=10) and in the presence of TTX 1 µM (14.45±7.28 vs 21.67±10.05 g•min-1 AUC, P<0.01, n=7). In conclusion: H2S fulfils

Resum en anglès (màxim 300 paraules) – continuació -.

part of the conditions to be considered as a gaseous neurotransmitter in the gastrointestinal tract: synthesis inhibition increased the intestinal motility and relaxes the intestinal smooth muscle when it is added exogenously.

2.- Memòria del treball (informe científic sense limitació de paraules). Pot incloure altres fitxers de qualsevol mena, no més grans de 10 MB cadascun d'ells.

Introducció

Les contraccions rítmiques fàsiques del còlon són indispensables per una correcta absorció d'aigua i electròlits presents en el quim, així com per la propulsió i expulsió del material fecal. Aquesta activitat mecànica es regulada per les cèl·lules intersticials de Cajal (ICC), factors hormonals i el sistema nerviós (entèric i autònom). Tots aquests sistemes interaccionen entre ells i amb la musculatura llisa intestinal determinant l'activitat mecànica del còlon.

El sistema nerviós autònom (SNA) exerceix un control central sobre l'activitat mecànica i la coordina entre els diferents segments del tracte gastrointestinal. Neurones aferents vagals i viscerals espinals envien informació cap al tronc de l'encèfal i a la medul·la espinal mentre que neurones intestinofugals (*Intestinofugal Afferent Neurones* IFAN) ho fan cap a les neurones simpàtiques postsinàptiques dels ganglis prevertebrals[1,2]. Aquestes aferències conjuntament amb informació provinent de centres superiors regulen l'activitat del SNA a nivell del tracte gastrointestinal, el qual exerceix la seva acció a través de fibres eferents simpàtiques i parasimpàtiques que actuen sobre el SNE o innervant directament estructures efectores. D'altra banda, el sistema nerviós entèric (SNE) presenta una gran autonomia i mitjançant arcs reflexes intrínsecs actua regulant la motilitat intestinal a nivell local. Les neurones que el composen es troben a nivell de la paret intestinal i els seus somes s'organitzen en dos plexes: el plexe submucós o de Meissner, situat sota el cantell intern de la capa muscular circular, i el plexe mientèric o d'Auerbach, situat entre la capa muscular circular i la longitudinal. Des del punt de vista funcional aquestes neurones es poden classificar com neurones aferents primàries intrínseques (*Intrinsic Primary Afferent Neurones* IPAN), interneurones i motoneurones[3]. Les interaccions entre les IPAN, interneurones i motoneurones formen xarxes neurals que asseguren un correcte funcionament de la motilitat intestinal.

Dintre del SNE les neurones que determinen finalment la contracció o relaxació de les cèl·lules musculars llises són les motoneurones. Aquestes poden ser excitadores o inhibidores segons els neurotransmissors que presenten. En el SNE els principals neurotransmissors excitadors són l'Acetilcolina, les taquiquinines (Substància P, Neuroquinina A i Neuroquinina B) i l'ATP quan actua sobre receptors P2X, mentre que l'òxid nítric (NO), l'ATP quan actua sobre receptors P2Y, el VIP i el PACAP són els principals neurotransmissors inhibitoris[4,5,6,7]. Tanmateix, el monòxid de carboni (CO)[8] i el

sulfur d'hidrogen (H_2S)[9] han estat recentment postulats com possibles neurotransmissor inhibidors a nivell del tracte gastrointestinal. Tot i això, el paper del H_2S com a neurotransmissor en el tracte gastrointestinal és encara desconegut.

El H_2S es sintetitzat a nivell biològic a partir de la L-cisteïna per acció de dos enzims dependents de priridoxal-5'-fosfat, la Cistationina β-sintasa (CBS) i la Cistationina γ-liasa (CSE). L'expressió d'aquests dos enzims és específica de teixit[10]. En còlon humà i de conill porquí aquests dos enzims han estat descrits a nivell neuronal[11]. En aquest mateix estudi la CSE també es va detectar a nivell de les ICC mientèriques d'ili de conill porquí. El H_2S exerceix un efecte relaxant sobre la musculatura llisa a través de canals de potassi sensibles a ATP (K^+_{ATP}) que produeixen la sortida de potassi i hiperpolaritzen la cèl·lula allunyant-la del voltatge d'obertura dels canals de calci dependents de voltatge[12]. Al igual que el NO, l' H_2S és una molècula altament permeable a la membrana plasmàtica i difon a través de la mateixa. Tanmateix, es creu que el seu efecte no es mediat intracel·lularment mitjançant GMP cíclic com en el cas del NO[13] sinó a través de AMP cíclic produït per l'activació de l'adenilat ciclasa[14]. D'altra banda, fenòmens d'interacció entre el NO i el H_2S han estat descrits a diversos nivells[15]. Tot i que diversos estudis posen de manifest la importància d'aquesta substància com a neurotransmissor en diversos teixits la seva participació en els fenòmens de relaxació de la musculatura gastrointestinal encara no és clara, de manera que una major investigació en aquest camp és necessària.

Hipòtesis

Valorar si el H_2S compleix els requisits per ser considerat com el tercer neurotransmissor gasos a nivell del sistema nerviós entèric i caracteritzar el seu paper dintre dels fenòmens que regulen la relaxació de la musculatura llisa intestinal.

Mètodes

Preparació de les mostres

Per la realització del present estudi es van utilitzar mostres de còlon sigma humà i còlon mig de rata. Les mostres humanes van ser obtingudes de 18 pacients (edat 54 - 81 anys, 9 homes i 9 dones) intervinguts per neoplàsies de colon i transportades al laboratori en solució salina fisiològica en refrigeració (4ºC). Els segments van ser obtinguts del marge quirúrgic distal, d'una regió sense alteracions macroscòpiques. Per aconseguir les mostres de rata es van utilitzar rates mascle Sprague-Dawley (Charles River, Lyon, France) de 8 a 10 setmanes d'edat i entre 300 i 350 g de pes. Els animals es mantenien en gàbies amb jaç d'encenall en grups de tres amb accés a pinso i aigua *ad libitum*. Les condicions ambientals de l'allotjament eren controlades: il·luminació artificial amb fotoperíode de 12 h. de llum / 12 h. de foscor, temperatura de 22 ± 2ºC i humitat relativa del 55 ± 10 %. Just abans de l'experiment els animals eren estabornits i exanguinats mitjançant decapitació amb guillotina. Posteriorment es procedia a l'obertura de la cavitat abdominal per tal d'extreure el còlon i immediatament es col·locava en solució de Krebs carbogenada a pH 7,3 – 7,4. Els procediments experimentals d'aquest estudi van ser aprovats pels comitès ètics de l'Hospital de Mataró (teixit humà) i de la Universitat Autònoma de Barcelona (mostres de rata).

Tot seguit les mostres eren col·locades en una placa de dissecció recoberta amb goma siliconada per procedir a la seva obertura longitudinal. En el cas de les mostres de rata es realitzava la determinació del còlon mig atenent a criteris anatòmics macroscòpics[16]. Les mostres van ser subjectades mitjançant agulles a la placa de dissecció per tal de poder retirar la mucosa i la submucosa. Utilitzant un bisturí es van preparar tires de teixit en el sentit de les fibres musculars circulars de 10 mm de llarg i entre 2 i 4 mm d'ample. Finalment aquestes preparacions van ser lligades pels seus dos extrems amb fil de sutura de seda de 2/0 per tal de poder realitzar l'enregistrament de l'activitat mecànica.

Enregistrament de l'activitat mecànica espontània

Per tal d'enregistrar l'activitat mecànica espontània de les tires de múscul llis circular de còlon es va utilitzar la tècnica de bany d'òrgans. Les tires de teixit es col·locaven en copes de 10 ml que contenien solució de Krebs carbogenada a 37 ± 1ºC. Les mostres eren lligades per un dels seus extrems a un suport, el qual també podia ser utilitzat per realitzar estimulació elèctrica, i de l'altre a un transductor isomètric de força (Harvard VF-1). Aquest transductor estava connectat a un ordinador mitjançant un amplificador. Les dades eren digitalitzades amb un convertidor analògic/digital amb una freqüència de mostreig de 25Hz i enregistrades mitjançant el software Data2001 (Panlab-Barcelona). Un cop realitzat el muntatge s'aplicava a les tires una tensió inicial de 4 i 1 g per les mostres d'humà i rata respectivament, es rentaven

i es deixaven equilibrar per un període de 1-2 h. fins que presentaven una activitat mecànica fàsica espontània estable.

Per tal de mesurar la motilitat de les preparacions es va utilitzar l'àrea sota la corba (AUC, *area under curve*), la freqüència i l'amplitud de les contracció expressant els resultats en grams per minut ($g \cdot min^{-1}$), contraccions per minut (cpm) i grams (g) respectivament.

Solucions i fàrmacs

La composició de la solució de Krebs va ser (en mM): glucosa 10,10; NaCl 115,48; $NaHCO_3$ 21,90; KCl 4,61; NaH_2PO_4 1,14; $CaCl_2$ 2,50 i $MgSO_4$ 1,16 (pH 7,3 – 7,4). La solució es va mantenir en perfusió constant amb carbogen (5% CO_2 – 95 % O_2).

Els següents fàrmacs van ser utilitzats: L-NNA, NaHS, ODQ, PAG, SQ22.536 (Sigma, St. Louis, USA); TTX (Latoxan, Valence, France). Tots aquests fàrmacs en van preparar dissolent-los en aigua destil·lada a excepció del L-NNA que es va dissoldre en solució de Krebs i l'ODQ que es va dissoldre en etanol 96%.

Anàlisi estadístic de les dades

Les dades van ser expressades com la mitja ± l'error estàndard. Pel seu anàlisi estadístic es va emprar el programa GraphPad Prism v. 4.01. En alguns casos es van normalitzar les dades expressant l'efecte dels fàrmacs com el percentatge d'activitat mecànica respecte al període anterior al tractament.

Es va utilitzar una t-student per a dades aparellades en aquells experiments en els que es volia valorar l'efecte d'un fàrmac sobre l'activitat mecànica d'una preparació.

Un test ANOVA d'una via va ser usat per comparar l'efecte de diversos fàrmacs sobre la motilitat d'una preparació.

Per tal de valorar la resposta a un fàrmac i comparar l'efecte de diversos tractaments previs sobre la mateixa en tires diferents d'un mateix espècimen es va fer servir un anàlisi ANOVA de dues vies.

Es van considerar les diferències entre dades comparades com estadísticament significatives quan $p < 0,05$. Es va utilitzar el valor "n" per tal de designar el nombre d'espècimens emprats en l'estudi.

Resultats

Activitat mecànica fàsica de la musculatura circular en solució de Krebs

Les preparacions de múscul llis circular de còlon humà i de rata (humà n=18; rata n=25) van presentar activitat mecànica fàsica espontània en solució de Krebs. Les característiques d'aquesta activitat es poden veure a la Taula 1.

Taula 1. Activitat mecànica fàsica espontània del múscul llis circular de còlon sigma humà i mig de rata en solució de Krebs.

Preparació	AUC ($g \cdot min^{-1}$)	Freqüència (cpm)	Amplitud (g)
Humà	63,58 ± 6,79	2,58 ± 0,20	3,39 ± 0,45
Rata	8,40 ± 0,74	0,57 ± 0,03	1,70 ± 0,18

Addició exògena de sulfur d'hidrogen

Amb l'objectiu d'avaluar l'efecte del H_2S sobre l'activitat mecànica fàsica del còlon sigma humà i mig de rata es va utilitzar el hidrogensulfur de sodi (NaHS) com a donador d'aquesta substància. El procediment experimental es va dur a terme prèvia incubació de les tires amb TTX 1 µM, un bloquejador neuronal que actua inhibint dels canals de sodi, per tal d'evitar l'acció sobre el SNE i valorar únicament el seu efecte sobre el múscul llis intestinal. A les mostres se'ls va aplicar un gradient de concentracions del fàrmac entre 10 i 3000 µM en humà i 1 i 1000 µM en rata.

En còlon humà l'administració de TTX 1 µM va produir una lleugera però significativa disminució de l'activitat mecànica (AUC: n=18; 63,58 ± 6,79 vs 56,68 ± 6,69 $g \cdot min^{-1}$; t-test $P<0,05$). Tanmateix, quan es va analitzar la freqüència i l'amplitud de contracció de manera independent no es va observar cap diferència significativa (Freqüència: n=18; 2,58 ± 0,20 vs 2,47 ± 0,23 cpm; t-test n.s. Amplitud: n=18; 3,39 ± 0,45 vs 3,18 ± 0,48 g; t-test n.s.). Per contra, en còlon mig de rata aquest fàrmac va incrementar la motilitat de forma significativa (AUC: n=10; 7,09 ± 1,20 vs 17,46 ± 2,55 $g \cdot min^{-1}$; t-test $P<0,001$). Aquest increment va ser degut tant a un increment de la freqüència (n=10; 0,54 ± 0,05 vs 0,75 ± 0,05 cpm; t-test $P<0,001$) com de l'amplitud (n=10; 1,30 ± 0,22 vs 2,63 ± 0,32 g; t-test $P<0,001$).

Tant en teixit humà com en el de rata el NaHS va produir una inhibició concentració depenent de l'activitat mecànica fàsica espontània (P<0,001 ANOVA 1 via) (Fig. 1). La IC_{50} d'aquest fàrmac en còlon sigma humà va ser de 329,15 ± 43,73 µM (n=18), mentre que en el còlon mig de rata va ser de 101,16 ± 9,20 µM (n=10).

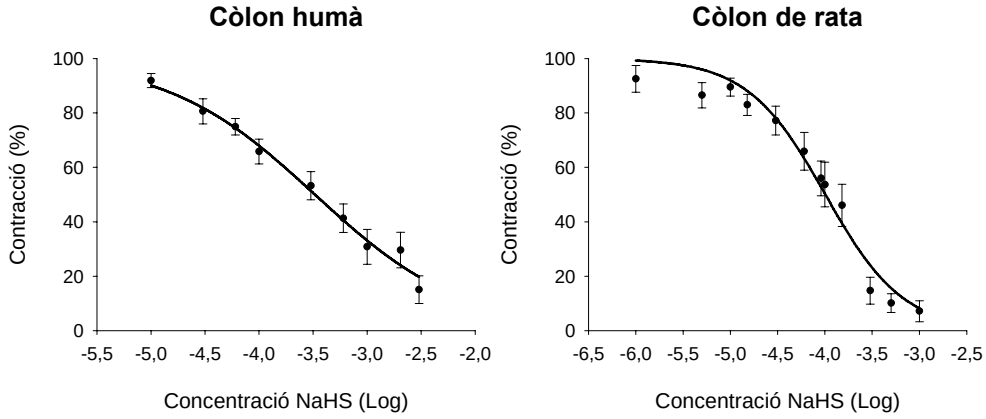

Fig. 1. Corbes d'inhibició de l'activitat mecànica produïda pel NaHS en còlon sigma humà (esquerra) i còlon mig de rata (dreta).

Caracterització de la via d'acció intracel·lular del sulfur d'hidrogen

Es van realitzar una sèrie d'experiments per tal de determinar la possible via d'acció intracel·lular a través de la qual el H_2S efectuava la seva acció relaxant. En questos experiments es van incubar mostres de teixit humà i de rata prèviament tractades amb TTX 1 µM amb SQ 22,536 100 µM (un inhibidor de l'adenilat ciclasa que actua bloquejant la síntesi d'AMP cíclic), ODQ 10 µM (un inhibidor de la guanilat ciclasa que bloqueja la síntesi de GMP cíclic) i L-NNA 1 mM (un inhibidor de la NOS que impedeix la síntesi de NO). A més a més es va fer un control de vehicle amb etanol 10 µL perquè l'ODQ va haver de ser dissolt en aquesta substància i va ser utilitzat a aquest volum d'administració.

En humà tots els tractaments realitzats van produir un increment significatiu de la IC_{50} de la corba d'inhibició del NaHS (Taula. 2). En còlon mig de rata només l'ODQ va produir increment significatiu de la IC_{50} (Taula. 3). Tanmateix, en aquest teixit no es va poder determinar si el SQ 22,536 tenia algun efecte sobre la corba d'inhibició concentració depenent produïda pel NaHS ja que a 100 µM va produir una inhibició total de l'activitat mecànica espontània (n=3; dades no mostrades).

Taula 2. Estudi comparatiu de la IC_{50} del NaHS en solució de Krebs utilitzant diversos tractaments previs en còlon sigma humà.

Tractaments comparats	n	Control IC_{50} (µM)	Tractat IC_{50} (µM)	Nivell significació (ANOVA dos vies)
Vehicle vs ODQ	6	742,25 ± 124,94	1128,76 ± 200,57	P<0,05
Control vs SQ22,536	10	294,78 ± 47,83	710,06 ± 178,79	P<0,05
Control vs L-NNA	8	380,10 ± 76,51	1358,01 ± 517,50	P<0,01

Taula 3. Estudi comparatiu de la IC_{50} del NaHS en solució de Krebs utilitzant diversos tractaments previs en còlon mig de rata.

Tractaments comparats	n	Control IC_{50} (µM)	Tractat IC_{50} (µM)	Nivell significació (ANOVA dos vies)
Vehicle vs ODQ	5	98,72 ± 10,49	279,80 ± 37,74	0,001
Control vs L-NNA	5	120,78 ± 16,62	120,55 ± 18,00	n.s.

Via endògena de síntesi del sulfur d'hidrogen

Es va valorar si la utilització de la D,L-Propargilglicina 2 mM (PAG), un inhibidor de la cistationina β-sintasa (CSE), produïa algun canvi en el patró mòtil espontani en còlon mig de rata.

Es va poder observar que la PAG 2mM (n=10) produïa un increment significatiu de l'activitat mecànica fàsica espontània en el còlon mig de rata (Taula. 4). Aquest increment de la motilitat va ser degut principalment a un increment en la freqüència de contracció (Fig. 2).

Taula 4. Resposta a l'administració de PAG 2 mM en còlon mig de rata en solució de Krebs.

	Control	PAG 2 mM	Nivell de significació (t-test)
AUC ($g \cdot min^{-1}$)	10,05 ± 0,91	17,46 ± 1,49	P<0,001
Freqüència (cpm)	0,58 ± 0,03	0,85 ± 0,04	P<0,001
Amplitud (g)	1,97 ± 0,20	2,10 ± 0,16	P<0,05

A més a més, es va valorar l'efecte de l'administració de PAG 2 mM prèvia incubació amb TTX 1 µM (n=7). Els resultats en aquest cas van ser similars als obtinguts sense l'administració de TTX (Taula 5) i l'activitat mecànica va incrementar degut a un increment de la freqüència de contracció (Fig. 2).

Taula 5. Resposta a l'administració de PAG 2 mM en còlon mig de rata en solució de Krebs, prèvia incubació amb TTX 1 µM.

	Control	TTX 1 µM	PAG 2 mM	Nivell significació (test de Bonferroni)
AUC ($g \cdot min^{-1}$)	5,48 ± 1,06	14,45 ± 2,98	21,67 ± 4,10	^{a}P<0,01; ^{b}P<0,05
Freqüència (cpm)	0,63 ± 0,07	0,79 ± 0,04	1,10 ± 0,06	^{a}n.s.;^{b}P<0,001
Amplitud (g)	1,26 ± 0,33	2,84 ± 0,60	2,83 ± 0,64	^{a}P<0,01;^{b}n.s.

^{a}Control vs TTX 1 µM; ^{b}TTX 1 µM vs PAG 2 mM

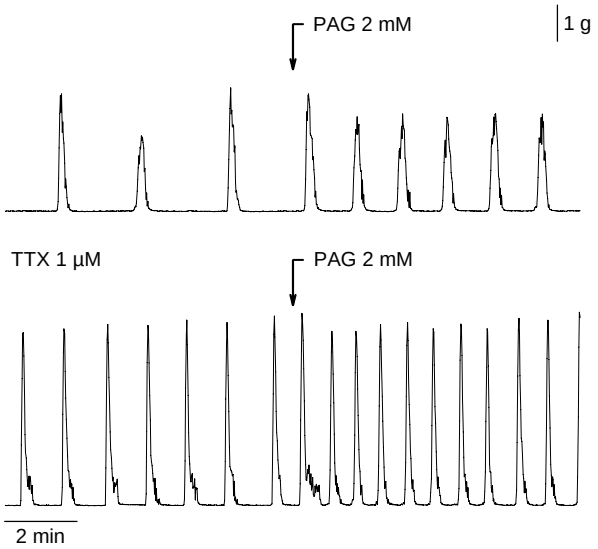

Fig. 2. Registres mecànics on es mostra l'efecte de la D,L-Propargilglicina 2 mM sobre la capacitat contràctil del còlon mig de rata sense blocatge neuronal (registre superior) i previ blocatge neuronal amb TTX 1 µM (registre inferior)

Discussió

El H_2S ha estat recentment descrit com una substància amb capacitat per regular funcions fisiològiques. Especialment important ha estat l'estudi del seu efecte a nivell vascular on es coneix que provoca vasodilatació i hipotensió[17,18]. Tanmateix, el seu efecte sobre la motilitat intestinal no és gaire conegut[19] i la seva importància com a neurotransmissor inhibitori a nivell del tracte gastrointestinal encara resta per determinar.

En aquest treball s'ha intentat determinar si el H_2S compleix alguns dels requisits per tal de ser considerat com a neurotransmissor. S'ha valorat la resposta a l'addició exògena, s'ha estudiat la via intracel·lular d'acció i s'ha avaluat de forma indirecta la seva síntesi endògena.

Tant el còlon sigma humà com el còlon mig de rata van respondre a l'addició exògena de NaHS, un donador de H_2S, el qual va produir una inhibició concentració depenent de l'activitat mecànica espontània. Aquest efecte en còlon mig de rata sembla estar mitjançat a través de l'activació de la guanilat ciclasa i posterior producció de GMP cíclic, en contra del que s'ha observat en teixit d'aorta de rata[20]. Tanmateix, la via d'acció en còlon humà sembla ser molt més complexa i involucraria l'activació tant de la guanilat ciclasa com de l'adenilat ciclasa. A més a més, s'ha observat que el L-NNA 1 mM en presència de blocatge neuronal amb TTX 1 µM afecta a la inhibició induïda per NaHS. Això implica que,

en aquesta espècie, el H_2S exerceix el seu efecte, almenys en part, mitjançant l'alliberament de NO d'origen no neuronal. Un possible origen d'aquest NO no neuronal podrien ser les ICC, ja que s'ha determinat la presència de NOS en les ICC de diverses espècies[21,22]. Així doncs, les ICC podrien actuar regulant l'activitat contràctil del múscul llis tant determinant l'activitat elèctrica a través de les ones lentes com participant en la seva modulació química. Tanmateix, aquesta és una hipòtesi que no es pot afirmar amb els resultats obtinguts en aquest estudi i caldria realitzar estudis addicionals per tal de determinar la presència de NOS en les ICC de còlon mig de rata i detectar de forma directa si el NO incrementa quan s'incuben amb H_2S cultius cel·lulars d'ICC. Finalment, la utilització de PAG 2 mM, d'un inhibidor de la CSE, va produir un increment de l'activitat contràctil del còlon mig de rata, bàsicament degut a un increment de la freqüència de contracció. Aquest fet demostra que en el còlon mig de rata es produeix de manera fisiològica H_2S i que aquest participa de manera rellevant en el to inhibitori intestinal en aquesta espècie. A més a més, el fet que el seu efecte sigui produït bàsicament per un increment de la freqüència de contracció fa pensar que el H_2S pugui actuar modulant l'activitat de les ICC i per tant la freqüència de les ones lentes. Aquesta hipòtesi concorda amb el fet que la inhibició amb NaHS en còlon de rata va ser produïda principalment per una reducció de la freqüència de contracció. D'altra banda, s'ha observat que l'efecte de la PAG 2 mM es mante en presència de bloqueig neural, de manera que l'origen d'aquest H_2S endogen podria ser no neural. Novament les ICC podrien ser les productores d'aquest H_2S no neural ja que estudis en ili de conill porquí han determinat la presència de CSE en les ICC mientèriques[23]. Així doncs, podríem ser que les ICC exerciren un mecanisme d'autoregulació mitjançant l'alliberament de H_2S. Per poder ratificar aquest fet hauríem de detectar la CSE en les ICC de còlon mig de rata, demostrar que les ICC en cultiu aïllat poden produir H_2S i que aquest a la seva vegada pot regular la capacitat de despolarització cíclica que presenten aquestes cèl·lules.

En conclusió, el H_2S compleix part dels requisits necessaris per ser considerat com a neurotransmissor a nivell de tracte gastrointestinal. Exerceix un efecte relaxant quan és administrat exògenament, la seva producció fisiològica s'ha demostrat indirectament mitjançant un inhibidor de la via de síntesi en còlon mig de rata i el seu mecanisme postsinàptic sembla implicar l'activació de la guanilat ciclasa, tot i que en humà l'adenilat ciclasa també podria participar-hi. La seva acció podria ser a la vegada directa sobre el múscul o mitjançant la modulació de l'activitat de les ICC. A més a més, en humà el H_2S pot exercir part del seu efecte a través de l'alliberació de NO d'origen no neural. Per tant, el H_2S pot ser un nou neurotransmissor a nivell del sistema nerviós entèric, encara que el seu paper en la fisiologia gastrointestinal requereix futurs estudis.

Bibliografia

1. Grundy D. Neuroanatomy of visceral nociception: vagal and splanchnic afferent. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i2-i5.

2. Szurszewski JH, Ermilov LG, Miller SM. Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i6-10.

3. Furness JB. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 3-7-2000; 81: 87-96.

4. Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 24-5-1990; 345: 346-347.

5. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 1970; 40: 668-688.

6. Christinck F, Jury J, Cayabyab F, Daniel EE. Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69: 1448-1458.

7. Lecci A, Santicioli P, Maggi CA. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 630-641.

8. Farrugia G, Miller SM, Rich A, Liu X, Maines MD, Rae JL, Szurszewski JH. Distribution of heme oxygenase and effects of exogenous carbon monoxide in canine jejunum. *Am J Physiol* 1998; 274: G350-G358.

9. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 139-145.

10. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 2002; 16: 1792-1798.

11. Schicho R, Krueger D, Zeller F, Von Weyhern CW, Frieling T, Kimura H, Ishii I, De GR, Campi B, Schemann M. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006; 131: 1542-1552.

12. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 1-11-2001; 20: 6008-6016.

13. Zhao W and Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H474-H480.

14. Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 7-1-2000; 267: 129-133.

15. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 2006; 131: 259-271.

16. Alberti E, Mikkelsen HB, Larsen JO, Jimenez M. Motility patterns and distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in the proximal, mid- and distal-colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 133-147.

17. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H2316-H2323.

18. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 1-11-2001; 20: 6008-6016.

19. Teague B, Asiedu S, Moore PK. The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 139-145.

20. Zhao W and Wang R. H(2)S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H474-H480.

21. Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, Faussone-Pellegrini MS. Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms. *Neurosci Lett* 5-7-2002; 326: 191-195.

22. Xue C, Pollock J, Schmidt HH, Ward SM, Sanders KM. Expression of nitric oxide synthase immunoreactivity by interstitial cells of the canine proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 1994; 49: 1-14.

23. Schicho R, Krueger D, Zeller F, Von Weyhern CW, Frieling T, Kimura H, Ishii I, De GR, Campi B, Schemann M. Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the Guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 2006; 131: 1542-1552.

Sumari

Introducció
Hipòtesis
Mètodes
- **Preparació de les mostres**
- **Enregistrament de l'activitat mecànica espontània**
- **Solucions i fàrmacs**
- **Anàlisi estadístic de les dades**

Resultats
- **Preparació de les mostres**
- **Enregistrament de l'activitat mecànica espontània**
- **Solucions i fàrmacs**
- **Anàlisi estadístic de les dades**

Discussió
Bibliografia