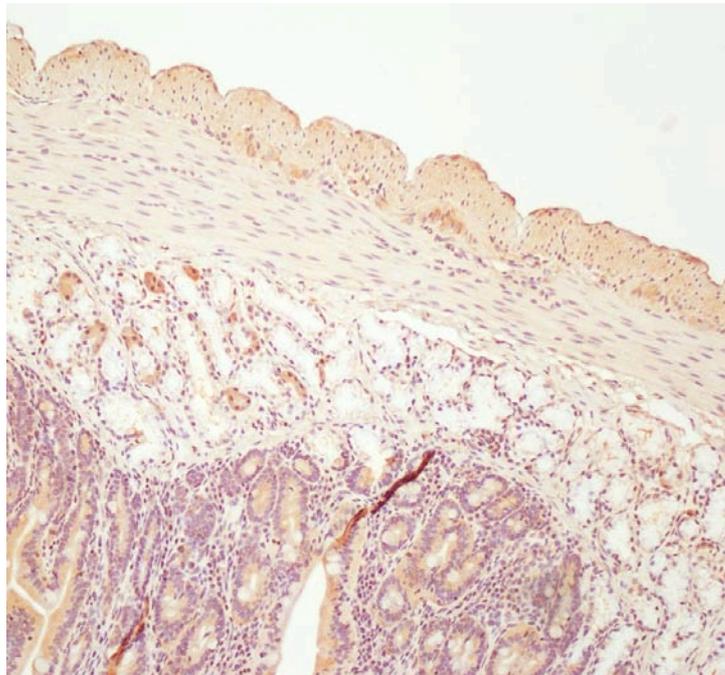


La inhibición de la p38 MAPK mejora las alteraciones intestinales y el estrés oxidativo inducidos en un modelo de endotoxemia en conejo



MODALIDAD: A) Medicina, Cirugía, Sanidad Animal Veterinarias, así como Ciencias Básicas relacionadas con la Veterinaria.

LEMA: ENDOTOXEMIA Y ESTRÉS

RESUMEN

Introducción: El lipopolisacárido (LPS) disminuye la contractilidad intestinal e induce un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, que juegan un papel importante en la patogénesis de la sepsis. La proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 puede ser activada por diversos estímulos como el LPS. Los objetivos del presente estudio fueron: (1) investigar el papel de la p38 MAPK en los efectos del LPS sobre (a) las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl en el duodeno de conejo y (b) el estrés oxidativo; (2) estudiar la expresión de la p-p38 y p38 en el intestino; (3) localizar la forma activa de la p38 en el intestino.

Métodos: Se establecieron 4 grupos de conejos y se les inyectó de forma intravenosa: (1) solución salina, (2) LPS, (3) SB203580, un inhibidor específico de la p38 o (4) SB203580 + LPS. La contractilidad intestinal se estudió en un baño de órganos. La expresión de las proteínas p-p38 y p38 total se estudiaron mediante western blotting y la p-p38 se localizó mediante inmunohistoquímica. Los productos formados a consecuencia del daño oxidativo en lípidos como el malondialdehído y 4-hidroxiacetaldehídos (MDA+4-HDA) y proteínas (carbonilos) se cuantificó en plasma e intestino.

Resultados: Las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl disminuyeron con el LPS. El LPS incrementó la expresión de la p-p38 y los niveles de MDA+4-HDA y de carbonilos tanto en el plasma como en el intestino. El tratamiento con SB203580 bloqueó el efecto del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina y los niveles de MDA+4-HDA y carbonilos. La p-p38 se localizó en las neuronas del plexo mientérico y en las células del músculo liso del duodeno.

Conclusiones: El LPS disminuye la contractilidad duodenal en conejos e incrementa la producción de radicales libres. La p38 MAPK está involucrada en estos efectos.

ABSTRACT

Background: Lipopolysaccharide (LPS) decreases intestinal contractility and induces the release of reactive oxygen species (ROS), which play an important role in the pathogenesis of sepsis. p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) can be activated by a variety of stimuli such as LPS. The aims of this study were: (1) to investigate the role of p38 MAPK in the effect of LPS on (a) the acetylcholine, prostaglandin E₂ and KCl-induced contractions of rabbit duodenum and (b) the oxidative stress status; (2) to localize the active form of p38 in the intestine.

Methods: Rabbits were injected with (1) saline, (2) LPS, (3) SB203580, a specific p38 MAPK inhibitor, or (4) SB203580 + LPS. Duodenal contractility was studied in an organ bath. SB203580 was also tested in vitro. The protein expression of p-p38 and total p38 was measured by Western blot and p-p38 was localized by immunohistochemistry. The formation of products of oxidative damage to proteins (carbonyls) and lipids (MDA+4-HDA) was quantified in intestine and plasma.

Key Results: ACh, PGE₂ and KCl-induced contractions decreased with LPS. LPS increased phospho-p38 expression and the levels of carbonyls and MDA+4-HDA. SB203580 blocked the effect of LPS on the ACh, PGE₂ and KCl-induced contractions in vivo and in vitro and the levels of carbonyls and MDA+4-HDA. P-p38 was detected in neurons of the myenteric plexus and smooth muscle cells of duodenum.

Conclusions & References: LPS decreases the duodenal contractility in rabbits and increases the production of free radicals. p38 MAPK is a mediator of these effects.

INTRODUCCIÓN

El lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina presente en la pared celular de las bacterias Gram negativas. Numerosas alteraciones asociadas a las infecciones bacterianas como fiebre, cambios circulatorios y daños a numerosos órganos, que incluyen el sistema nervioso central, corazón, riñones, pulmones, hígado y el tracto gastrointestinal, son atribuidas al LPS. La administración sistémica de la endotoxina provoca alteraciones en la motilidad gastrointestinal (Weisbrodt et al., 1996; Plaza et al., 1997; Eskandari et al., 1999; Rebollar et al., 2002; Hussain y Delovitch, 2005). Estudios previos de nuestro grupo han mostrado un efecto inhibitorio del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina en dos condiciones: en conejos tratados con LPS y en segmentos intestinales incubados con LPS *in vitro* (Rebollar et al., 2002). Los efectos del LPS sobre la motilidad se han atribuido a diferentes sustancias como las prostaglandinas y el óxido nítrico (Hori et al., 2001; Rebollar et al., 2002; Rebollar et al., 2003; Grasa et al., 2008).

El LPS provoca la liberación de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Giralt et al., 1993; Nowak et al., 1993). El estrés oxidativo está involucrado en un amplio rango de patologías, incluyendo el cáncer, la isquemia/reperfusión, la enfermedad inflamatoria intestinal, las enfermedades neurodegenerativas y la sepsis (van der Vliet y Bast, 1992; Goode y Webster, 1993; Bergeron, 1995; Lih-Brody et al., 1996; McKenzie et al., 1996; Kooreman et al., 1998). La acumulación de cantidades elevadas de radicales libres tienen efectos perjudiciales en el hospedador, produciendo diversos efectos fisiopatológicos. El estrés oxidativo también se ha descrito como una causa de las alteraciones en la motilidad intestinal inducidas por el LPS (Pons et al., 1991; de Winter et al., 2005).

El LPS activa las siguientes MAPKs: la p38, la cinasa activada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa c-Jun-N- terminal (JNK) (Kyriakis y Avruch, 2001). Las MAPKs se han conservado en todos los organismos eucariotas y participan en muchos procesos celulares como la embriogénesis, la diferenciación celular, la proliferación celular y la muerte celular (Pearson et al., 2001). La p38 MAPK es una proteína miembro de esta familia. Las consecuencias funcionales de la activación de la p38 MAPK son complejas y no se conocen con exactitud. Se ha observado una activación anormal de la p38 MAPK en circunstancias patológicas como el cáncer (Bradham y McClay, 2006), la enfermedad inflamatoria intestinal (Waetzig et al., 2002) o las enfermedades neurodegenerativas que incluyen la esclerosis lateral amiotrófica (Bendotti et al., 2004) o el Parkinson (Onyango et al., 2005). Se piensa que la p38 MAPK tiene un papel importante en la inflamación y está siendo estudiada como una diana terapéutica para las enfermedades inflamatorias (Kyriakis y Avruch, 2001).

Los objetivos del presente estudio fueron investigar el papel de la p38 MAPK en los efectos del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl en el duodeno de conejo, examinar el nivel de estrés oxidativo por medio de la cuantificación de carbonilos y de malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos en plasma y duodeno y localizar la forma activa de la p38 (p38 fosforilada, p-p38) en el intestino.

MATERIAL Y MÉTODOS

Disoluciones y productos

La composición de la solución Krebs en mM fue la siguiente: NaCl 120, KCl 4.7, CaCl₂ 2.4, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.5, KH₂PO₄ 1.0, y glucosa 5.6, pH 7.4. La acetilcolina (ACh), la prostaglandina E₂ y el lipopolisacárido (LPS, de *Escherichia coli* serotipo 0111:B4) se obtuvo de Sigma (Madrid, España). El KCl se obtuvo de Merck (Madrid, España). 4-[5-(4-Fluorofenil)-2-[4-(metilsulfonil)fenil]-1H-imidazol-4-yl]piridine hidrocloreto (SB203580) se obtuvo de Tocris (Madrid, España). Las disoluciones se prepararon en solución salina.

Animales

El manejo, equipamiento y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo con la legislación europea del Consejo 86/609/EEC sobre la protección de los animales de experimentación. Todos los protocolos se aprobaron por el Comité de Ética de la Universidad de Zaragoza (España).

Se utilizaron conejos machos de la raza neozelandesa, de 2-2.5 kg, mantenidos con pienso estándar y libre acceso al agua. Después de 24 h de ayuno, se dividió a los conejos en 4 grupos y se les inyectó intravenosamente: (1) solución salina, (2) LPS (0.2 µg/kg), (3) SB203580 (30 µg/kg) o (4) SB203580 + LPS. El SB203580 se administró 15 minutos antes del LPS o la solución salina. Los animales se sacrificaron de forma humanitaria mediante un golpe en la cabeza 90 minutos después de la inyección de LPS o solución salina.

Estudios de contractilidad intestinal

Se tomaron fragmentos de duodeno que se lavaron y cortaron en segmentos más pequeños. Los segmentos completos (10 mm de largo y 5 mm de ancho) se suspendieron en la dirección de las fibras musculares longitudinales o circulares en un baño de órganos (10 ml capacidad), a una temperatura controlada (37 °C), conteniendo solución de Ringer Krebs y siendo continuamente gaseado con 95% O₂ y 5% CO₂. Cada segmento se conectó a un transductor isométrico (Pioden UF1, Graham Bell House, Canterbury, UK) y se sometió a una tensión inicial de 20 mN. La señal de la actividad mecánica fue amplificada (The Mac Lab Bridge Amp, AD Instruments Inc., Milford, MA, U.S.A.) con un rango de 2 mV, registrada en un ordenador para su posterior análisis usando el programa the Mac Lab System/8e (AD Instruments Inc., Milford, MA, U.S.A.) y digitalizada a dos muestras por segundo y por canal. Antes de comenzar el registro, se dejó a los segmentos estabilizarse durante 45 minutos. Durante este tiempo se cambió la solución Krebs cada 20 min.

Cada protocolo se realizó sistemáticamente sobre ocho segmentos de duodeno (4 en el sentido de las fibras longitudinales y 4 en el de las circulares) tomadas del mismo conejo, y repetidas en tres o cuatro animales diferentes. Los segmentos que no presentaban actividad espontánea se descartaron.

Después del período de estabilización, se añadió acetilcolina (10⁻⁷ a 10⁻³ mol/l), prostaglandina E₂ (10⁻⁷ mol/l) y KCl (80 mol/l) al baño durante 3 minutos de forma no acumulativa. Las concentraciones se incrementaban en intervalos de 20 minutos.

Además, se añadió el SB203580 (10⁻⁷ mol/l) *in vitro* para estudiar su posible efecto local en los segmentos de duodeno de los conejos tratados con LPS.

Cuantificación de la peroxidación lipídica

Las concentraciones de malondialdehído y 4-hidroxi-alquenos en plasma y tejido se utilizaron como un índice de peroxidación lipídica (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Las muestras de sangre se tomaron en tubos que contenían EDTA y fueron centrifugadas a 3000 g en una centrífuga refrigerada a 4 °C durante 10 min. Se tomaron segmentos del duodeno de conejo, se lavaron con 0.9% NaCl (4 °C) y se almacenaron a -80 °C hasta su homogeneizado. Los tejidos se homogeneizaron en buffer Tris frío (50 mM, pH 7.4) y se centrifugaron a 3000 g a 4 °C durante 10 min. En la técnica, el MDA+4-HDA reacciona con el N-metil-2-fenilindol, dando lugar a un cromóforo estable con máxima absorbancia a 586 nm; se utilizó el 1,1,3,3-tetrametoxipropano como solución estándar. Los resultados se expresaron en nmol MDA+4-HDA/mg de proteína. Las concentraciones proteicas se determinaron mediante la técnica de Bradford (Biorad, Alemania).

Cuantificación de los niveles de carbonilos en las proteínas

El contenido en carbonilos de las proteínas se determinó en base al método descrito por Levine y col (Levine et al., 1994). Brevemente, 100 µl de buffer Tris 50 mmol/l y 200 µl de dinitrofenilhidracina 10 mmol/l se añadieron a las alícuotas de la muestra (muestras de plasma u homogeneizados de tejido) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 1 h. Se añadió ácido tricloroacético frío (325 µl) a la mezcla. El sedimento obtenido después de la centrifugación a 11000 g a 4 °C durante 3 min se lavó tres veces con 1 ml de etanol/etil acetato (1:1, v:v). El último sedimento se disolvió en guanidina 6 mol/l (700 µl) y fue incubado a 37 °C durante 15 min. Después de la centrifugación a 12000 g a 4 °C durante 10 min, la absorbancia del sobrenadante se midió mediante espectrofotometría a 375 nm para cuantificar los carbonilos proteicos, y su

concentración se expresó en nmol de grupos carbonilo por mg de proteína. La guanidina se utilizó como blanco.

Análisis de western blot

El LPS se inyectó a los conejos intravenosamente a las dosis de 0.2, 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y se sacrificaron los animales 90 minutos después. Otros conejos se trataron con LPS 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y fueron sacrificados a los 30 min, 60 min, 90 min, 4 h u 8 h. Estos protocolos se han utilizado previamente en nuestro laboratorio para los estudios funcionales (Rebollar et al., 2002). Se realizó el análisis de western blot sobre la proteína extraída de segmentos de duodeno tomados inmediatamente después del sacrificio de los animales. Se tomaron segmentos de duodeno de 3 conejos diferentes y se realizaron al menos dos western blots por cada conejo. Las muestras se homogenizaron con un Polytron (DI 25 Basic, IKA-WERKE, Alemania) en buffer RIPA frío con 0.1% PMSF (100 mM), 0.3% aprotinina y 0.1% ortovanadato sódico (1 M). Los homogeneizados se centrifugaron a 14000 g a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante que contenía las proteínas se almacenó a -80 °C hasta su análisis. La concentración proteica se determinó mediante el método de Bradford (Biorad, Alemania). Las muestras se solubilizaron en el tampón 2x sulfato dodecil sódico (SDS) y se hirvieron a 100 °C durante 5 min.

Se cargaron cantidades equivalentes de proteína (40 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$) y se separaron por electroforesis en geles de 10% SDS-poliacrilamida. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en 0.1% Tween 20/buffer fosfato (TPBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se utilizaron anticuerpos de ratón anti-p-p38 (1:500), anti-p38 (1:500) o anti-actina (1:5000) que se incubaron a 4°C toda la noche. A continuación, los anticuerpos anti-ratón conjugados con peroxidasa (1:1000) se

añadieron a temperatura ambiente durante 1 hora. Todos los anticuerpos se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (CA, U.S.A.; SC-7973, SC-7972 y SC-2005, respectivamente). La visualización se llevó a cabo mediante la técnica de quimiluminiscencia (Amersham Biosciences, Reino Unido). En los experimentos control, los anticuerpos primarios se omitieron como un control negativo y un lisado de células NIH/3T3 sometidas a un choque de calor (Santa Cruz Biotechnology, SC-2217) se utilizó como control positivo.

Inmunohistoquímica

El protocolo se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit Vectastain ABC (Cat. No. PK-4000, Vector Laboratories, CA, U.S.A.). Se fijaron segmentos de duodeno en formalina al 10% y se incluyeron en parafina. Secciones desparafinadas de 4 µm se incubaron con 0.9% H₂O₂/metanol durante 30 min y luego se calentaron en el microondas sumergidas en un buffer de citrato sódico durante 5 min. Después del bloqueo con suero normal de caballo 30%, los cortes se incubaron a 4 °C toda la noche con un anticuerpo de ratón anti-p-p38 (1:100), diluido en suero normal de caballo (10%). Este anticuerpo fue el mismo que el empleado en la técnica de western blot. Los cortes se incubaron con anticuerpo anti-ratón conjugado con biotina (proporcionado en el kit) a temperatura ambiente durante 30 min. Se empleó el método de la avidina-biotina tal como está descrito en el kit ABC elite. La localización de los anticuerpos se visualizó con un kit de diaminobencidina (Vector Laboratories, CA, U.S.A.). Los cortes se tiñeron con hematoxilina de Mayer y se montaron en DPX. En los experimentos control, el anticuerpo primario se omitió.

Análisis de los datos y estadística

Todos los segmentos intestinales incluidos en el análisis para el estudio de la contractilidad intestinal presentaron contracciones espontáneas. La respuesta motora (MR) a la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl se midió como la actividad mecánica integrada (IMA) por segundo, expresado en mN/s (Rebollar et al., 2002) y normalizado por milímetro cuadrado de superficie (CSA, mm²) según la fórmula: $MR = A_1 - A_0$, donde A es el área integrada por segundo y por mm² durante los primeros 3 min de la respuesta a la acetilcolina, prostaglandina E₂ o el KCl (A₁) o la motilidad espontánea, 3 min antes de añadir acetilcolina, prostaglandina E₂ o el KCl (A₀). El área integrada se calculó usando una línea base de 0 mN. La CSA se determinó para cada fibra muscular usando la ecuación $CSA \text{ (mm}^2\text{)} = \text{masa (mg)} / [\text{longitud (mm)} \cdot \text{densidad (mg/mm}^3\text{)}]$, donde la densidad del músculo intestinal se asumió como 1.05 mg/mm³; y la longitud y masa (peso húmedo) de cada segmento se anotó en todos los experimentos.

La expresión proteica de la p38 MAPK se midió mediante densitometría utilizando el software apropiado y los datos se expresaron como unidades arbitrarias con respecto a las muestras de los conejos tratados con solución salina (100%).

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar (e.s.). Las comparaciones entre las medias se realizaron utilizando el análisis de varianza (test ANOVA) y los valores de P se determinaron con el test de Scheffé. Las diferencias con valores de P <0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

RESULTADOS

En este estudio la tasa de mortalidad de los conejos fue del 0% durante el tratamiento con el LPS. La temperatura rectal de los conejos control fue de 38.2 ± 0.2 °C (n=8). La temperatura rectal se incrementó después del tratamiento de 90 minutos con el LPS ($0.2 \mu\text{g/kg}$) (40.4 ± 0.1 °C, n=8). El tratamiento con el SB203580 ($30 \mu\text{g/kg}$) bloqueó en parte este incremento (39.1 ± 0.4 °C, (n=8). El SB203580 no tuvo efecto *per sé* en la temperatura rectal.

Efecto del SB203580 sobre la contractilidad duodenal alterada por el LPS

La Fig. 1 muestra las curvas dosis respuesta no acumulativas de la acetilcolina (10^{-7} a 10^{-3} mol/l), la prostaglandina E_2 (10^{-7} mol/l) y el KCl (80 mol/l) después de 90 min de tratamiento con solución salina o LPS ($0.2 \mu\text{g/kg}$) respectivamente. El LPS ($0.2 \mu\text{g/kg}$, 90 min) redujo las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E_2 y el KCl y no modificó la amplitud ni la frecuencia de las contracciones espontáneas tanto en el músculo longitudinal como circular del duodeno de conejo, tal y como fue previamente descrito en nuestro laboratorio (Rebollar et al., 2002).

Con el fin de estudiar el papel de la p38 MAPK en el efecto del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E_2 y el KCl en el músculo longitudinal y circular de duodeno de conejo, se probó el SB203580 de dos maneras diferentes: (1) para examinar el efecto sistémico, el SB203580 ($30 \mu\text{g/kg}$, un inhibidor de la p38 MAPK) se inyectó i.v. 15 min antes del LPS ($0.2 \mu\text{g/kg}$). Los efectos del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E_2 y el KCl en el duodeno fueron antagonizadas por el SB203580 ($30 \mu\text{g/kg}$) (Fig. 1); (2) para estudiar el efecto local en los conejos tratados con LPS, se añadió el SB203580 (10^{-7} mol/l) *in vitro* a los segmentos duodenales 15 minutos antes de la acetilcolina (10^{-4} mol/l), la

prostaglandina E₂ (10⁻⁷ mol/l) y el KCl (80 mmol/l). En este caso, el SB203580 también bloqueó los efectos del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl (Fig. 2). El SB203580 añadido *in vitro* sobre los segmentos duodenales de los conejos tratados con solución salina no tuvo efecto *per sé* sobre las contracciones espontáneas ni sobre las contracciones inducidas por agonistas.

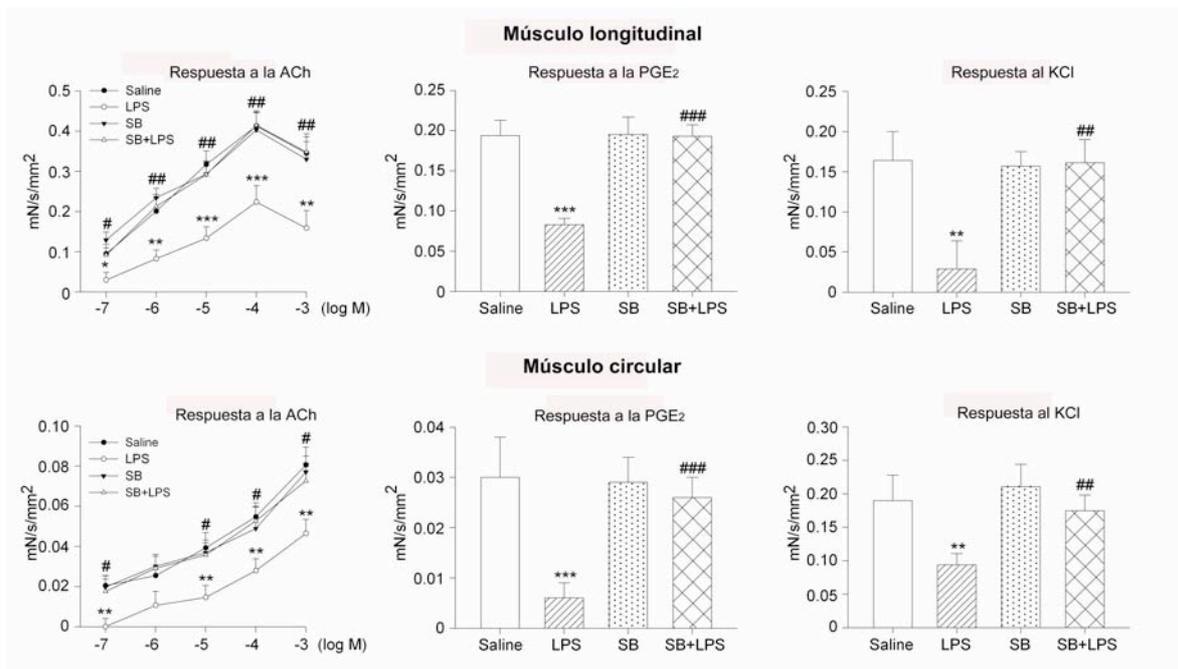


Fig. 1. Estudio de las contracciones inducidas en el duodeno de conejo por la acetilcolina (10⁻⁷ a 10⁻³ mol/l), la prostaglandina E₂ (10⁻⁷ mol/l) y el KCl (80 mol/l) en el músculo liso longitudinal y circular expresados como respuesta motora. El SB203580 (30 µg/kg) inyectado i.v. 15 min antes del LPS (0.2 µg/kg) bloqueó el efecto del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl. Cada punto representa los valores medios de la respuesta motora (mN/s/mm²) y las barras verticales indican el error estándar. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 respecto a la solución salina; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 respecto al LPS.

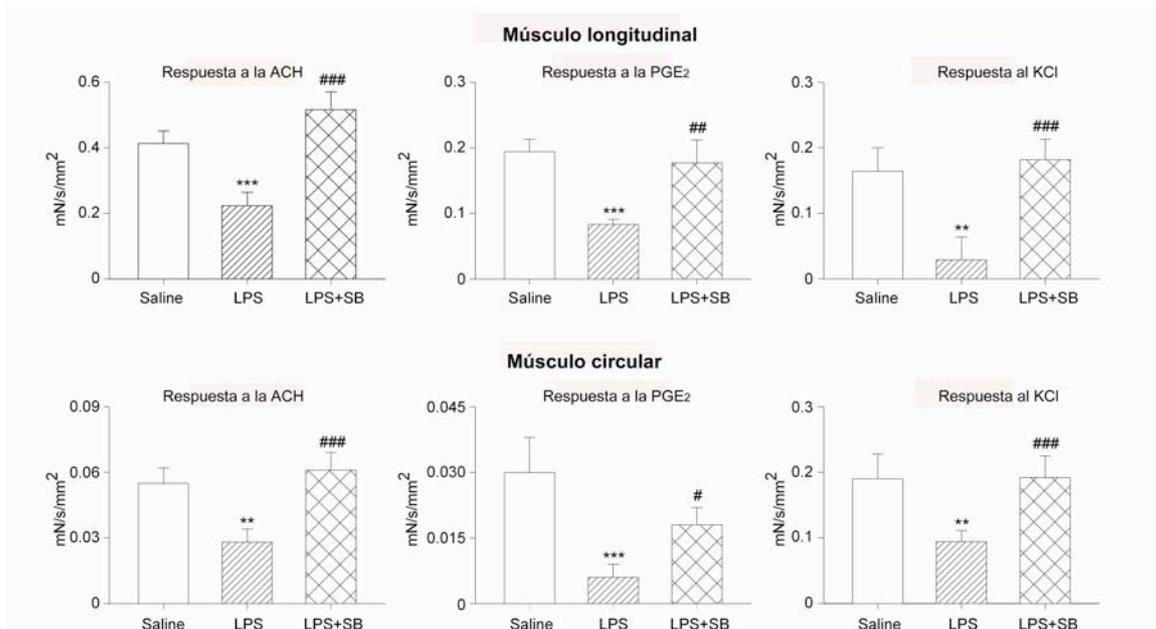


Fig. 2. Estudio de las contracciones inducidas en el duodeno de conejo por la acetilcolina (10^{-4} mol/l), la prostaglandina E_2 (10^{-7} mol/l) y el KCl (80 mol/l) en el músculo liso longitudinal y circular de duodeno de conejo. El SB203580 (10^{-7} mol/l) añadido *in vitro* 15 minutos antes de la acetilcolina, la prostaglandina E_2 y el KCl bloqueó el efecto del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E_2 y el KCl. Cada punto representa los valores medios de la respuesta motora (mN/s/mm²) y las barras verticales indican el error estándar. **P<0.01, ***P<0.001 respecto a la solución salina; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 respecto al LPS.

Efecto del LPS sobre la oxidación de lípidos y proteínas

Los niveles de oxidación lipídica y proteica se midieron en plasma y homogeneizados de duodeno después de 90 minutos de tratamiento de los conejos con solución salina o LPS (0.2 μ g/kg). El tratamiento con LPS incrementó significativamente los niveles de MDA + 4-HDA en un 79% en plasma (Fig. 2a) y en un

70% en el tejido duodenal (Fig. 3a); los contenidos en carbonilos en un 31% en plasma (Fig. 2b) y en un 53% en el tejido (Fig. 3b). Cuando los conejos se trataron con SB203580 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) inyectado antes del LPS, estos incrementos fueron bloqueados (Fig. 2 y 3). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de MDA + 4-HDA ni carbonilos entre los conejos tratados con SB203580 o solución salina.

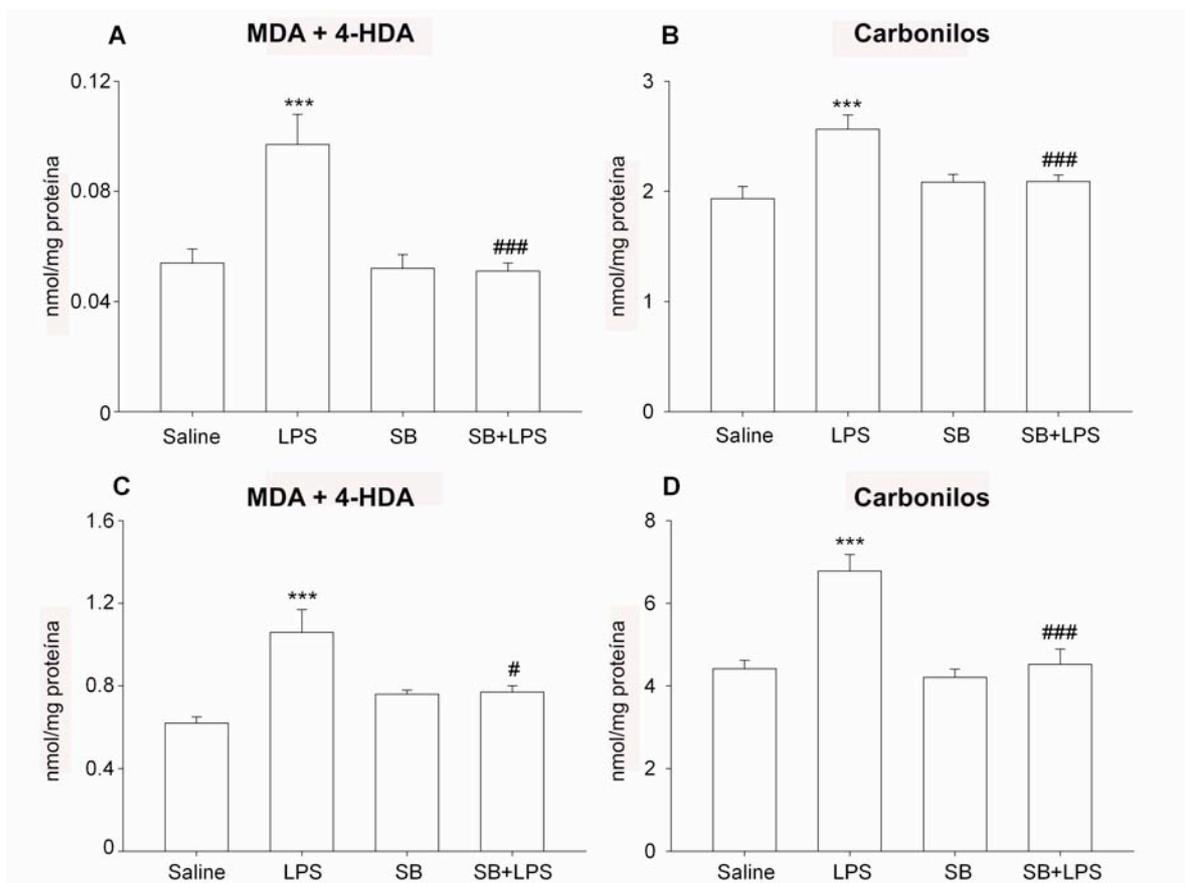


Fig. 3. Concentraciones de MDA + HDA en el plasma (A) y el duodeno (C) de conejos y el contenido en carbonilos en las proteínas en el plasma (B) y en el duodeno (D) de conejo. El LPS (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) incrementó las concentraciones de MDA + HDA y de carbonilos, y el SB203580 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) abolió este incremento. Las columnas representan valores medios (mmol/mg de proteína) y las barras verticales indican el error estándar. *** $P < 0.001$ respecto a la solución salina; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ respecto al LPS

Análisis de western blot

La expresión de la p38 MAPK se analizó mediante western blot con anticuerpos anti-p38 fosforilada. Los niveles de p38 MAPK total se determinaron para medir la tasa de activación (p-p38/total p38). Los niveles de actina se determinaron para verificar que los cambios en la p38 fosforilada eran debidos a los niveles de fosforilación y no a diferentes cargas de proteína.

En los western blots se observó una banda de aproximadamente 38 kDa correspondiente a la p38 y p-p38. El tratamiento con LPS no modificó la cantidad de la p38 total. Sin embargo el LPS (0.2, 2 and 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) incrementó el nivel de activación de la p38 MAPK en todas las dosis ensayadas, aunque no hubo diferencias entre las dosis (Fig. 4).

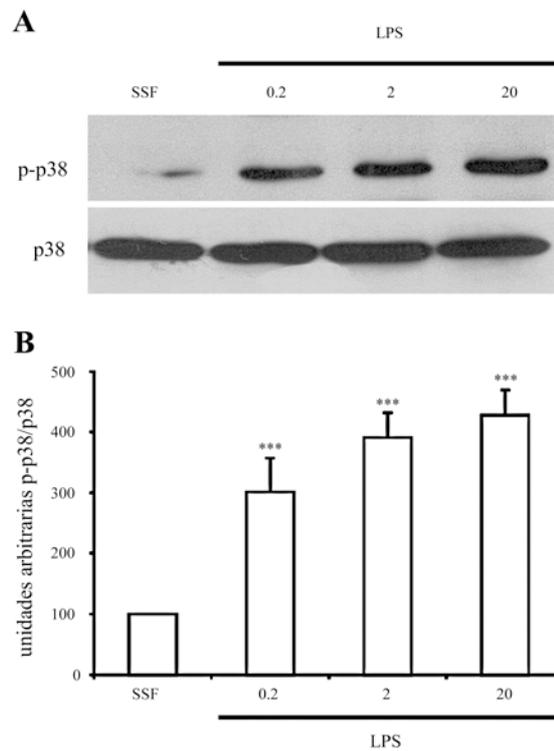


Fig. 4. Efecto de las diferentes dosis de LPS (0.2, 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) sobre la activación de la p38 MAPK en tejido duodenal obtenido de conejos. (A) La fosforilación de la p38 se utilizó como un indicador del estado de activación de la p38 en el análisis de western blot. El LPS incrementó la cantidad de p-p38 MAPK a todas las dosis. (B) Análisis densitométrico de p-p38/total p38. Los datos están expresados como unidades arbitrarias \pm error estándar, con respecto al tratamiento con solución salina (100%). Imágenes representativas de al menos tres animales diferentes. *** $P < 0.001$ respecto a la solución salina.

A la dosis de LPS 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la activación de la p38 MAPK comenzó a los 30 minutos tras la administración del LPS y la cantidad de p-p38 incrementó con el tiempo hasta los 90 min-4 h después del LPS. A las 8 horas se alcanzaron los valores control (Fig. 5).

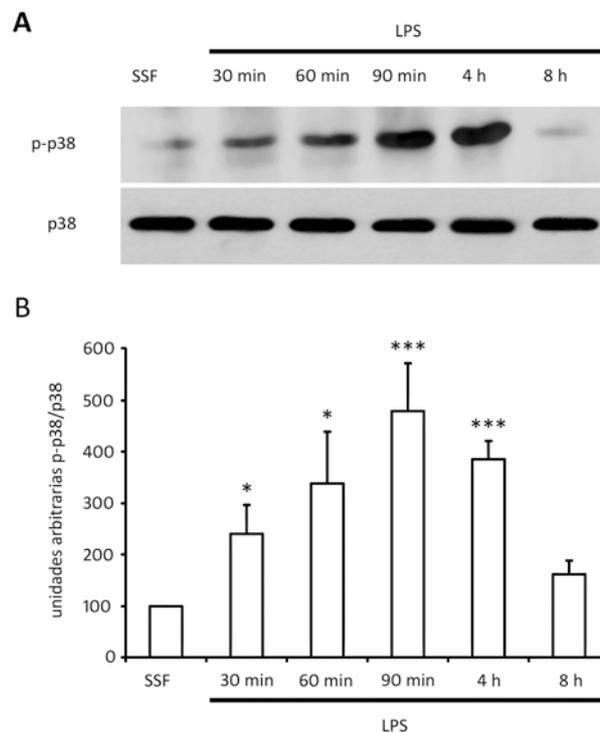


Fig. 5. Efectos del LPS sobre la expresión de la p38 MAPK en el tejido duodenal obtenido de conejos tratados a diferentes tiempos. (A) La fosforilación de la p38 se utilizó como un indicador del estado de activación de la p38 en los análisis de western blot. El LPS (0.2 μ g/kg) incrementó la fosforilación de la p38 MAPK de una forma tiempo dependiente con una activación máxima entre 90 minutos y 4 horas. (B) Análisis densitométrico de p-p38/total p38. Los datos están expresados como unidades arbitrarias \pm error estándar con respecto al tratamiento con solución salina (100%). Imágenes representativas de al menos tres animales diferentes. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ respecto a la solución salina.

La dosis 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de LPS durante 90 minutos se empleó para estudiar el efecto del SB203580. El tratamiento con el SB203580 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) antes de la administración del LPS inhibió significativamente la activación de la p38 inducida por el LPS en el duodeno de conejo (Fig. 6).

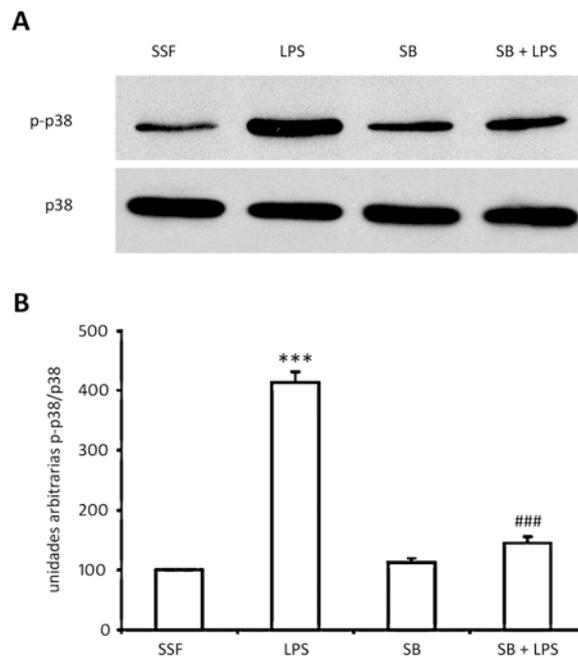


Fig. 6. Efecto del SB203580 sobre la activación de la p38 MAPK inducida por el LPS en el tejido duodenal de conejo. (A) La fosforilación de la p38 se utilizó como un indicador del estado de activación de la p38 en los análisis de western blot. (B) Análisis densitométrico de p-p38/total p38. El tratamiento con SB203580 (30 $\mu\text{g}/\text{kg}$) redujo significativamente el incremento en la fosforilación de la p38 por el LPS (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Los datos están expresados como unidades arbitrarias \pm error estándar con respecto al tratamiento con solución salina (100%). Imágenes representativas de al menos tres animales diferentes. *** $P < 0.001$ respecto a la solución salina; ### $P < 0.001$ respecto al LPS.

Inmunohistoquímica

Se examinó la expresión de la p-p38 en segmentos de duodeno de conejos tratados con LPS (0.2 µg/kg) (7b y 7d) o con solución salina (7c) durante 90 minutos. La expresión de la p-p38 se encontró tanto en los conejos tratados con solución salina como con LPS. Una elevada expresión de la p-p38 se encontró en las neuronas de los ganglios mientéricos y submucosos y en las glándulas de Brunner de la mucosa, así como un moderado marcaje en las células epiteliales de las vellosidades intestinales y en el músculo liso (Fig.s 7b, 7c y 7d). La especificidad del marcaje obtenido se controló omitiendo el anticuerpo primario en algunos cortes, con una clara supresión de la señal observada (Fig. 7a).

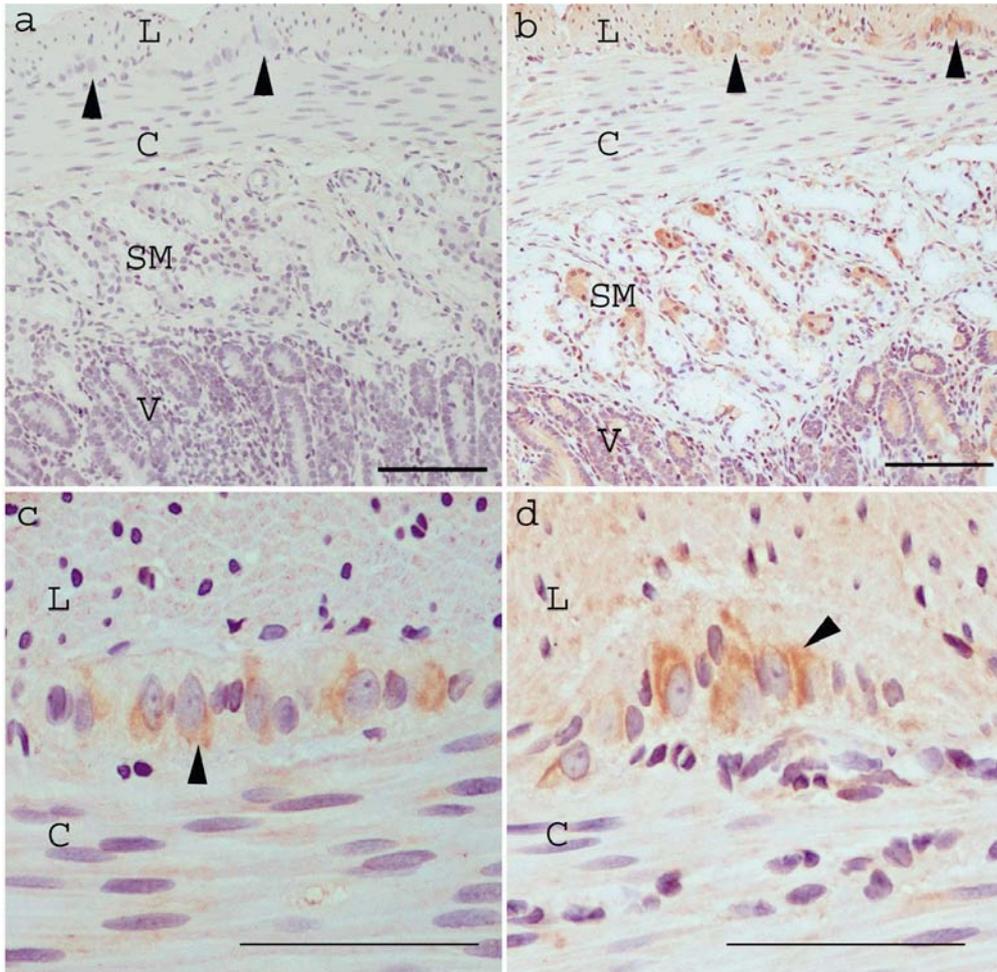


Fig. 7. Localización de la p-p38 en el duodeno de conejos tratados con LPS (b y d) o solución salina (c) utilizando el método de la avidina-biotina y la diaminobenzidina. La fotografía 'a' muestra un corte de duodeno en el que el anticuerpo primario se suprimió para controlar la especificidad del marcaje obtenido. Cortes representativos de 3 animales diferentes. Barras en a y b = 100 μ m. Barras en c y d = 50 μ m. Aumentos x100 (a, b), x400 (c, d). V: células epiteliales de las vellosidades intestinales; SM: submucosa; L y C: capas de músculo liso longitudinal (L) y circular (C); flechas: neuronas de los ganglios mientéricos.

DISCUSIÓN

El tratamiento de los conejos con LPS disminuyó las contracciones inducidas por la acetilcolina tanto en el músculo longitudinal como en el circular del duodeno e incrementó los niveles de MDA+4-HDA y de carbonilos en el plasma y en el tejido duodenal. Las alteraciones de la motilidad intestinal inducidas por el LPS han sido previamente estudiadas por medio de técnicas *in vitro* e *in vivo* (Weisbrodt et al., 1996; Plaza et al., 1997; Eskandari et al., 1999; Rebollar et al., 2002; Guerrero-Lindner et al., 2003; Grasa et al., 2008). En ratas tratadas con LPS, la amplitud de las contracciones espontáneas se redujo y la frecuencia de las ondas lentas no cambió en las células musculares lisas de yeyuno (Eskandari et al., 1999). Sin embargo, el LPS no modificó las contracciones espontáneas de tiras musculares longitudinales de yeyuno en rata (Eskandari et al., 1999). En conejos tratados con LPS, bajas dosis de LPS no afectaron a la frecuencia y amplitud de las contracciones espontáneas del músculo longitudinal del intestino delgado, mientras que altas dosis de endotoxina redujeron la frecuencia de las contracciones (Rebollar et al., 2002). Nuestros resultados concuerdan, en parte, con un estudio en el cual las contracciones fásicas espontáneas y las contracciones gigantes no fueron afectadas por la inflamación, pero las respuestas a la acetilcolina fueron suprimidas en ratas tratadas con sulfato sódico de dextrano (Gonzalez y Sarna, 2001).

El estrés oxidativo se caracteriza por un desequilibrio entre las especies reactivas del oxígeno, especies reactivas del nitrógeno y los sistemas de defensa antioxidantes (Goode y Webster, 1993; Victor et al., 2004). Además, se ha demostrado la implicación de las especies reactivas del oxígeno en la patogénesis de las alteraciones motoras gastrointestinales inducidas por el LPS (Pons et al., 1991; de Winter et al., 2005). El LPS incrementa la formación de las especies reactivas del oxígeno y de los productos de

la peroxidación lipídica como los aniones superóxido y peróxido y sus productos secundarios, MDA o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs), en diferentes tejidos como el hígado o pulmón (Giralt et al., 1993). La endotoxina incrementa los niveles de peroxidación lipídica en la sangre de conejos y de ratones (Lavicky y Raskova, 1991); los niveles de TBARs en el suero de rata y en hígado (Giralt et al., 1993) y en el tejido ileal de ratón (De Filippis et al., 2008). Se ha puesto de manifiesto la presencia de estrés oxidativo mediante los niveles elevados de MDA en miocitos después de una situación de hipoxia y en el suero tras quemaduras (Zhang et al., 2008). En otros estudios, se ha demostrado el estrés oxidativo mediante la presencia de nitrotirosina y de 4-hidroxi-2-nonenal en la mucosa gástrica e ileal de ratones tratados con LPS (de Winter et al., 2005). La presencia de grupos carbonilos se ha usado como un marcador de la oxidación proteica mediada por radicales libres (Levine et al., 1994). En ratas tratadas con LPS, la peroxidación lipídica y los carbonilos proteicos se elevaron en los homogeneizados de hígado (Lu et al., 2005) y en homogeneizados de mitocondrias cardíacas (Supinski y Callahan, 2006).

Un elevado número de artículos describen que un estado proinflamatorio y oxidativo está relacionado con la patogénesis y la progresión del shock séptico inducido por la endotoxina. Esto es confirmado por el hecho de que los antioxidantes tienen efectos terapéuticos en la sepsis inducida por el LPS y sus consiguientes alteraciones gastrointestinales (Goode y Webster, 1993; De Filippis et al., 2008; Fagundes et al., 2010). El efecto beneficioso de la melatonina en las alteraciones motoras inducidas por el LPS está asociado con una reducción en la peroxidación lipídica y en la activación de las MAPK (De Filippis et al., 2008). El papel del estrés oxidativo en nuestro modelo de

LPS se confirmó mediante los datos del incremento de los niveles de MDA + 4-HDA y de carbonilos tanto en el plasma como en el duodeno.

Los mediadores inflamatorios liberados durante las enfermedades agudas y crónicas activan múltiples cascadas intracelulares incluyendo la vía de transducción de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Herlaar y Brown, 1999; Ono y Han, 2000). Nuestros resultados muestran que la inhibición del LPS sobre las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl en el músculo liso duodenal fue antagonizada por el SB203580, un inhibidor de la p38 MAPK. Además, el incremento de los niveles de MDA+4HDA y de carbonilos en el plasma y el tejido provocados por el LPS fue atenuado por el SB203580, mostrando la participación de la p38 en la formación de radicales libres y el consiguiente daño en los órganos. En el estrés y la inflamación, el LPS activa las tres MAPKs: la p38, la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y la cinasa c-Jun-N- terminal (JNK) (Kyriakis y Avruch, 2001). Un tipo de inhibidores específicos de la p38, los piridinimidazoles, están hoy en día disponibles y son el objetivo de las investigaciones antiinflamatorias actualmente. El SB203580, está siendo ampliamente utilizado por ser reconocido como un producto específico frente a la p38 MAPK (Cuenda et al., 1995). Además, el SB203580 es el inhibidor de la p38 más utilizado y actúa bloqueando la actividad catalítica de la enzima en el sitio de unión del ATP (Young et al., 1997). Existe cierta controversia en cuanto al mecanismo de acción de este inhibidor. Algunos autores sugieren que este inhibidor actúa sin afectar a la capacidad de la p38 de ser fosforilada por sus cinasas anteriores en la cascada (Young et al., 1997; Hollenbach et al., 2004), mientras que otros argumentan que el SB203580 sí que reduce el nivel de fosforilación de la p38 MAPK (Frantz et al., 1998; Fatima et al., 2001; Ihara et al., 2007).

Nuestros datos sobre el SB203580 concuerdan con todos ellos: la p38 regula la transcripción de varios mediadores proinflamatorios como la iNOS, la COX-2, el TNF- α o la IL-1 β (Waetzig et al., 2002; Eckert et al., 2007; Gan et al., 2007; Zhang et al., 2008), que, a su vez, incrementan la liberación de radicales libres. Estos efectos concuerdan con nuestros resultados, donde el LPS incrementa la activación de la p38 y la formación de productos del daño oxidativo. Por otra parte, se ha descrito que los radicales libres activan la p38 (McCubrey et al., 2006). Por tanto, se propone que podría existir un mecanismo de retroalimentación o “feedback” positivo, ya que la activación de la p38 incrementa la liberación de radicales libres y los radicales libres activan la p38. Por tanto, mediante el bloqueo de la p38 con el SB203580, se disminuye la producción de radicales libres y la activación de la vía de la p38 y finalmente, la fosforilación de la p38.

Nuestros datos muestran como el tratamiento con LPS aumentó la expresión de la p-p38 en homogeneizados de duodeno de una forma dosis dependiente pero no modificó la expresión de la p38 total. La expresión de la p-p38 MAPK se incrementó a diferentes tiempos de tratamiento con la endotoxina (a la dosis de 0.2 μ g/kg) con una máxima activación entre 90 min y 4 horas. Estos datos concuerdan con resultados previos de nuestro grupo en los que el tratamiento con el LPS tuvo un efecto máximo sobre la contractilidad intestinal a los 90 minutos, mientras que a las 12 horas la contractilidad era similar a los niveles control (Rebollar et al., 2002).

Se observó que el LPS incrementó la expresión de la p-p38 MAPK en homogeneizados de duodeno y que el SB203580 redujo este incremento. Estos efectos concuerdan, en parte, con un estudio de leucocitos equinos en el cual la expresión de la p-p38 incrementó con el LPS de forma dosis dependiente con una máxima activación

después de 30 minutos (Eckert et al., 2007). Por otro lado, los niveles más elevados de fosforilación de la p38 MAPK se detectaron entre los 30-60 min de la estimulación con LPS, seguidos de una rápida recuperación a los niveles basales de expresión en miofibroblastos de intestino de ratón (Walton et al., 2009). Además, la expresión de la p-p38 MAPK incrementó de forma notable entre las 2-8 horas en el tejido intestinal de ratas sometidas a quemaduras (Gan et al., 2007).

En nuestro estudio se ha encontrado una expresión elevada de la p-p38 MAPK en las neuronas de los ganglios mientéricos y en las glándulas de Brunner de la mucosa del duodeno de conejo. Hasta la fecha, este es el primer estudio en el que se ha descrito la localización de la p-p38 MAPK en las neuronas de los ganglios mientéricos. En otros estudios, la expresión de la p-p38 se ha localizado principalmente en los núcleos de las células de las criptas, con una pequeña cantidad en las células de las vellosidades en intestino de rata después de lesiones por isquemia/reperfusión (Fu et al., 2003). Un marcaje más leve se encontró en el músculo liso. El daño producido por los radicales libres liberados por la activación de la p38 en el sistema nervioso entérico, en las células del músculo liso y en los tejidos próximos podría ser responsable de las alteraciones motoras intestinales. Aunque la máxima expresión de la p-p38 se encontró en el plexo mientérico, se podría pensar también que los radicales libres producidos allí puedan afectar a los tejidos más próximos como las células del músculo liso. De este modo, la capacidad de las células musculares lisas para responder a sustancias exógenas en el baño de órganos podría verse afectada por estos efectos.

Se ha descrito que la p38 MAPK está activada en motoneuronas degenerativas, por ejemplo, la activación de la p38 MAPK podría contribuir en la patología de las motoneuronas en la esclerosis lateral amiotrófica (Bendotti et al., 2004). De cualquier

forma, se ha observado una elevada prevalencia de alteraciones funcionales en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y se ha observado que la p38 está activada en esta enfermedad (Waetzig et al., 2002).

Este estudio indica que el LPS reduce las contracciones inducidas por la acetilcolina, la prostaglandina E₂ y el KCl e incrementa los niveles de MDA y carbonilos y la expresión de la p-p38 MAPK. Estos efectos se redujeron por el inhibidor de la p38 MAPK, SB203580. La p-p38 MAPK se localizó principalmente en las neuronas de los ganglios mientéricos, con una moderada expresión en el músculo liso.

En conclusión, nuestros resultados indican que el LPS disminuye la contractilidad duodenal e incrementa la producción de radicales libres y que la p38 puede ser clave de estos efectos.

RECONOCIMIENTOS

Nos gustaría agradecer al Dr José Emilio Mesonero su asistencia técnica en el estudio de western blotting.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, España (Dirección General de Investigación AGL2006-04317 y ERDF) y el Gobierno de Aragón (B61/2006, 2007, 2008). El Ministerio de Educación y Ciencia, España ha proporcionado una beca personal para Sergio Gonzalo (BES-2007-15646).

REFERENCIAS

- Bendotti, C., C. Atzori, R. Piva, M. Tortarolo, M. J. Strong, S. DeBiasi y A. Migheli (2004). "Activated p38MAPK is a novel component of the intracellular inclusions found in human amyotrophic lateral sclerosis and mutant SOD1 transgenic mice." J Neuropathol Exp Neurol 63(2): 113-9.
- Bergeron, C. (1995). "Oxidative stress: its role in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol Sci 129 Suppl: 81-4.
- Bradham, C. y D. R. McClay (2006). "p38 MAPK in development and cancer." Cell Cycle 5(8): 824-8.
- Cuenda, A., J. Rouse, Y. N. Doza, R. Meier, P. Cohen, T. F. Gallagher, P. R. Young y J. C. Lee (1995). "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1." FEBS Lett 364(2): 229-33.
- De Filippis, D., T. Iuvone, G. Esposito, L. Steardo, G. H. Arnold, A. P. Paul, G. De Man Joris y Y. De Winter Benedicte (2008). "Melatonin reverses lipopolysaccharide-induced gastro-intestinal motility disturbances through the inhibition of oxidative stress." J Pineal Res 44(1): 45-51.
- de Winter, B. Y., L. van Nassauw, J. G. de Man, F. de Jonge, A. J. Bredenoord, T. C. Seerden, A. G. Herman, J. P. Timmermans y P. A. Pelckmans (2005). "Role of oxidative stress in the pathogenesis of septic ileus in mice." Neurogastroenterol Motil 17(2): 251-61.
- Eckert, R. E., L. E. Neuder, J. L. Bell, J. C. Trujillo y S. L. Jones (2007). "The role of p38 mitogen-activated kinase (MAPK) in the mechanism regulating cyclooxygenase gene expression in equine leukocytes." Vet Immunol Immunopathol 118(3-4): 294-303.

- Eskandari, M. K., J. C. Kalff, T. R. Billiar, K. K. Lee y A. J. Bauer (1999). "LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity." Am J Physiol 277(2 Pt 1): G478-86.
- Esterbauer, H. y K. H. Cheeseman (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal." Methods Enzymol 186: 407-21.
- Fagundes, D. S., S. Gonzalo, M. P. Arruebo, M. A. Plaza y M. D. Murillo (2010). "Melatonin and Trolox ameliorate duodenal LPS-induced disturbances and oxidative stress." Dig Liver Dis 42(1): 40-4.
- Fatima, S., Z. Khandekar, J. H. Parmentier y K. U. Malik (2001). "Cytosolic phospholipase A2 activation by the p38 kinase inhibitor SB203580 in rabbit aortic smooth muscle cells." J Pharmacol Exp Ther 298(1): 331-8.
- Frantz, B., T. Klatt, M. Pang, J. Parsons, A. Rolando, H. Williams, M. J. Tocci, S. J. O'Keefe y E. A. O'Neill (1998). "The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding." Biochemistry 37(39): 13846-53.
- Fu, X. B., F. Xing, Y. H. Yang, T. Z. Sun y B. C. Guo (2003). "Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury." World J Gastroenterol 9(9): 2036-9.
- Gan, H. T., P. J. Pasricha y J. D. Chen (2007). "Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway ameliorates delayed intestinal transit in burned rats." Am J Surg 193(4): 530-7.

- Giralt, M., T. Gasull, A. Blaquez y J. Hidalgo (1993). "Effect of endotoxin on rat serum, lung and liver lipid peroxidation and on tissue metallothionein levels." Rev Esp Fisiol 49(2): 73-8.
- Gonzalez, A. y S. K. Sarna (2001). "Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(4): G546-54.
- Goode, H. F. y N. R. Webster (1993). "Free radicals and antioxidants in sepsis." Crit Care Med 21(11): 1770-6.
- Grasa, L., M. P. Arruebo, M. A. Plaza y M. D. Murillo (2008). "A downregulation of nNOS is associated to dysmotility evoked by lipopolysaccharide in rabbit duodenum." J Physiol Pharmacol 59(3): 511-24.
- Guerrero-Lindner, E., M. Castro, J. M. Munoz, M. P. Arruebo, M. D. Murillo, L. Bueno y M. A. Plaza (2003). "Central tumour necrosis factor-alpha mediates the early gastrointestinal motor disturbances induced by lipopolysaccharide in sheep." Neurogastroenterol Motil 15(3): 307-16.
- Herlaar, E. y Z. Brown (1999). "p38 MAPK signalling cascades in inflammatory disease." Mol Med Today 5(10): 439-47.
- Hollenbach, E., M. Neumann, M. Vieth, A. Roessner, P. Malfertheiner y M. Naumann (2004). "Inhibition of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease." Faseb J 18(13): 1550-2.
- Hori, M., M. Kita, S. Torihashi, S. Miyamoto, K. J. Won, K. Sato, H. Ozaki y H. Karaki (2001). "Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280(5): G930-8.

- Hussain, S. y T. L. Delovitch (2005). "Dysregulated B7-1 and B7-2 expression on nonobese diabetic mouse B cells is associated with increased T cell costimulation and the development of insulinitis." J Immunol 174(2): 680-7.
- Ihara, E., L. Moffat, J. Ostrander, M. P. Walsh y J. A. MacDonald (2007). "Characterization of protein kinase pathways responsible for Ca²⁺ sensitization in rat ileal longitudinal smooth muscle." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293(4): G699-710.
- Kooreman, K., C. Babbs y J. Fessler (1998). "Effect of ischemia and reperfusion on oxidative processes in the large colon and jejunum of horses." Am J Vet Res 59(3): 340-6.
- Kyriakis, J. M. y J. Avruch (2001). "Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation." Physiol Rev 81(2): 807-69.
- Lavicky, J. y H. Raskova (1991). "Different stressors and blood lipid peroxidation." Arzneimittelforschung 41(8): 793-6.
- Levine, R. L., J. A. Williams, E. R. Stadtman y E. Shacter (1994). "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins." Methods Enzymol 233: 346-57.
- Lih-Brody, L., S. R. Powell, K. P. Collier, G. M. Reddy, R. Cerchia, E. Kahn, G. S. Weissman, S. Katz, R. A. Floyd, M. J. McKinley, S. E. Fisher y G. E. Mullin (1996). "Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease." Dig Dis Sci 41(10): 2078-86.
- Lu, Y., X. Wang y A. I. Cederbaum (2005). "Lipopolysaccharide-induced liver injury in rats treated with the CYP2E1 inducer pyrazole." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 289(2): G308-19.

- McCubrey, J. A., M. M. Lahair y R. A. Franklin (2006). "Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways." Antioxid Redox Signal 8(9-10): 1775-89.
- McKenzie, S. J., M. S. Baker, G. D. Buffinton y W. F. Doe (1996). "Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease." J Clin Invest 98(1): 136-41.
- Nowak, D., T. Pietras, A. Antczak, M. Krol y G. Piasecka (1993). "Effect of bacterial lipopolysaccharide on the content of lipid peroxidation products in lungs and other organs of mice." Antonie Van Leeuwenhoek 63(1): 77-83.
- Ono, K. y J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal 12(1): 1-13.
- Onyango, I. G., J. B. Tuttle y J. P. Bennett, Jr. (2005). "Activation of p38 and N-acetylcysteine-sensitive c-Jun NH2-terminal kinase signaling cascades is required for induction of apoptosis in Parkinson's disease cybrids." Mol Cell Neurosci 28(3): 452-61.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman y M. H. Cobb (2001). "Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions." Endocr Rev 22(2): 153-83.
- Plaza, M. A., J. Fioramonti y L. Bueno (1997). "Role of central interleukin-1 beta in gastrointestinal motor disturbances induced by lipopolysaccharide in sheep." Dig Dis Sci 42(2): 242-50.
- Pons, L., M. T. Droy-Lefaix, P. Braquet y L. Bueno (1991). "Role of free radicals and platelet-activating factor in the genesis of intestinal motor disturbances induced by Escherichia coli endotoxins in rats." Gastroenterology 100(4): 946-53.

- Rebollar, E., M. P. Arruebo, M. A. Plaza y M. D. Murillo (2002). "Effect of lipopolysaccharide on rabbit small intestine muscle contractility in vitro: role of prostaglandins." Neurogastroenterol Motil 14(6): 633-42.
- Rebollar, E., E. Guerrero-Lindner, M. P. Arruebo, M. A. Plaza y M. D. Murillo (2003). "Role of prostaglandins in lipopolysaccharide effects on K⁺-induced contractions in rabbit small intestine." Acta Physiol Scand 179(3): 299-307.
- Supinski, G. S. y L. A. Callahan (2006). "Polyethylene glycol-superoxide dismutase prevents endotoxin-induced cardiac dysfunction." Am J Respir Crit Care Med 173(11): 1240-7.
- van der Vliet, A. y A. Bast (1992). "Role of reactive oxygen species in intestinal diseases." Free Radic Biol Med 12(6): 499-513.
- Victor, V. M., M. Rocha y M. De la Fuente (2004). "Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis." Int Immunopharmacol 4(3): 327-47.
- Waetzig, G. H., D. Seegert, P. Rosenstiel, S. Nikolaus y S. Schreiber (2002). "p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- α signaling in inflammatory bowel disease." J Immunol 168(10): 5342-51.
- Walton, K. L., L. Holt y R. B. Sartor (2009). "Lipopolysaccharide activates innate immune responses in murine intestinal myofibroblasts through multiple signaling pathways." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296(3): G601-11.
- Weisbrodt, N. W., T. A. Pressley, Y. F. Li, M. J. Zembowicz, S. C. Higham, A. Zembowicz, R. F. Lodato y F. G. Moody (1996). "Decreased ileal muscle contractility and increased NOS II expression induced by lipopolysaccharide." Am J Physiol 271(3 Pt 1): G454-60.

Young, P. R., M. M. McLaughlin, S. Kumar, S. Kassis, M. L. Doyle, D. McNulty, T. F. Gallagher, S. Fisher, P. C. McDonnell, S. A. Carr, M. J. Huddleston, G. Seibel, T. G. Porter, G. P. Livi, J. L. Adams y J. C. Lee (1997). "Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site." J Biol Chem 272(18): 12116-21.

Zhang, J. P., X. Ying, Y. Chen, Z. C. Yang y Y. S. Huang (2008). "Inhibition of p38 MAP kinase improves survival of cardiac myocytes with hypoxia and burn serum challenge." Burns 34(2): 220-7.