



**CONSORCI SANITARI  
DEL MARESME**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Estudio de la fisiología del esfínter anal interno porcino y de la rata, y de la fisiopatología de las alteraciones de la motilidad del esfínter anal interno en pacientes con fisura anal**

**Memoria presentada por Alvaro Javier Opazo Valdés  
para optar al grado de Doctor**

**Programa de Doctorado en Neurociencias**

Hospital de Mataró, 2011

**HOSPITAL DE MATARO  
Unidad de Exploraciones Funcionales Digestivas**

**FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología  
Universidad Autònoma de Barcelona**





CONSORCI SANITARI  
DEL MARESME



Universitat Autònoma de Barcelona

PERE CLAVÉ CIVIT, Hospital de Mataró y Profesor asociado de la Universidad Autónoma de Barcelona

HAGO CONSTAR

Que la memoria titulada “*Estudio de la fisiología del esfínter anal interno porcino y de la rata, y de la fisiopatología de las alteraciones de la motilidad del esfínter anal interno en pacientes con fisura anal*” presentada por ALVARO JAVIER OPAZO VALDES para optar al grado de Doctor, ha estado desarrollada en el marco del Grupo de Investigación CIBEREHD CSDM-UAB, se ha realizado bajo mi dirección, y al considerarla concluida, autorizo su presentación para ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos firmo la presente.

Hospital de Mataró, 30 Mayo 2011

Dr. Pere Clave Civit, MD, PhD.

Unidad Exploraciones Funcionales Digestivas – Departamento de Cirugía Hospital de Mataró  
Profesor Asociado. Departamento de Cirugía, Universidad Autónoma de Barcelona  
Director de la tesis



## **AGRADECIMIENTOS**

A mí director de tesis, el Dr. Pere Clavé por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto. Por su apoyo, colaboración y por guiarme en el desarrollo de esta tesis doctoral, mostrándome el sacrificio y perseverancia para conseguir las cosas.

A mí tutor, el Dr. Marcel Jiménez por la energía que transmite durante las conversaciones o discusiones científicas y por el apoyo durante el desarrollo de esta tesis.

A Bego por toda su ayuda, apoyo y comprensión durante estos años de tesis, por las eternas conversaciones y discusiones dentro del laboratorio, y sobretodo por las que tuvimos en el tren desde la UAB a Barna... por todo, gracias.

A Diana por estos últimos años donde hemos compartido mas tiempo, y por la cooperación fundamental en el capítulo 2 de esta tesis, además, de tus grandes chistes en los beer-club.

A Laia por compartir la etapa final de la tesis, por traernos de Mataró y por el gran congreso del Catalán de Digestivo de Blanes.

A Mariona por introducirme en el “mundo” del laboratorio 115 enseñándome las técnicas y dándome las bases para iniciarme en la investigación.

A Ricard por los experimentos preliminares realizados en porcino.

A Víctor por las vueltas de la vida, de esa guardia nocturna en el hospital de la UAB donde estuvimos de urgencias tratando de salvar la vida de un perro, para luego encontrarnos compartiendo horas de experimentos, salvándonos ahora nosotros mismos.

A Lorena, Claudia y Emma por el apoyo técnico que me brindaron durante la realización de esta tesis, por su paciencia y comprensión.

A Joan Antoni Fernández por su desinteresada cooperación en el capítulo 2.

A Jane Lewis por la revisión del inglés de los manuscritos y de los abstracts.

A las Dras. Maria Jose Fantova y Carme Admella, a los Drs. Fran Espin, Adolfo Heredia y Luis Hidalgo del Hospital de Mataró. Y a la Dra. Silvia Jané del Hospital de Callela.

A Escorxador Frigorific Avinyo SA por la donación desinteresada del tejido porcino utilizado en la primera parte de este estudio.

Alvaro



**ABREVIATURAS**

**ACh** acetilcolina

**ADP** adenosina difosfato

**ADPbS** adenosina 5'-O-2-tiodifosfato

**AF** anal fissure

**AH** “*afterhyperpolarization*”

**AT<sub>1</sub> / AT<sub>2</sub>** receptores de angiotensina

**ATP** adenosina 5'-trifosfato

**cAMP** adenosina monofosfato cíclico

**cGMP** guanosina monofosfato cíclico

**CO** monóxido de Carbono

**DAG** diacilglicerol

**DMSO** dimetilsulfóxido

**EAS** esfínter anal externo o “*external anal sphincter*”

**EFS** estimulación eléctrica de campo o “*electrical field stimulation*”

**EMG** electromyography

**IAS** esfínter anal interno o “*internal anal sphincter*”

**IC<sub>50</sub>** concentración inhibitoria al cincuenta por ciento

**ICC** célula intersticial de Cajal

**IJP** potencial postunión inhibitorio o “*inhibitory junction potential*”

**IJPf** potencial postunión inhibitorio rápido o “*inhibitory junction potential fast*”

**IJPs** potencial postunión inhibitorio lento o “*inhibitory junction potential slow*”

**s-IJP** potencial postunión inhibitorio espontáneo o “*spontaneous inhibitory junction potential*”

**IP<sub>3</sub>** inositol 1,4,5-trifosfato

**IPAN** neurona intrínseca aferentes primaria o “*intrinsic primary afferent neurons*”

**LES** esfínter esofágico inferior o “*lower esophageal sphincter*”

**LM** músculo longitudinal o “*longitudinal muscle*”

**L-NNA** Nw-nitro-L-arginina

**MNs** motoneuronas o “*motor neurons*”

**MP** plexo mientérico o de Auerbach

**MeRAP** mean resting anal pressure

**MRAP** maximal resting anal pressure

**MRS 2179** N<sup>6</sup>-metil 2'-deoxiadenosina 3',5'-bisfosfato

**nAChRs** receptores nicotínicos de acétil colina o “*nicotinic acetyl choline receptors*”

**NANC** no adrenérgico no colinérgico

**NKA** neuroquinina A

**NO** óxido nítrico

**NOS** sintasa del óxido nítrico

**PACAP** polipéptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria o “*pituitary adeylate cyclase activating polypeptide*”

**PGF2 $\alpha$**  prostaglandina F2 alfa o “*prostaglandin F2 $\alpha$* ”

**PPADS** ácido piridoxalfosfate-6-azoprenil-2',4'-disulfónico

**RAIR** reflejo rectoanal inhibitorio o “*recto anal inhibitory reflex*”

**RMP** potencial de membrana en reposo o “*resting membrane potencial*”

**sKCa** canales de potasio activados por calcio de baja conductancia

**SD-sIJP** desviación estándar de los IJP o “*standard deviation of spontaneous IJP*”

**SEM** error estándar de la media o “*standard error mean*”

**SNC** sistema nervioso central

**SNE** sistema nervioso entérico

**SP** sustancia P

**SW** slow wave

**TTX** tetrodotoxina

**USW** ultraslow wave

**VIP** polipéptido vasoactivo intestinal o “*vasoactive intestinal polypeptide*”





## PUBLICACIONES

Los estudios de esta tesis se han publicado o están pendiente de publicarse en los siguientes artículos:

**Specific And Complementary Roles For Nitric Oxide And ATP In The Inhibitory Motor Pathways To Rat Internal Anal Sphincter.** Alvaro Opazo, Begoña Lecea, Víctor Gil, Marcel Jiménez, Pere Clavé, Diana Gallego. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23 (1): E11-E25

**A Comparative Study of the Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter.** Alvaro Opazo, Begoña Lecea, Carme Admella, Maria José Fantova, Marcel Jiménez, Joan Marti-Ragué, Pere Clavé. *Dis Colom Rectum* 2009; 52 (11): 1902-1911.

**Patterns Of Impaired Internal Anal Sphincter Motility In Patients With Anal Fissure.** Opazo A, Aguirre E, Saldaña E, Fantova MJ, Clavé P. Submitted to *Neurogastroenterology and Motility*.

*En forma de abstract:*

**High Resolution Anorectal Manometry and Ultrasonography Of Internal Anal Sphincter In Patients With Anal Fissure.** Opazo A., Aguirre E., Clavé P. *Gut*, October 2010, Vol. 59 Suppl III, A199.

**Specific And Complementary Roles For Nitric Oxide And ATP In The Inhibitory Motor Pathways To Rat Internal Anal Sphincter.** A. Opazo, B. Lecea, V. Gil, M. Jiménez, P. Clavé, D. Gallego. *Gut*, October 2010, Vol. 59 Suppl III, A134.

**High Resolution Anorectal Manometry and Ultrasonography Of Internal Anal Sphincter In Patients With Anal Fissure.** Opazo A, Aguirre E, Clavé P. *Neurogastroenterology and Motility*, August 2010, Vol. 22 Suppl. 1, Page 93.

**Neural Regulation Of The Rat Internal Anal Sphincter, Hyperpolarization And Relaxation Involving Two Complementary Neurotransmitters: NO And ATP.** Alvaro Opazo, Begoña Lecea, Víctor Gil, Marcel Jiménez, Pere Clavé, Diana Gallego. *Neurogastroenterology and Motility*, August 2010, Vol. 22 Suppl. 1, Page 93.

**Regulación neural del esfínter anal interno: la hiperpolarización y la relajación están mediadas por dos neurotransmisores complementarios ATP y NO.** Alvaro Opazo, Begoña Lecea, Víctor Gil, Marcel Jiménez, Pere Clavé, Diana Gallego. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2010, Vol. 102 Supl. 1, Página 59.

**Estudio de la fisiopatología de la fisura anal mediante manometría de alta resolución y ecografía endoanal.** Alvaro Opazo, Ester Aguirre, Pere Clavé. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2010, Vol. 102 Supl. 1, Página 12.

**Dynamic activity of the internal anal sphincter in patients with anal fissure.** A. Opazo, E. Saldaña, A. Sanchez-Hugue, E. García, A. Heredia, S. Jane, J. Marti-Regue, P. Clave. *Neurogastroenterology and Motility*, August 2009, Vol. 21 Suppl. S1, Page 38.

**Actividad Motora del esfínter anal interno de pacientes con fisura anal.** Opazo A, Heredia A, Clavé P. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 2009, Vol. 100, Supl. 1, Página 39.

**Estudi comparatiu de l'estructura i la funció del múscul longitudinal del canal anal i de l'esfínter anal intern.** Opazo Valdés A., Lecea López B., Clavé I Civit P. *Suplements dels Annals de Medicina, Societat Catalana de Digestologia*, Enero 2009, Vol 92, Supl. 1, Pag. S1-64.

**A comparative study of the structure and function of the longitudinal muscle of the anal canal and the internal anal sphincter.** AJ Opazo, B Lecea, P Clavé. *Neurogastroenterology and Motility*, November 2008, Vol. 20 Suppl. 2, Page 112.

**Pharmacologic characterization of mechanism controlling relaxation of porcine internal Anal sphincter.** Opazo A, Auli M, Lecea B, Clave P. *Diseases of the Colon and Rectum*, May 2008, Vol. 51 Issue 5 Page 691.

**Caracterización farmacológica de los neurotransmisores que controlan la relajación del esfínter anal interno porcino.** A. Opazo, M. Aulí, B. Lecea, P. Clavé. *Gastroenterología y Hepatología*, Marzo 2008, Vol. 31 Num. 3.

**Pharmacologic characterization of mechanism controlling relaxation of porcine internal Anal sphincter.** Opazo A, Farre R, Auli M, Lecea B, Clave P. *Neurogastroenterology and motility*, October 2007 Vol. 19 Suppl. 3 Pages 44-45.

*Premios recibidos:*

Outstanding Poster Award. **Pharmacologic characterization of mechanism controlling relaxation of porcine internal Anal sphincter.** 21st International Symposium on Neurogastroenterology and Motility, September 2007. Jeju, Korea.

Premio a la mejor comunicación póster en la Sección Trastornos Funcionales por el trabajo: **Estudio comparativo de la estructura y función del músculo longitudinal del canal canal y el esfínter anal interno.** En la semana de las enfermedades digestivas celebrada en Sitges en Junio 2008.



## INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. ANATOMÍA DEL CANAL ANAL	2
1.1.1. Generalidades	2
1.2. ESFÍNTERES ANALES	3
1.2.1. Esfínter anal interno	3
1.2.2. Esfínter anal externo	4
1.2.3. Músculos del suelo pélvico y músculo puborectal	5
1.2.4. Músculo longitudinal del canal anal	7
1.2.5. Sistema nervioso somático	9
1.2.6. Sistema nervioso autónomo	10
1.2.7. Sistema nervioso entérico	12
1.2.8. Oxido nítrico (NO)	17
1.2.9. VIP y PACAP	18
1.2.10. ATP o purinas relacionadas	19
1.2.11. Monóxido de carbono (CO)	21
1.3. NEUROTRANSMISORES EXCITATORIOS	22
1.4. SUSTANCIAS NEUROHUMORALES QUE AFECTAN EL TONO DEL ESFÍNTER ANAL INTERNO	24
1.4.1. Angiotensina	24
1.4.2. Prostanoides	25
1.5. VASCULARIZACIÓN DEL CANAL ANAL	26
1.5.1. Flujo arterial	26
1.5.2. Flujo venoso	26
1.6. REVESTIMIENTO EPITELIAL Y MUCOSO DEL CANAL ANAL	27
1.7. FISIOLÓGÍA DEL CANAL ANAL	27
1.8. FISURA ANAL	28
1.8.1. Epidemiología	28
1.8.2. Definición	28
1.8.3. Fisiopatología	29
1.8.4. Histología	30
1.8.5. Sintomatología	30
1.8.6. Diagnóstico	31
1.8.7. Tratamiento	31
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>50</b>

<b>3. CAPÍTULO 1. A Comparative Study of the Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter</b>	<b>53</b>
3.1.1. Abstract	53
3.1.2. Introduction	54
3.1.3. Material And Methods	55
3.1.4. Results	57
3.1.5. Discussion	64
3.1.6. References	68
3.1.7. Appendix I. Complementary figures of porcine internal anal sphincter studies	72
<b>4. CAPÍTULO 2. Specific And Complementary Roles For Nitric Oxide And ATP In The Inhibitory Motor Pathways To Rat Internal Anal Sphincter</b>	<b>87</b>
4.1.1. Abstract	87
4.1.2. Introduction	88
4.1.3. Material And Methods	89
4.1.4. Results	93
4.1.5. Discussion	107
4.1.6. References	111
4.1.7. Appendix II. Complementary figures of rat internal anal sphincter studies	115
<b>5. CAPITULO 3. Patterns of Impaired Internal Anal Sphincter Motility in Patients With Anal Fissure</b>	<b>131</b>
5.1.1. Abstract	131
5.1.2. Introduction	132
5.1.3. Patients And Methods	133
5.1.4. Results	136
5.1.5. Discussion	145
5.1.6. References	151
5.1.7. Appendix III. Complementary figures of high-resolution anorectal manometry, endoanal ultrasonography and histology in patients with chronic anal fissure	156
<b>6. DISCUSION GENERAL</b>	<b>166</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>190</b>

## **INTRODUCCIÓN**

La prevalencia real de las patologías anorectales benignas como la fisura anal, la fistula anal, los hemorroides, la incontinencia fecal o estreñimiento funcional son poco conocidas. Se estima que alrededor del 30% - 40% de la población general ha sufrido al menos una vez en su vida alguna patología proctológica benigna y que hasta un 10% - 15% de la población ha padecido una fisura anal (Lund and Scholefield, 1996; Dhawan and Chopra, 2007); un 2,2% (20% en personas mayores) incontinencia fecal (del Rio et al., 2005); y un 5% - 36% hemorroides (de Miguel et al., 2005). Junto con esta elevada prevalencia -quizás infravalorada- también debemos considerar el elevado coste económico que significan estas patologías tanto para el sistema de salud como para el paciente afectado, aunque lamentablemente tampoco hay información detallada y certera sobre este tema. Existen algunos trabajos que han evaluado el coste sanitario del tratamiento de la fisura anal crónica, y estiman que el tratamiento farmacológico (nitroglicerina y toxina boulínica) o quirúrgico (esfinterotomía lateral interna) en Estados Unidos supone un costo de alrededor de U\$1,800 por persona, sin considerar las visitas médicas y los exámenes complementarios previos (Essani et al., 2005).

El paciente que padece una patología anorectal no solo sufre problemas físicos con síntomas clínicos como evacuaciones fecales involuntarias, dolor y/o sangrado durante o posterior a la defecación, incomodidad general, sino que también ve como su calidad de vida se deteriora significativamente sufriendo cambios psíquicos y sociales importantes. Los tratamientos tienen un papel fundamental no solo en mejorar los síntomas y la patología, sino que también la calidad de vida del paciente (Griffin, 2002; Hyman, 2004). Para poder cuantificar y hacer objetivo este problema distintos trabajos han utilizado el Cuestionario SF-36 (de calidad de vida) que fue desarrollado a principios de los noventa en Estados Unidos para su uso en el Estudio de los Resultados Médicos (Medical Outcomes Study, MOS). Este cuestionario es una escala genérica que proporciona un perfil del estado de salud, resultando útil para evaluar la calidad de vida relacionada a la salud en la población general como en pacientes individuales, evaluando; la función física, rol físico, dolor corporal, salud general, vitalidad, función social, rol emocional y salud mental (Vilagut et al., 2005). En estudios prospectivos con pacientes con fisura anal crónica, Ortiz et al. demostraron que los pacientes con fisura anal crónica valoraron mucho más la mejoría en su calidad de vida que haber quedado

con algún grado de incontinencia fecal posterior a la esfinterotomía (Ortiz et al., 2005). En otro trabajo, Griffin et al. (Griffin, 2002) estudiaron la salud mental y física en pacientes con fisura anal antes y después de un tratamiento tópico, concluyendo que un tratamiento efectivo mejora tanto los síntomas físicos como la salud mental del paciente afectado.

De esta manera queda en evidencia que las patologías anorectales benignas tienen una alta prevalencia en la población general, y aunque no implican un riesgo vital para el paciente, pueden deteriorar significativamente la calidad de vida representando además, una carga económica considerable para el que lo sufre, el sistema de salud y la sociedad en general. Por lo tanto, pensamos que es importante promover la investigación de estudios básicos *in vivo* como *in vitro* con el fin de mejorar el conocimiento de la fisiopatología de estas enfermedades, y realizar estudios clínicos para ofrecer tratamientos más eficaces, con menores efectos adversos y orientados a la etiología y fisiopatología de estas enfermedades y no sólo a su tratamiento sintomático. En la actualidad son escasas las publicaciones relacionadas con el origen o fisiopatología de la fisura anal y sólo algunas se dirigen al estudio de las diferentes opciones terapéuticas existentes.

## ***ANATOMÍA DEL CANAL ANAL***

### **Generalidades**

El canal anal es la continuación del recto y la última porción del tracto digestivo, con una longitud aproximada de 2,5 a 5 cm comienza a nivel proximal a la altura del músculo elevador del ano y termina a nivel distal en el borde anal. Tiene por función mantener la continencia fecal evitando la evacuación involuntaria de material fecal (sólido, líquido y/o gases) manteniéndose constantemente contraído de manera involuntaria, y controlando el momento socialmente oportuno para que se produzca la defecación. Esto es posible, principalmente, por la acción combinada del esfínter anal interno (EAI) de musculatura lisa y del esfínter anal externo (EAE) de musculatura estriada o esquelética que rodea externamente y concéntricamente al primero. También favorecen a la continencia fecal los músculos del suelo pélvico (puborectal, pubococcigeo, etc.) que complementan la función del esfínter externo. Aparte de este componente muscular motor, también hay un componente sensitivo a través del nervio



pélvico con una función somática y visceral.

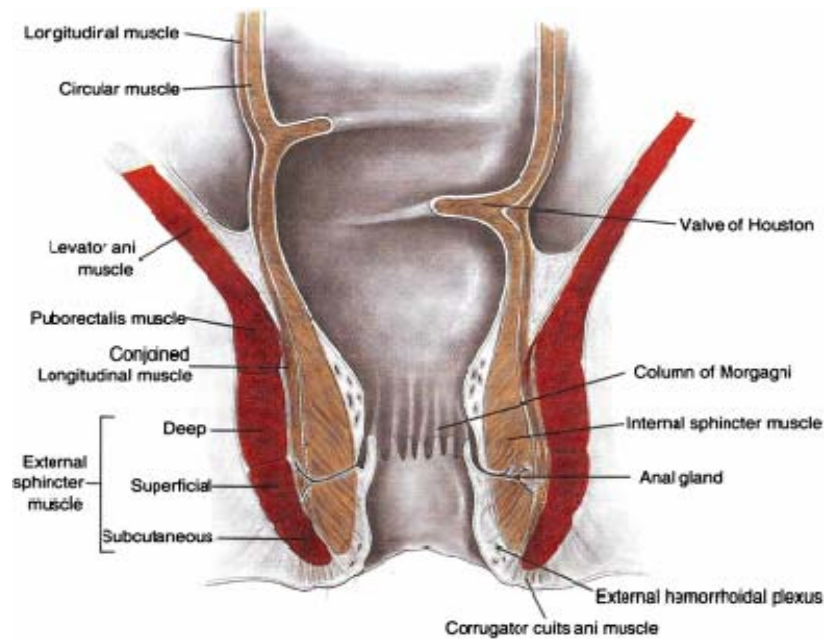
La defecación se origina cuando se estimulan los receptores mecánicos y sensoriales de la mucosa rectal al superarse el umbral de capacidad de almacenamiento de material fecal en el recto, estimulándose las vías inhibitorias intrínsecas (intramurales) descendentes que producen una relajación transitoria del EAI (Stebbing et al., 1996), permitiendo la defecación y un rápido retorno a la contracción de éste una vez terminado la expulsión de las deposiciones. Por tanto la defecación está íntimamente asociada al denominado reflejo rectoanal inhibitorio (RAI o RAIR del inglés recto-anal inhibitory reflex). El RAIR se encuentra preservado en pacientes con lesiones en la médula espinal y en denervaciones extrínsecas del recto (Lubowski et al., 1987; Valles et al., 2006) pero está ausente en la enfermedad de Hirshprung caracterizada por una aganglionosis del recto (Tomita et al., 2002).

## ***ESFÍNTERES ANALES***

### **Esfínter anal interno**

El EAI se inicia con el engrosamiento de la última porción de la capa muscular circular del recto (Figura 1), es de carácter involuntario, tiene aproximadamente 3 cm de largo y 3 mm de ancho teniendo mayor longitud en el hombre y puede aumentar de grosor con la edad (Burnett and Bartram, 1991). La contracción tónica de las fibras circulares de este esfínter origina entre el 70% al 85% de la presión basal del canal anal en reposo (Bennett and Duthie, 1964; Frenckner and Euler, 1975; Lestar et al., 1989; Rattan, 2005), y cuando presenta algún daño o debilidad muscular se puede observar una disminución de la presión basal del canal anal con pérdida pasiva de contenido fecal e incontinencia fecal. El EAI presenta patrones de motilidad espontánea de tipo fásico representados por las denominadas ondas lentas y ondas superlentas. Las primeras son ondas de baja amplitud con una frecuencia de 10 – 30 ondas/minuto. Las segundas se describen mayormente en pacientes con hipertonía y/o estreñimiento con una prevalencia mayor al 50%, teniendo una frecuencia de 1 - 2 ondas/minuto y una amplitud mayor a 20 mmHg (Hancock, 1976; Eckardt et al., 1997; Yoshino et al., 2007), y sólo se observan en alrededor del 5% de individuos sanos (Hancock, 1976). El origen, la función y el significado patológico o fisiológico de estas ondas no están del todo comprendidas, ambas pueden observarse en estudios *in vitro* de tiras aisladas de

EAI y se cree que también participan en el mantenimiento del tono muscular en reposo y la continencia anal (Sangwan and Solla, 1998).



**Figura 1.** Esquema representativo del canal anal y del esfínter anal interno y externo. Imagen obtenida de Barleben A and Mills S (2010) Anorectal anatomy and physiology. *Surg Clin North Am* 90:1-15.

### **Esfínter anal externo**

La anatomía del esfínter anal externo (EAE) es un tema de continua controversia desde que se empezó a estudiar por primera vez (Milligan and Morgan, 1934; Goligher, 1987), discutiéndose si está compuesto por dos o tres músculos concéntricos. En estudios recientes y a pesar de utilizar nuevas técnicas de imagen como resonancia magnética y ecografía, Uz et al. después de estudiar la anatomía del canal anal y las estructuras anexas en 24 cadáveres, concluyeron que el EAE está compuesto por tres anillos elípticos (subcutáneo, superficial y profundo) que envuelven al EAI desde el margen anal (Uz et al., 2004) (Figura 1). Contrariamente estudios de Fritsch et al. utilizando resonancia magnética y estudios morfológicos-histológicos con reconstrucción computarizada tridimensional en fetos humanos, de recién nacidos y de adultos concluyeron que el EAE se divide básicamente en una porción caudal y una craneal, rechazando la división tripartita. Además, este autor describe que a nivel de la línea media-ventral el EAE está incompleto formando una semicircunferencia abierta hacia delante (Fritsch et al., 2002). Por su parte, en un estudio reciente utilizando histología, ecografía endoanal y anatomía macroscópica estudiaron los esfínteres anales

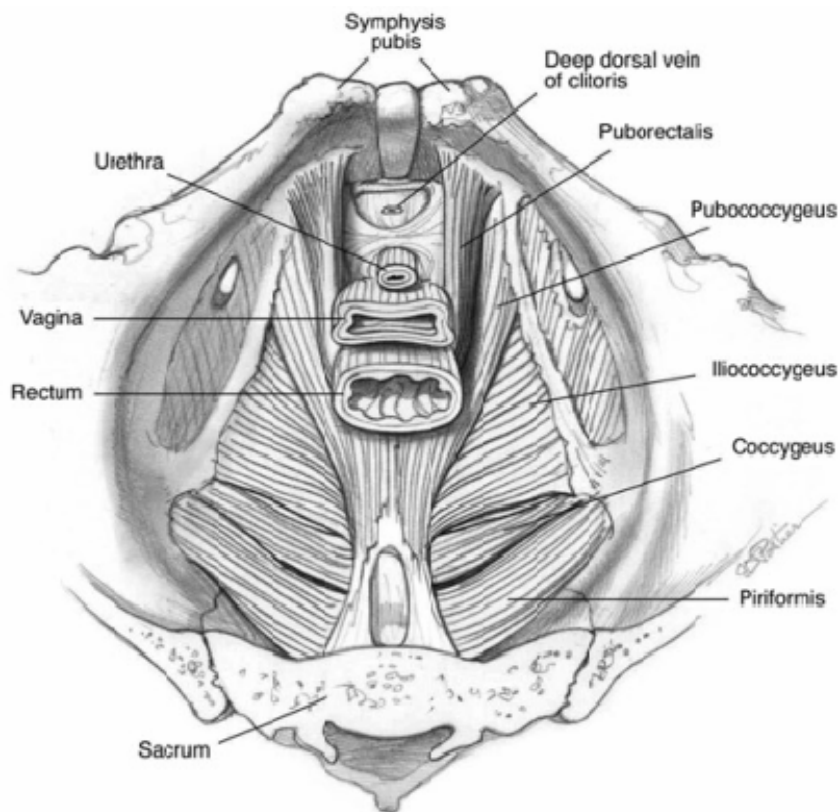
en 18 cadáveres humanos concluyendo que el esfínter externo es un músculo continuo con una parte superior (componente profundo) y una parte inferior (componente superficial y subcutáneo) (Al-Ali et al., 2009). Es posible que las diferencias observadas en el esfínter anal externo son principalmente dependientes del sexo (Bharucha, 2006), donde el hombre presentaría este patrón trilaminar a diferencia de las mujeres que tendrían puborectal y un esfínter externo con una banda muscular única a nivel inferior.

Lo que si está bien determinado es que el EAE es un músculo fatigable (a diferencia con el EAI) que está compuesto por fibras “slow switch” de contracción tónica y fibras “fast switch” de contracción fásica. Las primeras le permiten mantener un estado de contracción tónica continua que también contribuye a la presión basal del canal anal. En un estudio con voluntarios sanos bajo anestesia general o con bloqueo del nervio pudendo determinaron que este esfínter contribuye en alrededor del 25% de la presión en reposo del canal anal (Frenckner and Euler, 1975) y es el responsable del aumento de la presión observada en manometría anorectal durante la contracción voluntaria y en la maniobra de valsalva (reflejo de la tos) con presiones observadas entre 50 a 200 mmHg. Del mismo modo, cuando hay lesiones obstétricas en este esfínter se producen reducciones significativas en la presión máxima de la contracción voluntaria y la posible aparición de incontinencia fecal.

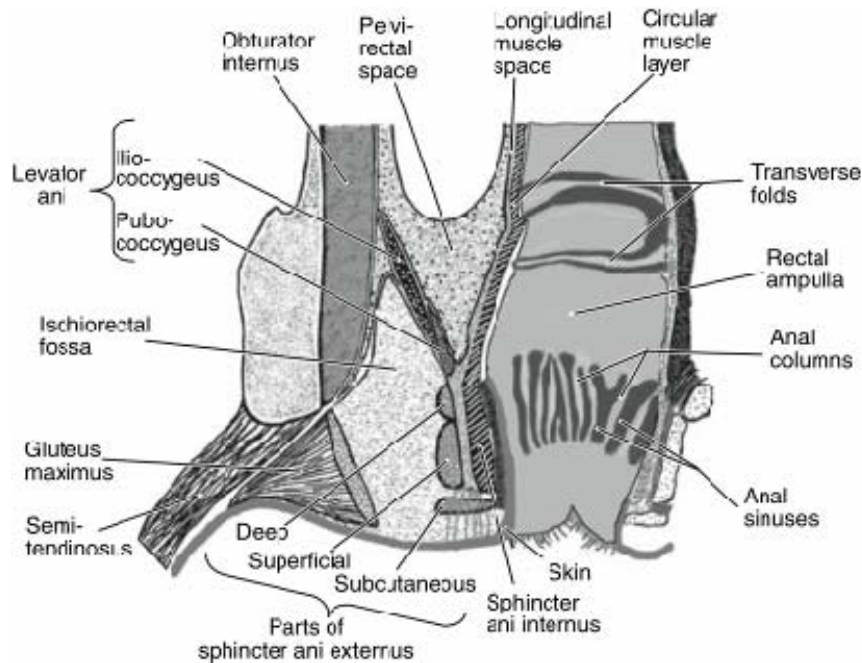
### **Músculos del suelo pélvico y músculo puborectal**

El músculo elevador del ano es un músculo amplio, ancho y delgado, ubicado en la parte ventral del periné que cubre gran parte del suelo pélvico. Los músculos del suelo pélvico se subdividen en cuatro músculos; pubococcígeo, ileococcígeo, coccígeo y puborectal (Figura 2 y 3). Estos músculos están insertados periféricamente al cuerpo púbico, la espina isquiática y al arco tendíneo. El músculo elevador del ano está innervado por el nervio pudendo, nervio inferior rectal, nervio perineal y nervios sacrales S3-S4, y es trascendental en el mecanismo de la continencia anal y del soporte de las vísceras pélvicas. (Fernandez-Fraga et al., 2002; Barleben and Mills, 2010). De todos ellos, el músculo puborectal es el de mayor relevancia para la continencia, ya que se localiza en la parte más antero-medial del diafragma pélvico, forma una “U” que rodea la porción superior del canal anal a modo de un lazo y tira de éste hacia delante, provocando un ángulo agudo entre el recto y el canal anal, denominado ángulo ano-rectal. Este ángulo se mantiene constante gracias a la capacidad de contracción tónica

del puborectal (Cerdan et al., 2005; Bajwa and Emmanuel, 2009). Cualquier daño en este músculo inevitablemente expondrá al paciente a una incontinencia fecal (Bharucha, 2006). Actualmente no está del todo determinado si el músculo puborectal se considera componente del complejo elevador del ano o al EAE, sin embargo, por su inervación se considera que son músculos distintos e independientes, puesto que mientras el esfínter externo está innervado por el nervio pudendo, el puborectal lo sería de forma directa por nervios sacrales S3-S4 (Percy et al., 1981; Bajwa and Emmanuel, 2009).



**Figura 2.** Diagrama del músculo elevador del ano, sus componentes y relaciones anatómicas en la pelvis. Imagen obtenida de Bharucha AE (2006) Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil* 18:507-519

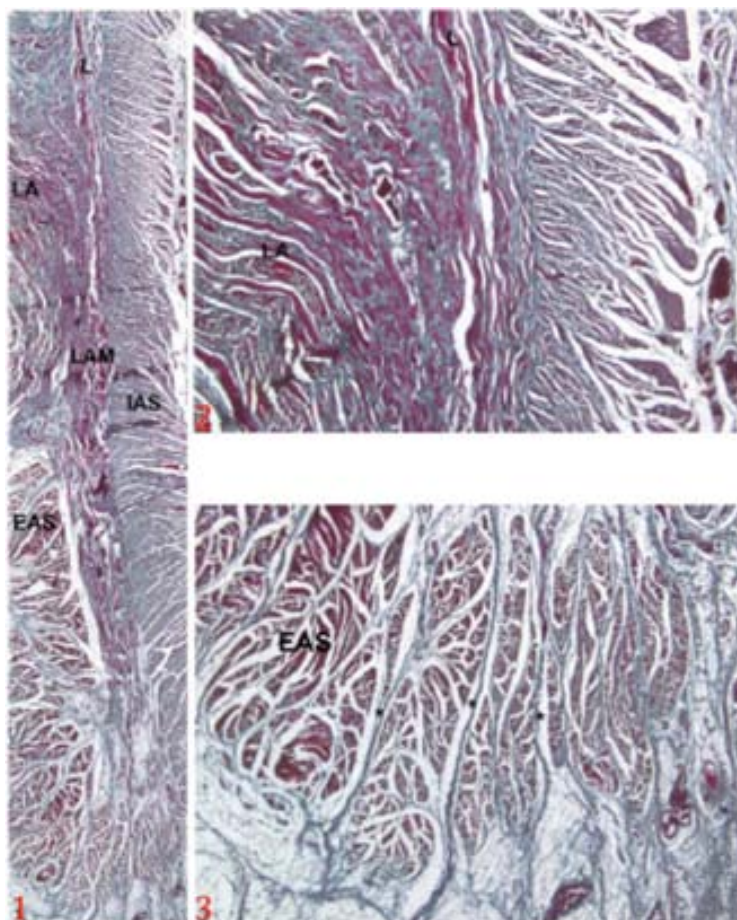


**Figura 3.** Diagrama representativo del corte coronal del recto, canal anal y las estructuras adyacentes. Imagen obtenida de Bharucha AE (2006) Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil* 18:507-519.

### Músculo longitudinal del canal anal

El músculo longitudinal anal o también llamado músculo rectococcigeo, retractor del ano, tensor fascia pélvica o “conjoint longitudinal muscle”. Es una estructura muscular del canal anal poco conocida debido principalmente a la falta de consenso en la bibliografía sobre su nomenclatura y su origen o composición, como describiré a continuación. De forma general se describe como una capa muscular vertical interpuesta entre el EAE y el EAI (Starding, 2005). Milligan y Morgan (Milligan and Morgan, 1934) sostienen que el músculo longitudinal anal está compuesto por fibras del extremo posterior del músculo puborectal y fibras de la zona anterior del fascículo profundo del EAE. Por su parte, Courtney (Courtney, 1950) lo describe como un músculo estriado de orientación vertical que recibe fibras de los músculos puborectal, pubococcigeo e ileococcigeo. Shafik (Shafik, 1976) divide el músculo longitudinal anal en tres capas; medial, intermedia y lateral. Todos envueltos por fascia o septos que se separan y se entrecruzan en la porción distal del músculo longitudinal anal para formar un tendón central. Lunniss y Phillips (Lunniss and Phillips, 1992) describen que el músculo longitudinal anal está formado por la fusión de fibras estriadas musculares de la porción interna del músculo puborectal con fibras musculares lisas de la capa muscular longitudinal del recto. La porción distal de esta capa se transforma en

tejido fibroelástico separándose en septos que atraviesan la porción subcutánea del EAE, para terminar contactando con la dermis perianal. Petros (Petros, 2004) describe que el músculo longitudinal anal se origina del músculo elevador del ano con fibras de la parte lateral del músculo pubococcigeo y puborectal. Este músculo envolvería parcialmente la zona posterior del recto sin estar insertado en él, y distalmente atravesaría la porción profunda y superficial del EAE. Más recientemente, Macchi (Macchi et al., 2008) concluyen que la capa longitudinal anal está compuesta externamente por fibras musculares estriadas provenientes del músculo elevador del ano, puborectal y puboanal, e internamente por una pequeña porción de fibras musculares lisas de la capa muscular longitudinal del recto. Su porción terminal se modifica en septos fibroelásticos que atraviesan la porción subcutánea del EAE (Figura 1 y 4). Del punto de vista funcional, Shafik (Shafik, 1976) postula que el músculo longitudinal anal ayuda a fijar el canal anal a las paredes de la pelvis durante la defecación, previniendo un prolapso anal, y Petros (Petros, 2004) atribuye un rol fundamental al músculo longitudinal anal en las funciones estáticas y dinámicas de las vísceras pélvicas, participando en el cierre y apertura del canal anal.



**Figura 4.** (1) Corte coronal de la pared derecha del canal anal, con el músculo longitudinal anal (LAM) entre el esfínter anal interno (IAS) y esfínter anal externo (EAS), L; identifica al músculo longitudinal del recto y LA; elevador del ano. (2) Aumento de la parte superior de la figura 1 que muestra la contribución del LA al L. (3) Aumento de la parte inferior de la figura 1 que muestra como el LAM termina en septos fibroelásticos (asteriscos) que atraviesan la porción subcutánea del EAS. Imagen obtenida de Macchi V, et al. (2008) Histotopographic study of the longitudinal anal muscle. *Clin Anat* 21:447-452

## ***INERVACIÓN DEL SUELO PÉLVICO***

### **Sistema nervioso somático**

El EAE es un músculo bajo control voluntario. Un estudio de Turnbull et al. realizado a 9 voluntarios sanos mediante estimulación magnética transcraneal describió por primera vez que la actividad de los músculos anorectales se representaban de forma bilateral en la corteza motora superior en el área 4 de Brodman, existiendo una variación individual del grado de simetría desarrollada y demostrando un control voluntario (cortical) en la respuesta anal y rectal (Turnbull et al., 1999). De la corteza cerebral nacen las neuronas motoras que forman parte del haz cortico-espinal (o primera motoneurona) llevando la información motora a la segunda motoneuronas, haciendo sinapsis en el núcleo de Onuf (ubicado en el cuerno dorsolateral anterior de la médula sacra entre los segmentos S1-S3). De este núcleo nacen motoneuronas con fibras nerviosas somáticas que forman el nervio pudendo, que se dividirá para formar el nervio rectal inferior, perineal y escrotal posterior. El nervio inferior rectal lleva fibras motoras al EAE y recoge *inputs* sensoriales desde la porción ventral del canal anal y de la piel que rodea al ano. El nervio perineal se divide en una rama escrotal posterior y ramas musculares que inervan la parte anterior del EAE y al músculo elevador del ano. Las fibras motoras del nervio pudendo derecho e izquierdo se entrecruzan y solapan dentro del EAE (Bharucha, 2006) (Figura 5).

El núcleo de Onuf también tiene un papel como centro regulador del parasimpático sacro, por lo que las fibras nerviosas somáticas también viajan acompañadas de fibras parasimpáticas. De la región ano-genital y región pélvica también emergen vías aferentes somáticas y viscerales. Las aferentes viscerales acompañan las fibras eferentes simpáticas y parasimpáticas, en cambio, las aferentes somáticas acompañan al nervio pudendo y son activadas por receptores de dolor, temperatura y presión ubicados en la piel de la zona perianal y en la mucosa anal. Al estimularse estos receptores (por ejemplo, reflejo ano-cutáneo o valsalva) se desencadena un arco reflejo espinal sacro que se integra en el núcleo de Onuf activándose las motoneuronas eferentes que modulan las fibras musculares del EAE. Del mismo modo, éste núcleo recibe *inputs* desde el córtex cerebral a través de la vía cortico-espinal que permiten controlar de forma voluntaria por ejemplo la contracción del esfínter externo, cuando no existe el momento adecuado para desencadenar la



defecación o relajación cuando esta es socialmente correcta (Schroder and Reske-Nielsen, 1983; Kaiser and Ortega, 2002; Bajwa and Emmanuel, 2009). A nivel clínico, este circuito neuronal puede verse seriamente afectado cuando existen lesiones medulares, y la sintomatología dependerá del segmento comprometido y la severidad de la lesión. Vallés et al. (2006) evaluaron clínicamente la función intestinal en pacientes con lesión medular y la relacionaron con sus características neurológicas. Observaron que los pacientes con lesiones superiores a T7 presentaban signos de motoneurona superior (estreñimiento, dificultad para defecar, retraso en el tránsito colónico y ausencia de relajación del EAE durante maniobras defecatoria, parálisis espástica). En cambio en las lesiones inferiores a T7 separaban a los pacientes con y sin reflejos sacrales, observando que los individuos sin reflejos espinales presentaban signos de motoneuronas inferior (leve dificultad defecatoria, ausencia contracción EAE, incontinencia fecal, parálisis flácida). Concluyendo que los síntomas colorrectales son muy prevalentes y las características del intestino neurógeno están relacionadas con el tipo de lesión medular (Valles et al., 2006).

### **Sistema nervioso autónomo**

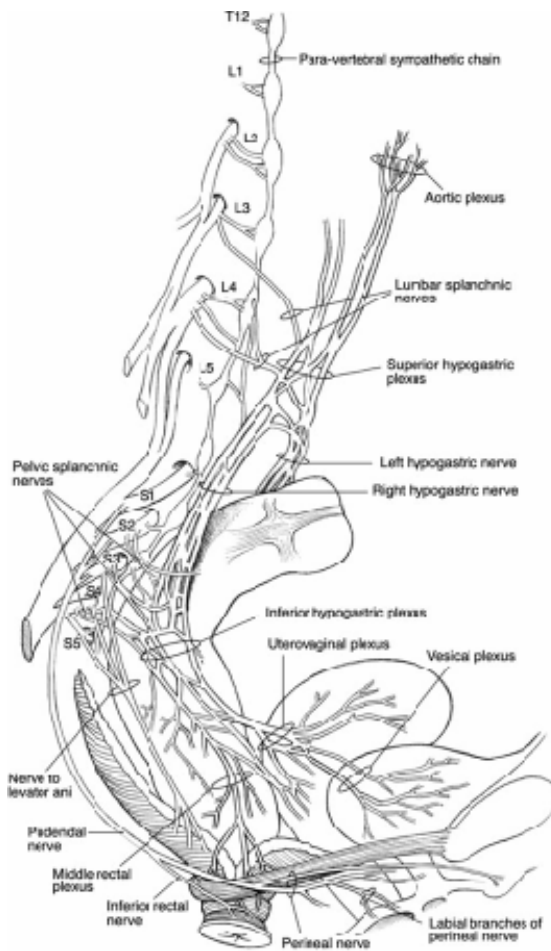
El sistema nervioso central (SNC) es capaz de modular la motilidad intestinal a través del sistema nervioso autónomo y sus dos componentes; el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático (Hansen, 2003a). El sistema nervioso autónomo a través de sus fibras simpáticas y parasimpáticas modula a su vez la actividad del sistema nervioso entérico. Las fibras eferentes parasimpáticas regulan por ejemplo, las fases digestivas e interdigestivas de la motilidad intestinal, los patrones motores, la secreción, el flujo sanguíneo, mientras que la vía simpática conduce la información que media por ejemplo la respuesta al estrés.

Las estructuras y vísceras del suelo pélvico y la zona anorectal están inervadas por nervios simpáticos y parasimpáticos del sistema nervioso autónomo y nervios somáticos (Bhardwaj et al., 2000; Bharucha, 2006; Barleben and Mills, 2010) (Figura 5). Los nervios preganglionares simpáticos se originan del ganglio torácico inferior de la cadena paravertebral de segmentos lumbares L1 a L3, uniéndose a las ramas del plexo aórtico formando el plexo hipogástrico superior. De este plexo se origina el nervio hipogástrico (derecho e izquierdo). Las fibras preganglionares parasimpáticas que se originan de ramas ventrales sacrales S2 a S4 forman el plexo hipogástrico inferior, ubicado



posteriormente a la vejiga urinaria. El plexo hipogástrico inferior da pie al plexo rectal, visceral, prostático y uretrovaginal. Las fibras nerviosas parasimpáticas que emergen del plexo rectal hacen sinapsis con neuronas postganglionares del plexo mientérico del canal anal. Por tanto, el recto y canal anal están inervados por nervios del plexo rectal superior, medio e inferior (Bharucha, 2006).

Las fibras nerviosas simpáticas que alcanzan el EAI producen contracción de las fibras circulares por medio de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha$ -AR) (Speakman et al., 1990; Carapeti et al., 1999) o relajación de las mismas través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) (Yamato and Rattan, 1990; Rathi et al., 2003). Los  $\alpha$ -AR presentan dos tipos; los  $\alpha$ 1-AR y  $\alpha$ 2-AR. Los  $\alpha$ 1-AR se encuentran en la célula muscular lisa y su estimulación produce contracción (Burleigh, 1983; Yamato and Rattan, 1990), y los  $\alpha$ 2-AR se encuentran en las neuronas mientéricas inhibitorias y su estimulación inhibe la relajación no adrenérgica no colinérgica del EAI inducida por el reflejo rectoanal inhibitorio (Yamato and Rattan, 1990). Los  $\beta$ -AR se clasifican en;  $\beta$ 1,  $\beta$ -2 y  $\beta$ -3. Estos receptores postunión acoplados a proteína G, median el efecto inhibitorio de los nervios simpáticos en el músculo liso de gran parte del tracto digestivo. Una vez activados liberan la subunidad  $G_s\alpha$  y  $G_{i/o}\alpha$  incrementando los niveles intracelulares de adenilato (AC) y guanilato ciclasa (GC) (Nantel et al., 1995). Se considera que las fibras nerviosas parasimpáticas producen relajación del EAI mediante la activación y modulación de las neuronas entéricas no adrenérgicas no colinérgicas (NANC, del inglés non-adrenergic non-cholinergic) (Parks et al., 1969; Lubowski et al., 1987; Yamato and Rattan, 1990). Además, las fibras descendentes del plexo hipogástrico inferior van a través del plexo aórtico e hipogástrico superior para unirse al plexo mesentérico inferior, inervando el colon descendente y sigma. Las vías parasimpáticas sacrales del colon tienen componentes excitatorios e inhibitorios (Gonella et al., 1987). La vía excitatoria juega un papel fundamental en la actividad peristáltica del colon sigmoide especialmente durante la defecación, mientras que la vía inhibitoria permite la adaptación del recto y del colon distal al contenido del lumen y regula la inhibición descendente que inicia la relajación del colon al paso del bolo fecal (Bharucha, 2006).

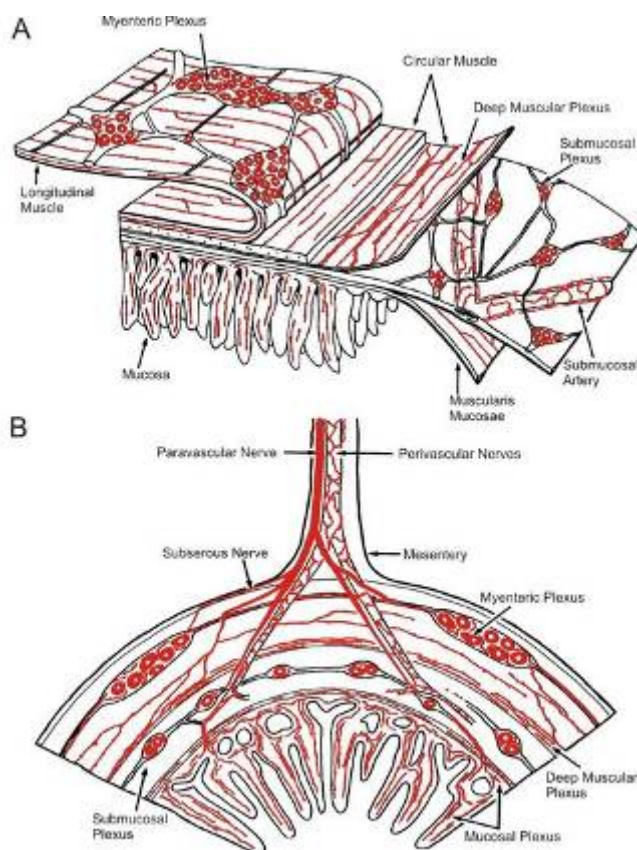


**Figura 5.** Esquema representativo de la innervación simpática, parasimpática y del nervio pudendo en la zona anorrectal. Imagen obtenida de Bharucha AE (2006) Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil* 18:507-519.

### Sistema nervioso entérico

Las funciones del sistema nervioso entérico (SNE) son controlar la motilidad intestinal, regular la respuesta inmune, la secreción exocrina y endocrina, y la microcirculación del tracto digestivo de forma autónoma (Hansen, 2003b) encontrándose en todo el tracto gastrointestinal desde el esófago hasta el canal anal. El SNE está formado por el plexo mientérico (o de Auerbach) y el plexo submucoso (o de Meissner). Este último, se divide en el plexo submucoso interno que está justo por debajo de la muscularis mucosae, el plexo submucoso externo (plexo de Schabadasch) adyacente a la capa muscular circular, y un plexo submucoso intermedio que se sitúa entre ambos (Figura 6). El plexo mientérico se encuentra por todo el tracto gastrointestinal desde el esófago al EAI, el plexo submucoso está muy desarrollado en el intestino delgado donde juega un papel fundamental en la secreción y absorción intestinal (Furness, 2006). Esta distribución tiene una relevancia funcional ya que el plexo mientérico regularía predominantemente la motilidad, mientras que el plexo submucoso estaría involucrado en la regulación de las funciones de la mucosa

(sensibilidad, secreción). Sin embargo, esta distribución no es del todo exacta, ya que algunas neuronas del plexo submucoso externo inervan el músculo circular, y neuronas del plexo mientérico en el íleon humano se proyectan a la mucosa (Schemann and Neunlist, 2004). A diferencia del sistema nervioso periférico donde sus nervios utilizan colágeno y a las células de Schwann para darles soporte, las neuronas del SNE tienen a las células de la Glia, que se encuentran en una relación de 4 células por 1 neurona. Las células de la Glia proporcionan soporte estructural y aportan nutrientes a las neuronas mientéricas, pero actualmente se reconoce que además tienen un rol más importante como son participar en la neurotransmisión, actuar como presentadoras de antígeno y de mantener la homeostasis en el tracto gastrointestinal y además, tener un papel importante en los procesos inflamatorios que afectan la motilidad intestinal (Cabarrocas et al., 2003; Bassotti et al., 2007).



**Figure 6.** Esquema representativo de la estructura y ubicación del sistema nervioso entérico y las capas musculares del intestino delgado de cobayo. Imagen obtenida de Furness JB (2006) *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, Massachusetts.

Las neuronas entéricas pueden ser clasificadas según su morfología, la codificación de neurotransmisores, sus propiedades electrofisiológicas, y por sus características funcionales (siendo esta última la más común). Por su morfología se clasifican en: Dogiel tipo I, II, III, IV, V, VI y VII. Las neuronas Dogiel tipo I poseen

numerosas dendritas y un axón. Las neuronas Dogiel tipo II poseen diversos axones que se pueden o no ramificar a poca distancia del cuerpo celular (este tipo de neuronas son muy numerosas en intestino delgado y colon de cobayo). Las neuronas Dogiel tipo III poseen pocas dendritas que se van estrechando a medida que se alejan del cuerpo celular (han sido identificadas en el intestino delgado de cobayo). Los otros tipos de neuronas son poco frecuentes en el tracto gastrointestinal (Furness, 2006). Según la codificación de neurotransmisores; la codificación depende de muchos factores como la especie y el segmento del tracto gastrointestinal, pero en general los neurotransmisores y los receptores del SNE humano poseen grandes similitudes con las de algunas especies. No obstante, existen diferencias en colocalizaciones y la expresión de receptores como por ejemplo, la colocalización del VIP y la acetilcolintransferasa en el plexo submucoso humano, que no coincide con las neuronas secretomotoras identificadas en el tracto gastrointestinal de cobayo (Schemann and Neunlist, 2004). O que las neuronas aferentes primaria sensitivas (IPANs) difieren en su codificación química, distribución en la red neuronal intestinal, en las propiedades eléctricas y sinápticas entre los grandes (porcino) y pequeños mamíferos (cobaya), así como, los receptores opiodes de las motoneuronas aferentes del intestino delgado porcino son predominantemente del tipo delta a diferencia del cobaya que son tipo mu (Brown and Timmermans, 2004). Esta diferencias inter-especie demuestran la complejidad del SNE, por lo que el desarrollo de nuevos fármacos gastrointestinales para uso humano debe realizarse en modelos animales que presentan semejanza fisiológica y anatómica como el caso del porcino, el cual presenta una estructura y patrón neuroquímico muy similar al SNE del hombre (Brown and Timmermans, 2004). Según sus propiedades electrofisiológicas las neuronas entéricas se clasifican en: las Tipo S, neuronas que reciben potenciales post sinápticos excitatorios rápidos o fEPSP (fast Excitatory PostSinaptic Potencial), y las Tipo AH (AfterHyperpolarization) que poseen una hiperpolarización de larga duración. Se ha descrito en el intestino de cobayo que las neuronas tipo S son Dogiel tipo I y las neuronas tipo AH suelen ser Dogiel tipo II (Furness, 2000). Cabe mencionar que la mayoría de los estudios morfológicos, electrofisiológicos e inmunohistoquímicos que describen estas neuronas se han realizado en cobayo, modelo experimental muy utilizado debido a la facilidad de acceso a los distintos plexos nerviosos, no siendo completamente extrapolables todos sus resultados a los demás modelos experimentales y menos al hombre.

A pesar de las descripciones anteriores, la clasificación mas comúnmente utilizada

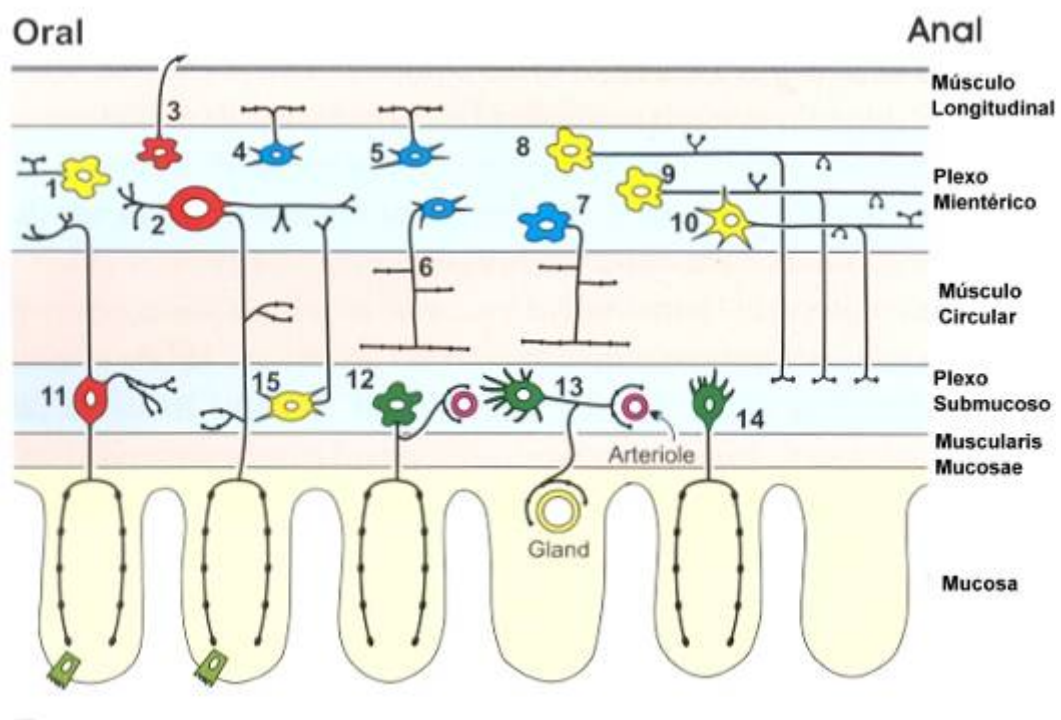
para las neuronas entéricas es por sus características funcionales; Neuronas sensitivas, motoneuronas e interneuronas (Costa et al., 2000; Furness, 2000; Brookes, 2001).

Neuronas sensitivas. Se pueden clasificar en dos grupos; las neuronas intrínsecas aferentes primarias o IPANs (del inglés Intrinsic Primary Afferent Neurons) o EPANs (Enteric Primary Afferent Neurons). Tienen sus cuerpos celulares tanto en los ganglios del plexo mientérico como en los del plexo submucoso y proyectan sus terminales hacia la mucosa intestinal. Responden a estímulos químicos, deformación mecánica de la mucosa y otros estímulos como el estiramiento radial y la tensión muscular (Bertrand and Bornstein, 2002). En el cobayo estas neuronas son Dogiel tipo II y poseen características electrofisiológicas AH, también se han descrito neuronas con esas características en otras especies como el cerdo (Cornelissen et al., 2000) y el ratón (Nurgali et al., 2004), por lo que las IPANs podrían poseer características comunes independientemente de la especie a la que pertenezcan (Costa et al., 2000). Las IPANs están interconectadas formando redes y reciben *inputs* de otras IPANs y además conectan con interneuronas y con las motoneuronas.

Motoneuronas. Representan la conexión final del sistema nervioso entérico con las células musculares lisas de la capa circular y longitudinal. Se pueden subclasificar; en motoneuronas excitatorias e inhibitorias, según los neurotransmisores que codifican (Furness, 2000), y también se pueden subclasificar según la capa muscular que inervan (Costa et al., 2000). Por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha encontrado la enzima acetilcolintransferasa (que sintetizan la acetilcolina) (Porter et al., 2002) y taquiquininas como la neurokinina A, neurokinina B y la sustancia P en las motoneuronas excitatorias (Yunker et al., 1999; Lecci et al., 2002b; Yip et al., 2003). También se ha descrito al ATP como neurotransmisor excitatorio actuando a través de receptores P2X<sub>1</sub> (Lecci et al., 2002a). De los neurotransmisores inhibitorios codificados por las motoneuronas inhibitorias en diferentes estudios utilizando técnicas como inmunohistoquímica, baño de órganos, microelectrodos, etc. se han propuesto el óxido nítrico (NO) (Bult et al., 1990; Pluja et al., 1999; Tomita et al., 2001; Jones et al., 2003; Farre et al., 2007; Auli et al., 2008) , el ATP (Burnstock et al., 1970; Galligan and Bertrand, 1994; McDonnell et al., 2008; Burnstock, 2009), el VIP (Chakder and Rattan, 1993a), el PACAP (Chakder and Rattan, 1998) y el monóxido de carbono (CO) (Chakder et al., 2000; Lecci et al., 2002a).

Interneuronas. Han sido identificadas en todas las regiones del tracto gastrointestinal y posiblemente, son las neuronas que más varían entre regiones. Las interneuronas forman cadenas en dirección oral y aboral, y se pueden diferenciar en interneuronas ascendentes y descendentes. Las interneuronas ascendentes parecen estar implicadas en reflejos locales (Kunze and Furness, 1999; Bornstein et al., 2004).

Neuronas aferentes intestinofugales o IFANs (del inglés Intestino Fugal Afferent Neurons). Son un grupo de neuronas cuyos cuerpos neuronales se encuentran en los ganglios del plexo mientérico y sus axones migran de la pared del tubo digestivo para contactar con los ganglios simpáticos prevertebrales (mesentérico inferior, superior y celiaco). Estas neuronas poseen mecanoreceptores y responden a estiramiento de la capa muscular circular (Szurszewski et al., 2002) (Figura 7).



**Figura 7.** Tipos de neuronas del intestino de cobayo (1) interneurona ascendente, (2) IPAN mientérica, (3) IFAN (4) motoneurona longitudinal excitatoria e inhibitoria (5), motoneurona circular excitatoria (6) e inhibitoria (7), interneurona descendente (8, 9 y 10), IPAN submucosa (11), neuronas secretomotoras y vasodilatadores (12, 13 y 14), neuronas que proyectan al plexo mientérico (15). Imagen obtenida de Furness JB (2006) *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, Massachusetts.

## **NEUROTRANSMISORES INHIBITORIOS**

En diferentes trabajos realizados por Burnstock y colaboradores en la década del 70 (Burnstock et al., 1970) utilizando taenia coli de guinea-pig observaron hiperpolarizaciones del músculo intestinal durante la estimulación de nervios intrínsecos en presencia de atropina y bretilio (un antagonista adrenérgico), respuesta bloqueada posteriormente con la neurotoxina TTX. Estos resultados llevaron a los autores a pensar que se originaban de los neuronas no adrenérgica no colinérgica (NANC). Por lo tanto, se habla de neurotransmisión inhibitoria NANC a los neurotransmisores que no son bloqueados por antagonistas colinérgicos ni adrenérgicos. Dentro de los neurotransmisores NANC que median la relajación del EAI que han sido demostrados y/o propuestos en diversos estudios se encuentran el óxido nítrico, el VIP, el PACAP, el ATP y el CO:

### **Oxido nítrico (NO)**

La participación del NO en la relajación NANC ha sido evaluada mediante estudios *in vivo* e *in vitro* utilizando inhibidores selectivos de la sintasa del NO (NOS), demostrando la liberación del NO así como subproductos generados en su síntesis, y utilizando ratones transgénicos knock-out. Se ha descrito que este neurotransmisor tiene una función importante en la relajación del músculo liso en las diversas áreas del tubo digestivo como es; en la relajación del esfínter esofágico inferior (Gonzalez et al., 2004), en el colon humano (Keef et al., 1993; Auli et al., 2008), que promueve la acomodación y el vaciado gástrico (Andrews et al., 2007), y que es el principal neurotransmisor inhibitorio en la relajación NANC del EAI como lo demuestran estudios *in vitro* con tejido sano de EAI, recto y colon humano estimuladas eléctricamente (Burleigh, 1992; O'Kelly et al., 1993a; Tomita et al., 2001), en cerdo (O'Kelly et al., 1992), o *in vivo* bloqueando el reflejo rectoanal inhibitorio con L-NNA en la zarigüeya (Rattan et al., 1992). También fue demostrado por medio de inmunohistoquímica la presencia de la NOS en la zona rectoanal del hombre (O'Kelly et al., 1994) y una co-localización de la nNOS y de VIP en neuronas del plexo mientérico (Lynn et al., 1995; Guo et al., 1997) sugiriendo una co-transmisión inhibitoria entre NO y VIP. Por otra parte, se ha visto que la carencia NO y de la NOS está relacionada con

patologías como la enfermedad de Hirschprung o la fisura anal (Guo et al., 1997; Lund, 2006) (Tabla 1).

El óxido nítrico es sintetizado a partir de L-arginina por la enzima NO sintasa (NOS), de las que existen tres isoenzimas codificadas por genes independientes; la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y la inducible (iNOS). La degradación de la L-arginina por estas enzimas genera entre otros productos L-citrulina, una molécula que favorece la relajación del EAI (Rattan and Chakder, 1997b). El NO es un gas lipofílico, el cual difunde a través de la membrana plasmática. A nivel intracelular el NO activa la guanilato ciclasa, produciendo un aumento en el GMP cíclico (Chakder and Rattan, 1993b), que activa la proteína quinasa C generando una cascada de fosforilaciones, que terminarán con la relajación del músculo liso. Sin embargo, el NO puede tener otros efectos o dianas como es por ejemplo, el regular directamente la función de canales iónicos incrementando la conductancia al  $K^+$  induciendo una hiperpolarización de la membrana celular (Bolotina et al., 1994) y una consiguiente relajación mecánica del músculo.

### **VIP y PACAP**

El VIP se propuso como neurotransmisor NANC implicado en la relajación del EAI cuando Biancani preincubando suero anti-VIP inhibió tanto la relajación NANC inducida eléctricamente como la inducida por VIP exógeno en tiras de EAI de conejo (Biancani et al., 1985). Así mismo, en un estudio *in vivo* en zarigüeya Nurko et al. utilizando antagonistas selectivos del VIP antagonizó significativamente el reflejo rectoanal inhibitorio (Nurko and Rattan, 1988). Posteriormente en estudios bioquímicos se demostró la presencia de los receptores de VIP principalmente en la célula muscular lisa del EAI y posiblemente en neuronas (Chakder and Rattan, 1995), y que la integridad molecular del VIP es fundamental para la activación de esos receptores al observar que fragmentos de VIP o análogos con radiomarcaje no eran capaces de activarlos (Chakder and Rattan, 1993a).

A su vez, el PACAP, un neuropéptido muy relacionado a VIP, produce una relajación debido a su acción directa en célula muscular lisa y/o en el botón terminal de neuronas inhibitorias mientéricas, pero también produce una contracción en el EAI que sería producida por la estimulación directa de sus receptores en el botón terminal de neuronas que contienen sustancia P (Rattan and Chakder, 1997a) (Tabla 1).



Los receptores de VIP y PACAP (VPAC1, VPAC2 y PAC1) forman parte de una familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G. El VIP tiene alta afinidad por los receptores VPAC1 y VPAC2, mientras que PACAP tiene igual afinidad para los tres receptores VPAC1, VPAC2 y PAC1. VIP produce la relajación del músculo liso de forma directa a través de la subunidad Gs que activa la adenilato ciclasa e incrementa los niveles intracelulares de AMP cíclico, éste a su vez activa una proteína quinasa que lleva a cabo una serie de fosforilaciones que desencadenan en la relajación del músculo liso (Chakder and Rattan, 1993b). Se ha descrito que el VIP de forma indirecta también promueve la formación de GMP cíclico estimulando; i) la liberación de NO por la activación de la eNOS expresada en el músculo liso intestinal y gástrico a través del receptor específico del péptido natriuretico atrial (NPR-C) (Murthy et al., 1998), y ii) por la producción de CO a través de la activación de la enzima HO2 (Watkins et al., 2004).

### **ATP o purinas relacionadas**

En la década del 70, Burnstock y sus colaboradores (Burnstock et al., 1970) propusieron al ATP como un neurotransmisor de las vías NANC al evidenciar su liberación por el sistema nervioso entérico al estimularlo eléctricamente. Posteriormente una serie de estudios han seguido investigando la participación de este nucleótido en la neurotransmisión, tanto a nivel central como periférico. La idea de que el ATP, la fuente principal de energía en varios ciclos metabólicos intracelulares pudiese participar como un neurotransmisor extracelular fue muy discutida durante varios años. Hoy en día, y gracias a antagonistas purinérgicos mas específicos, técnicas de estudio molecular y bioquímicas, se reconoce que el ATP o moléculas relacionadas tienen diversas funciones en el sistema nervioso incluyendo; neuroprotección, control central de las funciones autonómicas, interacciones glia-neurona, control del tono vascular y angiogénesis, transducción mecanosensorial y en el dolor, neurotransmisión inhibitoria en el sistema nervioso entérico, etc. (Burnstock, 2006). El ATP inmediatamente después de ser liberado de la neurona es degradado por las ectonucleotidasas, y esto tiene una importancia fisiológica porque sus metabolitos también pueden actuar como neurotransmisores o moléculas señalizadores (Zimmermann, 2006).

Los receptores purinérgicos se clasifican en dos grandes familias, los selectivos para adenosina se denominan purinoreceptores P1, y para ATP y ADP se denominan P2

(Burnstock, 2006). En los receptores P1 se han descrito cuatro subtipos los A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Todos acoplados a proteína G, los cuales activan segundos mensajeros como fosfolipasa C (PLC), diacilglicerol (DAG) y inositol trifosfato (IP3) que movilizan el calcio intracelular desde el retículo sarcoplasmico. El aumento del calcio intracelular puede activar diferentes vías como son la proteína kinasa C (PKC), la fosfolipasa A2 (PLA2), o canales de K<sup>+</sup> pendiente de calcio. Los subtipos A<sub>1</sub> y A<sub>3</sub> producen una inhibición, en cambio, los A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> una estimulación de la adenilato ciclasa y AMP cíclico. En los receptores P2 encontramos dos subclases de receptores: los P2X y los P2Y. Los P2X, son receptores ionotrópicos unidos a canales iónicos que median la entrada selectiva de cationes (sodio, potasio y calcio), y se han descrito siete receptores P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>. Los P2Y, son receptores metabotrópicos, están unidos a proteínas G y se han descrito ocho subtipos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> y P2Y<sub>14</sub>. La mayoría de ellos están unidos a proteína G que activan la vía de los segundos mensajeros PLC, DAG e IP3, movilizando del calcio intracelular. Se ha descrito que pueden activar también la vía de la adenilato ciclasa (Burnstock and Knight, 2004).

Los primeros estudios farmacológicos realizados en el EAI para determinar la participación de las purinas en la neurotransmisión inhibitoria lograron sólo demostrar la presencia tanto de purinoreceptores P1 y P2. En estos estudios *in vitro* utilizaron tiras de EAI humano (Burleigh et al., 1979) y de guinea-pig (Crema et al., 1983), observando que la adición exógena tanto de ATP como adenosina producían una relajación dosis-dependiente, pero que debido a la falta de antagonistas purinérgicos específicos no pudieron antagonizar este efecto, únicamente demostrando que estos agonistas utilizaban receptores independientes. Una vez demostrada la presencia de estos receptores en el EAI se realizó el primer estudio *in vivo* en zarigüeya (Rattan and Shah, 1988) para determinar el rol que podrían tener las purinas en el reflejo rectoanal inhibitorio, pero al igual que en los estudios anteriores sólo se demostró la presencia de los receptores purinérgicos en el EAI pero no una participación fisiológica de la purinas en la relajación inducida por el reflejo rectoanal ya que ni los antagonistas utilizados (8-phenyltheophylline y  $\alpha,\beta$ -methylene ATP) ni la tachifilaxis producida por los agonistas (ATP y adenosina) fueron capaces de modificar su respuesta. Por lo tanto estos estudios sólo evidenciaban la presencia farmacológica de los receptores purinérgicos en EAI pero no una participación fisiológica en la neurotransmisión NANC inhibitoria. En la década del 90 se dio un paso importante al lograr evidenciar electrofisiológicamente que los potenciales de postunión inhibitorios (IJP, *inhibitory junction potentials*) tenían un

componente denominado rápido sensible a neurotoxina TTX que era bloqueado por la suramina (un antagonista de los receptores P<sub>2</sub>) y por la apamina (un bloqueador de canales de K<sup>+</sup> activados por calcio) (Rae and Muir, 1996), y que la neurotransmisión nitrérgica y purinérgica participan, interactuando de forma compleja, en la relajación mecánica inducida por la estimulación eléctrica de campo (De Luca et al., 1999). De aquí en adelante y utilizando antagonistas específicos (MRS2179; antagonista receptor P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>) y agonistas (ADPBS; agonista receptores P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub>) purinérgicos mas selectivos junto a los no selectivos (PPADS, suramina, apamina) se ha podido identificar mas específicamente los receptores purinérgicos que participan en la relajación del EAI (McDonnell et al., 2008; Acheson et al., 2009) o en el colon (Gallego et al., 2006; Zhang et al., 2010) demostrando hasta ahora, que el receptor P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> es el principal purinoreceptor en este esfínter (Tabla 1).

### **Monóxido de carbono (CO)**

El CO también se ha propuesto como neurotransmisor NANC que facilitaría la relajación del EAI (Rattan and Chakder, 1993; Chakder et al., 2000) pero teniendo un papel secundario. El CO difunde a través de la membrana plasmática activando la guanilato ciclasa y la consiguiente producción de GMP cíclico (Rattan et al., 2004), al igual que el NO.

En un estudio reciente utilizando ratones transgénicos (HO-2<sup>-/-</sup> y nNOS<sup>-/-</sup>) estos mismos autores demostraron que el CO es el principal neurotransmisor inhibitorio de las vías NANC y que el NO juega un papel secundario en la relajación del EAI (Watkins et al., 2004). Estos resultados se contraponen a la mayoría de los estudios que concuerdan en que el NO es el principal neurotransmisor inhibitorio, mas aún, utilizando ratones knockout nNOS<sup>-/-</sup> demostraron que no había relajación del EAI al ser estimulado por el reflejo rectoanal inhibitorio, sugiriendo un rol crítico del NO (Jones et al., 2003; Terauchi et al., 2005). Una explicación para ese polémico resultado podria estar en la cepa de ratón utilizado, pero se requieren más estudios para dilucidar esta posibilidad. Sin embargo, también se ha descrito que el CO interviene en la relajación del esfínter esofágico inferior porcino (Farre et al., 2006). El CO es producido a partir de la metabolización de la protoporfirina por las enzimas hemooxigenasa 1 (HO-1) y la hemooxigenasa 2 (HO-2), y ésta última ha sido inmunolocalizada en las neuronas mientéricas en la zona rectoanal de la zarigüeya (Battish et al., 2000) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen de los neurotransmisores inhibitorios NANC de los cuales se ha descrito un rol mas importante en la relajación del esfínter anal interno.

Neurotransmisor	Efecto	Referencia
NO	relaja	Burleigh, 1992; O'Kelly et al., 1993; Tomita et al., 2001; O'Kelly et al., 1992; Rattan et al., 1992; McDonnell et al, 2008
VIP	relaja	Biancani et al., 1985; Nurko and Rattan, 1988; Chakder and Rattan, 1995; Chakder and Rattan, 1993a; Watkins et al., 2004
PACAP	relaja/contrae	Rattan and Chakder, 1997a; Chakder and Rattan, 1998; Rae and Muir, 1996
ATP	relaja	Burleigh et al., 1979; Rattan and Shah, 1988; Rae and Muir, 1996; De Luca et al., 1999; McDonnell et al., 2008; Acheson et al., 2009;
CO	relaja	Rattan and Chakder, 1993; Chakder et al., 2000; Battish et al., 2000; Watkins et al., 2004; Rattan et al., 2004

## NEUROTRANSMISORES EXCITATORIOS

De los neurotransmisores excitatorios que actúan en el EAI se conoce muy poco, quizás en parte porque el tono muscular de éste esfínter es de origen miogénico. Aunque adquieren gran importancia cuando existen patologías que cursan con hipotonía el EAI como sucede en la incontinencia fecal. Sin embargo, no hay que olvidar la capacidad de contracción muscular de la nor/adrenalina al estimular los receptores alfa-adrenérgicos, o la acción de la acetilcolina como neurotransmisor liberan mas neurotransmisores excitatorios. De los pocos estudios en EAI que describen los neurotransmisores intrínsecos excitatorios destacan la serotonina, la sustancia P o el neuropeptido Y (Tabla 2). La serotonina (5-HT) es un neurotransmisor excitatorio del plexo mientérico que modula los potenciales postsinápticos excitatorios que participan en el circuito neural, que controla los patrones de motilidad propulsivos en el intestino delgado y grueso, así como estimular las neuronas NANC inhibitorias, sugiriendo que la 5-HT actúa como un neurotransmisor en las interneuronas (Galligan and Parkman, 2007). En estudio *in vivo* en ratas anestesiadas a las cuales se les realizó manometrías anorectales, la 5-HT produjo una relajación del EAI inducida por la activación de las neuronas NANC inhibitorias (Goldberg et al., 1986). En un estudio *in vitro* utilizando tiras de EAI de pacientes con incontinencia fecal neurogénica, no observaron diferencia en la contracción inducida por la 5-HT pero si una menor sensibilidad a carbacol (agonista

muscarínico) comparado con tiras control, concluyendo que en esta patología los receptores serotoninérgicos no están afectados (Speakman et al., 1992). Como podemos observar, la 5-HT dependiendo del modelo experimental utilizado (*in vivo* vs. *in vitro*) puede producir relajación o contracción del EAI.

El neuropeptido Y fue estudiado en la zarigüeya en un modelo *in vivo* con manometría anorectal y observaron que producía una contracción del EAI, estimulando directamente la célula muscular lisa y además, siendo capaz de inhibir el reflejo rectoanal inhibitorio (Nurko and Rattan, 1990). Las taquiquininas son otro grupo de neurotransmisores que tiene una función excitatoria en el colon, representadas por la sustancia P y NKA actuando sobre receptores NK1 o NK2 (Auli et al., 2008). En un estudio *in vitro* utilizando tiras de EAI de conejo, sustancia P produjo una contracción muscular que depende del calcio intracelular (Bitar et al., 1990). Y con respecto a la innervación colinérgica, Knudsen et al. concluye que el EAI presenta nervios excitatorios colinérgicos y nervios NANC inhibitorios, desarrollándose una compleja interacción de mecanismos pre- y post-sinápticos entre ellos. Donde pre-sinápticamente el NO inhibiría la liberación de acetilcolina y/o una inhibición de la acción post-sináptica de VIP y ATP mediada por acetilcolina (Knudsen et al., 1995). En un estudio con tiras de EAI humano, O'Kelly et al. observó que al estimular los receptores muscarínicos presentes en el tejido se producía una relajación del EAI al interaccionar con éstos receptores de las motoneuronas inhibitorias, a diferencia de la contracción inducida en tiras de músculo liso rectal (O'Kelly et al., 1993b). De esto se desprende que dependiendo del modelo experimental y de la forma de estimulación de las vías colinérgicas y receptores muscarínicos, se puede observar relajación o contracción del EAI.

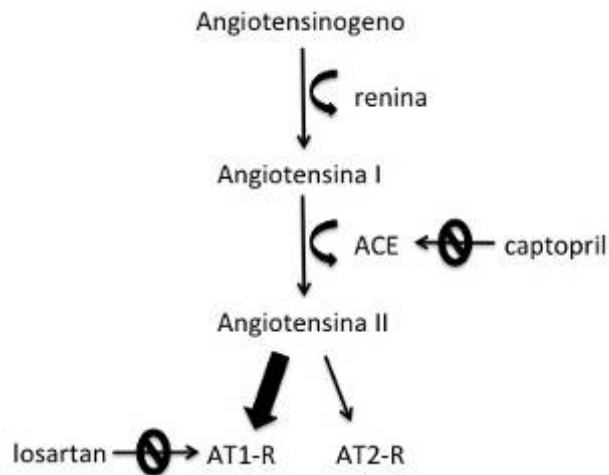
**Tabla 2.** Resumen de los neurotransmisores excitatorios que tienen un rol mas importante en la contracción del esfínter anal interno.

Neurotransmisor	Efecto	Referencia
5-HT	contrae/relaja	Burleigh et al., 1979; Speakman et al., 1992 / Goldberg et al. 1986
sustancia P	contrae	Bitar et al., 1990; Tomita et al., 1999
neuropeptido Y	contrae	Nurko and Rattan, 1990
noradrenalina	contrae/relaja	Parks et al., 1969; O'Kelly et al., 1993b; Rattan, 2005
acetilcolina	contrae/relaja	O'Kelly et al., 1993b, Knudsen et al. 1995

## ***SUSTANCIAS NEUROHUMORALES QUE AFECTAN EL TONO DEL ESFINTER ANAL INTERNO***

### **Angiotensina**

El importante rol de la angiotensina II (Ang II) en la modulación neurohumoral del tono basal del EAI ha sido demostrado mediante tres grupos de evidencias: a) el efecto farmacológico de la Ang II y sus metabolitos, b) la presencia de la maquinaria enzimática para la biosíntesis de Ang II en el EAI, y c) por la producción local de Ang II en el EAI de la rata. Estos hallazgos sugieren una participación activa del sistema renina-angiotensina en el control del tono EAI (De Godoy et al., 2004; De Godoy and Rattan, 2005). A partir de angiotensinógeno, la renina lo hidroliza transformándolo en angiotensina I (Ang I), posteriormente la enzima convertidora de angiotensina (ECA) transforma la Ang I en Ang II. Esta última estimula los receptores AT1 acoplados a proteína G que activan intracelularmente la PKC, la MAPK y la tirosina kinasa produciendo una movilización de calcio y la consiguiente contracción de la célula muscular lisa del EAI. Además de este efecto sobre la célula muscular lisa, también parece ser que una parte de la contracción inducida por Ang II estaría mediada por alfa-adrenoreceptores (Fan et al., 2002). También la Ang II puede estimular los receptores AT2 produciéndose una relajación muscular. Por tanto la respuesta neta a la Ang II dependerá del tejido diana, de la proporción AT1/AT2, o de la desensibilización del receptor AT1 (De Godoy and Rattan, 2006b). Ya se han realizado algunos estudios para determinar la posible acción terapéutica que abre esta vía en un EAI hipertenso. Para ello, De Godoy et al. utilizando una cepa de ratas normotensa y otra hipertensa, evidenció que la presión del canal anal y la presión sistólica disminuía de forma significativa en ambas cepas, pero de forma mas marcada en la hipertensa, después de administrar por vía endovenosa captopril o losartan (antagonista AT1) (De Godoy and Rattan, 2006a) (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema representativo del sistema renina-angiotensina y de antagonistas selectivos utilizados en estudios del esfínter anal interno.

### Prostanoides

La fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ) tiene un rol importante en diversas respuestas celulares incluyendo la transducción de señales, la producción de precursores de eicosanoides, y el metabolismo de los fosfolípidos de membrana. Las  $PLA_2$  pertenecen a un gran grupo de enzimas que hidrolizan los ácidos grasos de los fosfolípidos. Se clasifican en dos grupos según su ubicación en la célula: extracelular ( $sPLA_2$ ) o intracelular ( $cPLA_2$ ) (Six and Dennis, 2000). Cao et al evidencio que las  $PLA_2$  participaban en el mantenimiento del tono basal del esfínter esofágico inferior humano (Cao et al., 2000). Basándose en este estudio, De Godoy et al utilizando ratas demostró por medio de estudios moleculares e *in vivo* con manometría anorectal, que el tono basal del EAI es dependiente de la actividad de la  $PLA_2$ , ya que los antagonistas específicos disminuían significativamente la presión basal del canal anal con mínimos efectos cardiovasculares (De Godoy and Rattan, 2007). Continuando con esta línea de investigación, utilizando técnicas *in vitro* (biología molecular, baño órgano) y estudios *in vivo* en ratas y ratones control y transgénicos ( $COX-1^{-/-}$  y  $COX-2^{-/-}$ ) (De Godoy et al., 2009a; De Godoy et al., 2009b) demostró que el ácido araquidónico y sus metabolitos, principalmente por la vía de la  $COX-1$ , participan activamente en la regulación del tono del EAI.

## **VASCULARIZACIÓN DEL CANAL ANAL**

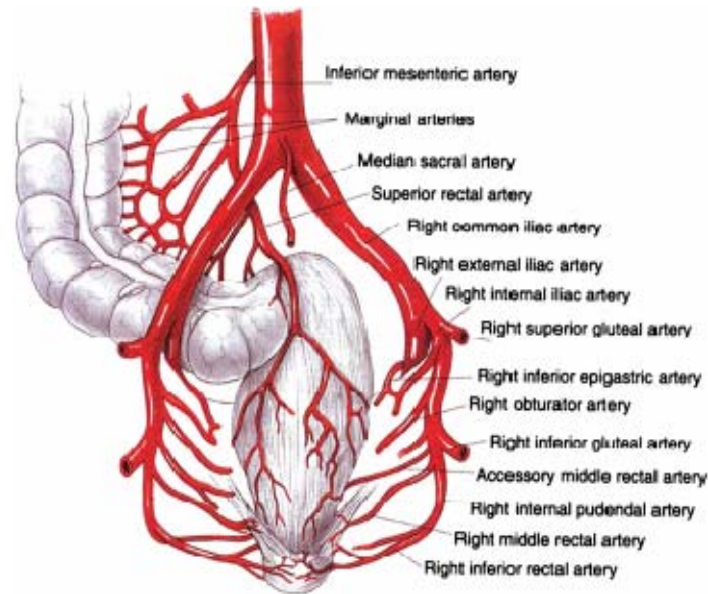
### **Flujo arterial**

El canal anal recibe riego sanguíneo arterial a través de las arterias rectales media e inferior (Ayoub, 1978; Goligher, 1987; Barleben and Mills, 2010). Las arterias rectales inferiores o arterias hemorroidales inferiores son ramas de la arteria pudenda interna que a su vez se originan de las arterias ilíacas internas, llevando irrigación sanguínea a la línea media posterior del canal anal, al EAI y EAE y al músculo elevador del ano (Thomson, 1975; Schouten et al., 1994). Las arterias mediales rectales o hemorroidales medias sólo se encuentran en el 40% de la población. Se originan habitualmente de las arterias hipogástricas o en ocasiones de las arterias pudendas o de las arterias glúteas inferiores y alcanzan la pared rectal al nivel del suelo pélvico (Shafik, 1975; DiDio et al., 1986). La arteria rectal superior es una rama de la arteria mesentérica inferior, que a nivel de la vértebra sacra S3 se divide en una rama derecha e izquierda, las cuales llevan riego sanguíneo a la pared derecha del recto, mientras que la rama izquierda irriga la pared anterior e izquierda (Ayoub, 1978). Aunque la zona anorectal posee irrigación desde las arterias rectales inferior y media, no existen colaterales intramurales entre las ramas de la arteria rectal inferior en el canal anal, creando un área potencial de isquemia en la línea media posterior del EAI (Klosterhalfen et al., 1989; Schouten et al., 1994) (Figura 9).

### **Flujo venoso**

El drenaje venoso anorectal se realiza a través de las venas hemorroidales superior, media e inferior. Las venas son bilaterales y discurren con las arterias. Entre las venas y arterias hemorroidales se forman anastomosis arteriovenosas llamados plexo hemorroidales. Se localizan en el espacio subepitelial del canal anal y se dividen por encima de la línea pectínea en la zona interna (plexo superior que origina los hemorroides internos) y caudalmente en la zona externa (plexo inferior que origina los hemorroides externos) (Barleben and Mills, 2010).





**Figura 9.** Diagrama representativo de la irrigación arterial del canal anal. Imagen obtenida de Barleben A and Mills S (2010) Anorectal anatomy and physiology. *Surg Clin North Am* 90:1-15.

## ***REVESTIMIENTO EPITELIAL Y MUCOSO DEL CANAL ANAL***

La mucosa del canal anal está dividida en dos segmentos separados por la línea pectínea, la cual se origina de la unión del ectodermo con el endodermo a nivel embriológico. Sobre la línea pectínea la mucosa rectal está formada por un epitelio columnar. A la altura de la línea pectínea la mucosa se denomina epitelio de transición, que pasará a modificarse en un epitelio escamoso estratificado para terminar en la piel de la zona perianal. La mucosa del canal anal está formada por pliegues verticales llamados columnas de Morgagni o anales, éstas columnas terminan en las criptas de Morgagni ubicadas sobre la línea pectínea, las cuales presentan un orificio que permite el drenaje de las glándulas anales y cuya infección puede dar lugar a los abscesos anales y/o fistula anal (Goligher, 1987).

## ***FISIOLOGÍA DEL CANAL ANAL***

En circunstancias normales el recto está vacío durante la mayor parte del tiempo y sólo de vez en cuando llega materia fecal o gas desde el colon. La llegada de material fecal suficiente al recto desencadenará la percepción consciente de su llegada y el

reflejo rectoanal inhibitorio que es la relajación refleja del EAI al distenderse el recto por el contenido fecal estimulándose las motoneuronas intrínsecas inhibitorias descendentes y motoneuronas excitatorias ascendentes (Radomirov et al., 2009) permitiendo la exposición del contenido rectal al canal anal. El tiempo de relajación del EAI dependerá del volumen de distensión, siendo directamente proporcional a éste (Sun et al., 1990) y permitirá la exposición del contenido fecal a la zona del anillo anorrectal o en canal anal superior donde podría existir una mayor concentración de receptores sensoriales (Smout and Akkermans, 1992). Es en este momento cuando se define la consistencia del contenido (sólido, gas o líquido) y se toma la decisión consciente de defecar o no. Si se decide no defecar el individuo responde con una contracción del EAE devolviéndose el contenido al recto. Si se decide defecar se produce la relajación voluntaria del esfínter externo asociada al pujo abdominal que facilita la expulsión del bolo fecal. Una vez evacuado el contenido anal, el EAI recupera su tono muscular y los músculos del suelo pélvico su contracción tónica, recuperándose la continencia (Cerdan et al., 2005). Las ondas lentas del EAI podrían facilitar el transporte de algunos restos fecales que permanecieran en el canal anal hacia el recto (Sangwan et al., 1995).

## ***FISURA ANAL***

### **Epidemiología**

Se estima que la prevalencia de la fisura anal puede afectar entre el 10% a 15% de la población general (Dhawan and Chopra, 2007). Sin embargo, no hay cifras exactas de la prevalencia de esta enfermedad. Esta patología se observa principalmente en la población adulto-joven y es frecuentemente e incorrectamente diagnosticada –en asistencia primaria- y confundida con las hemorroides (Madoff and Fleshman, 2003). A pesar de esta alta prevalencia y de ser una enfermedad que afecta en gran medida la calidad de vida (Ortiz et al., 2005), su fisiopatología y etiología siguen siendo desconocidas y su tratamiento –médico y quirúrgico- es completamente inespecífico.

### **Definición**

La fisura anal se define como una laceración, lágrima o “split” longitudinal en la zona distal del canal anal que se extiende debajo de la línea pectínea al margen anal. La mayoría de las fisuras son idiopáticas y se encuentran en la línea media posterior del canal anal. Las fisuras ubicadas lateralmente o de presentación múltiple, están asociadas

a traumas obstétricos o quirúrgicos, enfermedad de Crohn, sífilis, VIH o tuberculosis (Lund and Scholefield, 1996; Schouten et al., 1996). La presentación de esta enfermedad puede ser aguda o crónica. La fisura aguda cicatriza espontáneamente o con manejo dietético-higiénico (dieta rica en fibra, baños de asiento) en un plazo de unas 3 semanas. La fisura se considera crónica a partir de más de 6 - 8 semanas de evolución y presenta cambios morfológicos como son; bordes de la fisura engrosados y fibrosados, se observan las fibras del EAI a través de la fisura, y presentar un papiloma fibroepitelial denominado centinela (Madoff and Fleshman, 2003; Steele and Madoff, 2006).

### **Fisiopatología**

Históricamente se creía que la fisura anal se producía secundariamente a una lesión local de la mucosa por el paso de deposiciones duras (Lund and Scholefield, 1996). Sin embargo, la presencia de estreñimiento solo se observaba en el 20% de estos pacientes, mas aún, en el 4 % a 7 % de los pacientes con fisura anal (McCallion and Gardiner, 2001) la diarrea se ha reportado como un factor predisponente. De forma asociada a la lesión en la mucosa, aparece el espasmo del EAI que contribuye al dolor anal y al estreñimiento secundario creándose un círculo vicioso. La esfinterotomía o la dilatación anal era el tratamiento de elección que buscaba interrumpir este círculo reduciendo la hipertonia y/o el espasmo del esfínter. A partir de 1989 diferentes investigadores (Klosterhalfen et al., 1989; Schouten et al., 1994; Lund et al., 1999) han demostrado que el flujo sanguíneo de la línea media posterior del canal anal y de la zona anocutánea, que depende de la arteria rectal inferior, es deficiente en pacientes con fisura anal lo que ocasiona una zona potencial para la isquemia. La presión sanguínea arterial media normal es de 80 mmHg, en la fisura anal la presión en reposo del canal anal es superior a 90 mmHg, esta hipertonia comprimiría las arteriolas disminuyendo o bloqueando el flujo sanguíneo de la zona anocutánea. Con estos datos surge una nueva hipótesis de la fisiopatología de la fisura anal, considerando que la hipertonia del EAI produciría una úlcera isquémica en la línea media posterior, impidiendo su cicatrización y originando el dolor. Estas observaciones sugieren que la hipertonia del músculo liso del EAI sería la causa primaria de la fisura anal (Gibbons et al., 1986; McNamara et al., 1990).

Teniendo como referencia que la fisura anal se caracteriza clínicamente por un

aumento del tono del EAI que desencadena en una úlcera isquémica, cabe preguntarse ¿Cuál es la causa u origen del aumento del tono en el EAI? Este aumento podría originarse de: 1. Una neurotransmisión inhibitoria reducida, 2. Un aumento de la inervación excitatoria, o 3. Una alteración de la homeostasis del calcio en la célula muscular lisa del EAI que incrementa su contracción tónica. Existe un estudio (Lund, 2006) que utilizando técnicas inmunohistoquímicas observaron que en el EAI de pacientes con fisura anal crónica presentaban menor inmunoreactividad para la NOS en comparación a esfínter sanos, concluyendo que en esta patología habría una deficiencia en la producción de óxido nítrico por parte de las motoneuronas inhibitorias. Sin embargo, es necesario mas estudios *in vitro* como *in vivo* para caracterizar los neurotransmisores y los mecanismos que participan en la relajación y control del tono del EAI, pudiendo sólo así poder plantear hipótesis sobre la fisiopatología de la fisura anal.

### **Histología**

Existen muy pocos trabajos que hayan estudiado la histología del EAI en pacientes con fisura anal. Todos ellos describen una importante alteración estructural y morfológica (Brown et al., 1989; Lund, 2006). En las biopsias del EAI de estos pacientes se observa una significativa pérdida de masa muscular lisa que es reemplaza por tejido fibrótico, especialmente en las fisuras crónicas. En el estudio de Lund se describe un menor marcaje de la sintasa de óxido nítrico en comparación a tejido sano, indicando una posible deficiencia de óxido nítrico en el EAI de los pacientes con fisura anal.

### **Sintomatología**

El signo clínico característico de la fisura anal es el dolor severo y marcado durante o algunas horas después de la defecación. En fisuras agudas el dolor puede ser de corta duración en cambio en fisuras crónicas puede durar horas o ser un dolor continuo. Los pacientes describen el dolor similar “al paso de vidrios quebrados” durante la defecación (Madoff and Fleshman, 2003). También se observa sangrado después de la defecación, prurito, estreñimiento o disuria (Acheson and Scholefield, 2005). En la manometría anorectal las características observadas son aumento de la presión del canal anal con presencia de ondas lentas y superlentas. Hay que recordar que

la presión basal normal del canal anal varía entre 40 – 80 mmHg (Diamant *et al.*, 1999). Las ondas superlentas se presentan en mayor porcentaje en comparación a individuos sanos, tienen una gran amplitud (> 20 mmHg) y una frecuencia de 1 a 2 ondas /minuto (Stahl, 2006; Yoshino *et al.*, 2007).

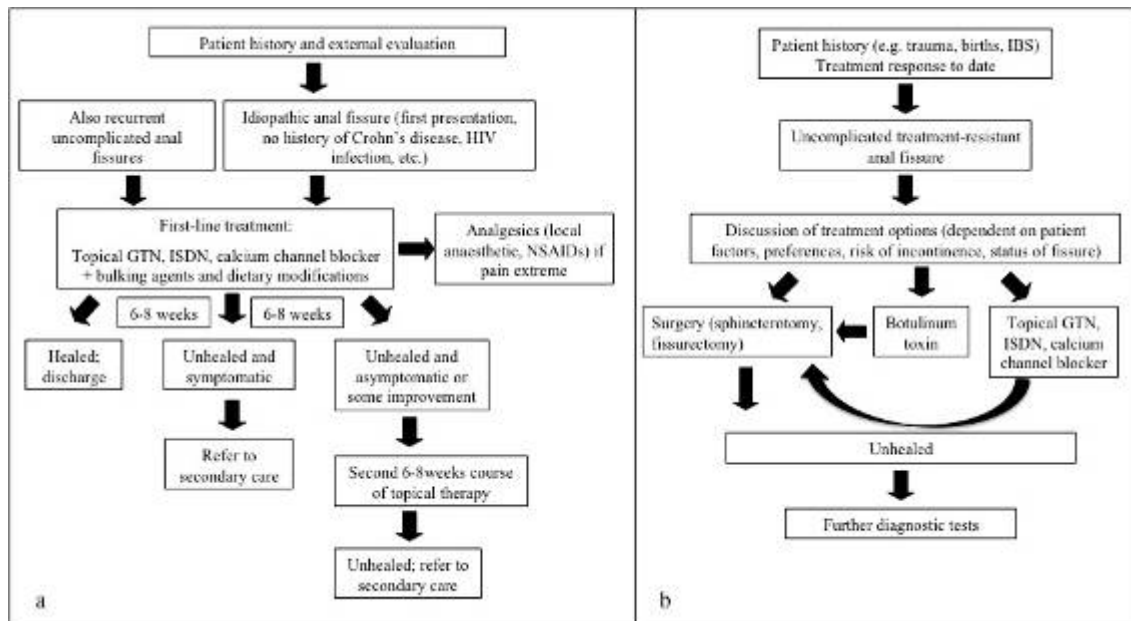
### **Diagnóstico**

El diagnóstico de la fisura anal se realiza por inspección directa de la zona perianal separando los glúteos para facilitar la observación del ano y la fisura. En algunas ocasiones es necesario el examen bajo anestesia general para confirmar o descartar posibles diagnósticos diferenciales como abscesos interesfinteriano o neoplasias del canal anal (Acheson and Scholefield, 2005).

### **Tratamiento**

Existen distintos algoritmos para abordar el tratamiento de la fisura anal (Acheson and Scholefield, 2005; Ayantunde and Debrah, 2006; Lund *et al.*, 2006; Bhardwaj and Parker, 2007; Collins and Lund, 2007). Los objetivos principales son reducir la presión del canal anal y con ello permitir la cicatrización de la fisura. En la primera línea de tratamiento (o medidas conservadoras, tratamiento no-quirúrgico) se utilizan: laxantes, baños de asiento, aumentar la fibra en la dieta, donantes de óxido nítrico, bloqueadores de canales de calcio, y en pacientes que presentan un dolor marcado el uso de analgésicos o anestésicos tópicos. El tratamiento se realiza durante 6 – 8 semanas y posteriormente se realiza un nuevo examen. En las fisuras que han cicatrizado, se recomienda al paciente mantener la dieta rica en fibra; en aquellas fisuras no cicatrizadas pero que existe una mejoría clínica se mantiene el tratamiento iniciado por otras 6 - 8 semanas. En cambio, las fisuras que no han cicatrizado ni ha habido mejoría clínica pasan a la segunda línea de acción, en esta etapa (o tratamiento quirúrgico) hay que reevaluar al paciente confirmando que la fisura sea la causa primaria y no existan otras enfermedades (VIH, sífilis, enfermedad de Crohn, tuberculosis, etc.). Si la fisura anal sigue siendo la causa primaria, se ofrece la alternativa de tratamiento quirúrgico (esfinterotomía del esfínter anal interno, dilatación anal, etc.), o tratamiento con la toxina botulínica o continuar con el tratamiento tópico de nitratos y/o bloqueadores de canales de calcio. Si la opción a seguir es el tratamiento quirúrgico, se debe discutir con el paciente los pros y contra de esta opción, y valorar los posibles efectos adversos en

especial la incontinencia fecal. Es entonces cuando puede ser necesarios realizar pruebas complementarias como ecografías endoanales y manometrías anorectales para descartar problemas en el esfínter anal externo o musculatura esquelética (Figura 10).



**Figura 10.** Algoritmo para el tratamiento de la fisura anal. a. Presentación inicial (fisura aguda), b. Fisuras resistentes al tratamiento inicial (fisura crónica). GTN, gliceril trinitrato; ISDN, isosorbide trinitrato; NSAIDs, antiinflamatorio no esterooidal; IBS, síndrome intestino irritable. Esquema obtenido de Lund JN, Nystrom PO, Coremans G, Herold A, Karaitianos I, Spyrou M, Schouten WR, Sebastian AA and Pescatori M (2006) An evidence-based treatment algorithm for anal fissure. *Tech Coloproctol* 10:177-180.

A continuación se describirán algunos de las opciones terapéuticas (farmacológicas y quirúrgicas) más utilizadas en el tratamiento de la fisura anal:

### Donantes de óxido nítrico

Gliceril trinitrato (glyceryl trinitrate o GTN) o isosorbide dinitrato (isosorbide dinitrate o ISDN) actúan como donadores de óxido nítrico permitiendo la cicatrización de la fisura a través de aumentar el flujo sanguíneo secundario a una reducción de la presión anal y quizás por la vasodilatación de las arterias que irrigan la zona del margen anal. Son fármacos de primera elección en el tratamiento de la fisura anal pero presentan el gran inconveniente de desarrollar efecto secundarios frecuentemente como fuertes cefaleas (siendo una causa de abandono del tratamiento) y poca efectividad a largo plazo (Bhardwaj and Parker, 2007).

### **Bloqueadores canales de calcio**

La nifedipina y el diltiazem son los más usados, pero diltiazem es el bloqueador de canales de calcio más utilizado de forma tópica en la práctica clínica, para reducir el tono del EAI y la consiguiente cicatrización de la fisura. Bloquea la entrada de calcio a la célula muscular lisa del EAI interrumpiendo su capacidad de contracción. Sus efectos adversos son pocos, incluyendo por ejemplo, dermatitis perianal (Collins and Lund, 2007).

### **Neurotoxinas**

Toxina botulínica (tipo A), neurotoxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, reduce el tono del EAI a través de reducir la liberación de noradrenalina (Jones et al., 2004), mostrando tasas de cicatrización de la fisura superiores a los donantes de óxido nítrico. Se han descrito efectos adversos como incontinencia a flatos o heces, hematoma perianal e infecciones subcutáneas. La gonyautoxina, una fitotoxina producida por dinoflagelados, también han sido utilizada en el manejo de la fisura anal mostrando una elevada tasa de cicatrización (Garrido et al., 2005), sin embargo, no hay un estudio control randomizado que permita validar el uso clínico de la gonyautoxina.

### **Inhibidor de la fosfodiesterasa-5**

Los inhibidores de la fosfodiesterasa-5, como el sildenafil, inhiben la degradación de la guanosina monofosfato cíclica (cGMP) intracelular produciendo una relajación sostenida del músculo liso. El sildenafil se ha utilizado de forma tópica en pacientes con fisura anal crónica mostrando una reducción de la presión del canal anal (Torradabella et al., 2004), sin embargo, faltan estudios que cuantifiquen la eficacia en la cicatrización de la fisura, pero deja abierta la puerta a esta nueva herramienta farmacológica.

### **Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina**

El sistema renina-angiotensina ha sido descrito en el EAI y que participaría en el control del tono. Utilizando captopril de forma tópica en voluntarios (Khaikin, 2007) se demostró que este inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (iECA), producía una reducción en la presión del canal anal en reposo observada manométricamente. Al igual que la neurotoxina gonyautoxina y los inhibidores de la fosfodiesterasa-5, los iECA pueden ser opciones farmacológicas nuevas para el

tratamiento de la fisura anal crónica.

### **Dilatación anal**

Esta técnica quirúrgica fue muy utilizada como tratamiento de la fisura anal en la década de los 80. Consiste en provocar la elongación del EAI mediante la introducción de 4 dedos dentro del canal anal y estirar el esfínter durante 2 a 4 minutos. Esta maniobra tiene una tasa de cicatrización de la fisura del 90% pero se han descrito recidivas de hasta un 56%. En los últimos años se ha descrito ecográficamente el daño que produce en las fibras del EAI, y que el riesgo de incontinencia fecal secundario es significativamente superior a los otros procedimientos quirúrgicos, por lo que es una técnica cuyo uso ha disminuido (Collins and Lund, 2007).

### **Esfinterotomía lateral interna**

Durante la década de 1950 el Dr. S. Eisenhammer popularizó la esfinterotomía anal interna para tratar la fisura anal, inicialmente utilizando la técnica de la esfinterotomía en la línea media posterior y luego la esfinterotomía lateral interna (ELI), sugiriendo que esta última presentaba mejor tasa de cicatrización y menor alteración funcional del EAI. Según el metanálisis realizado por Nelson, la ELI es la técnica quirúrgica mas utilizada por presentar las mejores tasa de cicatrización de la fisura (Nelson, 1999). De forma general se describe que la ELI presenta tasas de cicatrización del 95% de la fisura anal crónica (Acheson and Scholefield, 2005; Collins and Lund, 2007). La tasa de recidiva o fallo de cicatrización es menor al 3% (Pernikoff et al., 1994; Madoff and Fleshman, 2003). Tanto la recidiva de la fisura anal como la incontinencia fecal secundaria a la cirugía, dependen exclusivamente de la extensión de la esfinterotomía realizada (Garcia-Granero et al., 2009). La frecuencia de incontinencia fecal posterior a la cirugía varían ampliamente según los estudios pero se habla de tasas que van de: 0% - 36% para gases, 0% - 21% para líquidos y menos del 5% para sólidos (McCallion and Gardiner, 2001; Lindsey et al., 2004).

Como conclusión de las distintas opciones terapéuticas y tratando de dilucidar que fármaco/s sería/n la mejor opción, en un trabajo sistemático de la Cochrane, Nelson revisa 53 estudios control randomizados concluyendo que los donantes de óxido nítrico, los bloqueadores de canales de calcio y la toxina botulínica fueron significativamente superiores (pero marginalmente) respecto a placebo en permitir la cicatrización de la



fisura anal (48% vs. 37%,  $p < 0.004$ ), y que presentaban tasas de recidivas de alrededor del 50% (Nelson, 2006). Estos datos indican claramente que el tratamiento farmacológico de la fisura anal no es un tema resuelto. Por su parte, Arroyo (2005) demostró que las tasas de cicatrización de la fisura después de la esfínterotomía lateral interna fueron significativamente superior a la toxina botulínica (92.5% vs. 45%), concluyendo que este tratamiento quirúrgico sería el más efectivo (Arroyo et al., 2005).

## **Bibliografía**

- Acheson A, Rayment S, Eames T, Munday M, Nisar P, Scholefield J and Wilson VG (2009) Investigation of the role of adrenergic and non-nitroergic, non-adrenergic neurotransmission in the sheep isolated internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**:335-345.
- Acheson AG and Scholefield JH (2005) Anal fissure: the changing management of a surgical condition. *Langenbecks Arch Surg* **390**:1-7.
- Al-Ali S, Blyth P, Beatty S, Duang A, Parry B and Bissett IP (2009) Correlation between gross anatomical topography, sectional sheet plastination, microscopic anatomy and endoanal sonography of the anal sphincter complex in human males. *J Anat* **215**:212-220.
- Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide B, Burton D, Baxter K and Zinsmeister AR (2007) Nitroergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**:G1359-1365.
- Arroyo A, Perez F, Serrano P, Candela F, Lacueva J and Calpena R (2005) Surgical versus chemical (botulinum toxin) sphincterotomy for chronic anal fissure: long-term results of a prospective randomized clinical and manometric study. *Am J Surg* **189**:429-434.
- Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M and Clave P (2008) Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**:1043-1055.
- Ayantunde AA and Debrah SA (2006) Current concepts in anal fissures. *World J Surg* **30**:2246-2260.
- Ayoub SF (1978) Arterial supply to the human rectum. *Acta Anat (Basel)* **100**:317-327.
- Bajwa A and Emmanuel A (2009) The physiology of continence and evacuation. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **23**:477-485.
- Barleben A and Mills S (2010) Anorectal anatomy and physiology. *Surg Clin North Am* **90**:1-15, Table of Contents.
- Bassotti G, Villanacci V, Antonelli E, Morelli A and Salerni B (2007) Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab Invest* **87**:628-632.

- Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S and Rattan S (2000) Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**:G148-155.
- Bennett RC and Duthie HL (1964) The Functional Importance of the Internal Anal Sphincter. *Br J Surg* **51**:355-357.
- Bertrand PP and Bornstein JC (2002) ATP as a putative sensory mediator: activation of intrinsic sensory neurons of the myenteric plexus via P2X receptors. *J Neurosci* **22**:4767-4775.
- Bhardwaj R and Parker MC (2007) Modern perspectives in the treatment of chronic anal fissures. *Ann R Coll Surg Engl* **89**:472-478.
- Bhardwaj R, Vaizey CJ, Boulos PB and Hoyle CH (2000) Neuromyogenic properties of the internal anal sphincter: therapeutic rationale for anal fissures. *Gut* **46**:861-868.
- Bharucha AE (2006) Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil* **18**:507-519.
- Biancani P, Walsh J and Behar J (1985) Vasoactive intestinal peptide: a neurotransmitter for relaxation of the rabbit internal anal sphincter. *Gastroenterology* **89**:867-874.
- Bitar KN, Hillemeier C and Biancani P (1990) Differential regulation of smooth muscle contraction in rabbit internal anal sphincter by substance P and bombesin. *Life Sci* **47**:2429-2434.
- Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ and Cohen RA (1994) Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**:850-853.
- Bornstein JC, Costa M and Grider JR (2004) Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**:34-38.
- Brookes SJ (2001) Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec* **262**:58-70.
- Brown AC, Sumfest JM and Rozwadowski JV (1989) Histopathology of the internal anal sphincter in chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* **32**:680-683.
- Brown DR and Timmermans JP (2004) Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**:50-54.

- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM and Herman AG (1990) Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**:346-347.
- Burleigh DE (1983) Non-cholinergic, non-adrenergic inhibitory neurons in human internal anal sphincter muscle. *J Pharm Pharmacol* **35**:258-260.
- Burleigh DE (1992) Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* **102**:679-683.
- Burleigh DE, D'Mello A and Parks AG (1979) Responses of isolated human internal anal sphincter to drugs and electrical field stimulation. *Gastroenterology* **77**:484-490.
- Burnett SJ and Bartram CI (1991) Endosonographic variations in the normal internal anal sphincter. *Int J Colorectal Dis* **6**:2-4.
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **27**:166-176.
- Burnstock G (2009) Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* **42**:3-8.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D and Smythe A (1970) Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **40**:668-688.
- Burnstock G and Knight GE (2004) Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **240**:31-304.
- Cabarrocas J, Savidge TC and Liblau RS (2003) Role of enteric glial cells in inflammatory bowel disease. *Glia* **41**:81-93.
- Cao W, Harnett KM, Behar J and Biancani P (2000) Group I secreted PLA2 in the maintenance of human lower esophageal sphincter tone. *Gastroenterology* **119**:1243-1252.
- Carapeti EA, Kamm MA, Evans BK and Phillips RK (1999) Topical phenylephrine increases anal sphincter resting pressure. *Br J Surg* **86**:267-270.
- Cerdan J, Cerdan C and Jimenez F (2005) [Anatomy and physiology of continence and defecation]. *Cir Esp* **78 Suppl 3**:2-7.
- Chakder S, Cao GY, Lynn RB and Rattan S (2000) Heme oxygenase activity in the internal anal sphincter: effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* **118**:477-486.

- Chakder S and Rattan S (1993a) The entire vasoactive intestinal polypeptide molecule is required for the activation of the vasoactive intestinal polypeptide receptor: functional and binding studies on opossum internal anal sphincter smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **266**:392-399.
- Chakder S and Rattan S (1993b) Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP, and NO. *Am J Physiol* **264**:G702-707.
- Chakder S and Rattan S (1995) Distribution of VIP binding sites in opossum internal anal sphincter circular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **272**:385-391.
- Chakder S and Rattan S (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in opossum internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* **275**:G769-777.
- Collins EE and Lund JN (2007) A review of chronic anal fissure management. *Tech Coloproctol* **11**:209-223.
- Cornelissen W, De Laet A, Kroese AB, Van Bogaert PP, Scheuermann DW and Timmermans JP (2000) Electrophysiological features of morphological Dogiel type II neurons in the myenteric plexus of pig small intestine. *J Neurophysiol* **84**:102-111.
- Costa M, Brookes SJ and Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4**:iv15-19; discussion iv26.
- Courtney H (1950) Anatomy of the pelvic diaphragm and anorectal musculature as related to sphincter preservation in anorectal surgery. *Am J Surg* **79**:155-173, illust.
- Crema A, Frigo GM, Lecchini S, Manzo L, Onori L and Tonini M (1983) Purine receptors in the guinea-pig internal anal sphincter. *Br J Pharmacol* **78**:599-603.
- De Godoy MA, Dunn S and Rattan S (2004) Evidence for the role of angiotensin II biosynthesis in the rat internal anal sphincter tone. *Gastroenterology* **127**:127-138.
- De Godoy MA, Rattan N and Rattan S (2009a) Arachidonic acid metabolites follow the preferential course of cyclooxygenase pathway for the basal tone in the internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G727-734.
- De Godoy MA, Rattan N and Rattan S (2009b) COX-1 vs. COX-2 as a determinant of basal tone in the internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G219-225.

- De Godoy MA and Rattan S (2005) Autocrine regulation of internal anal sphincter tone by renin-angiotensin system: comparison with phasic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**:G1164-1175.
- De Godoy MA and Rattan S (2006a) Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor subtype 1 inhibitors reconstitute hypertensive internal anal sphincter in the spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:725-734.
- De Godoy MA and Rattan S (2006b) Translocation of AT1- and AT2-receptors by higher concentrations of angiotensin II in the smooth muscle cells of rat internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **319**:1088-1095.
- De Godoy MA and Rattan S (2007) Role of phospholipase A2 (group I secreted) in the genesis of basal tone in the internal anal sphincter smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**:G979-986.
- De Luca A, Li CG and Rand MJ (1999) Nitrergic and purinergic mechanisms and their interactions for relaxation of the rat internal anal sphincter. *J Auton Pharmacol* **19**:29-37.
- de Miguel M, Oteiza F, Ciga MA and Ortiz H (2005) [The surgical treatment of hemorrhoids]. *Cir Esp* **78 Suppl 3**:15-23.
- del Rio C, Biondo S and Marti-Rague J (2005) [Fecal incontinence. Patient assessment and classical treatments.]. *Cir Esp* **78 Suppl 3**:34-40.
- Dhawan S and Chopra S (2007) Nonsurgical approaches for the treatment of anal fissures. *Am J Gastroenterol* **102**:1312-1321.
- DiDio LJ, Diaz-Franco C, Schemainda R and Bezerra AJ (1986) Morphology of the middle rectal arteries. A study of 30 cadaveric dissections. *Surg Radiol Anat* **8**:229-236.
- Eckardt VF, Schmitt T and Bernhard G (1997) Anal ultra slow waves: a smooth muscle phenomenon associated with dyschezia. *Dig Dis Sci* **42**:2439-2445.
- Essani R, Sarkisyan G, Beart RW, Ault G, Vukasin P and Kaiser AM (2005) Cost-saving effect of treatment algorithm for chronic anal fissure: a prospective analysis. *J Gastrointest Surg* **9**:1237-1243; discussion 1243-1234.
- Fan YP, Puri RN and Rattan S (2002) Animal model for angiotensin II effects in the internal anal sphincter smooth muscle: mechanism of action. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**:G461-469.

- Farre R, Auli M, Lecea B, Estrada O, Sunol X and Clave P (2007) Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**:1427-1436.
- Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E and Clave P (2006) Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:1238-1248.
- Fernandez-Fraga X, Azpiroz F and Malagelada JR (2002) Significance of pelvic floor muscles in anal incontinence. *Gastroenterology* **123**:1441-1450.
- Frenckner B and Euler CV (1975) Influence of pudendal block on the function of the anal sphincters. *Gut* **16**:482-489.
- Fritsch H, Brenner E, Lienemann A and Ludwikowski B (2002) Anal sphincter complex: reinterpreted morphology and its clinical relevance. *Dis Colon Rectum* **45**:188-194.
- Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**:87-96.
- Furness JB (2006) *The Enteric Nervous System*. Blackwell Publishing, Massachusetts.
- Gallego D, Hernandez P, Clave P and Jimenez M (2006) P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**:G584-594.
- Galligan JJ and Bertrand PP (1994) ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neurosci* **14**:7563-7571.
- Galligan JJ and Parkman H (2007) Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility and functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil* **19 Suppl 2**:1-4.
- Garcia-Granero E, Sanahuja A, Garcia-Botello SA, Faiz O, Esclapez P, Espi A, Flor B, Minguez M and Lledo S (2009) The ideal lateral internal sphincterotomy: clinical and endosonographic evaluation following open and closed internal anal sphincterotomy. *Colorectal Dis* **11**:502-507.
- Garrido R, Lagos N, Lattes K, Abedrapo M, Bocic G, Cuneo A, Chiong H, Jensen C, Azolas R, Henriquez A and Garcia C (2005) Gonyautoxin: new treatment for healing acute and chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum* **48**:335-340; discussion 340-333.

- Gibbons CP, Bannister JJ, Trowbridge EA and Read NW (1986) An analysis of anal sphincter pressure and anal compliance in normal subjects. *Int J Colorectal Dis* **1**:231-237.
- Goldberg M, Hanani M and Nissan S (1986) Effects of serotonin on the internal anal sphincter: in vivo manometric study in rats. *Gut* **27**:49-54.
- Goligher J (1987) *Cirugía del Ano, Recto y Colon*. Editorial Salvat S.A.
- Gonella J, Bouvier M and Blanquet F (1987) Extrinsic nervous control of motility of small and large intestines and related sphincters. *Physiol Rev* **67**:902-961.
- Gonzalez AA, Farre R and Clave P (2004) Different responsiveness of excitatory and inhibitory enteric motor neurons in the human esophagus to electrical field stimulation and to nicotine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G299-306.
- Griffin N (2002) Pain coping strategies and quality of life in patients with chronic anal fissure *Gut* **50**:a58-A63.
- Guo R, Nada O, Suita S, Taguchi T and Masumoto K (1997) The distribution and co-localization of nitric oxide synthase and vasoactive intestinal polypeptide in nerves of the colons with Hirschsprung's disease. *Virchows Arch* **430**:53-61.
- Hancock BD (1976) Measurement of anal pressure and motility. *Gut* **17**:645-651.
- Hansen MB (2003a) The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* **92**:249-257.
- Hansen MB (2003b) [The enteric nervous system]. *Ugeskr Laeger* **165**:4097-4101.
- Hyman N (2004) Incontinence after lateral internal sphincterotomy: a prospective study and quality of life assessment. *Dis Colon Rectum* **47**:35-38.
- Jones OM, Brading AF and Mortensen NJ (2003) Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum* **46**:963-970.
- Jones OM, Brading AF and Mortensen NJ (2004) Mechanism of action of botulinum toxin on the internal anal sphincter. *Br J Surg* **91**:224-228.
- Kaiser AM and Ortega AE (2002) Anorectal anatomy. *Surg Clin North Am* **82**:1125-1138, v.
- Keef KD, Du C, Ward SM, McGregor B and Sanders KM (1993) Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. *Gastroenterology* **105**:1009-1016.



- Khaikin M (2007) Topical captopril cream: a new treatment fo anal fissure? The first human study. *Dis Colon Rectum* **50**:747.
- Klosterhalfen B, Vogel P, Rixen H and Mittermayer C (1989) Topography of the inferior rectal artery: a possible cause of chronic, primary anal fissure. *Dis Colon Rectum* **32**:43-52.
- Knudsen MA, Glavind EB and Tottrup A (1995) Transmitter interactions in rabbit internal anal sphincter. *Am J Physiol* **269**:G232-239.
- Kunze WA and Furness JB (1999) The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* **61**:117-142.
- Lecci A, Santicioli P and Maggi CA (2002a) Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* **2**:630-641.
- Lecci A, Valenti C and Maggi CA (2002b) Tachykinin receptor antagonists in irritable bowel syndrome. *Curr Opin Investig Drugs* **3**:589-601.
- Lestar B, Penninckx F and Kerremans R (1989) The composition of anal basal pressure. An in vivo and in vitro study in man. *Int J Colorectal Dis* **4**:118-122.
- Lindsey I, Jones OM, Cunningham C and Mortensen NJ (2004) Chronic anal fissure. *Br J Surg* **91**:270-279.
- Lubowski DZ, Nicholls RJ, Swash M and Jordan MJ (1987) Neural control of internal anal sphincter function. *Br J Surg* **74**:668-670.
- Lund JN (2006) Nitric oxide deficiency in the internal anal sphincter of patients with chronic anal fissure. *Int J Colorectal Dis* **21**:673-675.
- Lund JN, Binch C, McGrath J, Sparrow RA and Scholefield JH (1999) Topographical distribution of blood supply to the anal canal. *Br J Surg* **86**:496-498.
- Lund JN, Nystrom PO, Coremans G, Herold A, Karaitianos I, Spyrou M, Schouten WR, Sebastian AA and Pescatori M (2006) An evidence-based treatment algorithm for anal fissure. *Tech Coloproctol* **10**:177-180.
- Lund JN and Scholefield JH (1996) Aetiology and treatment of anal fissure. *Br J Surg* **83**:1335-1344.
- Lunniss PJ and Phillips RK (1992) Anatomy and function of the anal longitudinal muscle. *Br J Surg* **79**:882-884.
- Lynn RB, Sankey SL, Chakder S and Rattan S (1995) Colocalization of NADPH-diaphorase staining and VIP immunoreactivity in neurons in opossum internal anal sphincter. *Dig Dis Sci* **40**:781-791.

- Macchi V, Porzionato A, Stecco C, Vigato E, Parenti A and De Caro R (2008) Histotopographic study of the longitudinal anal muscle. *Clin Anat* **21**:447-452.
- Madoff RD and Fleshman JW (2003) AGA technical review on the diagnosis and care of patients with anal fissure. *Gastroenterology* **124**:235-245.
- McCallion K and Gardiner KR (2001) Progress in the understanding and treatment of chronic anal fissure. *Postgrad Med J* **77**:753-758.
- McDonnell B, Hamilton R, Fong M, Ward SM and Keef KD (2008) Functional evidence for purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G1041-1051.
- McNamara MJ, Percy JP and Fielding IR (1990) A manometric study of anal fissure treated by subcutaneous lateral internal sphincterotomy. *Ann Surg* **211**:235-238.
- Milligan E and Morgan C (1934) Surgical anatomy of the anal canal. *Lancet* **2**:1150-1156.
- Murthy KS, Teng B, Jin J and Makhlof GM (1998) G protein-dependent activation of smooth muscle eNOS via natriuretic peptide clearance receptor. *Am J Physiol* **275**:C1409-1416.
- Nantel F, Bouvier M, Strosberg AD and Marullo S (1995) Functional effects of long-term activation on human beta 2- and beta 3-adrenoceptor signalling. *Br J Pharmacol* **114**:1045-1051.
- Nelson R (2006) Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003431.
- Nelson RL (1999) Meta-analysis of operative techniques for fissure-in-ano. *Dis Colon Rectum* **42**:1424-1428; discussion 1428-1431.
- Nurgali K, Stebbing MJ and Furness JB (2004) Correlation of electrophysiological and morphological characteristics of enteric neurons in the mouse colon. *J Comp Neurol* **468**:112-124.
- Nurko S and Rattan S (1988) Role of vasoactive intestinal polypeptide in the internal anal sphincter relaxation of the opossum. *J Clin Invest* **81**:1146-1153.
- Nurko S and Rattan S (1990) Role of neuropeptide Y in opossum internal anal sphincter. *Am J Physiol* **258**:G59-64.
- O'Kelly T, Brading A and Mortensen N (1992) Inhibitory transmission in isolates pig internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *J. Physiol - Proceedings of the Physiological Society* **446**:523.

- O'Kelly T, Brading A and Mortensen N (1993a) Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* **34**:689-693.
- O'Kelly TJ, Brading A and Mortensen NJ (1993b) In vitro response of the human anal canal longitudinal muscle layer to cholinergic and adrenergic stimulation: evidence of sphincter specialization. *Br J Surg* **80**:1337-1341.
- O'Kelly TJ, Davies JR, Brading AF and Mortensen NJ (1994) Distribution of nitric oxide synthase containing neurons in the rectal myenteric plexus and anal canal. Morphologic evidence that nitric oxide mediates the rectoanal inhibitory reflex. *Dis Colon Rectum* **37**:350-357.
- Ortiz H, Marzo J, Armendariz P, DeMiguel M and Blasi ML (2005) [Fissure-in-ano. Alterations in continence and quality of life during disease and at six months after lateral subcutaneous internal sphincterotomy]. *Cir Esp* **77**:91-95.
- Parks AG, Fishlock DJ, Cameron JD and May H (1969) Preliminary investigation of the pharmacology of the human internal anal sphincter. *Gut* **10**:674-677.
- Percy JP, Neill ME, Swash M and Parks AG (1981) Electrophysiological study of motor nerve supply of pelvic floor. *Lancet* **1**:16-17.
- Pernikoff BJ, Eisenstat TE, Rubin RJ, Oliver GC and Salvati EP (1994) Reappraisal of partial lateral internal sphincterotomy. *Dis Colon Rectum* **37**:1291-1295.
- Petros PE (2004) *The Female Pelvic Floor: Function, Dysfunction and Management According to the Integral Theory*.
- Pluja L, Fernandez E and Jimenez M (1999) Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* **126**:883-892.
- Porter AJ, Wattoo DA, Brookes SJ and Costa M (2002) Cholinergic and nitrgenic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut* **51**:70-75.
- Radomirov R, Ivancheva C, Brading AF, Itzev D, Rakovska A and Negrev N (2009) Ascending and descending reflex motor activity of recto-anal region-cholinergic and nitrgenic implications in a rat model. *Brain Res Bull* **79**:147-155.
- Rae MG and Muir TC (1996) Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J Physiol* **493** ( Pt 2):517-527.
- Rathi S, Kazerounian S, Banwait K, Schulz S, Waldman SA and Rattan S (2003) Functional and molecular characterization of beta-adrenoceptors in the internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **305**:615-624.

- Rattan S (2005) The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil* **17 Suppl 1**:50-59.
- Rattan S, Al Haj R and De Godoy MA (2004) Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G605-611.
- Rattan S and Chakder S (1993) Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *Am J Physiol* **265**:G799-804.
- Rattan S and Chakder S (1997a) Excitatory and inhibitory actions of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the internal anal sphincter smooth muscle: sites of actions. *J Pharmacol Exp Ther* **283**:722-728.
- Rattan S and Chakder S (1997b) L-citrulline recycling in opossum internal anal sphincter relaxation by nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* **112**:1250-1259.
- Rattan S, Sarkar A and Chakder S (1992) Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* **103**:43-50.
- Rattan S and Shah R (1988) Influence of purinoceptors' agonists and antagonists on opossum internal anal sphincter. *Am J Physiol* **255**:G389-394.
- Sangwan YP, Collier JA, Barrett RC, Murray JJ, Roberts PL and Schoetz DJ, Jr. (1995) Distal rectoanal excitatory reflex: a reliable index of pudendal neuropathy? *Dis Colon Rectum* **38**:916-920.
- Sangwan YP and Solla JA (1998) Internal anal sphincter: advances and insights. *Dis Colon Rectum* **41**:1297-1311.
- Schemann M and Neunlist M (2004) The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**:55-59.
- Schouten WR, Briel JW and Auwerda JJ (1994) Relationship between anal pressure and anodermal blood flow. The vascular pathogenesis of anal fissures. *Dis Colon Rectum* **37**:664-669.
- Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ and Boerma MO (1996) Anal fissure: new concepts in pathogenesis and treatment. *Scand J Gastroenterol Suppl* **218**:78-81.
- Schroder HD and Reske-Nielsen E (1983) Fiber types in the striated urethral and anal sphincters. *Acta Neuropathol* **60**:278-282.
- Shafik A (1975) New concept of the anatomy of the anal sphincter mechanism and the physiology of defecation. II. Anatomy of the levator ani muscle with special reference to puborectalis. *Invest Urol* **13**:175-182.

- Shafik A (1976) A new concept of the anatomy of the anal sphincter mechanism and the physiology of defecation. III. The longitudinal anal muscle: anatomy and role in anal sphincter mechanism. *Invest Urol* **13**:271-277.
- Six DA and Dennis EA (2000) The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488**:1-19.
- Smout AJPM and Akkermans LMA (1992) *Fisiología y Patología de la Motilidad Gastrointestinal* Wrightson Biomedical Publishing Ltd.
- Speakman CT, Hoyle CH, Kamm MA, Henry MM, Nicholls RJ and Burnstock G (1990) Adrenergic control of the internal anal sphincter is abnormal in patients with idiopathic faecal incontinence. *Br J Surg* **77**:1342-1344.
- Speakman CT, Hoyle CH, Kamm MA, Henry MM, Nicholls RJ and Burnstock G (1992) Decreased sensitivity of muscarinic but not 5-hydroxytryptamine receptors of the internal anal sphincter in neurogenic faecal incontinence. *Br J Surg* **79**:829-832.
- Stahl TJ (2006) Anorectal Physiologic Testing in Anal Fissure Disease. *Semin Colon Rectal Surg* **17**:140-146.
- Starding S (2005) *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*.
- Stebbing JF, Brading AF and Mortensen NJ (1996) Nitric oxide and the rectoanal inhibitory reflex: retrograde neuronal tracing reveals a descending nitrergic rectoanal pathway in a guinea-pig model. *Br J Surg* **83**:493-498.
- Steele SR and Madoff RD (2006) Systematic review: the treatment of anal fissure. *Aliment Pharmacol Ther* **24**:247-257.
- Sun WM, Read NW, Prior A, Daly JA, Cheah SK and Grundy D (1990) Sensory and motor responses to rectal distention vary according to rate and pattern of balloon inflation. *Gastroenterology* **99**:1008-1015.
- Szurszewski JH, Ermilov LG and Miller SM (2002) Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* **51 Suppl 1**:i6-10.
- Terauchi A, Kobayashi D and Mashimo H (2005) Distinct roles of nitric oxide synthases and interstitial cells of Cajal in rectoanal relaxation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**:G291-299.
- Thomson WH (1975) The nature of haemorrhoids. *Br J Surg* **62**:542-552.
- Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K and Fukuzawa M (2002) Role of nitric oxide in the internal anal sphincter of Hirschsprung's disease. *World J Surg* **26**:1493-1498.

- Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S and Fukuzawa M (2001) The role of nitric oxide (NO) in the human internal anal sphincter. *J Gastroenterol* **36**:386-391.
- Torrabadella L, Salgado G, Burns RW and Berman IR (2004) Manometric study of topical sildenafil (Viagra) in patients with chronic anal fissure: sildenafil reduces anal resting tone. *Dis Colon Rectum* **47**:733-738.
- Turnbull GK, Hamdy S, Aziz Q, Singh KD and Thompson DG (1999) The cortical topography of human anorectal musculature. *Gastroenterology* **117**:32-39.
- Uz A, Elhan A, Ersoy M and Tekdemir I (2004) Internal anal sphincter: an anatomic study. *Clin Anat* **17**:17-20.
- Valles M, Vidal J, Clave P and Mearin F (2006) Bowel dysfunction in patients with motor complete spinal cord injury: clinical, neurological, and pathophysiological associations. *Am J Gastroenterol* **101**:2290-2299.
- Vilagut G, Ferrer M, Rajmil L, Rebollo P, Permanyer-Miralda G, Quintana JM, Santed R, Valderas JM, Ribera A, Domingo-Salvany A and Alonso J (2005) [The Spanish version of the Short Form 36 Health Survey: a decade of experience and new developments.]. *Gac Sanit* **19**:135-150.
- Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD and Snyder SH (2004) Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2631-2635.
- Yamato S and Rattan S (1990) Role of alpha adrenoceptors in opossum internal anal sphincter. *J Clin Invest* **86**:424-429.
- Yip L, Kwok YN and Buchan AM (2003) Cellular localization and distribution of neurokinin-1 receptors in the rat stomach. *Auton Neurosci* **104**:95-108.
- Yoshino H, Kayaba H, Hebiguchi T, Morii M, Ito W, Chihara J and Kato T (2007) Multiple clinical presentations of anal ultra slow waves and high anal pressure: megacolon, hemorrhoids and constipation. *Tohoku J Exp Med* **211**:127-132.
- Yunker AM, Krause JE and Roth KA (1999) Neurokinin B- and substance P-like immunoreactivity are co-localized in enteric nerves of rat ileum. *Regul Pept* **80**:67-74.
- Zhang Y, Lomax AE and Paterson WG (2010) P2Y1 receptors mediate apamin-sensitive and -insensitive inhibitory junction potentials in murine colonic circular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **333**:602-611.

Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* **276**:113-128; discussion 128-130, 233-117, 275-181.

## OBJETIVOS

Esta tesis doctoral tiene dos grandes objetivos generales:

- Nuestro primer objetivo ha sido caracterizar los mecanismos y neurotransmisores implicados en el control del tono, la relajación y la contracción del esfínter anal interno en dos modelos animales (cerdo y rata). Para ello hemos utilizado técnicas *in vitro* como baño de órganos y microelectrodos, así como técnicas inmunohistoquímicas e histología para describir tanto la fisiología como la histología de las estructuras del canal anal de estos dos modelos experimentales.
- Nuestro segundo gran objetivo ha sido estudiar la fisiopatología de las alteraciones de la motilidad del canal anal (esfínter anal interno y externo) de los pacientes con fisura anal mediante estudios funcionales (manometría anal de alta resolución y electromiografía) y morfológicos (histología y ecografía endoanal).

Los objetivos específicos para cada estudio fueron:

**Estudio 1.** Describir la relación anatómica y comparar las respuestas del músculo longitudinal del canal anal con el músculo circular del esfínter anal interno en el cerdo.

1. Estudiar el origen y control del tono del esfínter anal interno.
2. Caracterizar farmacológicamente los neurotransmisores liberados por las motoneuronas excitadoras e inhibitoras a través de la estimulación eléctrica de campo y de receptores nicotínicos en el músculo circular esfínter anal interno y músculo longitudinal del canal anal.
3. Estudiar las relaciones anatómicas y microscópicas del esfínter anal interno y del músculo longitudinal del canal anal por técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

**Estudio 2.** Describir y caracterizar el proceso de co-transmisión entre los neurotransmisores inhibitorios óxido nítrico y las purinas en las motoneuronas inhibitorias esfínter anal interno de la rata.



1. Evaluar el rol específico del óxido nítrico y de las purinas sobre el tono, el potencial de membrana y las hiperpolarizaciones espontáneas del esfínter anal interno.
2. Caracterizar el efecto del óxido nítrico, de las purinas y el VIP durante la estimulación de las motoneuronas inhibitorias mediante estimulación eléctrica de campo y de nicotina, en las técnicas de baño de órganos y microelectrodos.
3. Determinar la presencia y ubicación de los receptores P2Y<sub>1</sub> en el esfínter anal interno mediante estudios inmunohistoquímicos.

**Estudio 3.** Estudio de los patrones de dismotilidad (actividad tónica y fásica) del esfínter anal interno y su estructura en los pacientes con fisura anal aguda y crónica mediante manometría anorectal convencional y de alta resolución, electromiografía y estudios morfológico mediante ecografía endoanal y estudio histopatológico de biopsias de esfínter anal interno de pacientes con fisura anal crónica.

1. Evaluar la actividad tónica (presión en reposo del canal anal) y fásica (presencia de ondas lentas y superlentas) en pacientes con fisura anal.
2. Estudiar la estructura (ecografía) del esfínter anal interno y la inervación intrínseca inhibitoria mediante el reflejo rectoanal inhibitorio. Describir las alteraciones inmunohistológicas del esfínter anal interno de pacientes con fisura anal crónica.
3. Estudiar la estructura (ecografía) y función del esfínter estriado, mediante la evaluación de la contracción voluntaria y reflejo de la tos y la maniobra defecatoria.



## **CAPÍTULO 1. A Comparative Study of the Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter**

*Dis Colom Rectum* 2009; 52 (11): 1902-1911

### **Abstract**

**Purpose:** To compare the physiology of the longitudinal muscle of the anal canal with the internal anal sphincter in pigs. **Methods:** Histology and *in vitro* studies were performed to compare the effect of neural responses induced by electrical stimulation and through nicotinic, purinergic, and serotonergic receptors. **Results:** The longitudinal muscle and the internal anal sphincter are exclusively constituted by smooth muscle. Strips from the internal anal sphincter: a) developed myogenic tone, b) responded to electrical stimulation with an “on” relaxation antagonized by nitric oxide synthase inhibitors and purinergic P2Y<sub>1</sub> antagonists, and with an “off” contraction antagonized by atropine and phentolamine, c) responded to stimulation of nicotinic receptors with a relaxation antagonized by nitrenergic and purinergic P2Y<sub>1</sub> antagonists, to stimulation of serotonergic 5HT<sub>3</sub> receptors with a contraction, and relaxed to carbachol and purinergic P2X agonists. Strips from the longitudinal muscle: a) did not develop tone, b) responded to electrical stimulation with an “on” contraction antagonized by atropine, c) did not respond to stimulation of nicotinic or serotonergic 5HT<sub>3</sub> receptors, and carbachol and purinergic P2X agonists induced a contraction. **Conclusions:** The motility of the internal anal sphincter includes myogenic tone, relaxation mediated by nitric oxide and purinergic P2Y<sub>1</sub> receptors and contraction mediated by cholinergic motor neurons and sympathetic fibres. The motility of the longitudinal muscle is limited to a contraction mediated by cholinergic neurons suggesting longitudinal muscle contracts during relaxation of the internal sphincter, shortening the anal canal. Nicotinic, muscarinic, and serotonergic receptors might be therapeutic targets for anal motor disorders.

## **Introduction**

The human anal sphincter complex is formed by two concentric muscular rings with specific and independent mechanisms of control: a) the striated external anal sphincter, innervated by somatic nerves, and b) the circular smooth muscle of the internal anal sphincter (IAS), innervated by the enteric nervous system. The third component of the anal sphincter complex is the anal longitudinal muscle (LM) located in the intersphincteric space. This longitudinal muscle is a continuation of the external muscular layer of the rectum and it has been suggested that it is also composed of striated muscle fibers from the external sphincter and surrounding striated muscles supporting the term of conjoined longitudinal muscle (*Lunniss and Phillips, 1992*). The structure and anatomic relationship, innervation and function of the IAS and the LM are not yet fully understood (*Lunniss and Phillips, 1992*). Dysfunction of neuromyogenic mechanisms controlling tone, relaxation and contraction of IAS may cause low sphincter tone and contribute to fecal incontinence or hypertonicity and impaired IAS relaxation may contribute to anal fissure hemorrhoids and constipation (*Cook et al., 2001; Madoff and Fleshman, 2004*). Dysfunction of LM has been implicated in the pathogenesis of hemorrhoids and prolapse (*Lunniss and Phillips, 1992*). It is of clinical interest to improve our knowledge of neuromyogenic mechanisms controlling LM and IAS motility and to develop new and specific pharmacological strategies for these common anal diseases.

The primarily myogenic tone of the IAS contributes to up to 70% of resting anal pressure and is modulated by the intrinsic neurons from the enteric nervous system and extrinsic parasympathetic and sympathetic fibers (*Bhardwaj et al., 2000; Rattan, 2005*). In contrast, parasympathetic fibers synapse with enteric motor neurons in the myenteric plexus and their stimulation induces inhibitory effects on IAS tone. The internal anal sphincter relaxes during the recto-anal inhibitory reflex in response to rectal distension and during defecation (*Jones et al., 2003a*). This intrinsic reflex is caused by stimulation of rectal mechanoreceptors and descendent stimulation of inhibitory motor neurons, is preserved in patients with complete spinal cord injury and is absent in patients with Hirschsprung disease characterized by lack of intrinsic motor neurons (*Valles et al., 2006*). Intrinsic innervation of IAS is composed of excitatory and inhibitory enteric motor neurons with their cell bodies located in the ganglia of the myenteric plexus and axons and varicosities reaching the smooth muscle cells. It is well known that nitric oxide (NO) is the main inhibitory neurotransmitter causing IAS relaxation (*Rattan and*

*Chakder, 1992; Shah et al., 2004*), however, the relative role of other possible inhibitory neurotransmitters such as ATP, VIP, PACAP and carbon monoxide (CO) has not been determined (*Nurko and Rattan, 1988; Rattan and Chakder, 1993; Chakder and Rattan, 1998; Watkins et al., 2004*). Pigs possess anatomical, pathological and physiological similarities to humans and have been used as homologous animal models for the development of new pharmacologic strategies to treat human neurogastrointestinal diseases (*Jones et al., 2003b; Jones et al., 2003c; Farre et al., 2006*).

The aims of this study are to describe the anatomic relationships and to compare the physiology of the longitudinal muscle of the anal canal with the internal anal sphincter in pigs. To that end we explored the mechanisms controlling IAS tone and pharmacologically characterized the responses induced by stimulation of motor neurons and the neurotransmission at the neuro-effector junction in the longitudinal muscle and the internal anal sphincter. Improvement in the knowledge of these physiological events has therapeutic potential for anal diseases associated with impaired internal anal sphincter and longitudinal muscle motility.

## **Material And Methods**

Specimens of rectum and anal sections were obtained from adult hybrid pigs (age: 6-8 months, weight: 75-80kg), stunned and killed in a slaughterhouse in compliance with specific guidelines of the European Union. The experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain.

**Morphological Studies.** Anatomical studies were conducted on fresh specimens. For light microscopy and immunohistochemistry studies the tissue was fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer saline (pH 7.3), dehydrated, and embedded in paraffin to obtain sagittal and coronal preparations. We used hematoxylin-eosin (H&E) stain, S100 immunohistochemical stain for neural structures (Policlonal Rabbit Anti-Cow S-100, Dako, Glostrup, Demark) and c-Kit immunohistochemical stain for interstitial cells of Cajal (Policlonal Rabbit Anti-Human CD117, c-Kit, Dako).

**Physiological Studies.** Muscular strips were obtained from the internal anal sphincter and the longitudinal muscle. Width (3 mm), length (10 mm) and thickness (2 mm) of IAS and LM strips were the same. Great care was taken to include only smooth muscular bundles in each preparation and to avoid striated muscle, fat or

intersphincteric tissue. Weight of the strips from both regions was also similar  $0.3 \pm 0.0$  g for IAS strips (N=51) and  $0.3 \pm 0.0$  g for LM strips (N=53). Strips were transferred to 10mL organ baths containing Krebs solution (pH 7.4, 37°C) bubbled with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, placed between two parallel platinum wire electrodes and attached to force transducers. Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (model 03 Force Transducer and model 7 Series Polygraph, respectively, Grass Instruments Co, Quincy, MA), and recorded on a computer using the data acquisition software AcqKnowledge<sup>®</sup> MP100, Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA.. Electrical field stimulation (EFS, pulses of 0.4 ms duration, frequency 0.3–20Hz, 4 s-trains at 26V) was delivered to electrodes by an electrical stimulator Model S88 (Grass Instruments Co).

**Solutions and drugs.** Adenosine 5'-beta-2-thiodiphosphate (ADPβS), nifedipine, cyclopiazonic acid (CPA), α-chymotrypsin (α-CMT), sodium nitroprusside (SNP), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-α]quinoxalin-1-one (ODQ), nicotine, phentolamine, apamin, Nω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM-1), vasoactive intestinal peptide (VIP), carbachol, serotonin (5-HT), α,β-methyleneadenosine 5'-triphosphate lithium salt (αβmeATP) and tetrodotoxin (TTX) were obtained from Sigma–Aldrich Co (Madrid, Spain); 2'-Deoxy-N6-methyl adenosine 3',5'-diphosphate diammonium salt (MRS2179), propranolol hydrochloride, tin protoporphyrin IX dichloride (SnPP-IX), 2-methyl-5-hydroxytryptamine hydrochloride (2-Me-5HT) and substance P (SP) from Tocris Cookson Ltd (Bristol, UK); pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-27) from Peptide Institute (Osaka, Japan); atropine from Merck (Darmstadt, Germany).

**Experimental design.** *Morphological studies* aimed to assess the nature and relationship of the IAS and LM. *Physiological studies* assessed: a) the mechanisms controlling IAS tone, b) the effect of agonists for putative inhibitory and excitatory neurotransmitters in the IAS and LM, and c) the responses induced by stimulation of motor neurons and the neurotransmission at the neuro-effector junction in the LM and the circular fibres of IAS.

**Data analysis.** Relaxation of strips was expressed as a percentage of total tone while contraction was expressed in grams. N indicates number of animals. The dose-response curve and the EC<sub>50</sub> were calculated by GraphPad prism 4 (Version 4.01, USA). Data are expressed as mean ± SEM. Student-t test was selected for comparisons, using the paired model when appropriate, and the effect of pharmacological agents on frequency-

response curves was determined using two-way repeated-measure ANOVA. A P value <0.050 was considered statistically significant.

## **Results**

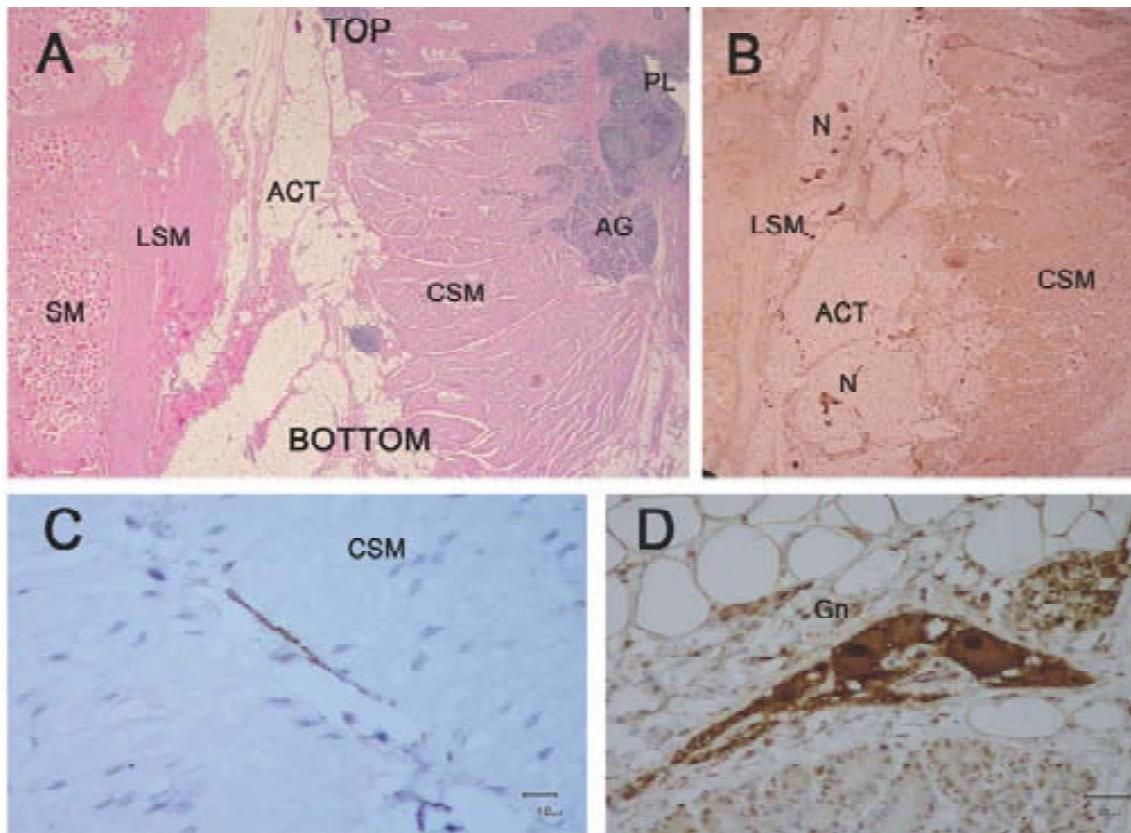
### **Morphological studies**

The IAS was  $12.9 \pm 0.3$  mm long and  $3.2 \pm 0.1$  mm wide. An intersphincteric plane separates the IAS from the LM. The LM (a direct continuation of the external muscle of the rectum) lies adhered to the striated muscle of the external anal sphincter, and 6 to 9 extensions of LM fibres crossed the subcutaneous portion of external sphincter to reach the perianal skin. Haematoxylin and eosin stains showed that LM and IAS are composed of smooth muscle fibres, separated by the intersphincteric plane which contain adipose and connective tissue, blood vessels, myenteric ganglia, and nerve fibres (Figure 1A). Neural S100 staining identified neuronal fibres (Figure 1B) and myenteric ganglia (Figure 1D) in the myenteric plexus and neural fibres between smooth muscle bundles. c-Kit stain was positive in 6/8 specimens showing interstitial cells of Cajal (ICC) within circular muscle bundles and/or close to the septum (Figure 1C), some ICC in the LM and no ICC in the striated fibres.

### **Physiological Studies**

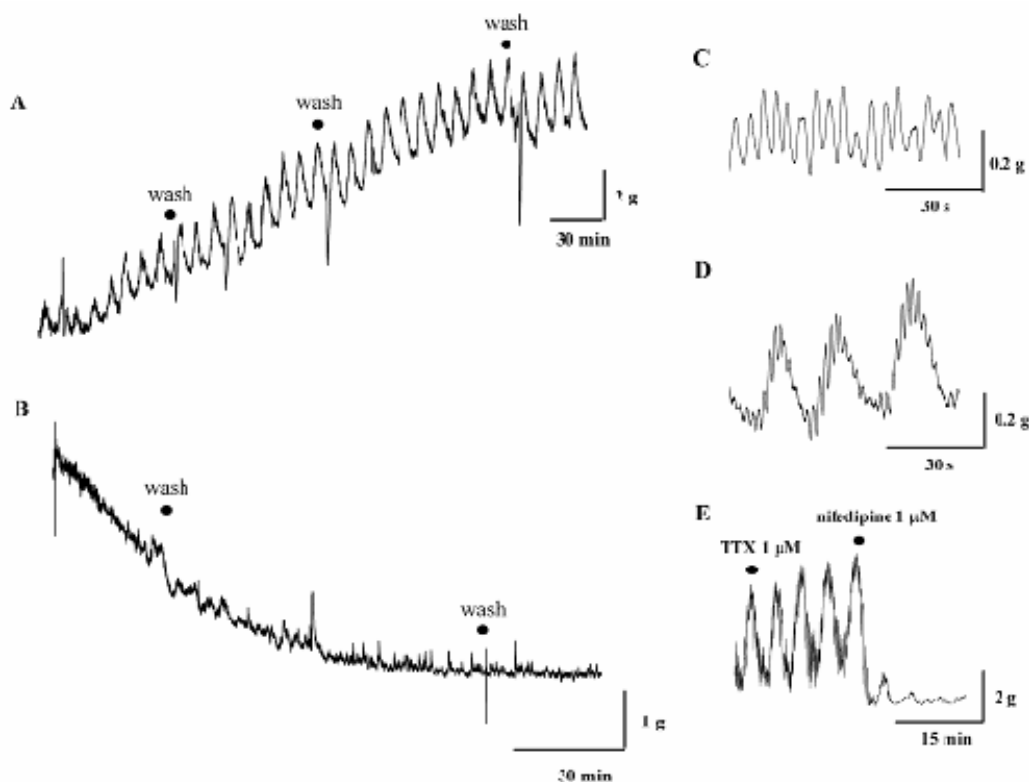
**a) Active tone and spontaneous rhythmic contractions.** All IAS strips developed active tone during equilibration period averaging  $4.7 \pm 0.2$  g (N=140), and most of them (82/140) also developed a pattern of rhythmic spontaneous motility including tonic and phasic contractions superimposed to active tone (Figure 2). In contrast LM did not develop active tone or rhythmic spontaneous motility (Figure 2B). IAS tone and the spontaneous contractions were unaffected by the neurotoxin TTX  $1 \mu\text{M}$  and both were abolished by the L-type calcium blocker nifedipine  $1 \mu\text{M}$  (Figure 2E). IAS tone was also fully abolished by exposure to calcium-free Krebs, whereas depletion of intracellular calcium stores by the inhibitor of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the sarcoplasmic reticulum, cyclopiazonic acid CPA  $10 \mu\text{M}$  produced only a slight decrease in IAS tone ( $-7 \pm 2.3\%$ ,  $P < 0.05$ ). Neither apamin  $1 \mu\text{M}$ , propranolol  $1 \mu\text{M}$ , atropine  $1 \mu\text{M}$  nor phentolamine  $1 \mu\text{M}$  significantly affected IAS tone (not shown) and in contrast, ODQ  $10 \mu\text{M}$ , L-NAME

1mM and MRS2179 10 $\mu$ M significantly enhanced tone by 17 $\pm$ 6.7% (P<0.05), 11 $\pm$ 1.9% (P<0.001) and 3 $\pm$ 1.0% (P<0.05) respectively.



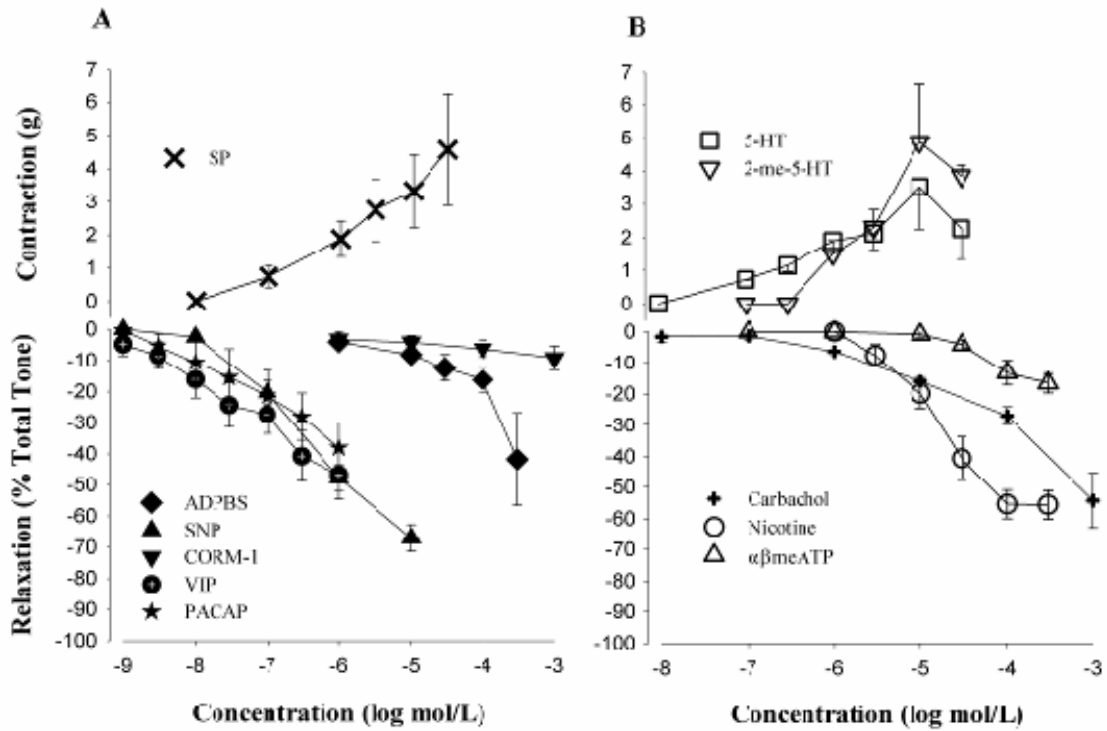
**Figure 1.** A) Hematoxylin-eosin stain of a sagittal section at the level of the pectinate line. B) Neural S100 staining of the intersphincteric space. C) ICC-IM in the internal anal sphincter (IAS), and D) Neural ganglion in the intersphincteric space with S100 staining. Pectinate line (PL), anal glands (AG), circular smooth muscle (CSM-IAS), longitudinal smooth muscle (LSM-LM), adipose-connective tissue (ACT) between IAS and LM, striated muscle (SM) of the external anal sphincter, nerve fibres (N) and neural ganglia (Gn).



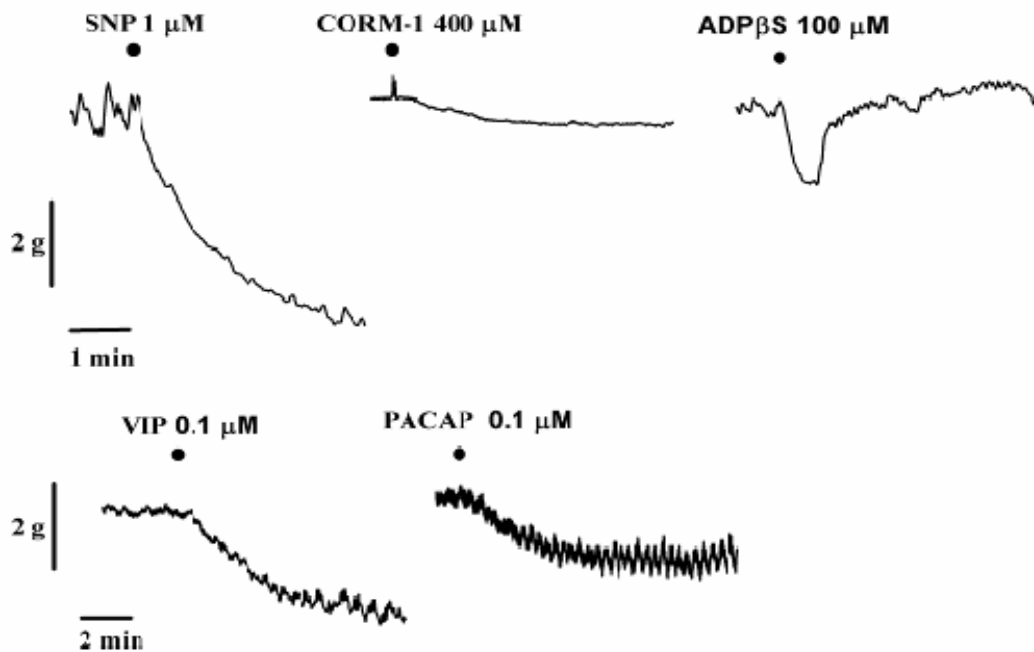


**Figure 2.** Representative tracings showing the pattern of spontaneous motility developed by internal anal sphincter strips including: (A) active tone, (C) low-amplitude and high frequency contractions ( $0.9 \pm 0.1$  g,  $14.3 \pm 0.4$  contractions/minute), (D) rhythmic phasic contractions ( $2 \pm 0.5$  g,  $1.8 \pm 0.1$  contractions/minute), and (E) slow rhythmic tonic contractions ( $2.1 \pm 0.2$  g, peaking every  $12 \pm 2.8$  minutes). (B) Longitudinal muscle strips did not develop tone or spontaneous rhythmic motility.

**b) Effect of putative neurotransmitters.** The NO donor, SNP; VIP; PACAP; the CO donor, CORM-1, and the  $P2Y_1$  receptor agonist, ADP $\beta$ S, relaxed IAS strips in a concentration-dependent and TTX-insensitive manner (Figure 3 and 4). Table 1 summarizes the dynamics of the effects of the proposed neurotransmitters in the IAS and LM. Substance P produced a concentration-dependent IAS contraction, unaffected by TTX. In longitudinal muscle ACh, SP and carbachol induced a fast concentration-dependent contraction (Figure 5, Table 1).



**Figure 3.** Concentration-response curves of proposed inhibitory and excitatory neurotransmitters (A) and effect of stimulation of enteric motor neurons (B) in internal anal sphincter strips. SNP, NO-donor; CORM-1, CO-donor;  $\alpha\beta$ meATP, P2X receptor agonist; ADP $\beta$ S, P2Y1 receptor agonist; VIP, vasoactive intestinal peptide; PACAP, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; SP, substance P; 5-HT, serotonin and 2-Me-5-HT, 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist.



**Figure 4.** Representative tracings showing the morphology of internal anal sphincter (IAS) relaxation induced by proposed inhibitory neurotransmitter.

**Table I.** Pharmacology of IAS and LM. EC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub> and time to E<sub>max</sub> (s) of agonists causing IAS relaxation and contraction, and LM contraction.

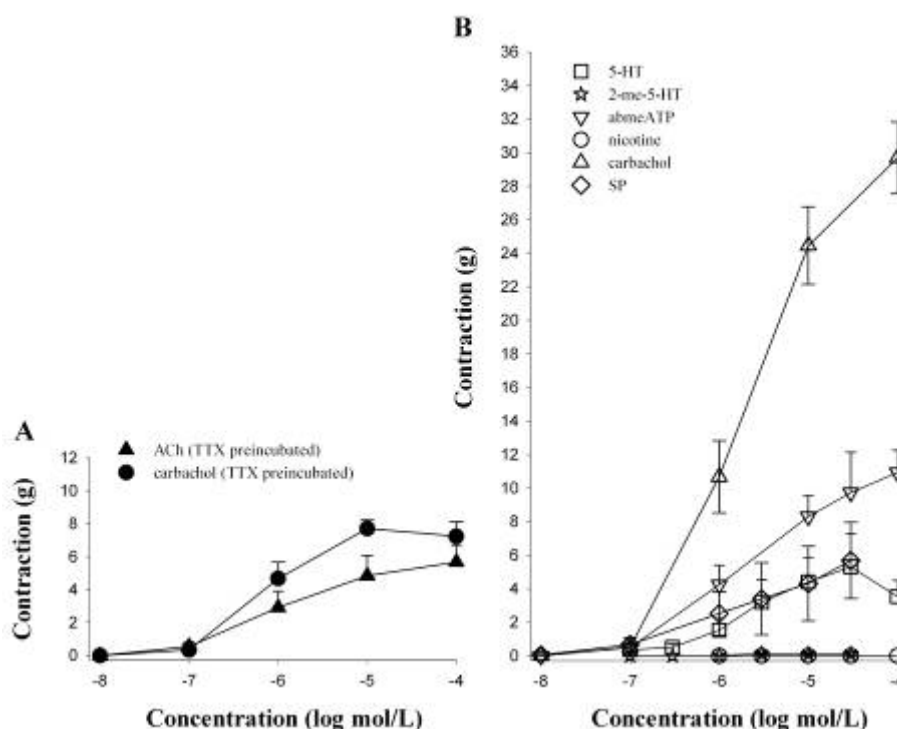
INTERNAL ANAL SPHINCTER			
IAS Relaxation	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (% IAS tone)	Time to E <sub>max</sub> (s)
SNP	3.1E-07	-67.1±4.4	548.6±70
VIP	5.8E-08	-46.8±7.9	593.6±80.4
ADPβS	9.2E-03	-41.8±14.8	21.7±1.3 †
PACAP	7.7E-08	-38.1±98.1	413.4±31.1
CORM-1	1.2E-04	-9.2±3.8 †	158±25.4 †
Nicotine	6.5E-06	-55.4±4.6	50.3±2.9 †
Carbachol	1.1E-04	-27±2.8 *	115.9±8.2 †
αβmeATP	8.8E-08	-16.5±3.1 †	38.3±2.7 †
IAS Contraction	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (g)	Time to E <sub>max</sub> (s)
SP	2.1E-06	4.6±1.7	220.7±31.6
2-Me-5-HT	1.9E-06	4.9±1.7	527.7±72.2
5-HT	4.6E-07	3.5±1.3	165.1±23.8
LONGITUDINAL MUSCLE			
LM Contraction	EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (g)	Time to E <sub>max</sub> (s)
Carbachol (+TTX)	3.1E-07	7.7 ± 0.5	32.6 ± 16.9
Acetylcholine (+TTX)	9.2E-07	5.7±1.0	17.9±4.9
αβmeATP	1.7E-06	10.9±1.3	24.2±8.9
SP	1.8E-06	5.7±2.3	97.5±19.4 ‡
5-HT	1.5E-06	5.3±1.9	86.2±14.9 ¶
2-Me-5-HT	1.4E-06	0.1±0.1 ¶	90.9±5.9 ‡

† P<0.01 vs SNP. \* P<0.05 vs SNP. ¶ P<0.05 vs the same agonist in the IAS. ‡ P<0.01 vs the same agonist in the IAS.

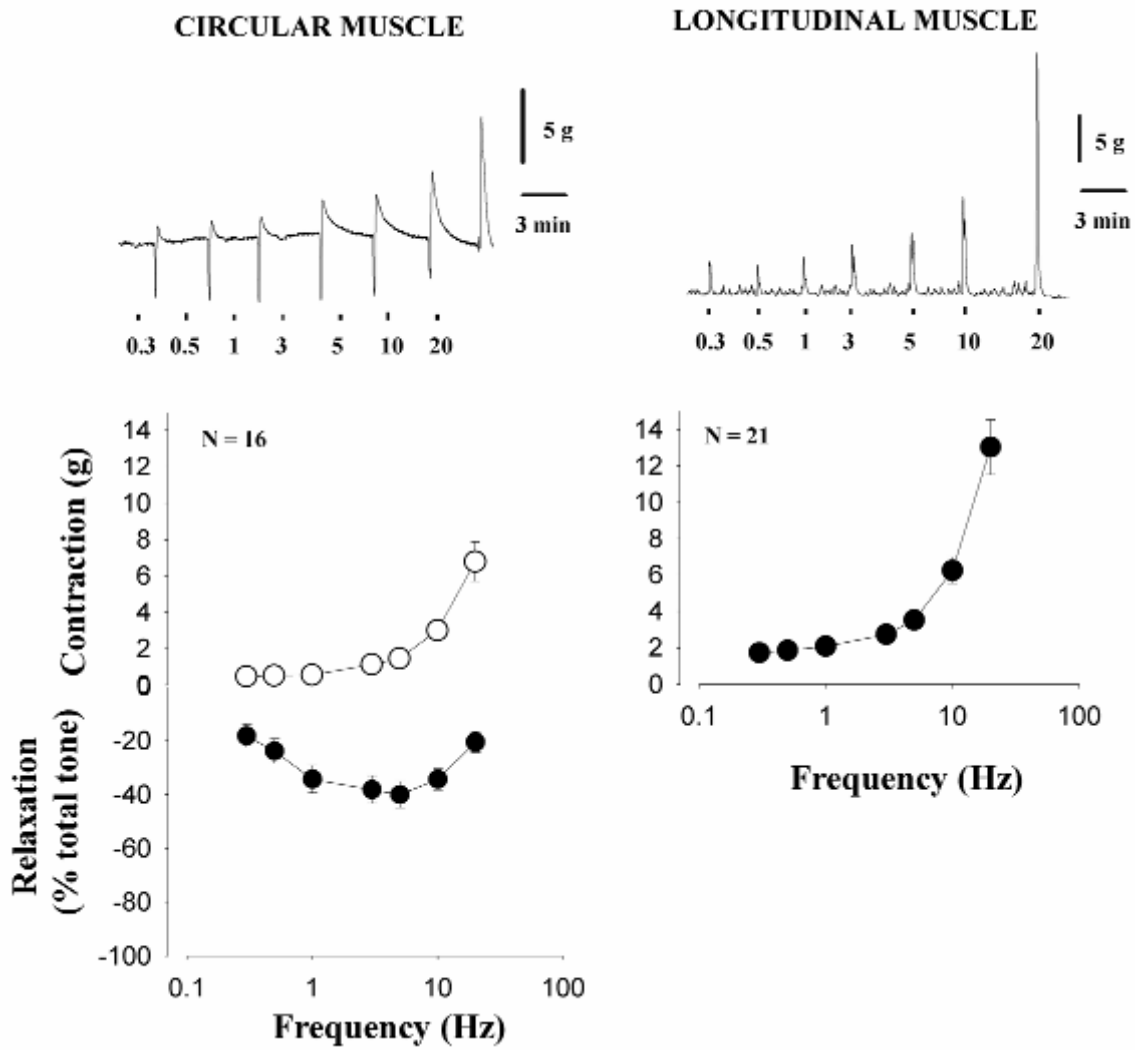
**c) Effect of stimulation of motor neurons on the internal anal sphincter.** IAS strips responded to electrical field stimulation with a frequency-dependent “on” relaxation during electrical stimulus followed by an “off” contraction at the end of the stimulus (Figure 6). EFS-responses were almost abolished by TTX 1μM and unaffected by hexamethonium 100μM. L-NAME 1mM antagonized EFS-“on” relaxation by -95±1.2% (N=4, P<0.01). In a sequential experiment with antagonists, ODQ 10 μM significantly reduced the EFS-relaxation (-87±0.9%, P<0.001) and significantly increased the amplitude of the EFS-contraction (71±2.5%, P<0.01); atropine 1μM reduced the amplitude of contraction (-85±0.3%, P<0.01), and phentolamine 1μM completely abolished atropine-insensitive contraction (N=5, P<0.01). The non-nitregic relaxation following ODQ 10 μM or L-NAME 1mM was significantly reduced by MRS2179 10μM (-47±0.4%, N=5, P<0.05). Stimulation of enteric motor neurons through nAChRs induced a concentration-dependent IAS relaxation (Figure 3). Nicotine-induced relaxation was fully blocked by hexamethonium 100μM (N=5,

$P < 0.01$ ), and reduced by L-NAME 1mM, ODQ 10 $\mu$ M, MRS2179 10 $\mu$ M and the neurotoxin TTX (Figure 7). Carbachol induced a concentration-dependent IAS relaxation (Figure 3) fully abolished by TTX (N=4,  $P < 0.001$ ). 5-HT and 2-Me-5-HT induced a strong, concentration-dependent IAS contraction (Figure 3), both partly antagonized by TTX ( $-20 \pm 4.5\%$ , N=3,  $P < 0.05$  and  $-44 \pm 7.0\%$ , N=4,  $P < 0.05$ , respectively).

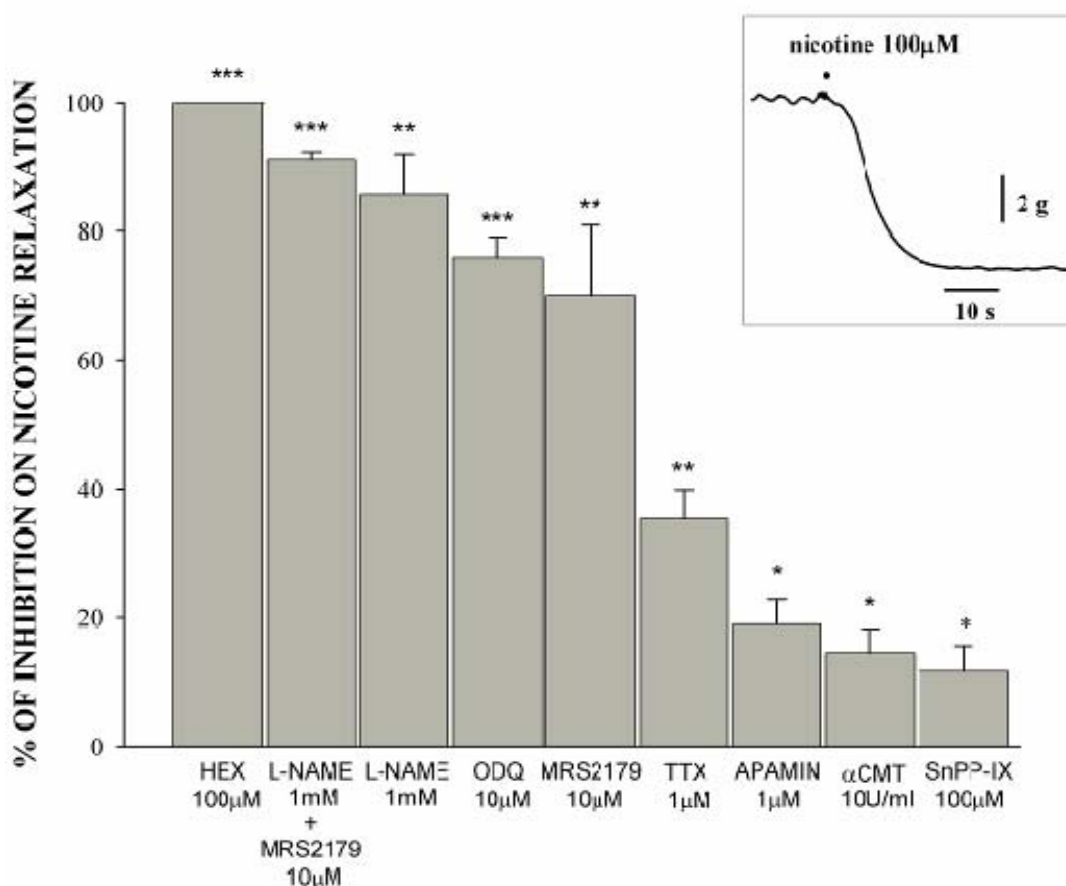
**d) Effect of stimulation of motor neurons on the longitudinal muscle.** LM strips (N=21) responded to EFS with a frequency-dependent “on” contraction during electrical stimulus of the strips (Figure 6). EFS-“on” contractions on the LM were almost abolished by TTX 1 $\mu$ M. Atropine 1 $\mu$ M reduced EFS-induced contraction by  $-70 \pm 3.6\%$  (N=4,  $P < 0.01$ ), and the  $\alpha$ -adrenergic blocker phentolamine 1 $\mu$ M did not show any significant effect on LM. Nicotine 100 $\mu$ M did not induce any response in LM strips at rest (Figure 5), nor in carbachol 1 $\mu$ M precontracted strips (not shown). 5-HT induced a concentration-dependent contraction that was significantly reduced by TTX ( $-57 \pm 6.1\%$ , N=5,  $P < 0.05$ ).  $\alpha\beta$ meATP induced a LM contraction unaffected by TTX (Figure 5). In contrast, carbachol-induced contraction of LM was significantly reduced by TTX ( $-67 \pm 3.8\%$ , N=3,  $P = 0.05$ ) and blocked by sequential addition of atropine (N=4,  $P < 0.01$ ).



**Figure 5.** (A) Concentration-response curves of proposed excitatory neurotransmitters on longitudinal muscle strips by carbachol (N=3) and acetylcholine (ACh, N=3); and (B) Effects of stimulation of excitatory enteric motor neurons by serotonin (5-HT, N=3); 2-Me-5-HT (5-HT3 receptor agonist, N=3); nicotine (N=3);  $\alpha\beta$ meATP (P2X receptor agonist, N=4), and substance P (SP, N=3).



**Figure 6.** Representative tracings and frequency-response curves showing the response of porcine internal anal sphincter and longitudinal muscle strips to electrical field stimulation (0.3 – 20 Hz, pulses indicated below tracings). Black dots represent “on” responses and white dots, “off” responses.



**Figure 7.** Graph bar summarizing the antagonism produced by different drugs on internal anal sphincter relaxation induced by nicotine. Hexamethonium (HEX) fully blocked nicotine-relaxation; the combination of L-NAME and MRS2179 almost antagonized relaxation.  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CMT), tetrodotoxin (TTX), tin protoporphyrin IX (SnPP-IX). Results are normalized in % of antagonism on nicotine-induced IAS relaxation. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

## Discussion

The main results of this study show specific motor patterns and mechanisms of motor control in the porcine internal anal sphincter and longitudinal muscle. Motility in the internal anal sphincter is complex and includes myogenic tone modulated by tonic activity of inhibitory motor neurons, non-neural spontaneous rhythmic contractions, relaxation mediated by stimulation of inhibitory neurons releasing NO and ATP acting on  $P2Y_1$  receptors, and contraction mediated by stimulation of cholinergic neurons and sympathetic fibers. The motility of the anal longitudinal muscle is much simpler as LM does not develop tone or rhythmic contractions and the only response obtained after neural stimulation is a contraction mediated by cholinergic motor neurons.

We also found that stimulation of motor neurons by direct electrical stimulus or through specific receptors causes reciprocal contraction/relaxation responses in the IAS and LM,

suggesting LM contracts during IAS relaxation, shortening the anal canal, and that muscarinic, nicotinic and serotonergic receptors might be new therapeutic targets for anal motor disorders.

We found that porcine IAS is a muscular ring composed of smooth muscle cells. LM is also composed of smooth muscle cells coming from the longitudinal muscular layer of the rectum. An intersphincteric layer of adipose-connective tissue containing myenteric ganglia separates the IAS from the LM. A similar organization of LM and IAS has been described in dogs (*Mutafova-Yambolieva et al., 2003*), whereas human studies described close apposition between LM and IAS and the intersphincteric space located between LM and the external anal sphincter (*Macchi et al., 2008*). Using antibodies against the receptor tyrosine kinase (Kit), which is highly specific for interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract (*Horiguchi et al., 2003*), we found these cells between muscular fibers in the IAS, and also in the intersphincteric border of the LM, a distribution similar to that previously found in canine IAS (*Horiguchi et al., 2003*). Interstitial cells of Cajal have been identified in animal models and in humans (*Hagger et al., 1998*), and studies described a loss of these cells in Hirschprung's disease (*Rolle et al., 2007*). In our study, IAS spontaneously developed active tone and rhythmic contractions and LM did not. Tone developed by IAS depends on extracellular  $Ca^{2+}$  entry through L-type  $Ca^{2+}$  channels (*Rattan, 2005; Farre et al., 2006*). Intracellular  $Ca^{2+}$  stores play a minor role in IAS tone as we observed only a slight reduction in basal tone with the specific inhibitor of the calcium-ATPase of sarcoplasmic reticulum CPA (*Seidler et al., 1989*). We excluded the neural origin of IAS tone and rhythmic spontaneous contractions since they are resistant to the neurotoxin tetrodotoxin. Rhythmic phasic contractions could be caused by pacemaker potentials originating in the interstitial cells of Cajal, as the frequency of these contractions corresponds to membrane potential oscillations attributed to these cells, however the basal IAS tone and its slow rhythmic fluctuations are probably myogenic in origin (*Mutafova-Yambolieva et al., 2003*). We also found that IAS tone is modulated by intrinsic influences of inhibitory motor neurons as nitroergic and purinergic blockade increased IAS tone, suggesting tonic release of inhibitory neurotransmitters. Patients with hemorrhoids or anal fissure also show a pattern of rhythmic slow pressure waves superimposed on increased IAS tone. It could be hypothesized that this increased IAS tone is due to a loss in this tonic neural influence from inhibitory motor neurons.

NO, VIP, PACAP, ATP and CO have been proposed as inhibitory neurotransmitters in several studies on gastrointestinal sphincters (*Nurko and Rattan, 1988; Rattan et al., 1992; Goyal and Hirano, 1996; Chakder et al., 2000*). Agonists for all these putative neurotransmitters induced a concentration-dependent relaxation in our porcine IAS strips not affected by the neurotoxin TTX suggesting direct action on smooth muscle cells (*Rattan, 2005*). It is well known that NO is the main inhibitory neurotransmitter causing relaxation of IAS in humans and animals (*O'Kelly et al., 1993; Cook et al., 2001*) 26, -as we also found in this study- however the relative role of the other inhibitory neurotransmitters has not been established yet (*Jones et al., 2003a*). We observed that P2Y<sub>1</sub> antagonists blocked the non-nitric relaxation following stimulation of the inhibitory neurons by electrical field or nicotinic receptors. Recent studies on mice also described that IAS relaxation was partly mediated through P2Y<sub>1</sub> receptors (*McDonnell et al., 2008*). Other animal studies have also found that selective VIP antagonism caused partial attenuation of non-nitric IAS relaxation (*Biancani et al., 1985; Nurko and Rattan, 1988; Rattan and Chakder, 1992; Lynn et al., 1995*). Finally CO produced only a slightly dose-dependent relaxation in our study, and the antagonism of nicotine-induced relaxation by the heme-oxygenase inhibitor was only 20%, suggesting CO did not play a significant role in IAS relaxation (*Rattan and Chakder, 1993; Battish et al., 2000; Rattan et al., 2004; Rattan et al., 2005*). Taken together, our results suggest a prominent role for NO, a relevant participation of a purine through P2Y<sub>1</sub> receptors and only a minor contribution for VIP/PACAP on neural induced IAS relaxation.

Electrical stimulation induced a frequency-dependent “on” relaxation and “off” contraction in our porcine IAS strips (*Munday et al., 2000; Farre et al., 2006*). Low frequency of stimulation mainly activated inhibitory motor neurons in the IAS while at higher frequency the excitatory cholinergic motor neurons and sympathetic fibers were also stimulated (*Rattan, 2008*). In contrast, the electrical stimulation of LM strips only produced an “on” contraction by stimulation of cholinergic neurons. We also explored the mechanisms and receptors involved in synaptic transmission to these motor neurons from parasympathetic fibers and interneurons in the IAS and LM (*Galligan, 2002*). What we found in this study was that nicotine caused a strong stimulation of inhibitory motor neurons and did not induce any contraction in IAS or LM strips, suggesting that nicotinic receptors do not stimulate excitatory motor neurons. In addition, nicotine did not induce any relaxation in pre-contracted LM strips also suggesting that inhibitory



motor neurons do not reach LM fibers. We also found that inhibitory motor neurons in the porcine IAS can be stimulated by muscarinic receptors as carbachol caused IAS relaxation, fully antagonized by tetrodotoxin (*Speakman et al., 1992*), and strong LM contraction. Stimulation of P2X receptors did not induce any neural response in the IAS or LM, and stimulation of 5-HT receptors selectively stimulated excitatory motor neurons causing IAS and LM contraction. Based on these results we propose physiological and coordinated mechanisms of control of IAS and LM motility. At rest, IAS is closed by myogenic mechanisms and the LM is relaxed. Physiological stimulation of motor neurons causes transient IAS relaxation with simultaneous LM contraction -shortening the anal canal during IAS opening- followed by sequential stimulation of excitatory motor neurons in the IAS, which close the sphincter.

Finally, our study has some potential therapeutic implications. Hypertonicity of the internal anal sphincter is a constant finding in patients with anal fissure and IAS spasm cessation is associated with pain relief and healing of the fissure (*Nelson, 2003*). Several pharmacological methods to relax the IAS have been used to avoid the risk of incontinence associated with anal fissure surgery (*Garcia-Aguilar et al., 1996*), however, the issue is not settled. In a very recent Cochrane systematic review, only NO donors (nitroglycerin, isosorbide dinitrate), calcium channel blockers (diltiazem, nifedipine), and botulinum toxin were found to be marginally but significantly better than placebo in healing anal fissure (48% vs. 37%,  $p < 0.004$ ), and presented a high (50%) rate of fissure recurrence (*Nelson, 2003*). Our study suggests stimulation of inhibitory motor neurons by nicotinic and muscarinic agonists might be a new pharmacologic strategy for the pharmacological modulation of IAS tone in treating anal fissures. In addition, stimulation of excitatory motor neurons by 5HT<sub>3</sub> receptors might be useful in patients with fecal incontinence and impaired IAS closure. Further clinical studies will help to clarify these new therapeutic approaches for these common anal motor diseases.

## References

- Battish R, Cao GY, Lynn RB, Chakder S and Rattan S (2000) Heme oxygenase-2 distribution in anorectum: colocalization with neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**:G148-155.
- Bhardwaj R, Vaizey CJ, Boulos PB and Hoyle CH (2000) Neuromyogenic properties of the internal anal sphincter: therapeutic rationale for anal fissures. *Gut* **46**:861-868.
- Biancani P, Walsh J and Behar J (1985) Vasoactive intestinal peptide: a neurotransmitter for relaxation of the rabbit internal anal sphincter. *Gastroenterology* **89**:867-874.
- Chakder S, Cao GY, Lynn RB and Rattan S (2000) Heme oxygenase activity in the internal anal sphincter: effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* **118**:477-486.
- Chakder S and Rattan S (1998) Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating peptide in opossum internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* **275**:G769-777.
- Cook TA, Brading AF and Mortensen NJ (2001) The pharmacology of the internal anal sphincter and new treatments of ano-rectal disorders. *Aliment Pharmacol Ther* **15**:887-898.
- Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E and Clave P (2006) Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**:1238-1248.
- Galligan JJ (2002) Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**:611-623.
- Garcia-Aguilar J, Belmonte C, Wong WD, Lowry AC and Madoff RD (1996) Open vs. closed sphincterotomy for chronic anal fissure: long-term results. *Dis Colon Rectum* **39**:440-443.
- Goyal RK and Hirano I (1996) The enteric nervous system. *N Engl J Med* **334**:1106-1115.
- Hagger R, Gharai S, Finlayson C and Kumar D (1998) Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* **73**:75-79.

## *Capítulo 1: porcine internal anal sphincter*

- Horiguchi K, Keef KD and Ward SM (2003) Distribution of interstitial cells of Cajal in tunica muscularis of the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G756-767.
- Jones OM, Brading AF and Mortensen NJ (2003a) Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum* **46**:963-970.
- Jones OM, Moore JA, Brading AF and Mortensen NJ (2003b) Botulinum toxin injection inhibits myogenic tone and sympathetic nerve function in the porcine internal anal sphincter. *Colorectal Dis* **5**:552-557.
- Jones OM, Thompson JM, Brading AF and Mortensen NJ (2003c) L-Erythromethoxamine is more potent than phenylephrine in effecting contraction of internal anal sphincter in vitro. *Br J Surg* **90**:872-876.
- Lunniss PJ and Phillips RK (1992) Anatomy and function of the anal longitudinal muscle. *Br J Surg* **79**:882-884.
- Lynn RB, Sankey SL, Chakder S and Rattan S (1995) Colocalization of NADPH-diaphorase staining and VIP immunoreactivity in neurons in opossum internal anal sphincter. *Dig Dis Sci* **40**:781-791.
- Macchi V, Porzionato A, Stecco C, Vigato E, Parenti A and De Caro R (2008) Histotopographic study of the longitudinal anal muscle. *Clin Anat* **21**:447-452.
- Madoff RD and Fleshman JW (2004) American Gastroenterological Association technical review on the diagnosis and treatment of hemorrhoids. *Gastroenterology* **126**:1463-1473.
- McDonnell B, Hamilton R, Fong M, Ward SM and Keef KD (2008) Functional evidence for purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G1041-1051.
- Munday MK, Jonas M, Worthley T, Scholefield JH and Wilson VG (2000) Pharmacological characterization of neurogenic responses of the sheep isolated internal anal sphincter. *Br J Pharmacol* **130**:489-494.
- Mutafova-Yambolieva VN, O'Driscoll K, Farrelly A, Ward SM and Keef KD (2003) Spatial localization and properties of pacemaker potentials in the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G748-755.
- Nelson R (2003) Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev*:CD003431.

## *Capítulo 1: porcine internal anal sphincter*

- Nurko S and Rattan S (1988) Role of vasoactive intestinal polypeptide in the internal anal sphincter relaxation of the opossum. *J Clin Invest* **81**:1146-1153.
- O'Kelly T, Brading A and Mortensen N (1993) Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* **34**:689-693.
- Rattan S (2005) The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil* **17 Suppl 1**:50-59.
- Rattan S (2008) Sympathetic (adrenergic) innervation modulates but does not generate basal tone in the internal anal sphincter smooth muscle. *Gastroenterology* **134**:2179-2181; author reply 2181-2172.
- Rattan S, Al Haj R and De Godoy MA (2004) Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G605-611.
- Rattan S and Chakder S (1992) Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* **262**:G107-112.
- Rattan S and Chakder S (1993) Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *Am J Physiol* **265**:G799-804.
- Rattan S, Regan RF, Patel CA and De Godoy MA (2005) Nitric oxide not carbon monoxide mediates nonadrenergic noncholinergic relaxation in the murine internal anal sphincter. *Gastroenterology* **129**:1954-1966.
- Rattan S, Sarkar A and Chakder S (1992) Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* **103**:43-50.
- Rolle U, Piaseczna-Piotrowska A and Puri P (2007) Interstitial cells of Cajal in the normal gut and in intestinal motility disorders of childhood. *Pediatr Surg Int* **23**:1139-1152.
- Seidler NW, Jona I, Vegh M and Martonosi A (1989) Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **264**:17816-17823.
- Shah V, Lyford G, Gores G and Farrugia G (2004) Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **126**:903-913.
- Speakman CT, Hoyle CH, Kamm MA, Henry MM, Nicholls RJ and Burnstock G (1992) Decreased sensitivity of muscarinic but not 5-hydroxytryptamine receptors of the internal anal sphincter in neurogenic faecal incontinence. *Br J Surg* **79**:829-832.

*Capítulo 1: porcine internal anal sphincter*

Valles M, Vidal J, Clave P and Mearin F (2006) Bowel dysfunction in patients with motor complete spinal cord injury: clinical, neurological, and pathophysiological associations. *Am J Gastroenterol* **101**:2290-2299.

Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD and Snyder SH (2004) Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2631-2635.

## **Appendix I. Complementary figures of porcine internal anal sphincter studies**

### **Index:**

#### **A) Morphological Studies**

##### **Anatomy**

- a) Anal canal dissection and structure (Complementary figure 1)

##### **Histology**

- a) Haematoxylin and eosin stain (Complementary figure 2)
- b) S100 neural stain (Complementary figure 3)
- c) CD117 stain for interstitial cells of Cajal (Complementary figure 4)

##### **Ultrasonographic study**

- a) Ultra-sonographic study of the porcine anal canal specimen shown in Figure 1A (Complementary figure 5)

#### **B) Physiological Studies**

##### **Circular internal anal sphincter**

- a) Effect of neurotoxins TTX and  $\omega$ -conotoxin GVIA on responses to electrical field stimulation (Complementary figure 6)
- b) Effects of several calcium channel blockers (Complementary figure 7)
- c) Characterization of the effects of putative neurotransmitters:
  - i.  $\alpha\beta$ meATP (Complementary figure 8A)
  - ii. Substance P (Complementary figure 8B)
  - iii. Characterization of 5-HT/5-HT<sub>3</sub> responses (Complementary figure 8C)

##### **Longitudinal muscle**

- a) Characterization of responses to electrical field stimulation:
  - i. Phentolamine, neurotoxins TTX and  $\omega$ -conotoxin GVIA (Complementary figure 9)
  - ii. Atropine, SR140333 and GR98400 (Complementary figure 10)
- b) Characterization of effects of putative neurotransmitters:
  - i.  $\alpha\beta$ meATP (Complementary figure 11A)
  - ii. Serotonin (Complementary figure 11B)
  - iii. Acetylcholine (Figure 11C)

Graph of the IAS and LM of the porcine (Complementary figure 12)

## Summary

This section shows complementary figures that were originated from the experiments of chapter 1 and were not published. The porcine anal canal dissection of the specimens obtained from the slaughterhouse shows the inner smooth muscle ring of the IAS, surrounded by the EAS and longitudinal smooth muscle (LM) which is a continuation of the external layer of the longitudinal muscle of the rectum (Complementary figure 1). Our histological studies showed anal glands located in the ventral and dorsal edge of the IAS with their ducts crossing the muscle bundles (Complementary figure 2), the neural S100 stain identified glial cells and neural fibers in the myenteric ganglion between the circular and longitudinal smooth muscle of the myenteric plexus (Complementary figure 3), and a few interstitial cells of Cajal were found in the IAS and in the myenteric edge of the LM (Complementary figure 4). The endoanal ultrasonographic study reveals that the IAS is a hypoechoic ring while the EAS have hyperechoic and mixed echogenicity (Complementary figure 5).

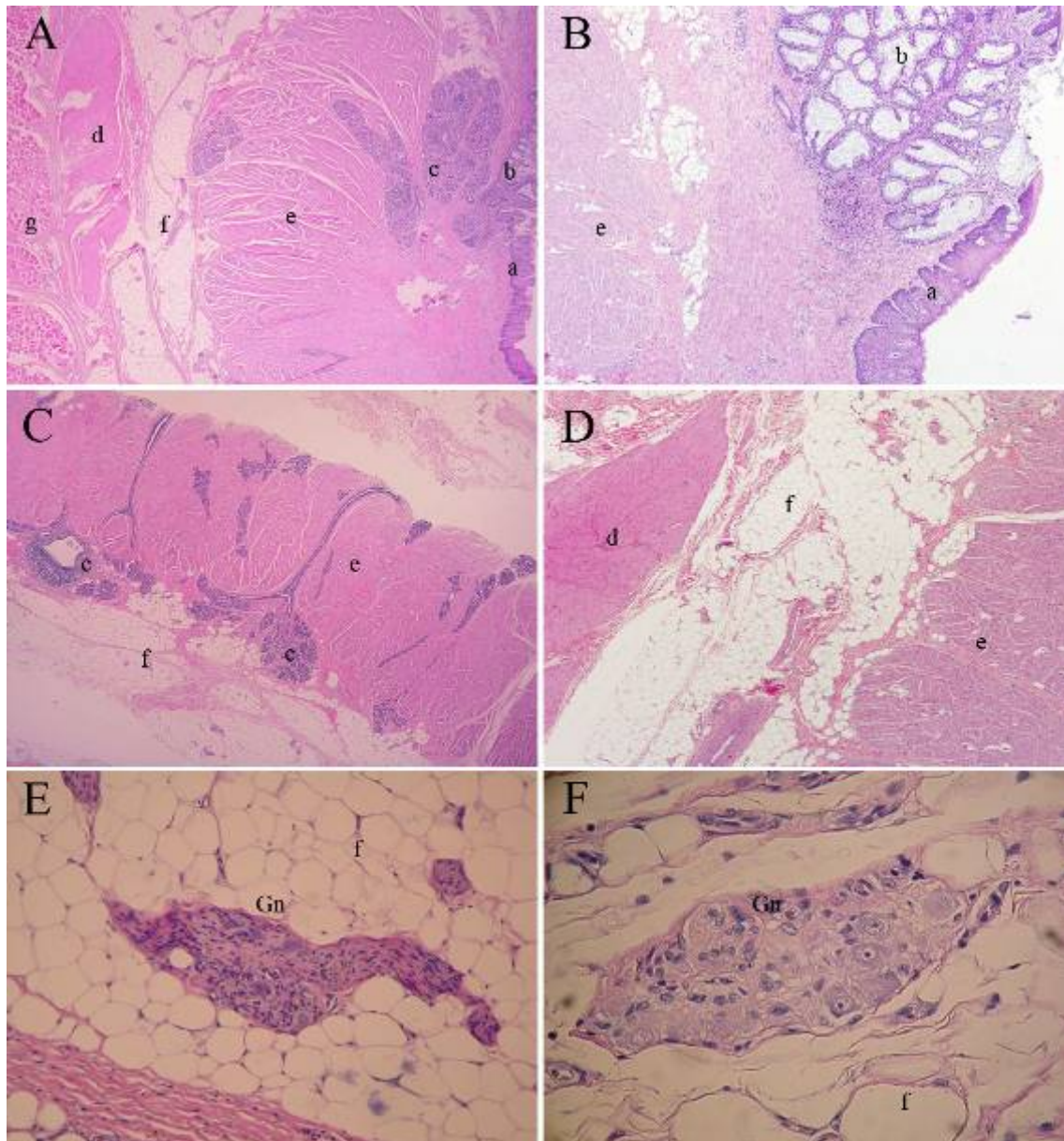
The *in vitro* mechanical response induced in the porcine IAS and LM by electrical stimulation was blocked by the neurotoxin TTX (Complementary figure 6 and 11). The neurotoxin  $\omega$ -conotoxin ( $\omega$ -GVIA) blocked contraction and reduced low frequency-induced relaxation while the sequential addition of L-NAME blocked the residual relaxation in IAS strips (Complementary figure 6). The IAS myogenic tone was markedly reduced by dihydropyridines (nifedipine and diltiazem) when used in non-additive application, whereas otilonium bromide has slightly effect (Complementary figure 7). Continuing with the pharmacological characterization, the P2X agonist  $\alpha\beta$ meATP induced an IAS relaxation and LM contraction, and interestingly, both MRS2179 (P2Y<sub>1</sub> antagonist) and NF279 (P2X antagonist) antagonized  $\alpha\beta$ meATP-induced IAS relaxation and LM contraction (Complementary figure 8A and 11A). Neurokinin receptors (NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub>) were present in both layers but the electrically and substance P induced-contraction was only significantly reduced by the NK<sub>2</sub> antagonist GR98400 (Complementary figure 8B and 10). Serotonin receptors were also implicated in the IAS and LM motility, producing contractions in both layers, which were antagonized by atropine and TTX (Complementary figure 8C and 11B). The M<sub>1</sub> receptor antagonist (pirenzipine) blocked the IAS relaxation induced by carbachol and significantly reduced the contraction induced by ACh in the LM (Complementary figure 11C), indicating the presence of M<sub>1</sub> receptors in the inhibitory enteric MNs in the IAS and in the excitatory enteric MNs in LM. Finally, in complementary figure 12 we can observe a representative scheme of the porcine anal canal morphology and neurotransmission we proposed in porcine anal canal.

**A) Morphological Studies**

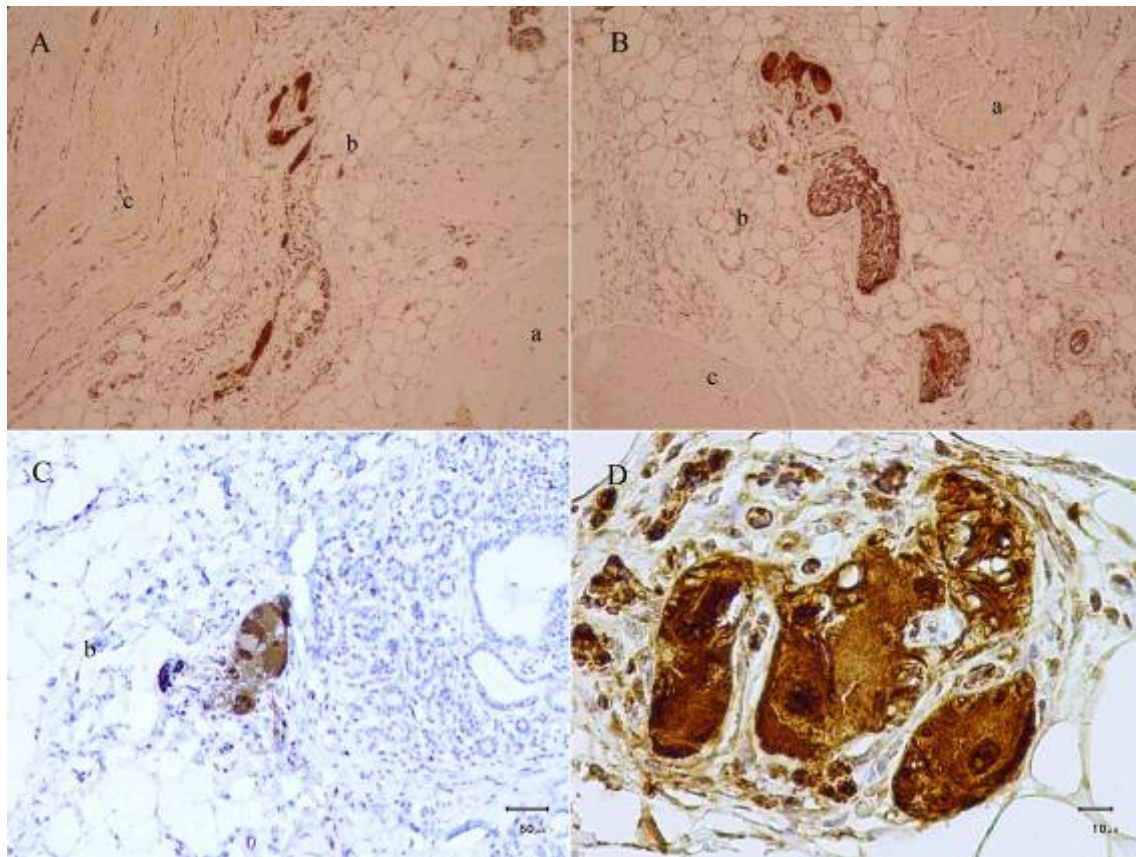


**Complementary figure 1.** Photograph of the porcine anal canal dissection. (A) Porcine anal canal obtained from the slaughterhouse and cleaned of fat and other connective tissue, (B) and (C) The anal canal opened along the longitudinal axis observing the anal sphincter complex, (D) The anal canal completely open along the longitudinal axis, with the mucosa and submucosa removed, showing the thickening of the internal anal sphincter and the longitudinal smooth muscle fibre of the longitudinal muscle. a1, subcutaneous portion of the external anal sphincter; a2, superficial portion of the external anal sphincter; b, rectal serosa in (A) and rectal mucosa in (B, C, D); c, skin; d, internal anal sphincter; e, *pectinate line*, and f, longitudinal muscle of the anal canal.



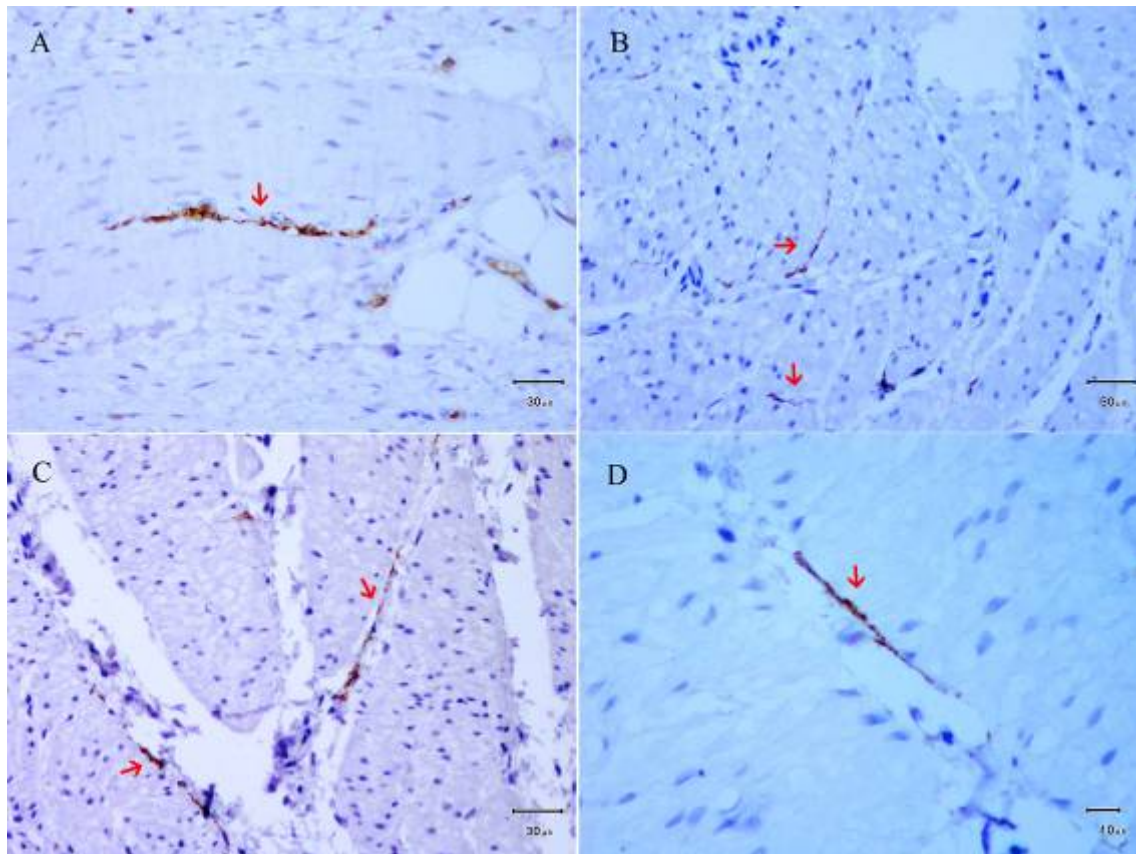


**Complementary figure 2.** Microphotograph of the porcine anal canal with haematoxylin & eosin stain. **(A)** Transversal section at the level of the *pectinate line*. A general view of the last portion of the simple columnar epithelium of the rectal mucosa, the transitional epithelium (*pectinate line*), and the stratified squamous epithelium. The anal gland is located in the intersphincteric and submucous border of the internal anal sphincter (2X). **(B)** Amplified section of the muco-cutaneous union or *pectinate line* of the anal canal between the simple columnar epithelium of the rectal mucosa and the transitional epithelium (10X). **(C)** Transversal section of the internal anal sphincter without mucous or submucous. The anal gland with its duct crossing the muscle bundles to the submucous border (4X). **(D)** Intersphincteric space of the porcine anal canal (4X). **(E and F)** Myenteric ganglion of the myenteric plexus observed in the intersphincteric space between the circular and longitudinal smooth muscle layers (40X); a, Stratified squamous epithelium; b, Rectal mucosa; c, Anal gland; d, Longitudinal muscle of the anal canal; e, Internal anal sphincter; f, adipose-connective tissue; g, External anal sphincter and Gn, myenteric ganglion.



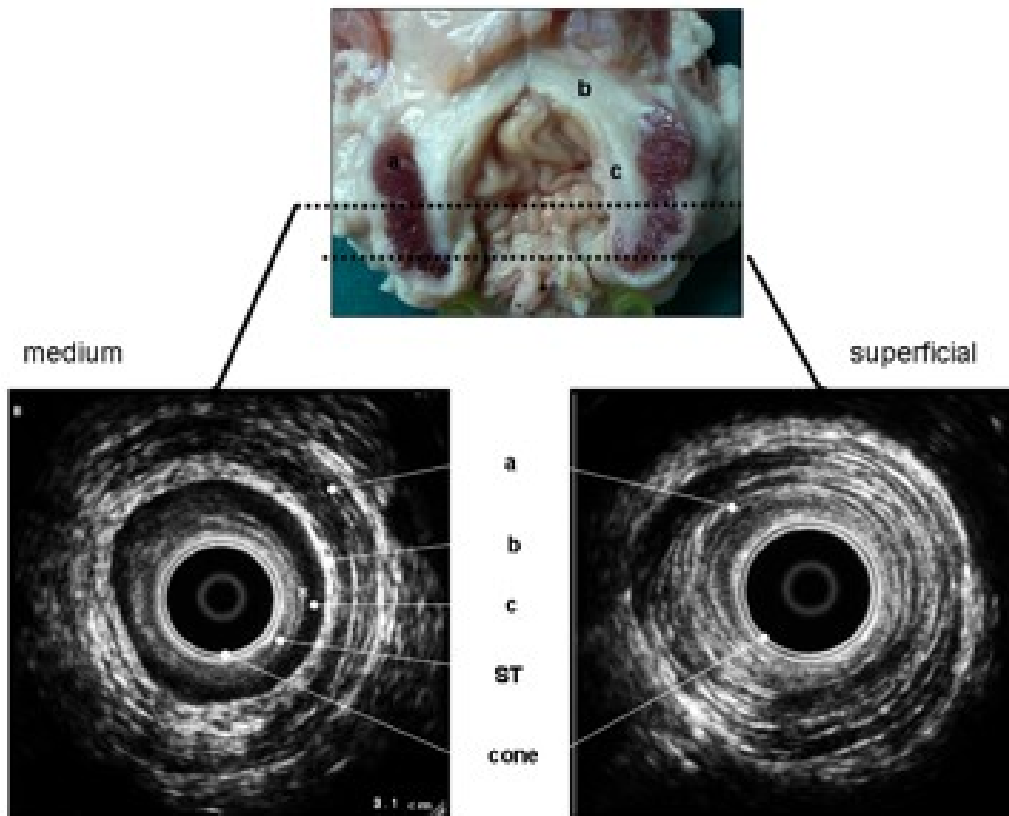
**Complementary figure 3.** S100 immunoreactivity. (A) A general view of a transversal cut at the level of the *pectinate line*, the neural structures (brownish colour) can be seen in the intersphincteric space and between muscle bundles (2X). (B, C and D) show different magnifications of myenteric ganglion of the myenteric plexus in the intersphincteric space. a, Internal anal sphincter; b, adipose-connective tissue and c, longitudinal muscle of the anal canal.





**Complementary figure 4.** CD117 immunoreactivity. In **A**, **B**, **C** and **D** we can see the interstitial cells of Cajal (ICC) (red arrows) between the muscular septum of the circular muscle of the porcine internal anal sphincter. These ICC are identified as intramuscular (ICC-IM).

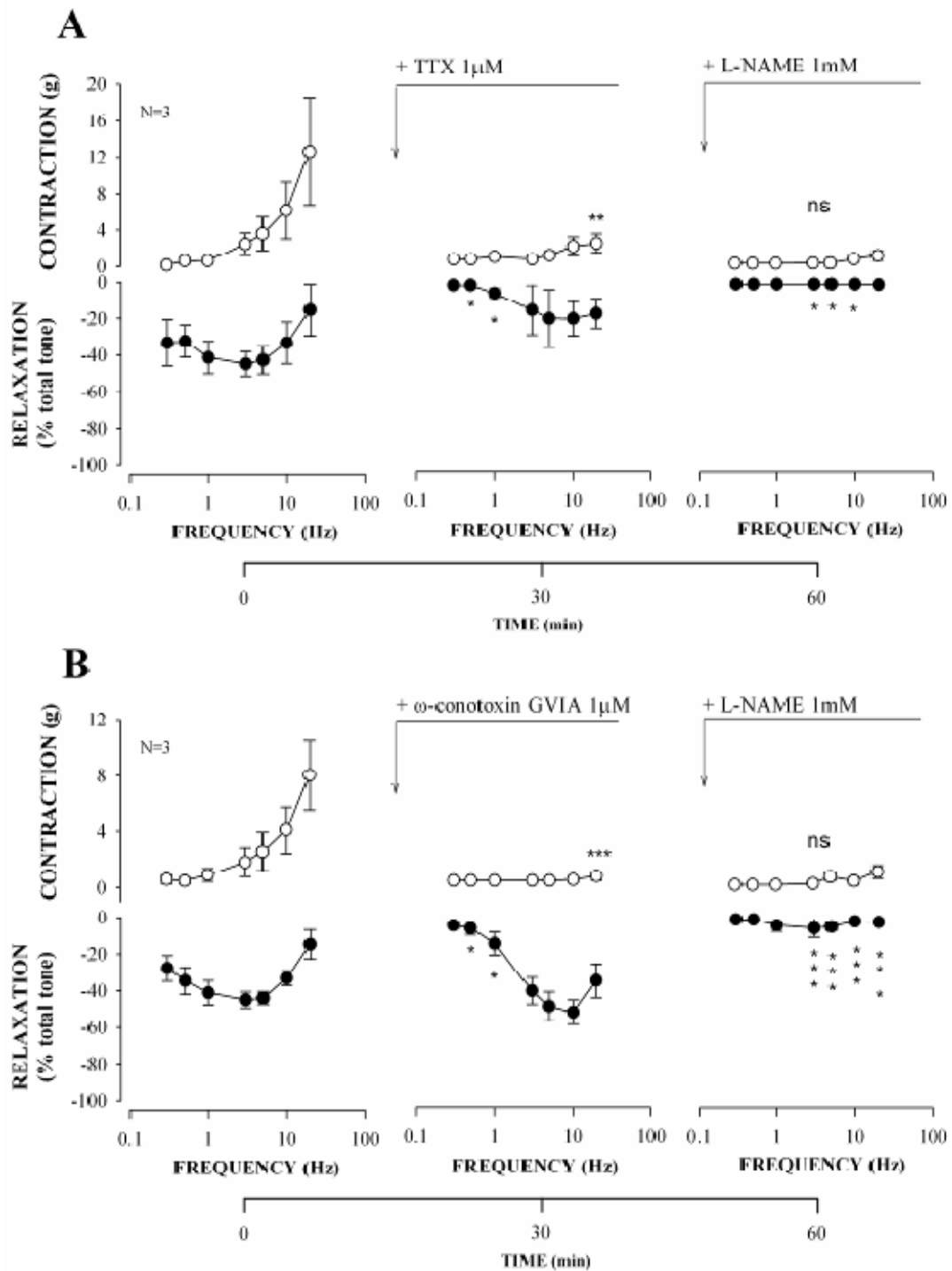
**Ultra-sonographic study of porcine anal canal**



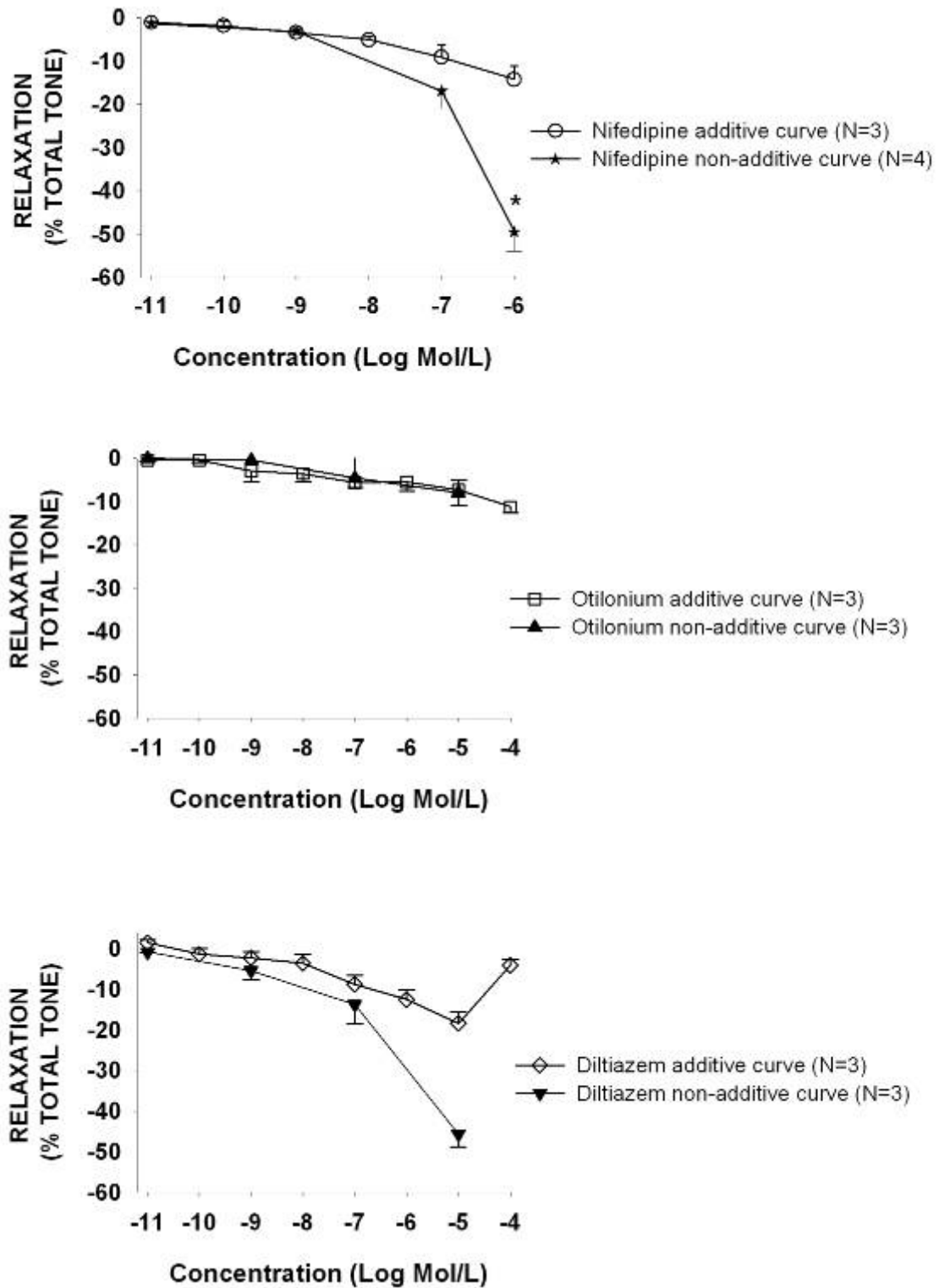
**Complementary figure 5.** Transversal images obtained by endoanal ultrasonography of the mild level (left picture) and the superficial level (right picture) of the porcine anal sphincter complex using the Bartman system. a) External anal sphincter, b) longitudinal smooth muscle, c) internal anal sphincter, and ST, subepithelial tissue.

**B) Physiological Studies**

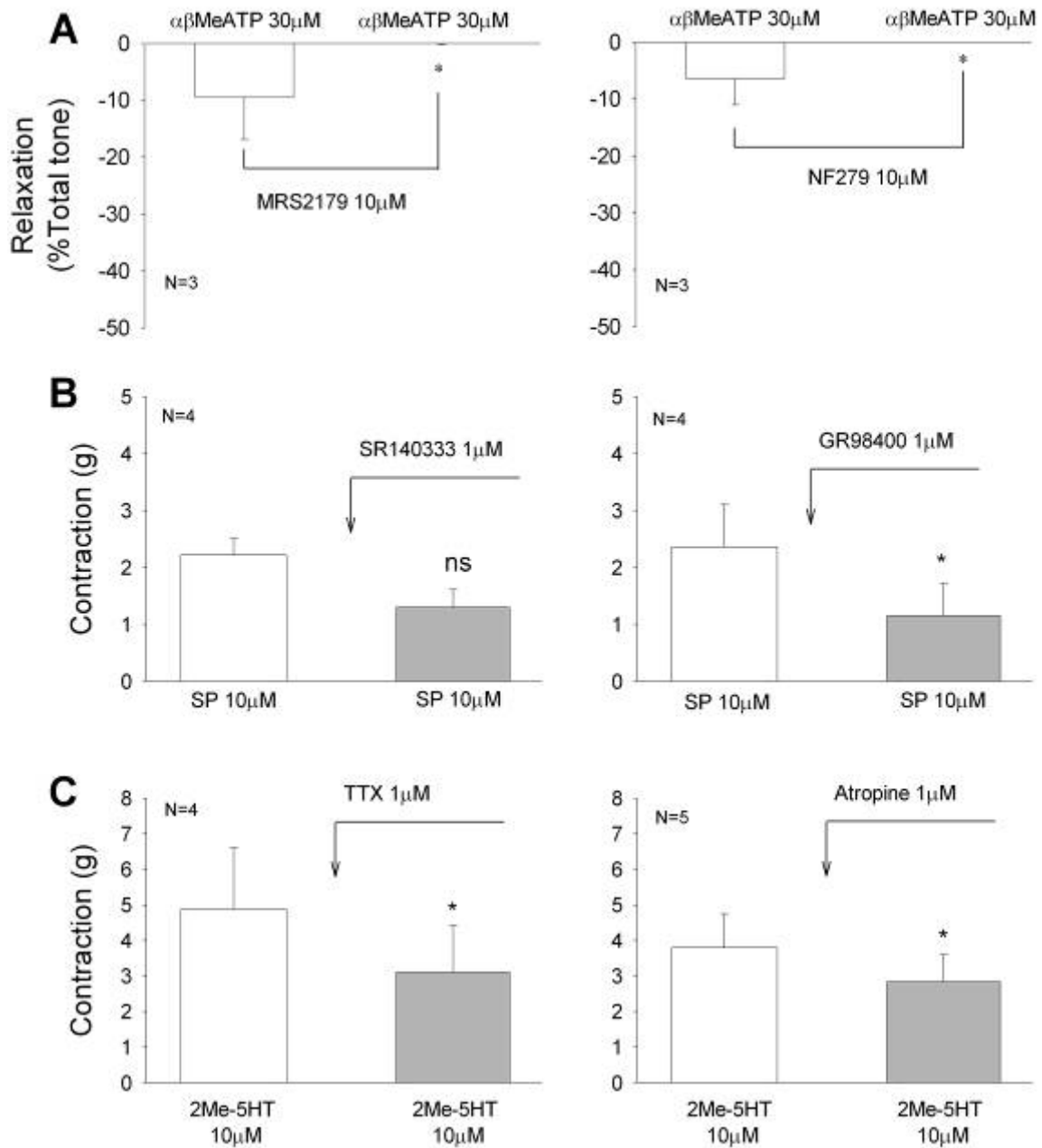
**Circular Internal Anal Sphincter**



**Complementary figure 6.** Characterization of the electrical field stimulation (EFS) in IAS strips by the sequential addition of neurotoxin TTX (**A**) or  $\omega$ -conotoxin GVIA (**B**) and L-NAME. Both neurotoxins blocked the EFS-induced contraction. While TTX inhibited EFS-induced relaxation,  $\omega$ -conotoxin GVIA only antagonized low frequency-induced relaxation and sequential addition of L-NAME significantly reduced residual relaxation.

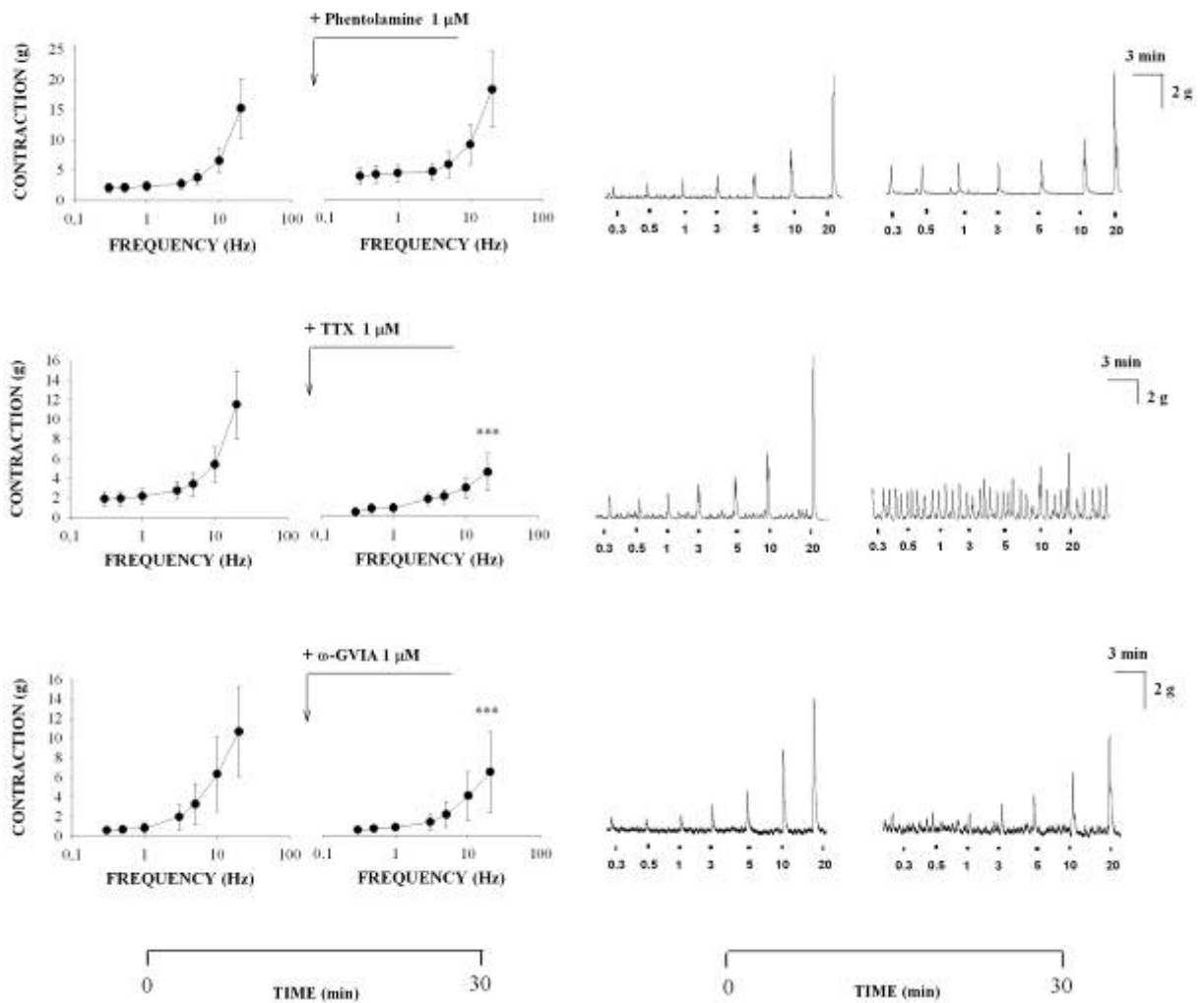


**Complementary figure 7.** Additive and non-additive concentration-response curve of nifedipine, otilonium and diltiazem (calcium channel blockers) in the internal anal sphincter. All blockers induced a dose-dependent fall in IAS tone, but non-additive application induced higher fall for each concentration, particularly nifedipine and diltiazem.



**Complementary figure 8.** (A)  $\alpha\beta$ MeATP-induced internal anal sphincter relaxation was significantly reduced by MRS2179 (selective P2Y<sub>1</sub> antagonist) and NF279 (P2X receptor agonist). (B) Substance P-induced contraction in internal anal sphincter strips was significantly reduced by GR98400 (NK<sub>2</sub> receptor antagonist) ( $p < 0.05$ ), while SR140333 (NK<sub>1</sub> receptor antagonist) did not have a significant effect. The contraction induced by substance P is thus mainly mediated by NK<sub>2</sub> receptors. (C) 2-Me-5HT-induced internal anal sphincter contraction was significantly reduced by TTX and atropine ( $p < 0.05$ ).

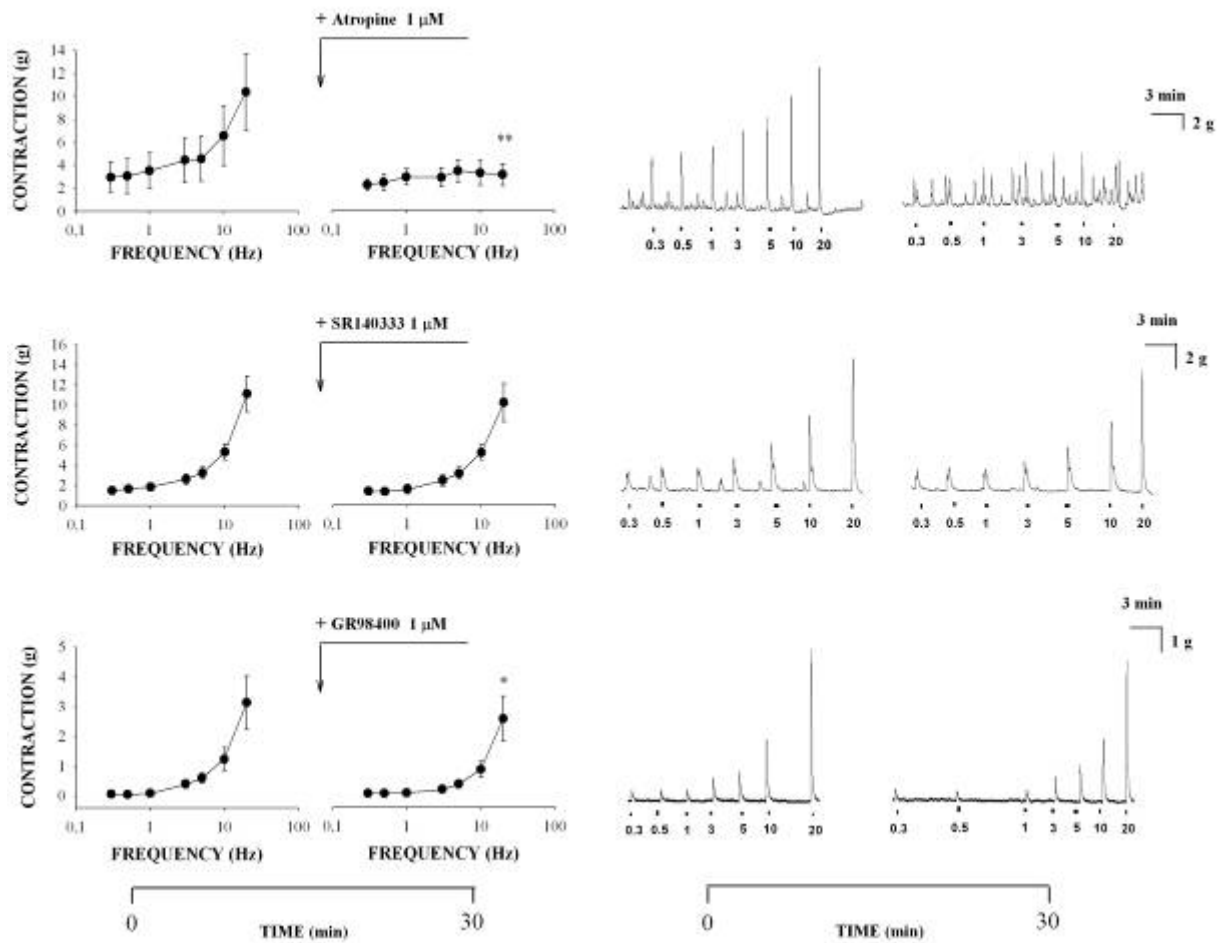
**Longitudinal Muscle**



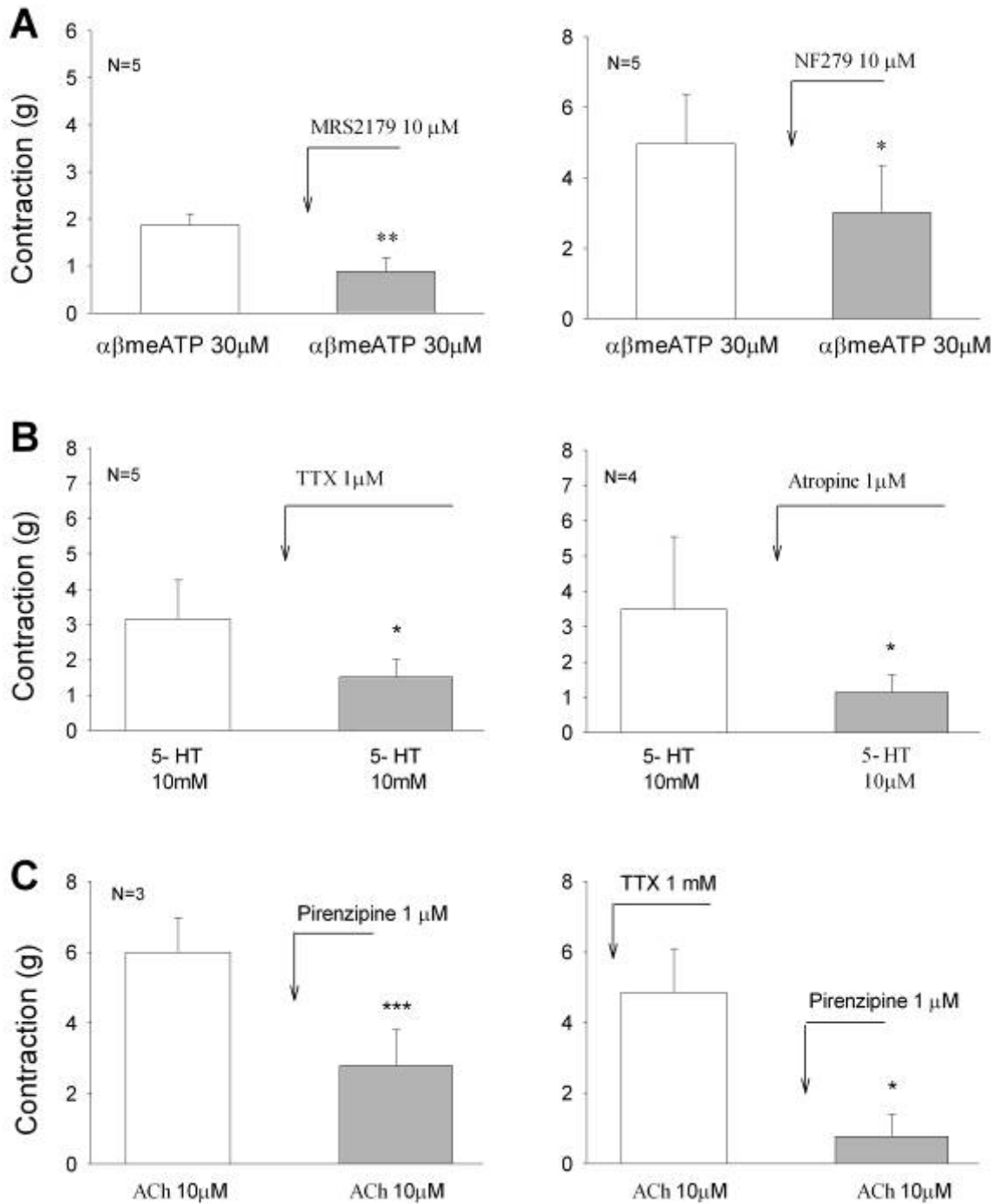
**Complementary figure 9.** Neurotoxins ω-conotoxin GVIA and TTX, and phentolamine antagonism on EFS-induced contraction in longitudinal muscle. Phentolamine had no effect on EFS-induced contraction, while ω-conotoxin GVIA and TTX significantly reduced contraction at highest frequency of 20 Hz.



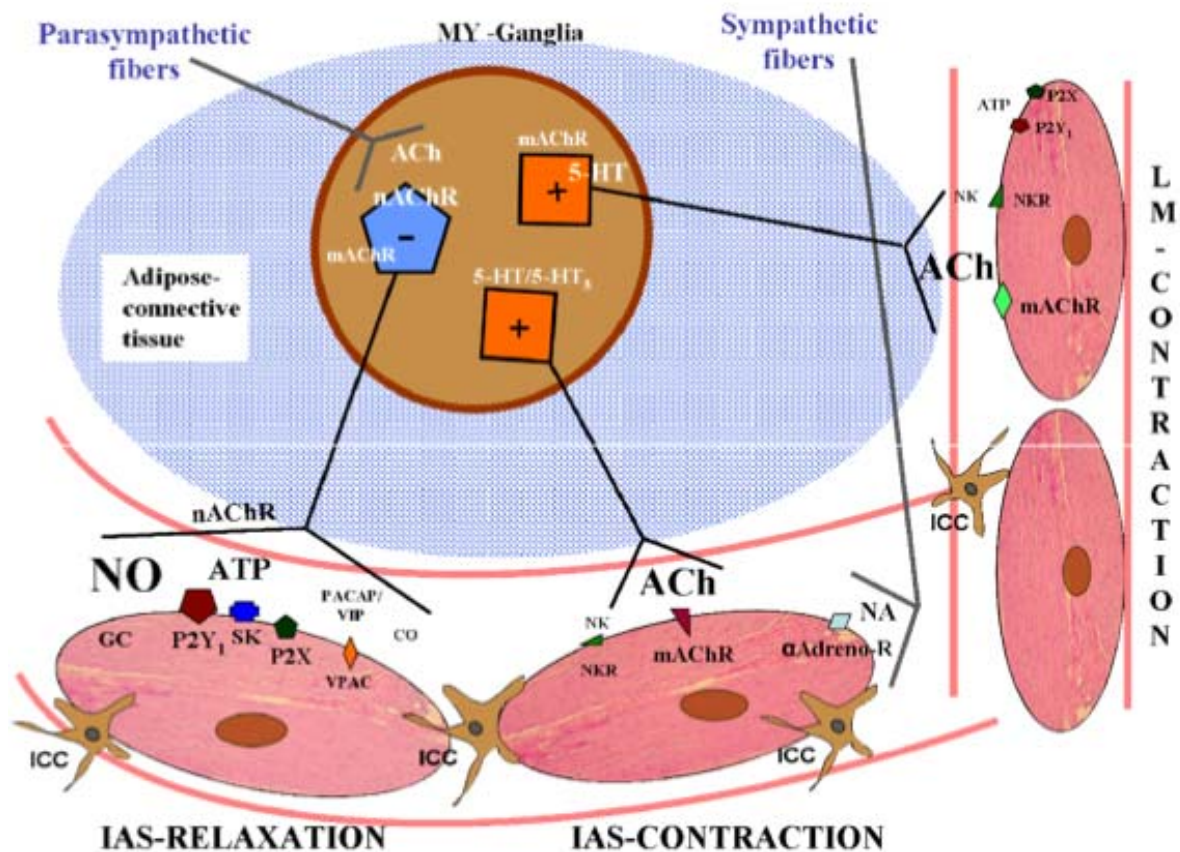
*Anexo 1: porcine internal anal sphincter*



**Complementary figure 10.** Antagonism of atropine, SR140333 (NK<sub>1</sub>-receptor antagonist) and GR98400 (NK<sub>2</sub>-receptor antagonist) on EFS-induced contraction in longitudinal muscle. Atropine and GR98400 significantly reduced EFS-induced contraction at highest frequency while SR140333 had no effect.



**Complementary figure 11.** (A)  $\alpha\beta\text{MeATP}$ -induced longitudinal muscle contraction was significantly reduced by MRS2179 ( $\text{P2Y}_1$  receptor antagonist) ( $p < 0.01$ ) and NF279 ( $\text{P2X}$  receptor antagonist) ( $p < 0.05$ ). (B) TTX and atropine significantly reduced 5-HT-induced longitudinal muscle contraction ( $p < 0.05$ ). (C) Acetylcholine (ACh)-induced longitudinal muscle contraction was significantly reduced by the direct effect of pirenzepine ( $p < 0.001$ ) and in preincubation by neurotoxin TTX ( $p < 0.05$ ).



**Complementary figure 12.** Graph of the porcine internal anal sphincter and longitudinal muscle. The figure indicates the neurotransmitters mediating neuromuscular transmission in the internal anal sphincter (inhibitory and excitatory) and longitudinal muscle (excitatory); the receptors mediating stimulation of excitatory and inhibitory enteric motor neurons, and the effect of sympathetic and parasympathetic fibers. MY-ganglia indicates myenteric-ganglia; Ach, acetylcholine; nAChR, nicotinic acetylcholine receptor; mAChR, muscarinic acetylcholine receptor; 5-HT, serotonin receptor; 5-HT<sub>3</sub>, serotonin ionotropic receptor; NO, nitric oxide; GC, guanylate cyclase; SK, small conductance Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> channels; CO, carbon monoxide; VPAC, VIP/PACAP receptors; NK, neurokinin; NKR, neurokinin receptor, and ICC, interstitial cells of Cajal.



## **CAPÍTULO 2. Specific And Complementary Roles For Nitric Oxide And ATP In The Inhibitory Motor Pathways To Rat Internal Anal Sphincter.**

*Neurogastroenterol Motil* 2011; 23 (1): E11-E25

### **Abstract**

**Background.** The neurotransmitters mediating inhibitory pathways to internal anal sphincter (IAS) have not been fully characterized. Our aim was to assess the putative release of nitric oxide, purines and VIP from inhibitory motoneurons (MNs) and their role in the myogenic tone, resting membrane potential (RMP) of smooth muscle cells (SMC), spontaneous inhibitory junction potentials (sIJP), mechanical relaxation and IJP induced by electrical field stimulation (EFS) or nicotine. **Methods.** Rat IAS strips were studied using organ baths, microelectrodes and immunohistochemistry. **Key results.** IAS strips developed active myogenic tone (0.31g), enhanced and stabilised by PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . L-NNA (1mM) depolarised SMC and increased tone but did not modify sIJP. In contrast, the specific P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2500 (1 $\mu$ M) did not modify the RMP or the basal tone but abolished sIJP. EFS and nicotine (10 $\mu$ M) caused IAS relaxation (-45.9% vs. -52.2%), partially antagonized by L-NNA (35%-45%,  $P < 0.05$ ) and fully abolished by MRS2500 ( $P < 0.001$ ). EFS induced a biphasic IJP, the initial fast component was selectively blocked by MRS2500 and the sustained slow component was blocked by L-NNA. VIP 6-28 (0.1 $\mu$ M) or  $\alpha$ -chymotrypsin (10U/mL) did not modify the RMP, sIJP, EFS-induced IJP or relaxation. P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptors were immunolocalized in the circular SMC of IAS. **Conclusions & Inferences.** The effects of inhibitory MNs on rat IAS are mediated by a functional co-transmission process involving nitrgergic and purinergic pathways through P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptors with specific and complementary roles on the control of tone, sIJP, and hyperpolarization and relaxation of IAS following stimulation of inhibitory MNs.

**Keywords:** inhibitory junction potential, nitric oxide, P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> receptors, immunohistochemistry.

## **Introduction**

The rectoanal inhibitory reflex is initiated by stimulation of rectal mechanoreceptors by rectal distension and descendent stimulation of intrinsic inhibitory motor neurons (MNs) in the internal anal sphincter (IAS) (Jones et al., 2003). *In vitro* studies on humans (Burleigh, 1992; O'Kelly et al., 1993) and pigs (O'Kelly et al., 1992; Opazo et al., 2009) mainly attribute IAS relaxation to nitric oxide (NO) release. However, in species such as the rabbit (Tottrup et al., 1995), rat (De Luca et al., 1999), guinea-pig (Rae and Muir, 1996), and opossum (Rattan, 2005) other mediators such as ATP, VIP and/or CO are complementary inhibitory neurotransmitters which contribute to IAS relaxation. In addition, study of the biosynthetic enzymes for CO and NO in knockout mice show that physiologic effects of VIP in the IAS are mediated by CO (Watkins et al., 2004). VIP and NO synthase are co-localised in inhibitory neurons in the opossum IAS (Lynn et al., 1995). We recently found that porcine IAS relaxation following stimulation of inhibitory MNs is mediated by neurotransmission of NO and ATP acting on P2Y<sub>1</sub> receptor (Opazo et al., 2009). However, the specific physiological role of each of these neurotransmitters on the inhibitory pathways to the IAS is not settled.

Hyperpolarization and inhibitory junction potentials (IJP) are the electrophysiological basis of mechanical relaxation. Spontaneous inhibitory junction potentials (sIJP) are small-amplitude, brief hyperpolarizations of the smooth muscle cell membrane which occur as a consequence of tonic release of inhibitory neurotransmitters (Strong et al., 2010). Evoked IJP by electrical field stimulation have a fast followed by a slow component. NO contributes to the sustained or slow phase of the transient hyperpolarization (usually called IJP-s) but not to the fast component (IJP-f) (Gallego et al., 2006). The study of ATP or a related purine as a putative inhibitory mediator has been difficult due to the lack of a proper pharmacological approach. Usually non-selective antagonists such as suramine and/or pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulfonate (PPADS), have been used to antagonize the non-nitroergic component of the relaxation (Rae and Muir, 1996; Jenkinson and Reid, 2000; McDonnell et al., 2008). Alternatively, apamin –sK(Ca) channel blocker- has been widely used as a tool to distinguish between the nitroergic and non-nitroergic inhibitory responses (Knudsen et al., 1995; Rae and Muir, 1996; De Luca et al., 1999). However, sK(Ca) channels might be activated downstream by several neurotransmitters and can be expressed in neurons, smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal (Fujita et al., 2001). In addition,

purines may contribute to inhibitory responses through both apamin-sensitive and insensitive pathways (Vogalis and Goyal, 1997; Zhang et al., 2010). MRS2179 is a P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist that we have used in the colon (Gallego et al., 2006; Auli et al., 2008; Gallego et al., 2008a) and small intestine (Gallego et al., 2008b). MRS2179 has also been used to characterize the contribution of P2Y<sub>1</sub> receptors in IAS relaxation in mice (McDonnell et al., 2008), sheep (Acheson et al., 2009) and our previous studies on pigs (Opazo et al., 2009). In these studies, high concentrations of up to 10 μM are needed to observe mild effects on the IJP-f and relaxation suggesting other P2Y receptors might also participate. We have recently found that the new P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2500 has a greater potency and abolished the IJP-f at 1 μM in the rat colon while MRS2179 only caused a 20% reduction (Grasa et al., 2009).

We have now used this new pharmacological tool to characterize the specific roles for NO and purines on the steady state electrical and mechanical properties, on the electrical and mechanical responses following stimulation of inhibitory MNs of rat IAS and on the relationships between these physiological events.

## Material And Methods

All experiments were approved by the Ethics Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona. All animals were treated according the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of this university.

**Animals and tissue preparation.** Male Sprague-Dawley rats (300-350 g) were kept at a constant temperature (19-21°C) and humidity (60%), with a lighting cycle of 12 h light/12 h dark and given *ad libitum* access to water and food. Rats were killed by decapitation and bled. The rectoanal region was dissected, quickly removed, placed in carbogenated Krebs solution, opened along the longitudinal axis and pinned to a Sylgard base with the mucosa facing upward. The mucosa and submucosal layers were removed by sharp dissection. Circular smooth muscle strips from the IAS were obtained from the lower part of the anal canal at the level of the *pectinate line* as previously described (De Godoy et al., 2004).

**Morphological studies.** For light microscopy and immunohistochemistry studies, the tissue was fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer saline (pH 7.3), dehydrated, and embedded in paraffin. We used hematoxylin-eosin (H&E) stain and

S100 (Policlonal Rabbit Anti-Cow S-100, Dako, Glostrup, Demark) performed with Dako Autostainer as previously described (Opazo et al., 2009). For anti-HuD, immunohistochemistry tissue samples were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.2 M phosphate buffer. Paraffin sections were mounted on glass slides and kept in a cold place until processed. Slides were deparaffinised and rehydrated, then pre-treated with NH<sub>4</sub>Cl 50 mM pH 8.0 to reduce autofluorescence. Afterwards, a standard blocking was performed with Triton X-100 0.1% + Tween 20 0.2% and goat serum 10% for 30 minutes. The incubation with the primary antibody H-300 (rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, INC., Santa Cruz, CA, U.S.A) 1:100 was performed overnight at 4°C. After rinsing, the sections were incubated with the secondary antibody (Alexa Fluor 568 goat anti-rabbit, Invitrogen Ltda., Paisley, Scotland, UK) at 1:200 for 1 hour at room temperature. For P2Y<sub>1</sub> immunohistochemistry we used primary antibody Anti P2Y<sub>1</sub> (Alomone Labs Ltd, Jerusalem, Israel.) 1:50 and performed as previously described (Gallego et al., 2006).

**Mechanical studies in organ baths.** Circular smooth muscle strips (7 mm long and 3 mm wide; mean weight  $0.027 \pm 0.002$  g) from 28 specimens were placed between two parallel platinum wire electrodes, attached to force transducers and transferred to 10 ml organ baths containing Krebs solution (pH 7.4, 37°C) bubbled with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>. Strips were stretched up to 2 g and equilibrated up to 90 minutes. To maintain a stable and enhanced IAS tone, Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) at 1  $\mu$ M was added to the bath (McDonnell et al., 2008). Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (model 03 Force Transducer and model 7 Series Polygraph, respectively, Grass Instruments Co, Quincy, MA), and recorded on a computer using the data acquisition software AcqKnowledge<sup>®</sup> (MP100, Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). EFS pulses of 0.5 ms duration, frequency 0.5–20 Hz, 4 s-trains at 10V (De Godoy and Rattan, 2007) were delivered by an electrical stimulator Model S88 (Grass Instruments Co) and a power booster (Stimu-Splitter II, Med-Lab Instruments, Loveland, CO) in order to obtain six identical and undistorted stimuli. These electrical stimuli were simultaneously recorded with tension tracings through a synchronized Transistor-Transistor logic signal between the electrical stimulator Grass S88 and the computerized Biopac System in order to assess whether the mechanical responses occurred during (“on”) or after (“off”) the electrical stimulus (Auli et al., 2008).



**Intracellular microelectrode recording.** Muscle strips were pinned to the base of a Sylgard coated chamber, submucosa side up, and continuously perfused with carbogenated Krebs solution at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  and equilibrated 1 hour before recording. Circular smooth muscle cells were impaled with glass microelectrodes filled with 3M KCl (30-60 M $\Omega$  of resistance). Membrane potential was measured using standard electrometer Duo773 (WPI Inc., Sarasota, FL, USA). Tracings were displayed on an oscilloscope 4026 (Racal-Dana Ltd., Windsor, England) and simultaneously digitalized (100 Hz) using PowerLab 4/30 system and Chart 5 software for Windows (all from ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). Electrical stimulation (100 ms of train duration, 20 Hz, 0.3 ms pulse and increasing amplitude voltage of 5-50 V) (Gallego et al., 2008b) was applied using two silver chloride plates placed perpendicular to the longitudinal axis of the preparation and 1.5 cm apart. Nifedipine (1  $\mu\text{M}$ ) was used to abolish the spontaneous contractions during electrophysiological experiments and obtain stable impalements.

**Solutions and drugs.** The composition of the Krebs solution was (in mM) glucose, 10.10; NaCl, 115.48; NaHCO<sub>3</sub>, 21.90; KCl, 4.61; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.14; CaCl<sub>2</sub>, 2.50 and MgSO<sub>4</sub>, 1.16 (pH 7.3-7.4). The solution was bubbled with carbogen, 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. The following drugs were used: atropine from Merck (Darmstadt, Germany), nifedipine, prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ), N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA), VIP, VIP 6-28,  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CMT) and nicotine from Sigma–Aldrich Co (St. Louis, MO. USA). Tetrodotoxin (TTX) and (1R,2S,4S,5S)-4-[2-Iodo-6-(methylamino)-9H-purin-9-yl]-2-(phosphonoxy)bicyclo[3.1.0]- hexane-1-methanol dihydrogen phosphate ester diammonium salt (MRS2500) from Tocris (Bristol, UK). Stock solutions were made by dissolving drugs in distilled water except for nifedipine which was dissolved in 96% ethanol, and L-NNA which was dissolved in Krebs solution by sonication.

**Experimental design.** 1) *Morphological studies* aimed to assess the nature and relationship of smooth muscle cells of the rat IAS, and locate the enteric MNs and the purinergic P2Y<sub>1</sub> receptors. 2) *Physiological studies*: In *organ bath studies* we assessed the mechanical responses following stimulation of MNs by EFS or through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) by nicotine (10  $\mu\text{M}$ ) (Opazo et al., 2009). A frequency-related curve on the effect of EFS on IAS strips was drawn in order to explore the responses (relaxation/contraction) induced by electrical stimulation of MNs. EFS responses were characterized by the neurotoxin TTX (1  $\mu\text{M}$ ), and antagonists of

inhibitory neurotransmitters L-NNA (1 mM), MRS2500 (1  $\mu$ M), VIP 6-28 (0.1  $\mu$ M) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL). Excitatory responses were characterized by atropine (1  $\mu$ M). Finally, nicotine responses were also characterized by L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M). In *electrophysiological studies*, the amplitude and the duration of EFS-induced IJP with single electrical stimuli were measured under control conditions and after infusion of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M), and in separate protocol, VIP 6-28 (0.1  $\mu$ M) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL). In addition, longer electrical stimuli with pulses of 5 s duration, 50 V and 0.3 ms were also performed at 1 Hz (5 pulses) and 5 Hz (25 pulses) as previously described (Gallego et al., 2008a). The fast component was assessed by measuring the maximum amplitude of the IJP during the initial pulses and the amplitude of the slow component was assessed at 2.5 and 3.75 s after the beginning of the stimulus in control conditions and after L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M), and in separate protocol, VIP 6-28 (0.1  $\mu$ M) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL). Finally, we also characterized the hyperpolarization induced by stimulation of inhibitory MNs by nicotine (10  $\mu$ M) with the sequential addition of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M). The frequency of spontaneous IJP (sIJP) was also assessed by: a) measuring the frequency distribution (0.5 mV bins) of the values of the membrane potential (30 to 60 s) as described by our group (Gil et al., 2010a), and b) measuring the standard deviation (SD-sIJP; expressed in mV) as previously described (Powell et al., 2001). RMP was considered the value with a highest probability of the frequency distribution (Gil et al., 2010a).

**Data analysis and statistics.** Basal tone was determined by averaging the tone of the strips during the last 5 minutes of the equilibration period, before the strips developed active myogenic tone. Active myogenic tone was defined as the tone that the strips developed spontaneously. Total tone also included the tone induced by the drugs used in the study. Relaxation of strips was expressed as a percentage of total tone while contraction was expressed in grams. Student-t Test or one-way ANOVA, were selected for comparisons using the paired model when appropriate, and the effect of pharmacological agents on frequency-response curves was determined using two-way ANOVA. For microelectrode experiments, differences in the resting membrane potential before and after infusion of different drugs were compared by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. The differences between the amplitude and duration of the IJP before and after drug infusion were compared by two-way ANOVA

(drug and voltage), using GraphPad prism 4 (Version 4.01, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Number of animals were represented by n. Data were expressed as mean  $\pm$  sem. A *P* value  $< 0.05$  was considered statistically significant and ns non-significant.

## **Results**

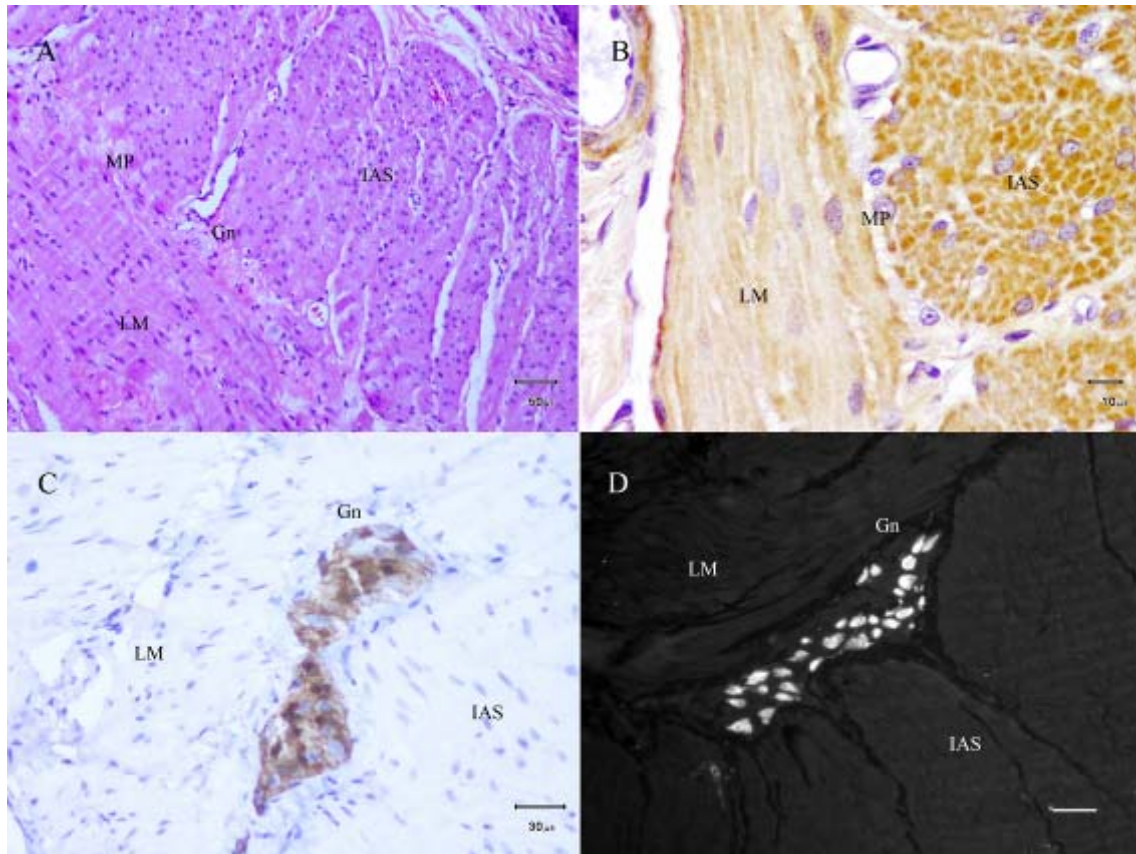
### **Histological studies**

Hematoxylin and eosin (H&E) stains showed two layers of smooth muscle cells in the IAS: the circular layer, divided into discrete circular muscle bundles separated by connective tissue septa, and the longitudinal muscle layer (LM), an external and continuous thin layer following the LM of the rectum (Figure 1A). The circular and LM layers are attached and the striated external anal sphincter is in direct contact with the external border of the LM (*n* = 6). Neural S100 and anti-HuD staining identified glial cells (Figure 1C) and enteric MNs (Figure 1D) in the ganglia of the myenteric plexus between LM and IAS fibres (*n* = 6). Positive P2Y<sub>1</sub> receptor immunoreactivity was found in the smooth muscle cells of circular and LM layers, a minor staining was also observed in the myenteric plexus (*n* = 4) (Figure 1B).

### **Physiological studies**

#### **Organ bath mechanical studies**

**Internal anal sphincter tone.** After equilibration period, IAS strips developed an unstable active myogenic tone ( $0.31 \pm 0.05$  g, *n* = 20) and phasic contractile activity with mean amplitude of  $0.092 \pm 0.014$  g and frequency of  $51.20 \pm 1.6$  contractions/minute. PGF2 $\alpha$  (1  $\mu$ M) induced an intense and stable tonic contraction and significantly increased the amplitude of phasic activity (*n* = 14) (Table 1). The NOS-inhibitor L-NNA (1 mM) strongly increased IAS tone and the amplitude of phasic activity (*n* = 8); in contrast, the P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2500 (1  $\mu$ M) did not modify IAS tone (*n* = 10) or the phasic activity (Table 1). Following L-NNA or MRS2500, atropine did not significantly affect IAS tone ( $-2.41 \pm 1.74\%$ , *n* = 14, ns). The free calcium Krebs solution reduced IAS tone by  $-83.34 \pm 3.4\%$  (*n* = 10, *P*  $< 0.001$ ). In contrast, the neurotoxin TTX did not affect IAS tone nor spontaneous contractions (*n* = 3, not shown).



**Figure 1.** Morphological aspects of the internal anal sphincter in the rat. **(A)** Hematoxylin & eosin stain identify the myenteric plexus between the circular and longitudinal smooth muscle layers (scale bar 50  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Immunohistochemical localization of P2Y<sub>1</sub> receptors (brown staining) in circular and longitudinal smooth muscle cells (scale bar 10  $\mu\text{m}$ ). **(C)** Glial cells with small nuclei and positive to S100 staining in the myenteric plexus (scale bar 30  $\mu\text{m}$ ), and **(D)** Positive anti-HuD neurons in a motor ganglion of the myenteric plexus (scale bar 30  $\mu\text{m}$ ). IAS indicates internal anal sphincter; LM, longitudinal muscle; MP, myenteric plexus; Gn, myenteric ganglion; PL pectinate line and SM, striated muscle.

### **Mechanical responses induced by electrical stimulation of enteric motor neurons.**

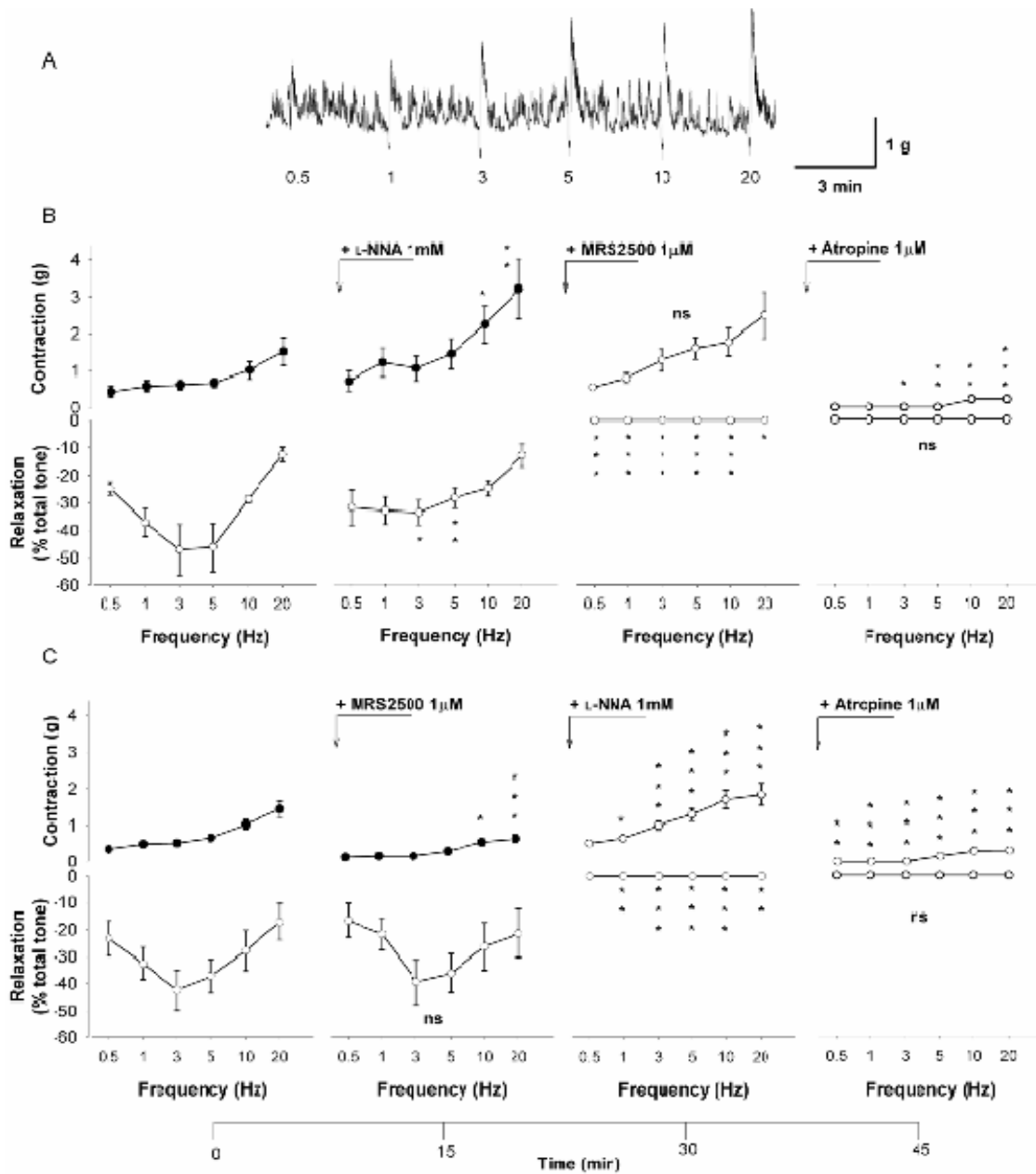
All IAS strips responded to EFS with a frequency-dependent “on” relaxation during electrical stimulus followed by an “off” contraction at the end of the stimulus. Maximal “on” relaxation was observed at 3 Hz ( $-45.90 \pm 6.03\%$  of total tone) and amplitude of “off” contraction was maximal at 20 Hz ( $1.37 \pm 0.17$  g) (Figure 2). Both EFS-“on” and “off” responses were abolished by TTX (1  $\mu\text{M}$ ) (not shown). The NOS-inhibitor L-NNA (1 mM) significantly reduced EFS-“on” relaxation at 3 and 5 Hz by  $-28.93 \pm 4.45\%$  ( $P < 0.05$ ) and  $-38.96 \pm 3.75\%$  ( $P < 0.01$ ) respectively (Figure 2). EFS-“off” contraction was significantly enhanced by L-NNA at 10 and 20 Hz by  $2.24 \pm 0.47$  and  $3.21 \pm 0.89$  g respectively ( $P < 0.05$ ). Sequential addition of the P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2500 (1  $\mu\text{M}$ ) fully blocked the residual non-nitroergic relaxation at all

frequencies ( $P < 0.001$ ), and shifted the contractile “off” response to an “on” contraction during EFS. Atropine (1  $\mu\text{M}$ ) almost abolished EFS-“on” contraction by  $-91.63 \pm 0.1\%$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) showing the major role of cholinergic neurons in excitatory neurotransmission in the rat IAS (Figure 2B). In separate experiments, initial incubation of MRS2500 (1  $\mu\text{M}$ ) did not affect EFS-“on” relaxation at any frequency tested, and in contrast, significantly reduced the electrical “off” contraction at 10 and 20 Hz by  $-55.56 \pm 0.08\%$  ( $P < 0.05$ ). Sequential addition of L-NNA (1 mM) completely blocked the non-purinergic relaxation at all frequencies ( $P < 0.01$ ), and shifted the EFS-“off” contraction to an “on” contraction enhancing their amplitude by  $1.84 \pm 0.3$  g (at 20 Hz,  $P < 0.05$ ). Finally, atropine (1  $\mu\text{M}$ ) almost blocked EFS-“on” contraction by  $-83.24 \pm 0.1\%$  ( $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ) (Figure 2C).

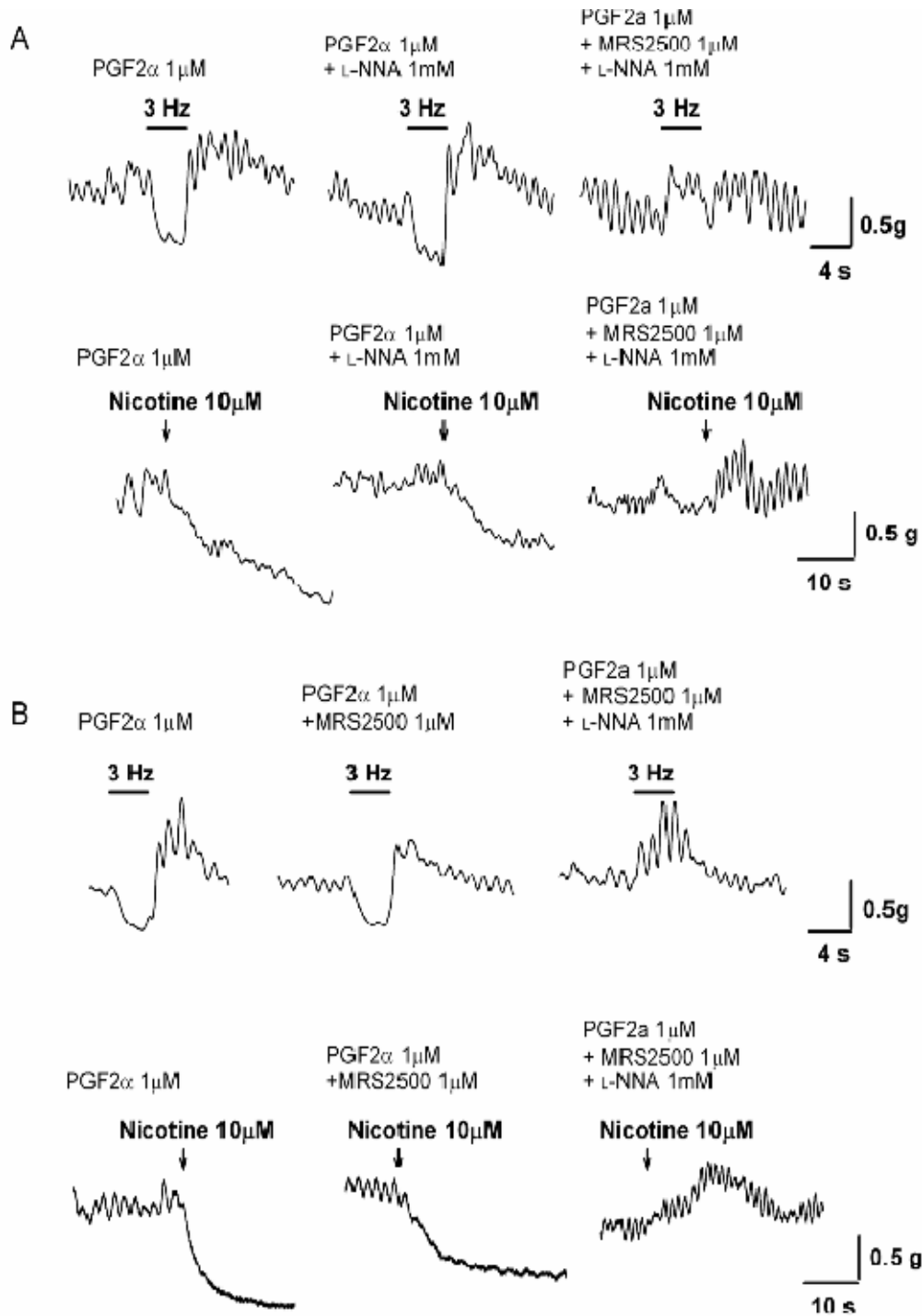
**Mechanical responses induced by stimulation of enteric motor neurons through nAChRs.**

In two independent sets of experiments on the same strips, we compared the mechanical responses induced by stimulation of MNs through nAChRs by nicotine with those caused by 3 Hz. Stimulation of enteric MNs by nicotine (10  $\mu\text{M}$ ) induced a sustained IAS relaxation of  $-52.15 \pm 5.07\%$  of total tone ( $n = 11$ ) with 17.5 sec to  $E_{\text{max}}$ , (Figures 3 and 4). The NOS-inhibitor L-NNA (1 mM) significantly reduced nicotine relaxation by  $-34.95 \pm 3.07\%$  ( $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) and the sequential addition of MRS2500 (1  $\mu\text{M}$ ) completely blocked non-nitric relaxation, inducing a contraction of  $0.8 \pm 0.11$  g ( $P < 0.01$ ) (Figure 3A and 4A). In contrast, initial addition of MRS2500 did not significantly affect nicotine relaxation while sequential addition of L-NNA fully blocked non-purinergic relaxation ( $P < 0.01$ ), inducing a contraction of  $0.71 \pm 0.2$  g ( $P < 0.01$ ) (Figure 3B and 4B). This contraction was fully abolished by atropine ( $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ). Stimulation of enteric MNs by 3 Hz electrical stimuli, caused IAS relaxation of  $-43.81 \pm 4.17\%$  of total tone followed by an “off” contraction of  $0.87 \pm 0.08$  g. L-NNA (1 mM) significantly reduced the EFS “on” relaxation by  $-41.68 \pm 6.8\%$  ( $P < 0.001$ ) and significantly enhanced “off” contraction by  $0.44 \pm 0.10$  g ( $P < 0.05$ ); the sequential addition of MRS2500 (1  $\mu\text{M}$ ) fully abolished the residual non-nitric relaxation ( $P < 0.001$ ) and slightly reduced electrical contraction ( $n = 4$ , ns) (Figure 4A). In contrast, when the initial antagonist was MRS2500, the amplitude of EFS-“on” relaxation and “off”-contraction was not affected; and further addition of L-NNA fully blocked non-purinergic residual relaxation ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ) (Figure 4B). The morphology of EFS

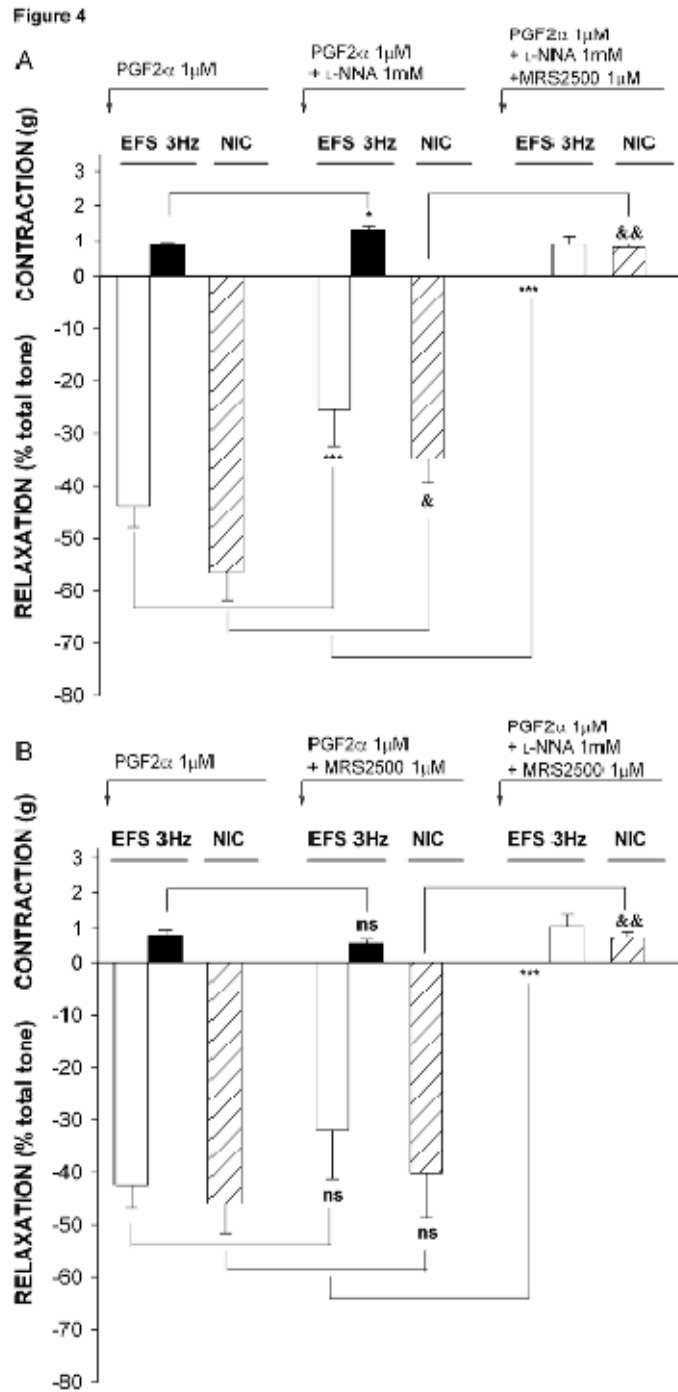
relaxation (sharp and sustained “on” relaxation and sharp “off” contraction) was not modified by either L-NNA or MRS2500 (Figure 3).



**Figure 2.** Pharmacologic characterization of neurotransmitters released during stimulation of internal anal sphincter enteric motor neurons by electrical field stimulation (EFS) (0.5-20 Hz) in mechanical study. **(A)** Representative tracing showing the response of rat internal anal sphincter strips pre-incubated with PGF<sub>2</sub>α (1 μM) to EFS (n = 11). And in both protocols simultaneous addition of **(B)** L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 μM) or **(C)** MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM) was required to fully block EFS relaxation (n = 5 for figure B and n = 7 for figure C). Horizontal axis depicts the time schedule of the experiment during sequential addition of antagonists; drugs were incubated for 15 min before the following EFS. Frequencies are indicated below the tracing. White dots represent “on” responses and black dots, “off” responses. All values are expressed as mean ± sem. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; ns, non-significant.



**Figure 3.** Representative mechanical tracings showing the responses induced by stimulation of enteric motor neurons by a 3 Hz stimuli or nicotine (10 μM) and pharmacological characterization with the sequential addition of (A) L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 μM) or (B) MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM). Antagonists were incubated for 15 min. After the maximal relaxation induced by nicotine, strips were repeatedly washed.



**Figure 4.** Paired experiments comparing the mechanical relaxation induced by stimulation of inhibitory enteric motor neurons through nAChRs by nicotine (10  $\mu$ M) and by maximal electrical stimulation by 3 Hz. Pharmacological characterizations of inhibitory responses by **(A)** L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M) or **(B)** MRS2500 (1  $\mu$ M) and L-NNA (1 mM) in independent protocols. Note that, following incubation of L-NNA and MRS2500, both nicotine and EFS induced a weak IAS contraction. Nicotine is represented by strip bar and 3 Hz EFS-“on” response by white bar while EFS-“off” response by black bar. Drugs were added to the bath in sequential addition and incubated for 15 minutes, after nicotine produced maximal relaxation, strips were repeatedly washed, and allowed to equilibrate before the following protocol. All values are expressed as mean  $\pm$  sem. &,  $P < 0.05$ ; &&,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, non-significant.



## **Electrophysiological studies**

### **Resting membrane potential and spontaneous inhibitory junction potentials.**

Circular smooth muscle cells had a mean RMP of  $-51.05 \pm 1.6$  mV ( $n = 9$ ) in control conditions. sIJP were recorded in 8 out of 9 preparations, with variable amplitude (from less than 1 mV to 10 mV) and leading to a standard deviation of the resting membrane potential reflecting the sIJP (SD-sIJP) ( $n = 8$ ) (Table 1). L-NNA (1 mM) depolarized circular smooth muscle cells ( $n = 6$ ) but did not modify sIJP. In contrast, the selective P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2500 (1  $\mu$ M) did not modify the RMP ( $n = 6$ ) but inhibited sIJP (Table 1 and Figure 5). Notice that L-NNA caused a shift to the right of the curve representing the bin distribution of the RMP, indicating a strong depolarization without modifying the frequency distribution of the spontaneous IJP (Figure 5D). In contrast, MRS2500 reduced the frequency of distribution of the membrane potential indicating inhibition of sIJP without greatly modifying the RMP (Table 1 and Figure 5D). Taken together, these data demonstrate that the RMP is mainly NO regulated whereas sIJP have a purinergic origin.

### **Inhibitory junction potentials evoked by electrical stimulation of inhibitory MNs.**

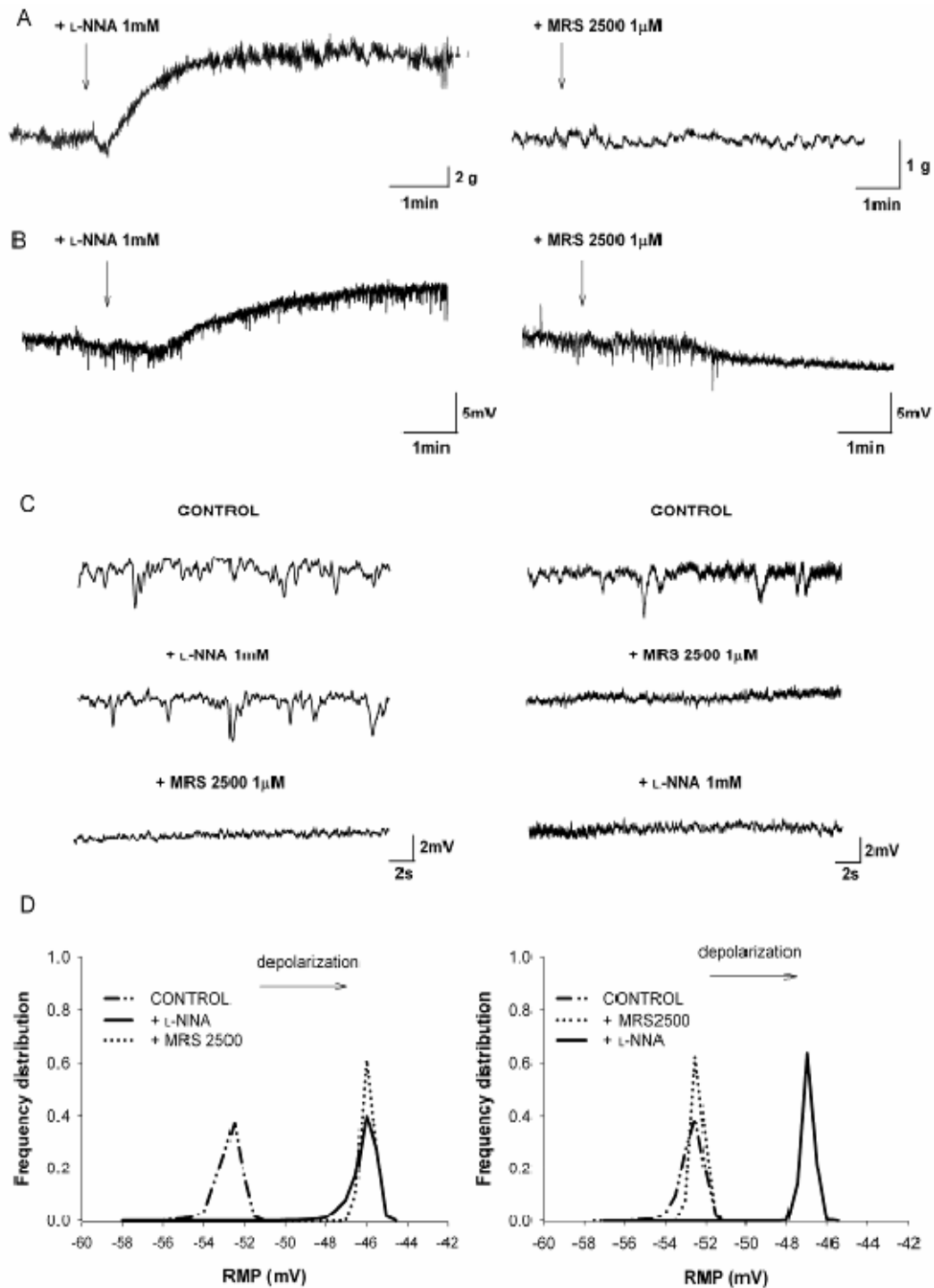
Single EFS pulses caused an IJP-f followed by a more sustained response (IJP-s). In control experiments, the increase in the voltage of stimulation caused a progressive increase in the amplitude and duration of the IJP reaching transient hyperpolarization of  $-24.96 \pm 2.26$  mV and  $1.94 \pm 0.26$  s at 50 V. L-NNA (1 mM) caused a significant reduction of the duration of the IJP without affecting its amplitude and further addition of MRS2500 (1  $\mu$ M) completely blocked the IJP (Figure 6). In experiments using longer pulses of electrical stimuli, EFS at 1 Hz (50 V during 5 s) elicited five consecutive single pulses (P1 to P5). P1 induced an initial fast IJP of  $-15.31 \pm 2.5$  mV ( $n = 6$ ) and the following pulses P2-P5 elicited a lesser response probably attributable to rundown as observed in other species. The EFS at 5 Hz (50 V during 5 s) elicited a transient initial fast hyperpolarization followed by a more sustained response, the amplitude of the fast IJP was  $-21.98 \pm 2.05$  mV ( $n = 6$ ) and the measurements at 2.5 and 3.75 s were  $-17.19 \pm 1.11$  mV and  $-15.41 \pm 0.9$  mV respectively. L-NNA did not affect either the amplitude of the IJP at 1 Hz (P1 to P5) nor the IJP-f at 5 Hz, but significantly inhibited the slow component of the IJP at 5 Hz measured at 2.5 and 3.75 s. Sequential addition

of MRS2500 fully abolished the amplitude of the IJP elicited by the single pulses at 1 Hz and the IJP-f at 5 Hz (Figure 7).

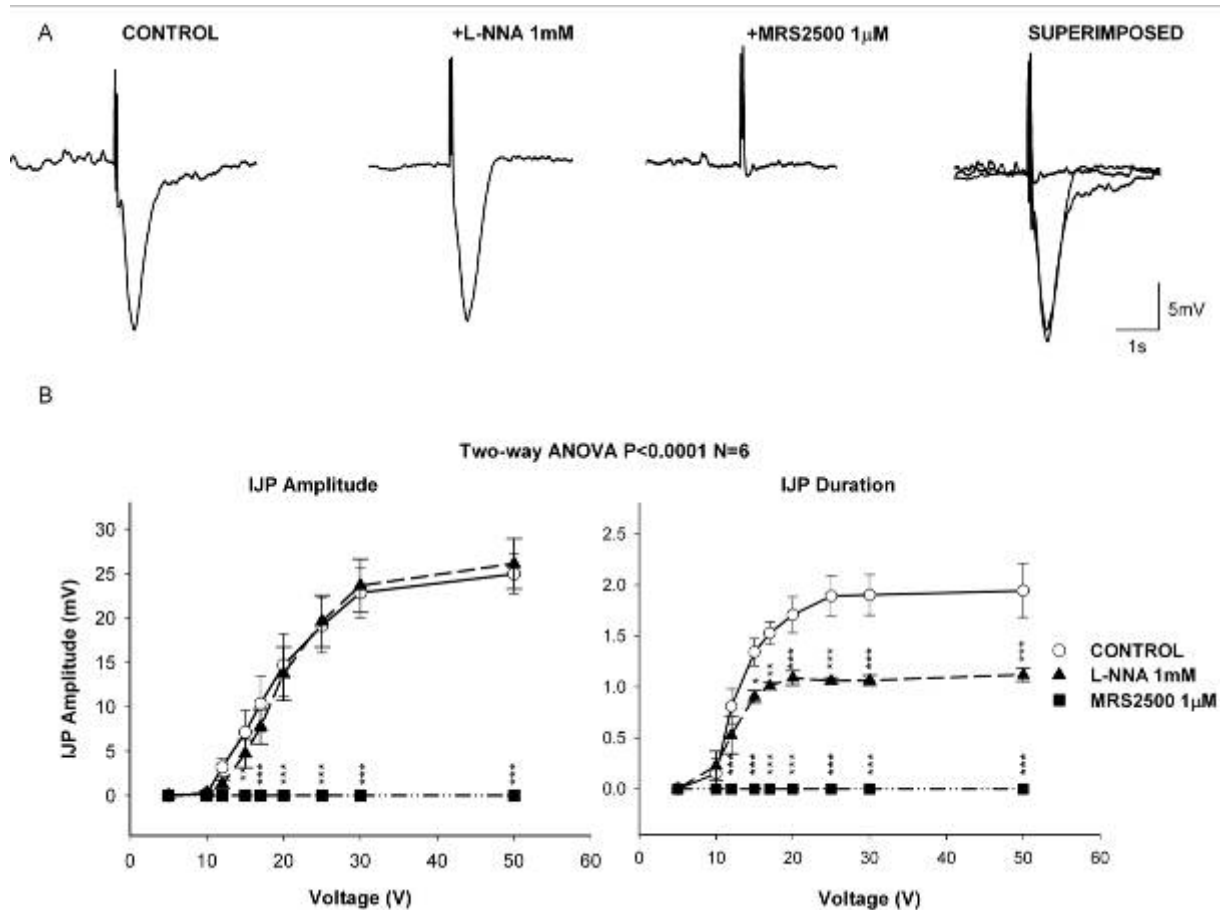
**Table 1.** Pharmacological characterization of nitroergic and purinergic control of IAS tone, phasic contractions, resting membrane potential and spontaneous inhibitory junction potentials.

	Mechanical Studies			Electrophysiological Studies	
	Tone (g)	Phasic Contractions		RMP (mV)	SD-sIJP (mV)
		Amplitude (g)	Frequency (contraction/minute)		
<i>Protocol 1</i>					
<b>Control<sup>1</sup></b>	0.86±0.1	0.14±0.06	51.00±1.7	-51.11±2.1	0.33±0.05
<b>+L-NNA 1mM</b>	1.67±0.1 <sup>***</sup>	0.18±0.02 <sup>***</sup>	52.02±1.6 <sup>ns</sup>	-44.90±2.5 <sup>***</sup>	0.34±0.05 <sup>ns</sup>
<b>+MRS 2500 1µM</b>	1.24±0.1 <sup>ns</sup>	0.17±0.01 <sup>ns</sup>	52.50±1.4 <sup>ns</sup>	-44.86±2.4 <sup>ns</sup>	0.11±0.03 <sup>**</sup>
<i>Protocol 2</i>					
<b>Control<sup>1</sup></b>	0.99±0.1	0.10±0.01	50.13±1.4	-50.94±3.1	0.30±0.05
<b>+MRS 2500 1µM</b>	1.06±0.1 <sup>ns</sup>	0.09±0.01 <sup>ns</sup>	49.90±1.3 <sup>ns</sup>	-51.1±3.0 <sup>ns</sup>	0.02±0.02 <sup>*</sup>
<b>+L-NNA 1mM</b>	1.26±0.1 <sup>***</sup>	0.15±0.01 <sup>***</sup>	50.16±1.5 <sup>ns</sup>	-45.04±2.5 <sup>**</sup>	0.02±0.01 <sup>ns</sup>

Values are means ± sem. RMP, resting membrane potential; SD-sIJP, standard deviation of the membrane potential reflecting the presence of spontaneous IJP. <sup>1</sup> Control values in mechanical experiments are obtained on addition of PGF2α. Paired Student's t-test used to assess the statistical significance of differences. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 and ns non-significant.

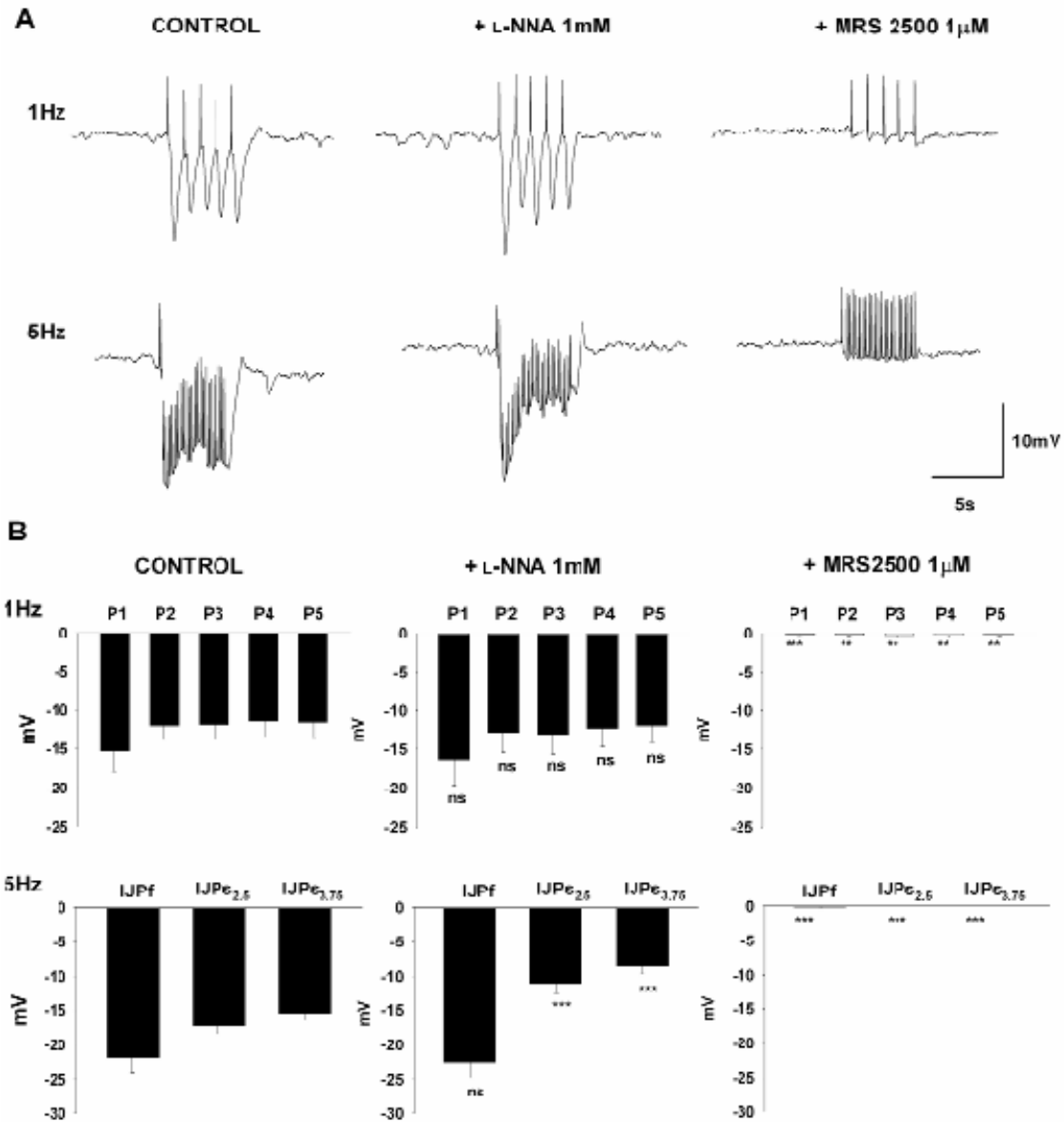


**Figure 5.** Representative mechanical recording of the (A) IAS tone and (B) intracellular microelectrode recording showing the effect of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 μM). (C) Representative microelectrode recordings showing the spontaneous IJP and the effect of the sequential addition of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 μM) **left** and MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM) **right** on them. (D) Frequency distribution (0.5 mV bins) of the membrane potential (60 s recording) from a circular smooth muscle cell in control conditions and after the sequential addition of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 μM) on the **left** and MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM) on the **right**. Note that L-NNA increased the IAS tone and depolarized smooth muscle cells while MRS2500 only blocked spontaneous IJP. Drugs were incubated for 15 minute.

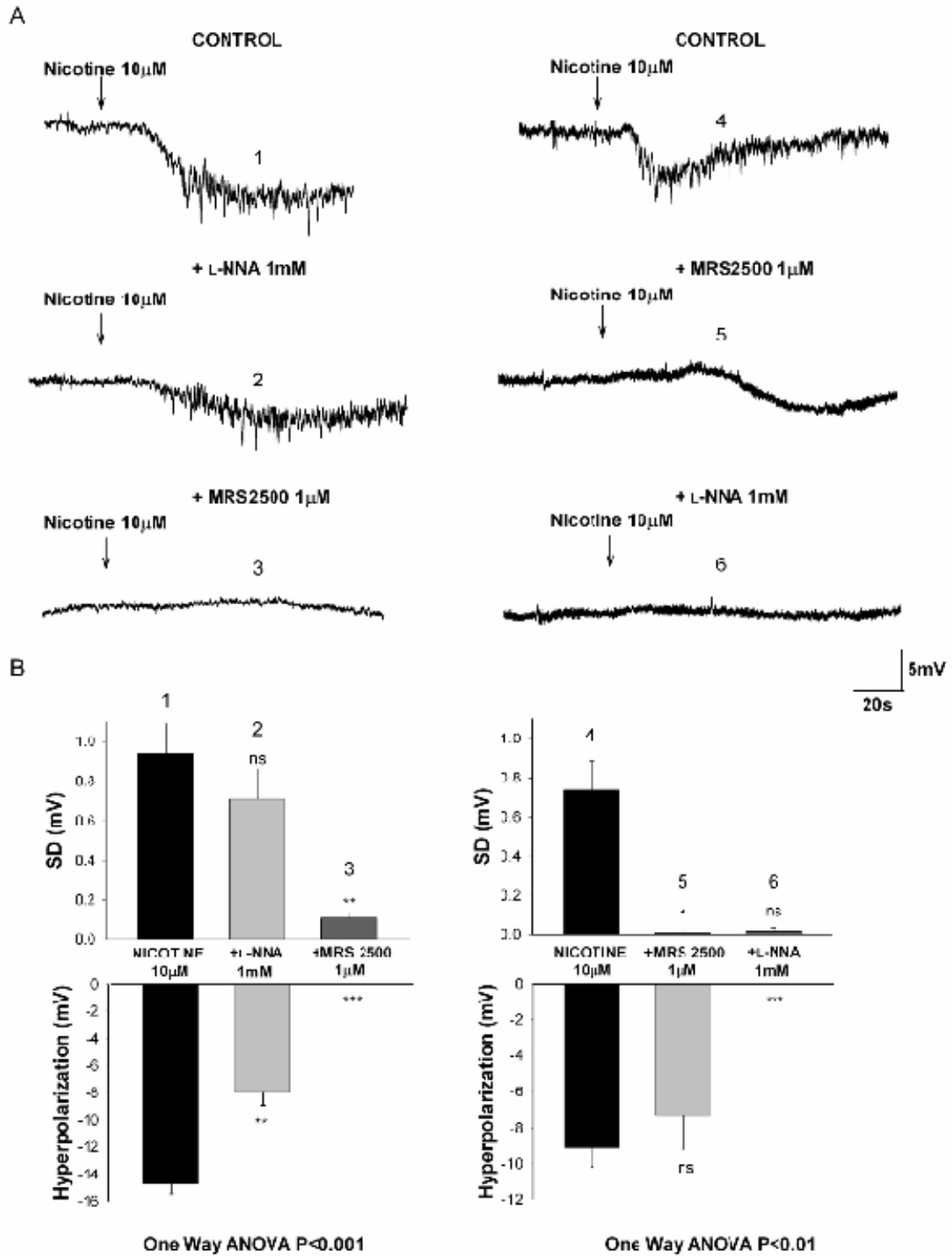


**Figure 6.** Intracellular microelectrode recording showing (A) a representative electrical field stimulation (EFS)-induced inhibitory junction potential (IJP) obtained with 50 V of EFS in control conditions and after incubation with L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 µM), and the three recordings superimposed, and (B) plot graphs showing the inhibitory effect of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1 µM) on the amplitude (left) and duration (right) of the EFS-induced IJP at 5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 and 50 V. Antagonists were incubated for 15 minutes. All values are expressed as mean ± sem. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Hyperpolarization induced by stimulation of MNs through nAChRs.** Nicotine (10 µM) induced a sustained hyperpolarization of  $-12.87 \pm 1.47$  mV ( $n = 9$ ) partly antagonized by L-NNA (1 mM) by  $-46.28 \pm 4.03\%$  of control values ( $n = 3$ ,  $P < 0.01$ ). Sequential addition of MRS2500 (1 µM) completely abolished the non-nitroergic hyperpolarization. When MRS2500 (1 µM) was used prior to L-NNA the hyperpolarization induced by nicotine was only reduced by  $-19.42 \pm 12.68\%$  of the control values ( $n = 3$ , ns) and was completely abolished when both drugs were added ( $P < 0.001$ ). In both experiments, nicotine caused a marked increase of spontaneous inhibitory junction potentials; L-NNA did not affect the sIJP but MRS2500 completely abolished them (Figure 8).



**Figure 7.** Intracellular microelectrode recordings showing (A) the EFS-induced IJP obtained after 5 Hz and 5 s stimulation (25 pulses) (**bottom**) and 1 Hz and 5 s stimulation (5 pulses: P1 to P5) (**top**) in control conditions and after the sequential addition of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M) and (B) histograms showing the response of the fast component and the sustained component measured at 2.5 and 3.75 s after the beginning of the stimuli of 5 Hz (**top**) and the response from each pulse (P1 to P5) in each experimental condition (1 Hz frequency) (**bottom**). Antagonists were incubated for 15 minutes. All values are expressed as mean  $\pm$  sem. \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

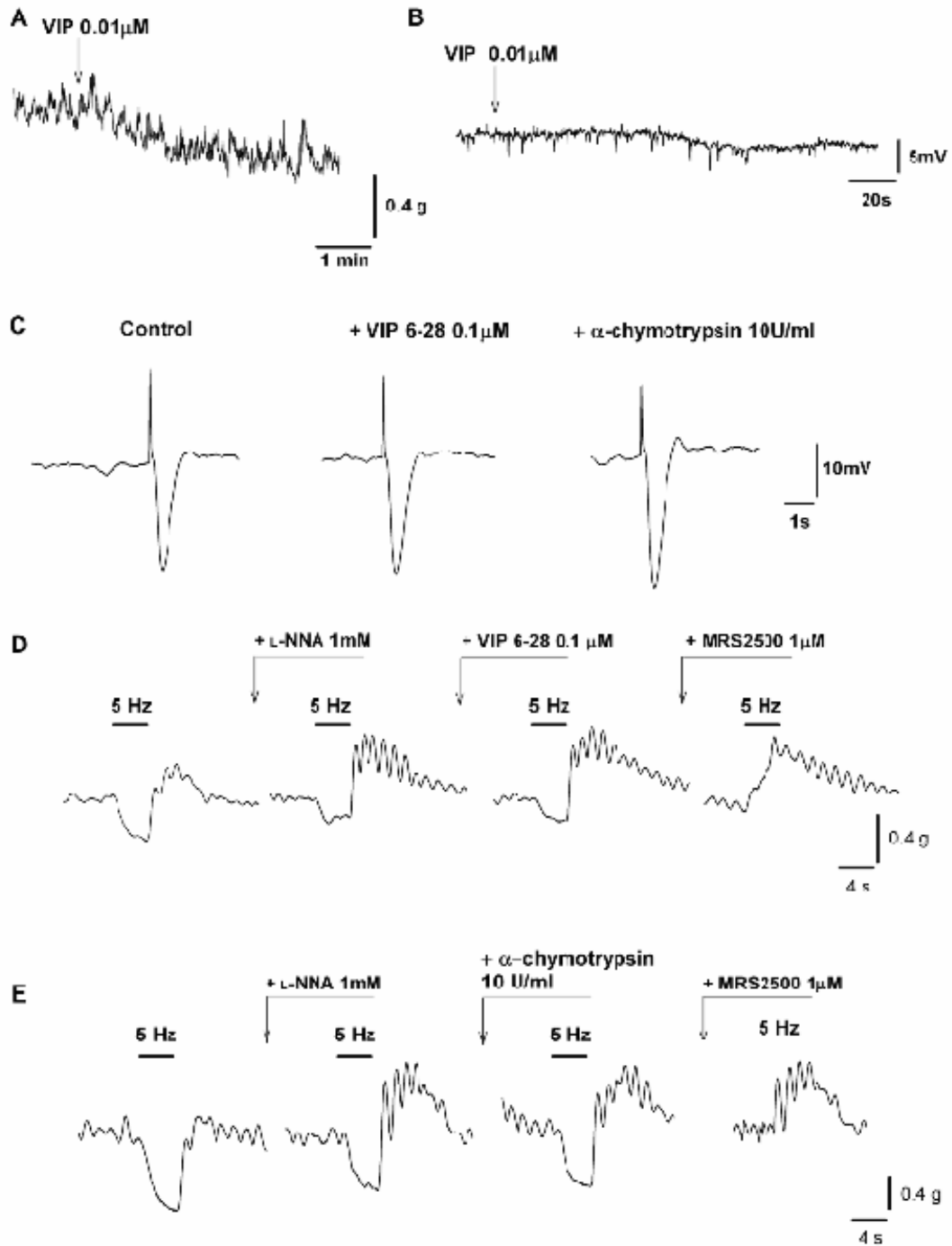


**Figure 8.** Intracellular microelectrode recordings showing (A) the pharmacological characterization of the hyperpolarization induced by nicotine (10  $\mu$ M) in control conditions and after sequential incubation of L-NNA (1 mM) and MRS2500 (1  $\mu$ M) (left) and MRS2500 (1  $\mu$ M) and L-NNA (1 mM) (right) and (B) histograms showing the quantitative effects on resting membrane potential (RMP) (bottom) and the standard deviation (SD) of the RMP induced by the spontaneous IJPs before and after the sequential incubation of L-NNA and MRS2500, and MRS2500 and L-NNA. Nicotine was added by superfusion and antagonists were incubated for 15 minutes. All values are expressed as mean  $\pm$  sem. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Role of VIP.** Single concentrations of VIP (0.01  $\mu\text{M}$ ) caused a mechanical relaxation of  $-43.9 \pm 5.1\%$  total tone and an electrical hyperpolarization of  $-3.7 \pm 0.46$  mV ( $n = 4$ ). Both VIP 6-28 (0.1  $\mu\text{M}$ ) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) significantly antagonized VIP-induced relaxation ( $-79 \pm 9.8\%$  for  $\alpha$ -chymotrypsin and  $-33 \pm 6.3\%$  for VIP 6-28), and completely blocked VIP-induced hyperpolarization.

During electrical stimulation of inhibitory motor neurons at 3 and 5 Hz, sequential addition of L-NNA (1 mM), decreased significantly ( $p < 0.05$ ) electrical-induced relaxation by  $13.73 \pm 9.2\%$  (3 Hz) and  $46.80 \pm 10.5\%$  (5 Hz). In contrast neither VIP 6-28 [ $2.22 \pm 6.9\%$  (3 Hz) and  $36.36 \pm 10.21\%$  (5 Hz)] nor  $\alpha$ -chymotrypsin [ $21.52 \pm 13.02\%$  (3 Hz) and  $2.22 \pm 9.3\%$  (5 Hz)], modified the non-nitroergic electrical relaxation. Finally, sequential addition of MRS2500 (1  $\mu\text{M}$ ) completely blocked non-nitroergic relaxation ( $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Figure 9).

In electrophysiological studies, VIP (0.01  $\mu\text{M}$ ) induced a hyperpolarization of  $-3.7 \pm 0.46$  mV ( $n = 4$ ) that was completely blocked by both VIP 6-28 (0.1  $\mu\text{M}$ ) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) ( $p < 0.001$ ). In contrast, neither VIP 6-28 nor  $\alpha$ -chymotrypsin affected the amplitude [ $(-20.71 \pm 2.6$  mV vs.  $-20.54 \pm 2.7$  mV) for VIP 6-28 and  $(-22.33 \pm 3.8$  mV vs.  $-23.36 \pm 4.6$  mV) for  $\alpha$ -chymotrypsin] or the duration [ $(1.55 \pm 0.09$  s vs.  $1.62 \pm 0.1$ ) for VIP 6-28 and  $(1.62 \pm 0.13$  vs.  $1.52 \pm 0.17$ ) for  $\alpha$ -chymotrypsin] of EFS-induced IJP at 50V, (ns,  $n = 4$ ). Finally, the resting membrane potential, the SD-sIJP and electrical responses at 1 Hz and 5 Hz were unaffected by these VIP antagonists (ns,  $n = 4$ ) (data not shown).



**Figure 9.** Mechanical (A) and intracellular (B) representative tracings of the relaxation and hyperpolarization induced by exogenous addition of VIP in rat internal anal sphincter strips. Representative tracings of the blockade of the endogenous release of VIP by sequential addition of VIP 6-28 (0.01  $\mu$ M) and  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) by EFS-induced IJP (C) and EFS-induced mechanical relaxation (D and E). Antagonists were incubated for 15 minutes.



## **Discussion**

In the present study we assessed the neurotransmitters involved in the mechanical and electrical inhibitory responses in the rat IAS and the relationships between these responses. We found that the inhibitory neurotransmission in rat IAS had two main components, one attributable to ATP or a related purine acting through P2Y<sub>1</sub> receptors, and the second one to NO. We also found that each of these components had different physiological functions. ATP mediated spontaneous IJP, the fast component of the inhibitory junction potential (IJP-f) and had no effect on the resting membrane potential or on basal mechanical tone. In contrast, NO released from the inhibitory MNs decreased the basal IAS tone and the resting membrane potential and mediated the slow component of the inhibitory junction potential. Thus, our mechanical and electrophysiological data suggest that these two neurotransmitters are co-released in resting conditions and following stimulation of inhibitory MNs and have specific and complementary roles in the inhibitory neurotransmission pathways to rat IAS.

The first part of our study was to characterize the IAS preparation by morphological and mechanical studies. The immunohistochemical studies found anti-HuD immunoreactivity in the neurons of the myenteric plexus, as described in guinea-pig small intestine (Lin et al., 2002), and the S100 stained both glial cells and MNs. Immunoreactivity for P2Y<sub>1</sub> receptors was found in circular and longitudinal smooth muscle layers, and a minor staining was observed in the myenteric plexus. A similar distribution of P2Y<sub>1</sub> receptors was described in the pig ileum (Gallego et al., 2008b), human colon (Gallego et al., 2006), and in the mouse intestine (Giaroni et al., 2002).

In our mechanical studies, circular IAS strips developed an active myogenic tone dependent on extra-cellular calcium and unaffected by neurotoxin TTX, as found in other species (Rattan, 2005; Opazo et al., 2009). We used PGF2 $\alpha$  to cause a direct pre-contraction of circular smooth muscle cells, stabilize the IAS tone and facilitate the reproducibility of the mechanical responses (McDonnell et al., 2008; Shiraki et al., 2009). We also found that MRS2500 had no effect on IAS tone whereas L-NNA strongly enhanced it suggesting that continuous release of NO modulates myogenic tone. The electrical stimuli activated both inhibitory and excitatory motor neurons causing a mechanical “on” relaxation during stimulus followed by an “off” contraction at the end of the stimulus (Auli et al., 2008; Opazo et al., 2009); both responses were blocked by TTX showing that they were induced by stimulation of enteric MNs. We observed maximal stimulation of inhibitory MNs at low frequencies (3-5 Hz) whereas

maximal stimulation of excitatory MNs was obtained at high frequencies (20 Hz) (Opazo et al., 2009). We used the NO synthase inhibitor L-NNA and the new P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2500 to characterize the inhibitory neurotransmitters mediating IAS relaxation following electrical stimulation of MNs. We found, as expected, that L-NNA partially inhibited EFS relaxation but MRS2500 did not affect EFS relaxation when added to the bath prior to L-NNA. However, blockade of P2Y<sub>1</sub> receptors was necessary to fully block EFS relaxation. Previous studies also observed that L-NNA reduced IAS relaxation by ~50% in humans (Burleigh, 1992; O'Kelly et al., 1993) and several animal species (O'Kelly et al., 1992; Rattan and Chakder, 1992; Rae and Muir, 1996; De Luca et al., 1999; Opazo et al., 2009); and purinergic antagonists such as apamin, PPADS and MRS2179, alone or combined, reduced but did not block the non-nitregic relaxation (De Luca et al., 1999; McDonnell et al., 2008; Opazo et al., 2009). To our knowledge this is the first study that has used the new P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2500 in the IAS, claimed to be more specific than previous antagonists (Cattaneo et al., 2004; Grasa et al., 2009). We believe that the full blockade of non-nitregic relaxation by MRS2500, as shown in the present study, could be due to its greater potency and affinity on P2Y<sub>1</sub> receptors. In parallel experiments we compared the effects of maximal stimulation of inhibitory MNs by 3 Hz EFS or through nAChRs by nicotine (Burleigh et al., 1979; De Luca et al., 1999; Opazo et al., 2009). We found IAS relaxation of similar magnitude in both cases and again L-NNA antagonized both relaxations, no effect was seen when MRS2500 was first added to the bath, and MRS2500 was again necessary to fully block the relaxation.

In the second part of our study we assessed the electrical correlates of our mechanical observations. We have recently proposed a method of quantification of the neural inhibitory tone in the rat colon (Gil et al., 2010b) which includes both the quantification of the resting membrane potential and spontaneous IJP (Powell et al., 2001). This ongoing release of inhibitory transmitters counteracts the myogenic tone as it causes smooth muscle hyperpolarization and relaxation. In the present study, L-NNA caused a strong IAS depolarization and increased tone; in contrast, MRS2500 did not affect either the membrane potential or the tone. This suggests that both NO and ATP or a related purine are “spontaneously” released from inhibitory MNs but NO regulates the resting membrane potential and mechanical tone and ATP causes spontaneous IJP. When inhibitory MNs were stimulated by single EFS pulses, we observed a biphasic IJP with a fast component followed by a sustained component, a result consistent with that

observed in other species such as the guinea-pig (Rae and Muir, 1996), mouse IAS (McDonnell et al., 2008) and rat colon (Pluja et al., 1999). In contrast, in the human colon (Gallego et al., 2006) and mouse caecum (Zizzo et al., 2007), single pulses failed to elicit a sustained component and a longer stimulus was needed to reveal the IJP-s (Gallego et al., 2008a). In this study we found that the slow component of the IJP was sensitive to L-NNA and therefore mediated by NO and the fast component of the IJP was insensitive to L-NNA and consequently mediated by other/s neurotransmitter/s as in the human colon (Gallego et al., 2006), the pig ileum (Gallego et al., 2008b) and in the guinea-pig small intestine (Wang et al., 2007). EFS at 5 Hz for 5 s also elicited a fast component followed by a sustained one, which has been previously observed in the mouse IAS (McDonnell et al., 2008). In contrast, pulses at 1 Hz for 5 s elicited an initial IJP of higher amplitude than the following ones, probably due to the rundown mechanism (King, 1994; Gallego et al., 2008b). When the more specific P2Y<sub>1</sub> antagonist, MRS2500, was used, we found that it fully blocked the IJP-f elicited by single pulses, the IJP-f at longer pulses of 5 Hz, and the response at 1 Hz. Our data agree to some extent with recent results obtained on the mouse IAS where high doses of MRS2179 (10 µM) failed to completely abolish the IJP-f (McDonnell et al., 2008). We believe the differences between these results may be attributable to the lower affinity of MRS2179 for P2Y<sub>1</sub> receptors as we found in the rat colon (Grasa et al., 2009) or to a different distribution of purinergic receptors between species. In the mouse gastrointestinal tract, both P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>2</sub> have been immunolocalized in smooth muscle cells (Giaroni et al., 2002) and maybe other P2Y receptors could be accountable for the MRS2179-resistant part of the IJP-f. Finally, we found that stimulation of inhibitory MNs through nAChRs caused a sustained hyperpolarization of smooth muscle cells and increased the spontaneous IJP. This hyperpolarization was significantly reduced by L-NNA but not modified by MRS2500, while the combination of both completely blocked it. In contrast, while L-NNA did not affect spontaneous IJP, MRS2500 completely abolished them.

Previous *in vitro* studies have reported a role for VIP in IAS relaxation in several species (Chakder and Rattan, 1993; Lynn et al., 1995; Rattan, 2005; Acheson et al., 2009). We found that VIP produced a mechanical relaxation and a hyperpolarization, however we were unable to demonstrate the endogenous release of VIP from inhibitory neurons since VIP 6-28 and  $\alpha$ -chymotrypsin did not reduce EFS-induced IJP or mechanical relaxation in our experimental conditions. Nevertheless a role for VIP in the

IAS cannot be ruled out and, in other experimental conditions (Nurko and Rattan, 1988), VIP might participate in IAS relaxation.

In summary, our results clearly show a functional co-transmission for NO and purines with specific and complementary roles in the tonic and phasic effects of inhibitory motor pathways to rat IAS. Resting tone and membrane potential is mainly controlled by NO whereas purines mediate sIJP. IAS hyperpolarization and relaxation following stimulation of inhibitory enteric MNs in the rat IAS is caused by co-release of NO and a purine acting at P2Y<sub>1</sub> receptors. In addition, we found a functional specialization between these two independent pathways: the purine acting through P2Y<sub>1</sub> receptors may be the neurotransmitter responsible for phasic relaxations and NO responsible for the sustained tonic IAS relaxation. Our results also suggest that the contribution of NO is predominant in IAS relaxation and that both represent a “reserve” physiological mechanism as abolition of one of these pathways (specially the purinergic one) does not prevent a strong IAS relaxation following stimulation of inhibitory MNs. Further studies are needed to establish the physiological and physiopathological significance of this functional specialization.

## References

- Acheson A, Rayment S, Eames T, Munday M, Nisar P, Scholefield J and Wilson VG (2009) Investigation of the role of adrenergic and non-nitroergic, non-adrenergic neurotransmission in the sheep isolated internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**:335-345.
- Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M and Clave P (2008) Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**:1043-1055.
- Burleigh DE (1992) Ng-nitro-L-arginine reduces nonadrenergic, noncholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* **102**:679-683.
- Burleigh DE, D'Mello A and Parks AG (1979) Responses of isolated human internal anal sphincter to drugs and electrical field stimulation. *Gastroenterology* **77**:484-490.
- Cattaneo M, Lecchi A, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Tchilibon S, Lombardi R, Bischofberger N, Harden TK and Jacobson KA (2004) Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y<sub>1</sub> receptor. *Biochem Pharmacol* **68**:1995-2002.
- Chakder S and Rattan S (1993) Involvement of cAMP and cGMP in relaxation of internal anal sphincter by neural stimulation, VIP, and NO. *Am J Physiol* **264**:G702-707.
- De Godoy MA, Dunn S and Rattan S (2004) Evidence for the role of angiotensin II biosynthesis in the rat internal anal sphincter tone. *Gastroenterology* **127**:127-138.
- De Godoy MA and Rattan S (2007) Role of phospholipase A<sub>2</sub> (group I secreted) in the genesis of basal tone in the internal anal sphincter smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**:G979-986.
- De Luca A, Li CG and Rand MJ (1999) Nitroergic and purinergic mechanisms and their interactions for relaxation of the rat internal anal sphincter. *J Auton Pharmacol* **19**:29-37.
- Fujita A, Takeuchi T, Saitoh N, Hanai J and Hata F (2001) Expression of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**:C1727-1733.

- Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P and Jimenez M (2008a) Purinergic and nitrenergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**:G522-533.
- Gallego D, Hernandez P, Clave P and Jimenez M (2006) P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**:G584-594.
- Gallego D, Vanden Berghe P, Farre R, Tack J and Jimenez M (2008b) P2Y1 receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission and enteric neuronal activation in small intestine. *Neurogastroenterol Motil* **20**:159-168.
- Giaroni C, Knight GE, Ruan HZ, Glass R, Bardini M, Lecchini S, Frigo G and Burnstock G (2002) P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology* **43**:1313-1323.
- Gil V, Gallego D, Grasa L, Martin MT and Jimenez M (2010a) Purinergic and nitrenergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**:G158-169.
- Gil V, Gallego D, Grasa L, Martin MT and Jimenez M (2010b) Purinergic and nitrenergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Grasa L, Gil V, Gallego D, Martin MT and Jimenez M (2009) P2Y(1) receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *Br J Pharmacol* **158**:1641-1652.
- Jenkinson KM and Reid JJ (2000) The P(2)-purinoceptor antagonist suramin is a competitive antagonist at vasoactive intestinal peptide receptors in the rat gastric fundus. *Br J Pharmacol* **130**:1632-1638.
- Jones OM, Brading AF and Mortensen NJ (2003) Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum* **46**:963-970.
- King BF (1994) Prejunctional autoinhibition of purinergic transmission in circular muscle of guinea-pig ileum; a mechanism distinct from P1-purinoceptor activation. *J Auton Nerv Syst* **48**:55-63.
- Knudsen MA, Glavind EB and Tottrup A (1995) Transmitter interactions in rabbit internal anal sphincter. *Am J Physiol* **269**:G232-239.

- Lin Z, Gao N, Hu HZ, Liu S, Gao C, Kim G, Ren J, Xia Y, Peck OC and Wood JD (2002) Immunoreactivity of Hu proteins facilitates identification of myenteric neurones in guinea-pig small intestine. *Neurogastroenterol Motil* **14**:197-204.
- Lynn RB, Sankey SL, Chakder S and Rattan S (1995) Colocalization of NADPH-diaphorase staining and VIP immunoreactivity in neurons in opossum internal anal sphincter. *Dig Dis Sci* **40**:781-791.
- McDonnell B, Hamilton R, Fong M, Ward SM and Keef KD (2008) Functional evidence for purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G1041-1051.
- Nurko S and Rattan S (1988) Role of vasoactive intestinal polypeptide in the internal anal sphincter relaxation of the opossum. *J Clin Invest* **81**:1146-1153.
- O'Kelly T, Brading A and Mortensen N (1992) Inhibitory transmission in isolates pig internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *J. Physiol - Proceedings of the Physiological Society* **446**:523.
- O'Kelly T, Brading A and Mortensen N (1993) Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* **34**:689-693.
- Opazo A, Lecea B, Admella C, Fantova M, Jiménez M, Martí-Ragué J and Clavé P (2009) A Comparative Study of Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter in Pigs. *Dis Colon Rectum* **52**:1902-1922.
- Pluja L, Fernandez E and Jimenez M (1999) Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* **126**:883-892.
- Powell AK, Fida R and Bywater RA (2001) Ongoing nicotinic and non-nicotinic inputs to inhibitory neurons in the mouse colon. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**:792-798.
- Rae MG and Muir TC (1996) Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J Physiol* **493 ( Pt 2)**:517-527.
- Rattan S (2005) The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil* **17 Suppl 1**:50-59.
- Rattan S and Chakder S (1992) Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* **262**:G107-112.

- Shiraki A, Kume H, Oguma T, Makino Y, Ito S, Shimokata K, Honjo H and Kamiya K (2009) Role of Ca<sup>2+</sup> mobilization and Ca<sup>2+</sup> sensitization in 8-iso-PGF 2 alpha-induced contraction in airway smooth muscle. *Clin Exp Allergy* **39**:236-245.
- Strong DS, Cornbrooks CF, Roberts JA, Hoffman JM, Sharkey KA and Mawe GM (2010) Purinergic neuromuscular transmission is selectively attenuated in ulcerated regions of inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* **588**:847-859.
- Tottrup A, Knudsen MA, Hanberg Sorensen F and Glavind EB (1995) Pharmacological identification of different inhibitory mediators involved in the innervation of the internal anal sphincter. *Br J Pharmacol* **115**:158-162.
- Vogalis F and Goyal RK (1997) Activation of small conductance Ca(2+)-dependent K<sup>+</sup> channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. *J Physiol* **502 ( Pt 3)**:497-508.
- Wang GD, Wang XY, Hu HZ, Liu S, Gao N, Fang X, Xia Y and Wood JD (2007) Inhibitory neuromuscular transmission mediated by the P2Y1 purinergic receptor in guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**:G1483-1489.
- Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD and Snyder SH (2004) Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic/noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2631-2635.
- Zhang Y, Lomax AE and Paterson WG (2010) P2Y1 receptors mediate apamin-sensitive and -insensitive inhibitory junction potentials in murine colonic circular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **333**:602-611.
- Zizzo MG, Mule F and Serio R (2007) Inhibitory purinergic transmission in mouse caecum: role for P2Y1 receptors as prejunctional modulators of ATP release. *Neuroscience* **150**:658-664.



## **Appendix II. Complementary figures of rat internal anal sphincter studies**

### **Index:**

#### **A) Morphological Studies**

##### **Anatomy**

- b) Macroscopic anatomy of the rat anal canal (Complementary figure 1)

##### **Histology**

- d) Haematoxylin and eosin stain (Complementary figure 2)
- e) S100 neural stain (Complementary figure 3)
- f) Anti-HU stain (Complementary figure 4)
- g) CD117 stain for interstitial cells of Cajal (Complementary figure 5)
- h) P2Y<sub>1</sub> receptors stain (Complementary figure 6)

#### **B) Physiological Studies**

##### **Organ baths experiments**

- a) Representative tracing of the experimental design (Complementary figure 7)
- b) Superimposed representative tracing of the 3Hz isolated stimulus (Complementary figure 8)

##### **Microelectrode experiments**

- a) Representative microelectrode tracing showing the change of the resting membrane potential by different antagonist (Complementary figure 9)

##### **Role of VIP**

- a) Organ baths experiments (Complementary figures 10 and 11)
- b) Electrophysiological experiments (Complementary figure 12)

Schematic representative of the internal anal sphincter of the rat (Complementary figure 13)

## **Summary**

This section shows complementary figures that were originated from the experiments of chapter 2 and were not published. The rat IAS strips were dissected from the rat anal canal as shown in Complementary figure 1. The IAS ring is composed by smooth muscle and surrounded by striated muscle of the EAS. Histological studies show the smooth muscle components of the IAS, structured by muscle bundles and in contact with the longitudinal muscle, the continuation of the external layer of the rectum (Complementary figure 2). Immunohistochemical S100 and anti-Hu staining identified myenteric ganglion of the myenteric plexus between both smooth muscles layers (Complementary figure 3 and 4). Some interstitial cells of Cajal were observed in the IAS and in the myenteric ganglion (Complementary figure 4), and positive P2Y<sub>1</sub> immunoreactivity was observed in smooth muscle cells and neural structure of the myenteric ganglion (Complementary figure 6).

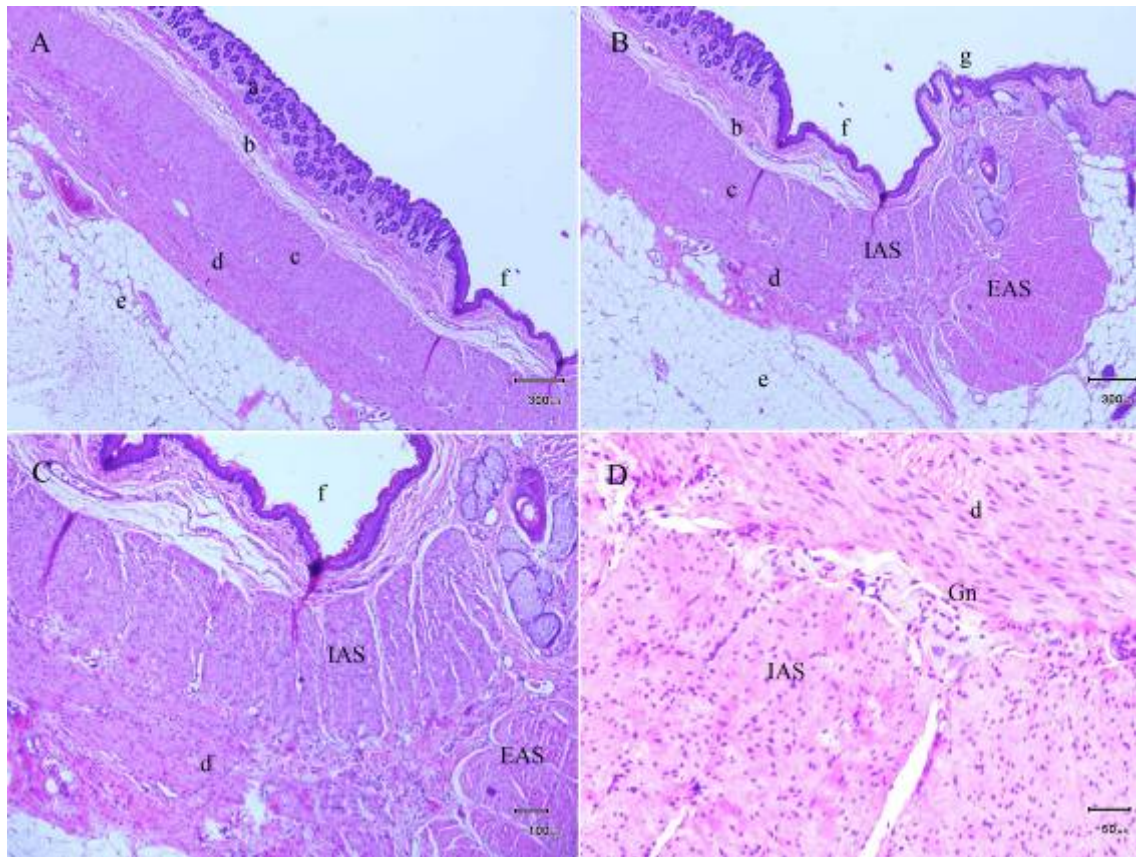
From the *in vitro* mechanical study we could observed a representative tracing of the relaxation and contraction induced by electrical stimulation and the effect of the antagonist used (Complementary figure 7), and the morphologic change induced by the antagonization of L-NNA and MRS2500 in isolated 3Hz electrical stimulus (Complementary figure 8). As described in the text in the results of chapter 2, the complementary figure 9 shows the representative tracing of the L-NNA induced depolarization of the membrane potential of IAS strip and that MRS2500 only block the IJPs. Complementary figure 10, 11 and 12 are representative tracing and histograms that shows that in our experimental conditions we could not demonstrate that VIP was released from inhibitory nerves in rat IAS.

Finally, representative figure of the proposed IAS neurotransmission observed in our experimental condition (Complementary figure 13).

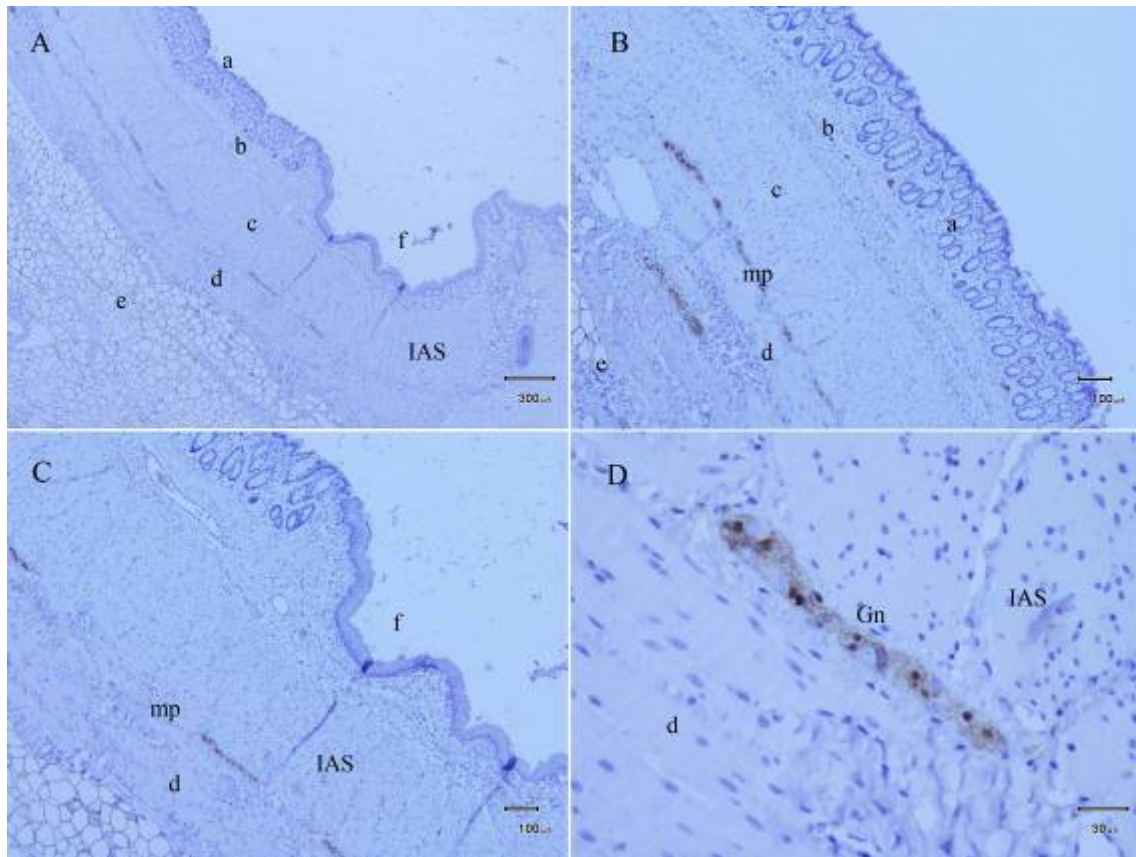
A) Morphological Studies



**Complementary figure 1.** Dissection of the rat anal canal. (A) The anoderm and the anus before beginning the dissection; (B) Cross section in the longitudinal axis of the anal canal exposing the rectal mucosa, *pectinate line* and the internal anal sphincter (mean of  $1.9 \pm 0.01$  mm long and  $0.8 \pm 0.08$  mm wide, N=6); (C) the anal canal without the mucosa and submucosa, observing the circular muscle layer and the thickening in the last portion, and (D) the internal anal sphincter with silk ligature. a, anus; b, rectal mucosa; c, *pectinate line*; d, internal anal sphincter; e, circular muscle layer.

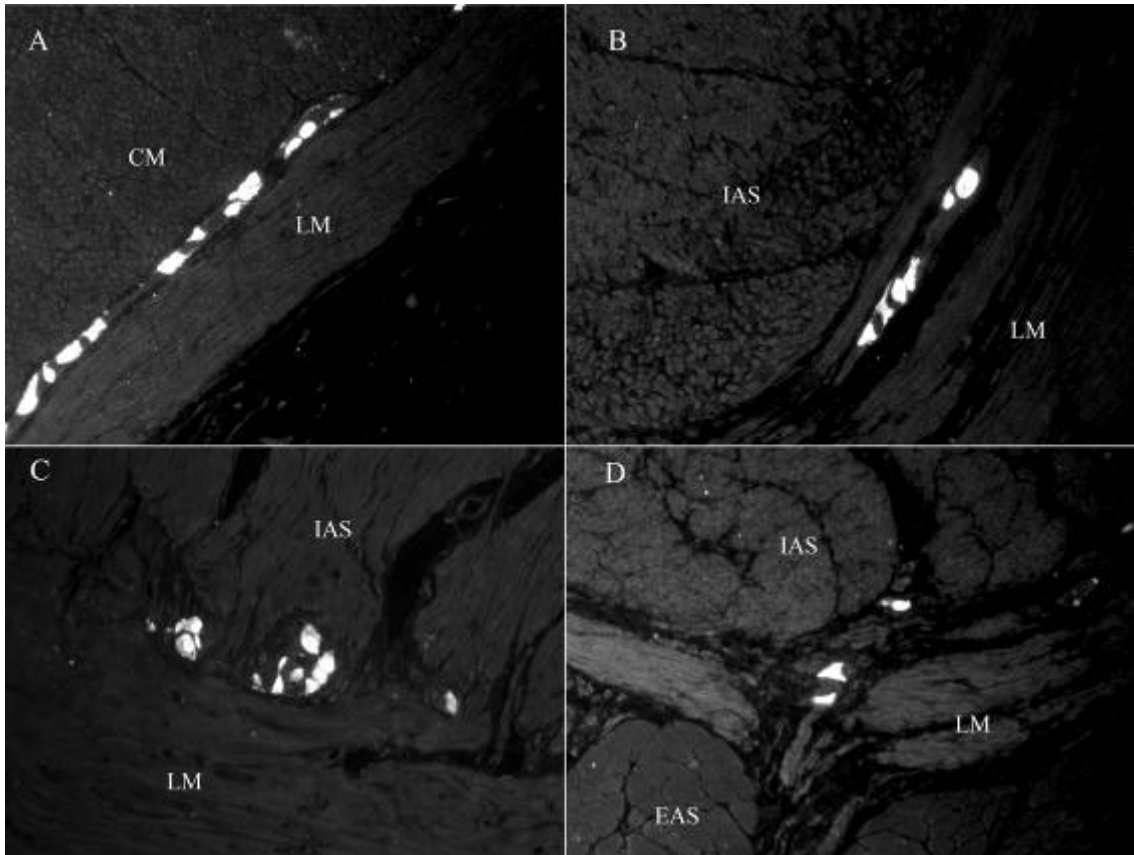


**Complementary figure 2.** Microphotograph of the rat anal canal with haematoxylin & eosin stain. **(A)** The different layer of the rectum and anal canal of the rat; **(B)** Longitudinal section of the anal canal at the level of the *pectinate line*; **(C)** Magnification of the section under the *pectinate line*, and **(D)** the circular smooth muscle of the internal anal sphincter in contact with the longitudinal muscle, with motor ganglion between them. a indicates rectal mucosa; b, submucosa; c, circular smooth muscle layer of the rectum; d, longitudinal smooth muscle; e, adipose tissue; f, *pectinate line*; g, stratified squamous epithelium; IAS, internal anal sphincter; EAS, external anal sphincter and Gn, myenteric ganglion.

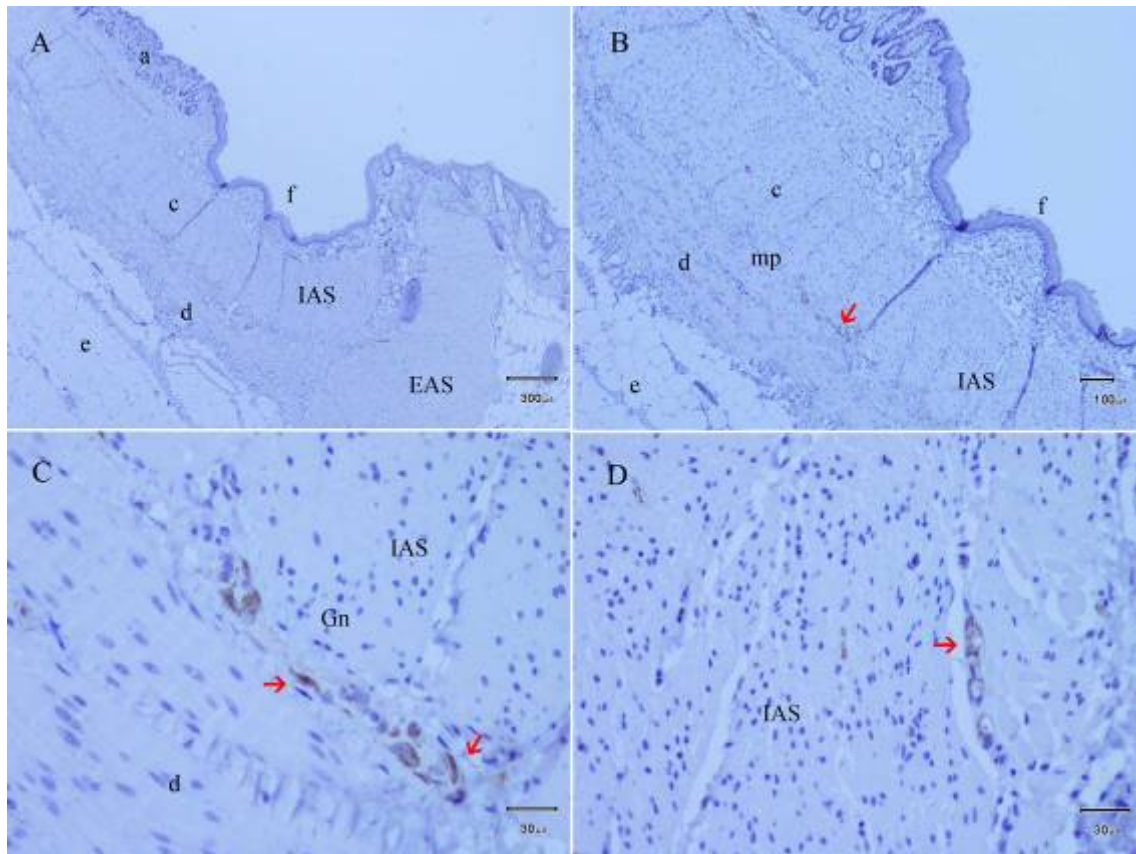


**Complementary figure 3.** S100 immunoreactivity in the rectum and anal canal. (A) Low magnification of the rectum and anal canal observing positive staining between the circular and longitudinal smooth muscle layers, (B) magnification of the rectum, (C) magnification at the level of the *pectinate line*, and (D). S100 identifying glial cells and neural fibers in the motor ganglion. a indicates rectal mucosa; b, submucosa; c, circular smooth muscle layer of the rectum; d, longitudinal smooth muscle; e, adipose tissue; f, *pectinate line*; g, cornified stratified epithelium; IAS, internal anal sphincter; Gn, myenteric ganglion and mp, myenteric plexus.

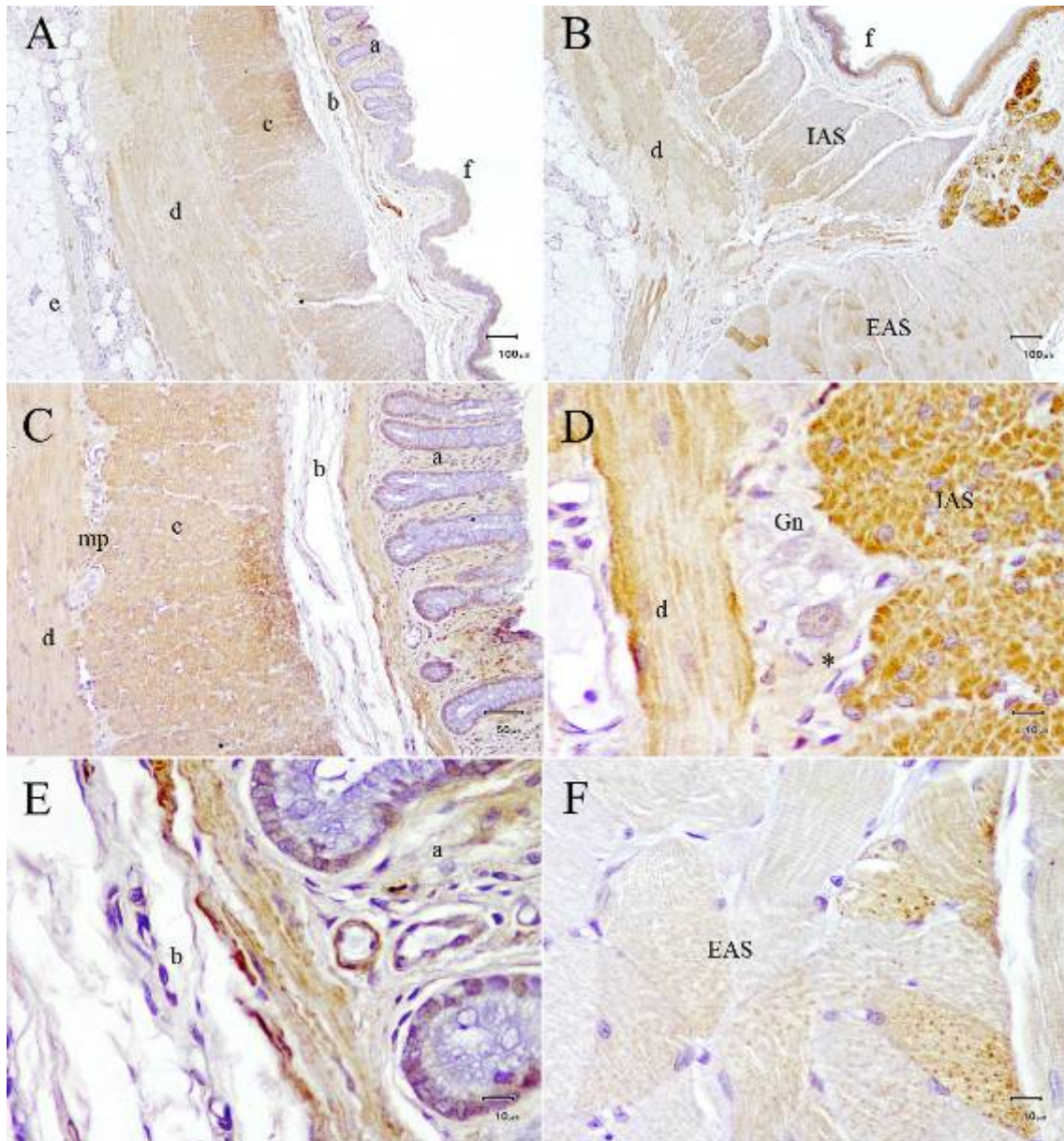




**Complementary figure 4.** Anti-Hu immunoreactivity in the rectum and anal canal. The motor neurons of the myenteric plexus are clearly identified by this immunohistochemical stain in the (A) rectum, and (B), (C) and (D) between the internal anal sphincter and the longitudinal muscle. CM indicates circular muscle layer; IAS, internal anal sphincter; EAS, external anal sphincter and LM, longitudinal muscle. Scale bar 30 $\mu$ m.



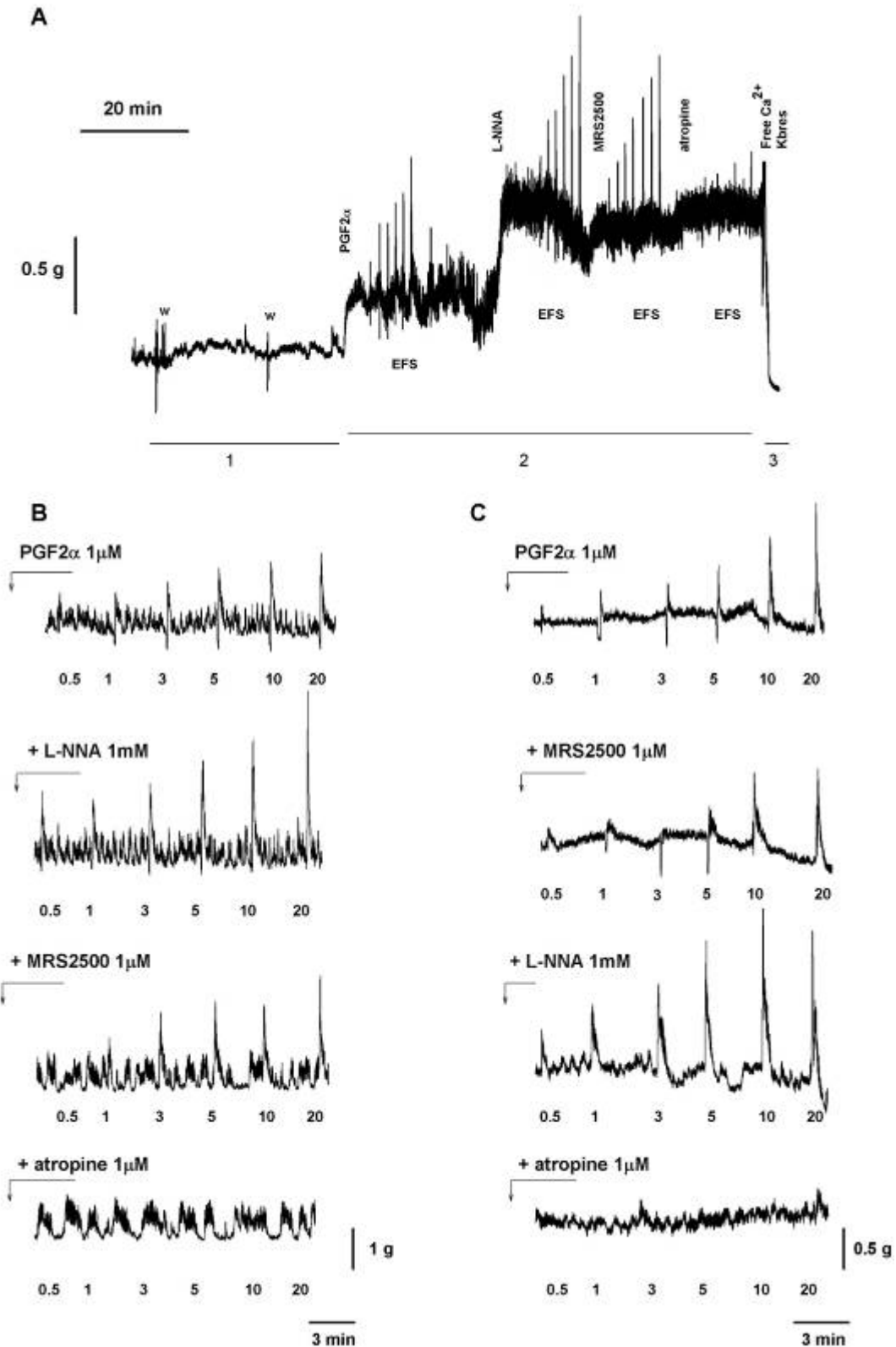
**Complementary figure 5.** CD117 immunoreactivity for interstitial cells of Cajal (ICC, red arrows). (A) Rectum and anal canal section, (B) magnification at the level of the *pectinate line*, (C) ICC in a motor ganglion of the myenteric plexus, and (D) ICC between the circular muscle septum of the internal anal sphincter. a indicates rectal mucosa; c, circular smooth muscle layer of the rectum; d, longitudinal smooth muscle; e, adipose tissue; f, *pectinate line*; IAS, internal anal sphincter; EAS, external anal sphincter; Gn, myenteric ganglion and mp, myenteric plexus.



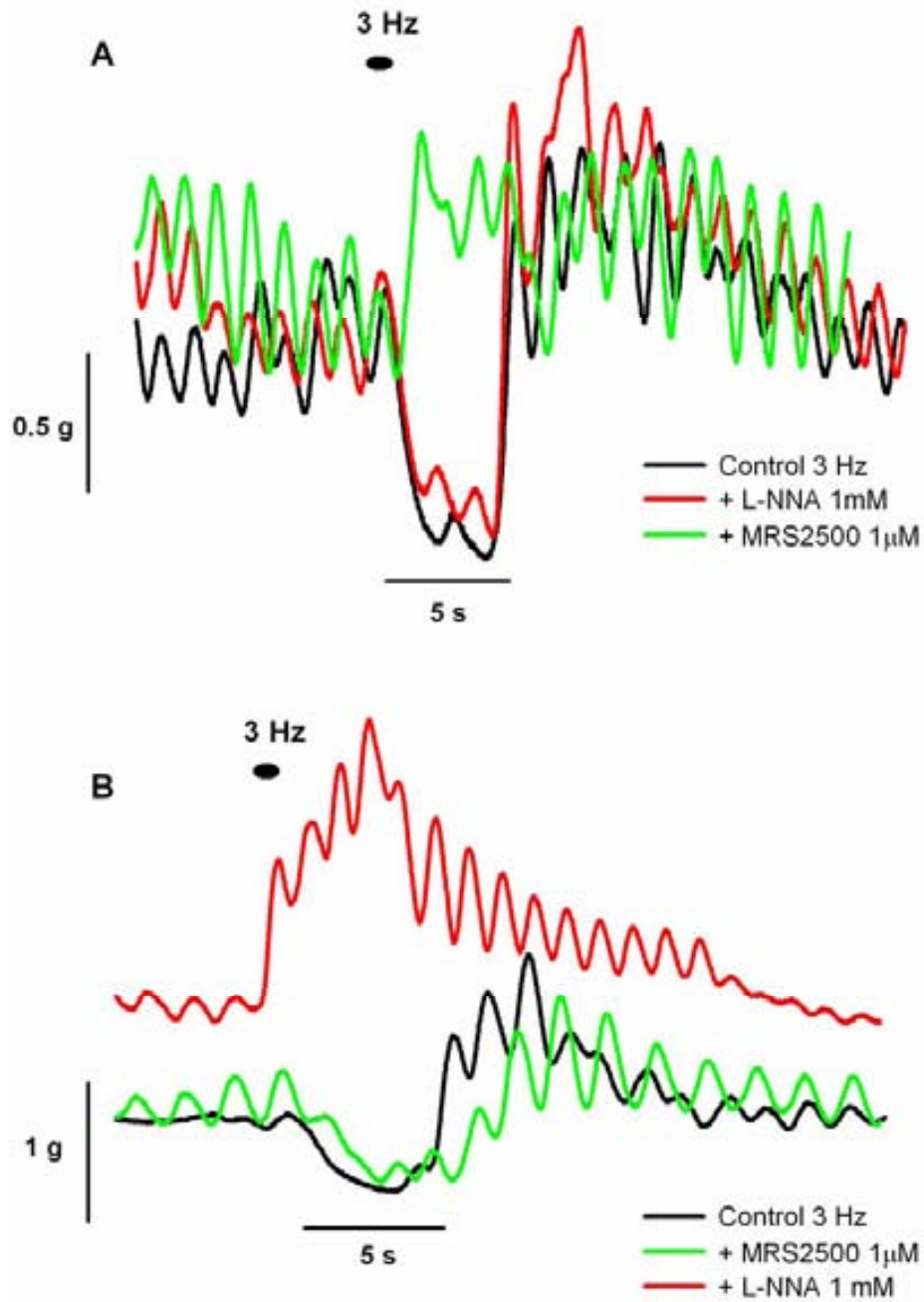
**Complementary figure 6.** P2Y<sub>1</sub> receptor immunoreactivity (brownish colour) on the circular and longitudinal smooth muscle layer, in the muscularis mucosae, and in the striated muscle of the external anal sphincter. (A) low magnification of ano-cutaneous union, (B) section under the *pectinate line*, (C) and (E) magnification of the mucosa and the submucosa of the rectum, (D) magnification of the intersphincteric space showing a light positive immunostaining in myenteric ganglion (\*), and (F) the striated muscle of the external anal sphincter. A indicates rectal mucosa; b, submucosa; c, circular smooth muscle layer; d, longitudinal smooth muscle; e, adipose tissue; f, *pectinate line*; IAS, internal anal sphincter; EAS, external anal sphincter; Gn, myenteric ganglion and mp, myenteric plexus.



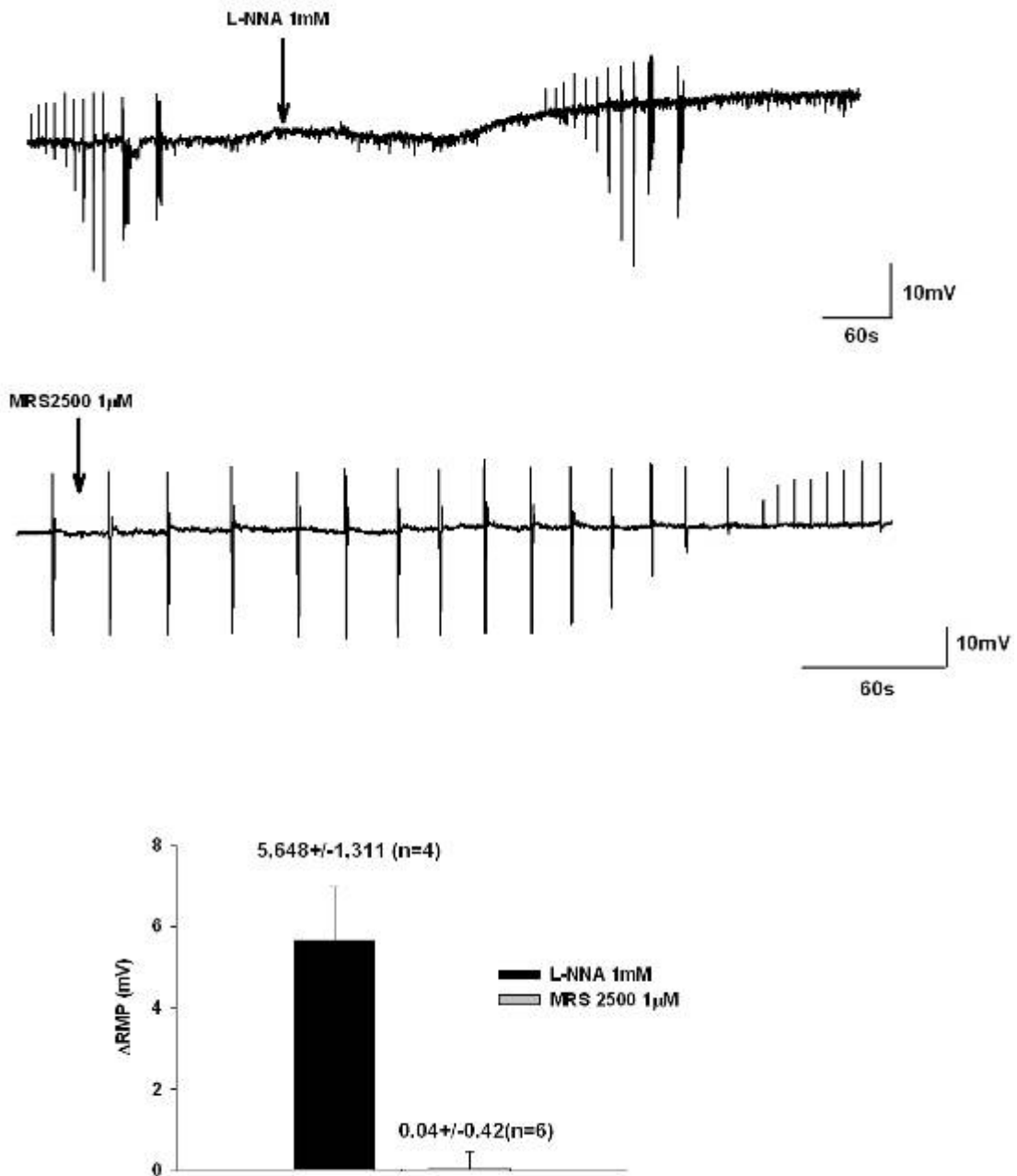
B) Physiological Studies



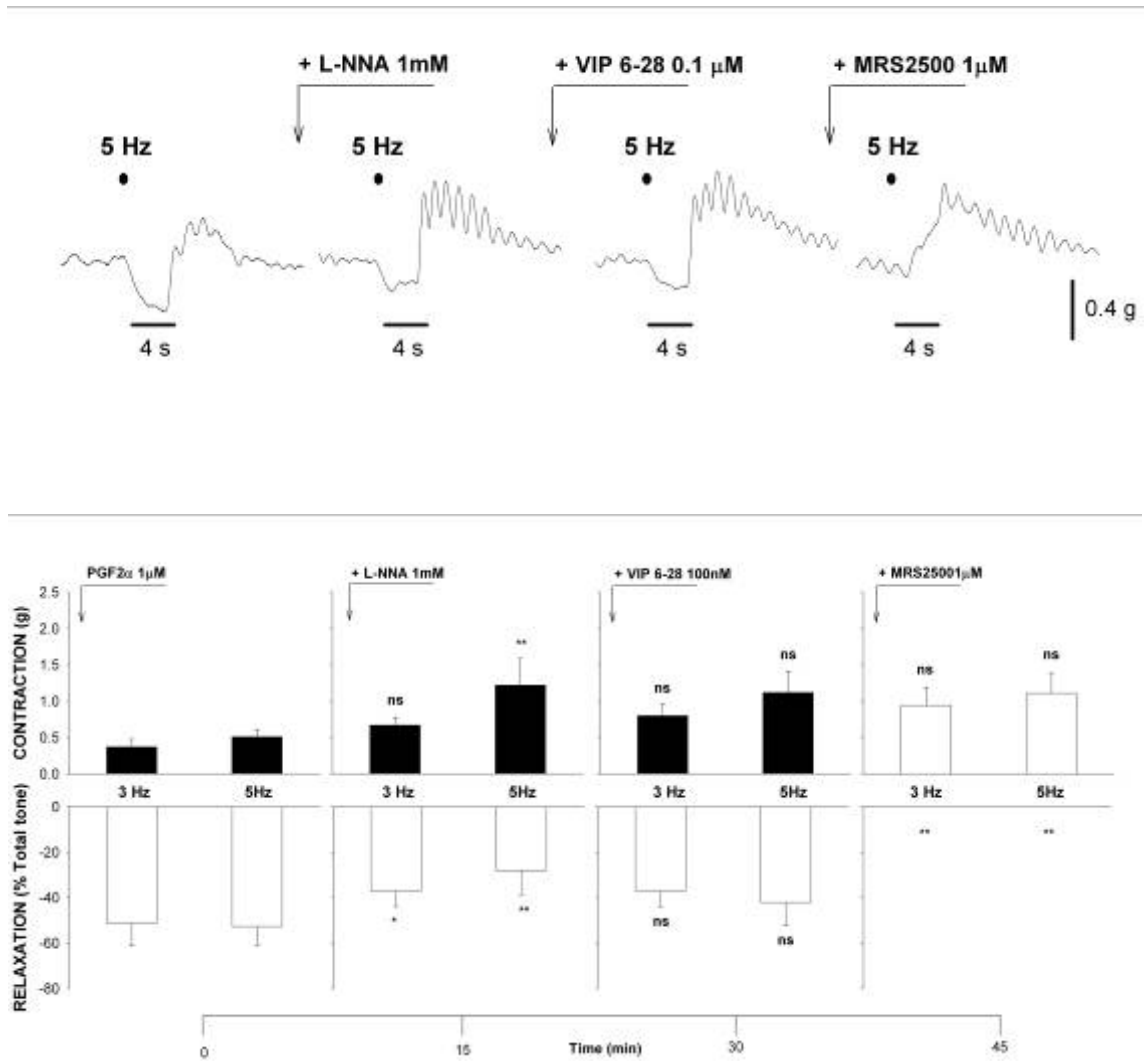
**Complementary figure 7.** (A) Representative tracing of the experimental design: 1, equilibration period; 2, studies and stabilization with PGF2 $\alpha$ ; and 3, effect of free Ca<sup>2+</sup> Krebs solution on tone. EFS indicates electrical field stimulation and W, wash. (B) Representative tracings of the EFS responses during sequential antagonism with L-NNA +MRS2500 +atropine, and (C) sequential antagonism with MRS2500 +L-NNA +atropine.



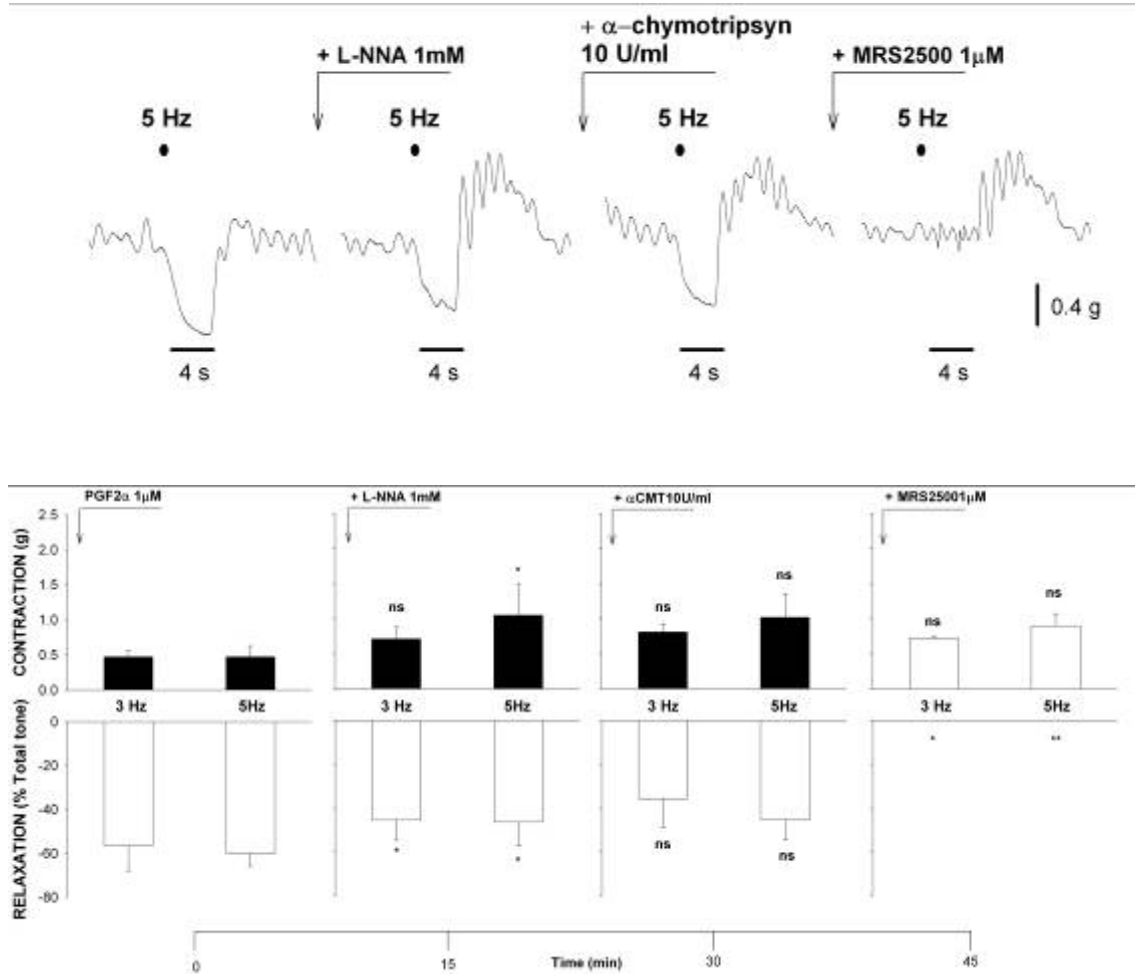
**Complementary figure 8.** Superimposed representative tracing of the 3Hz isolated stimulus characterized by sequential addition of (A) MRS2500 1  $\mu$ M and L-NNA 1 mM and by sequential addition of (B) L-NNA 1 mM and MRS2500 1  $\mu$ M.



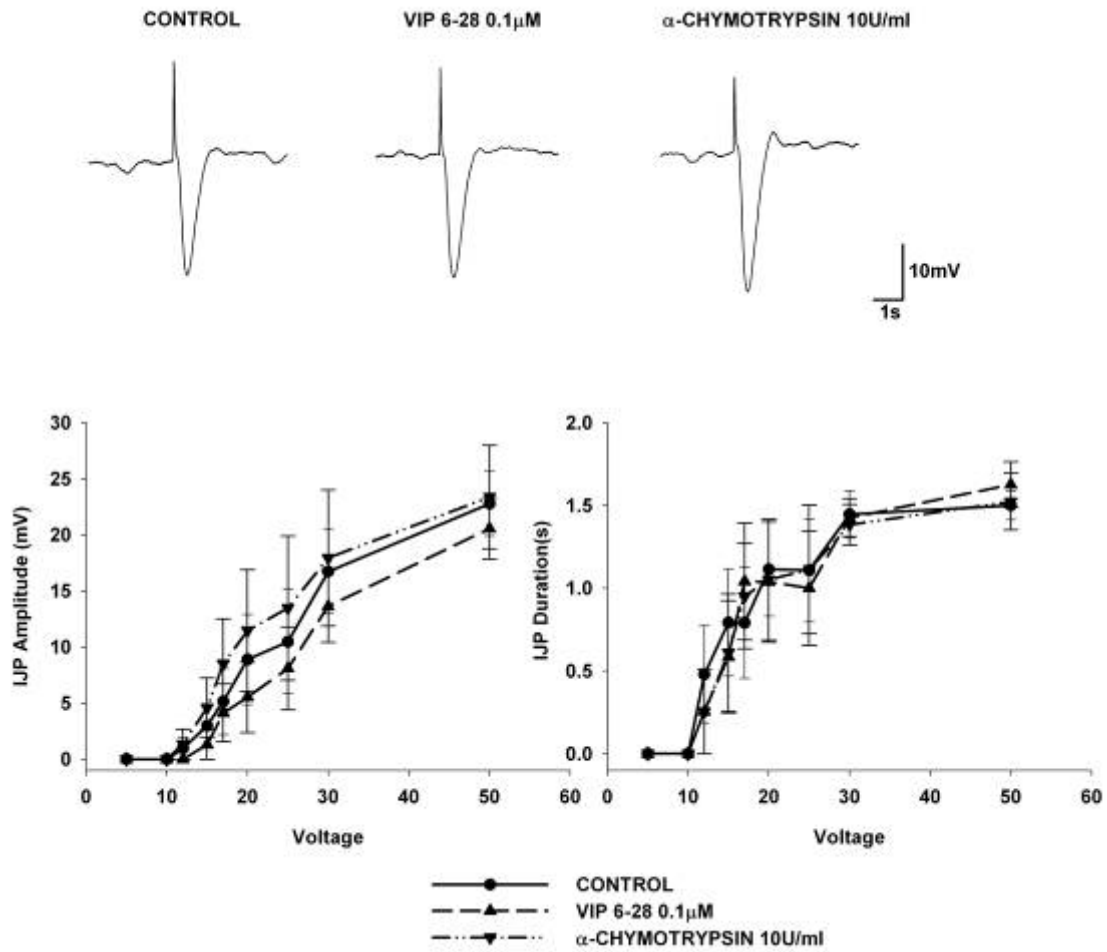
**Complementary figure 9.** Intracellular microelectrode representative recording of the rat internal anal sphincter. (TOP) L-NNA 1mM induced a depolarization of the resting membrane potential and (MIDDLE) MRS2500 1µM had no effect on the resting membrane potential but completely abolished the inhibitory junction potentials. (BOTTOM) Graph bar showing the change of the resting membrane potential (RMP) induced by L-NNA and MRS2500.



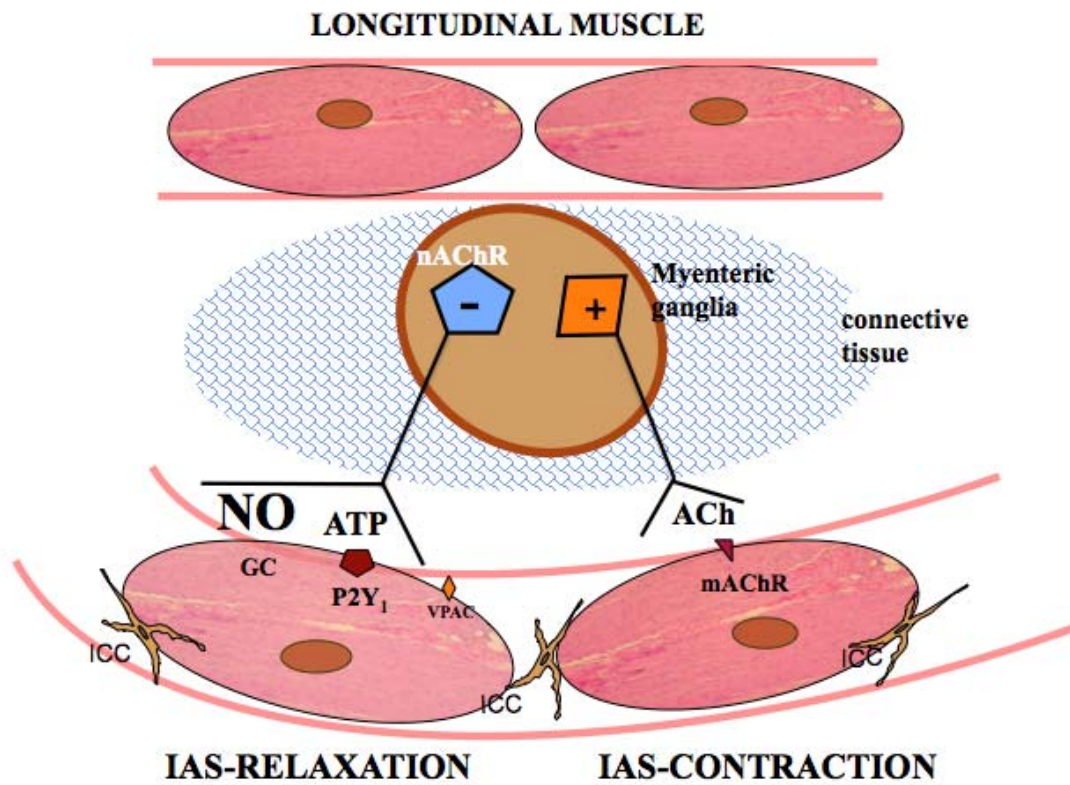
**Complementary figure 10.** Effect of VIP 6-28 (0.1 μM) on non-nitric oxide relaxation following maximal electrical stimulation of inhibitory motor neurons at 3 and 5 Hz. The VPAC-1 receptor antagonist VIP 6-28 did not affect the residual relaxation after L-NNA addition (1mM) whereas MRS2500 (1 μM) fully blocked it. \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ns, non-significant,  $n = 4$ .



**Complementary figure 11.** Effect of  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/ml) on non-nitregic relaxation following maximal electrical stimulation of inhibitory motor neurons at 3 and 5 Hz.  $\alpha$ -chymotrypsin did not affect the residual relaxation after L-NNA (1 mM) whereas MRS2500 (1  $\mu$ M) fully blocked it. \* indicates  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; ns, non-significant,  $n = 4$ .



**Complementary figure 12.** Intracellular microelectrode recording showing (A) a representative EFS-induced inhibitory junction potential at 50 V in control conditions and after incubation with VIP 6-28 (0.01 μM) and α-chymotrypsin (10 U/ml), and (B) plot graphs showing that VIP 6-28 and α-chymotrypsin did not affect the amplitude (left) and duration (right) of the EFS-induced IJP at 5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 and 50 V. All values are expressed as mean ± SEM.



**Complementary figure 13.** Graph of the rat internal anal sphincter (IAS). The figure shows the structure of IAS and the neurotransmitters mediating neuromuscular transmission in the IAS (inhibitory and excitatory); the receptors mediating stimulation of excitatory and inhibitory enteric motor neurons. nAChR indicates nicotinic acetylcholine receptor; mAChR, muscarinic acetylcholine receptor; NO, nitric oxide; GC, guanylate cyclase; VPAC, VIP/PACAP receptors; VIP, vasoactive intestinal peptide, and ICC, interstitial cells of Cajal.





## CAPITULO 3. Patterns of Impaired Internal Anal Sphincter Motility in Patients With Anal Fissure

### Abstract

**Background:** The pathophysiology of internal anal sphincter (IAS) hypertonicity in patients with anal fissure (AF) is not well understood so the aim of this study was to examine the patterns and the pathophysiology of impaired IAS motility in patients with AF. **Methods:** We studied 61 patients ( $51 \pm 1.9$  years, 49% women) with acute AF using anorectal manometry with simultaneous EMG and 53 patients ( $46.5 \pm 2$  years, 79% women) with chronic AF using high-resolution anorectal manometry, 360° ultrasonography and histopathology. We assessed mean (MeRAP) and maximal (MRAP) resting anal pressure, spontaneous rhythmic slow (SW) and ultraslow waves (USW), IAS relaxation induced by rectal distention (RAIR), and IAS structure. **Results:** a) Patients with acute AF have higher MeRAP ( $106.4 \pm 3.6$  mmHg) and MRAP ( $161.5 \pm 5.6$  mmHg) than those with chronic AF ( $P < 0.05$ ); 95% of patients presented SW and 67% USW. b) Patients with chronic AF have higher MeRAP ( $92.4 \pm 3.1$  mmHg) and MRAP ( $117.5 \pm 4.4$  mmHg); 94% of patients presented SW and 69% USW. Patients with USW (with either acute or chronic AF) presented increased IAS hypertonicity (MeRAP and MRAP,  $P < 0.05$ ), and decreased amplitude and reduced extension of IAS relaxation and increased IAS after-contraction following rectal distention. **Conclusion:** Patients with acute or chronic AF presented impaired IAS motility with hypertonicity and increased spontaneous rhythmic activity (SW and USW). Patients with AF and USW presented higher IAS hypertonicity, and reduced IAS relaxation and enhanced IAS after-contraction following rectal distention. Our study suggests an impairment in the intrinsic nitrergic motor pathways to the IAS as a major mechanism for IAS dysfunction in patients with AF.

## Introduction

Primary anal fissure (AF) is a very prevalent disease affecting 10–15% of the general population, mainly young to middle-aged adults (Lund and Scholefield, 1996; McCallion and Gardiner, 2001; Dhawan and Chopra, 2007). Despite its high prevalence and morbidity, its pathogenesis and aetiology are uncertain and treatment is not specific (Nelson, 2004). AF is a lineal anal ulcer occurring below the dentate line. Most primary AF are located in the posterior midline, 10-15% in anterior midline and less than 1% in lateral position (Schubert *et al.*, 2009). The condition can be acute or chronic. Patients with chronic AF present visible transverse internal anal sphincter (IAS) fibres at the base of the fissure, indurate edges, sentinel pile, hypertrophic anal papilla, and thickened ulcer walls (Madoff and Fleshman, 2003; Steele and Madoff, 2006). The clinical hallmark of AF is severe, sharp anal pain during defecation which can persist for several hours afterwards (Madoff and Fleshman, 2003). Bright-red bleeding is commonly reported (Nelson, 2004) as well as anal discharge and pruritus (Acheson and Scholefield, 2005). The majority of patients do not report changes in bowel habits, constipation is found in only about 20% of patients and diarrhoea in about 7% (McCallion and Gardiner, 2001).

There is a well-established association between AF and increased anal resting pressure (Gibbons and Read, 1986; Stahl, 2006), caused by sustained hypertonicity of the IAS of unknown origin which could be the cause of the ischemic ulcer (Gibbons and Read, 1986). AF is also thought to be secondary to local trauma of the mucosa induced by constipation, straining and/or the passage of hard stool, the subsequent sphincter hypertonicity leading to further constipation making a vicious circle (Lund and Scholefield, 1996). In addition, various studies have shown that the blood flow to the posterior midline of the anus is potentially deficient. The hypertonic IAS in AF compress the end arteries which pass through the IAS before reaching the posterior midline, decreasing the posterior anodermal blood flow and producing pain and an ischemic ulcer (Klosterhalfen *et al.*, 1989; Schouten *et al.*, 1994; Lund *et al.*, 1999). Studies have found other physiological abnormalities in the IAS of patients with AF such as “ultraslow waves” and a pressure “overshoot” following rectal distension, although the rectoanal inhibitory reflex was found to be normal in most studies (Stahl, 2006). The slow and ultraslow waves are spontaneous rhythmic tonic contractions of the IAS. The slow waves have a frequency of 10 - 20 waves per minute and seem to be present in both healthy people and patients (Yoshino *et al.*, 2007). The ultraslow waves

have a frequency of 1-2 waves per minute with an amplitude > 25 mmHg, and are observed in less than 10% of healthy people (Hancock, 1977; Eckardt *et al.*, 1997; Stahl, 2006; Yoshino *et al.*, 2007). The prevalence, pathophysiology and clinical relevance of all these abnormalities in the IAS of patients with AF are not known.

IAS tone mostly originates from the tonic contraction of circular smooth muscle cells, dependent on calcium influx through L-type Ca<sup>2+</sup> channels (McDonnell *et al.*, 2008; Opazo *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2010) and is modulated by the renin-angiotensin system through AT1/2 receptors, arachidonic acid metabolites and RhoA/ROCK proteins (De Godoy *et al.*, 2004; De Godoy and Rattan, 2006; Patel and Rattan, 2007; De Godoy *et al.*, 2009). This myogenic IAS tone is also modulated by tonic activity of the intrinsic neurons of the myenteric plexus. In earlier studies we found that blockade of neural nitric oxide synthase depolarized smooth muscle cells and enhanced IAS tone in pigs and rats (Opazo *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2010). In addition, the final step of the rectoanal inhibitory reflex is known to be the activation of the intrinsic inhibitory motor neurons in the IAS (Jones *et al.*, 2003). We found IAS relaxation was mediated by a co-transmission process involving nitric oxide (NO) and purinergic (through P2Y<sub>1</sub>) pathways with a specific role for NO as mediator of resting membrane potential and tone (Opazo *et al.*, 2010).

The aim of our study was to describe the patterns of internal anal sphincter motility as well as the structure and function of the internal and external anal sphincter in acute and chronic AF patients to improve our knowledge on the pathophysiology of AF.

### Patients And Methods

**Sample.** We studied 114 consecutive patients with anal fissure (72 women and 42 men, mean age 49.4 ± 1.3 years) at the Hospital de Mataró and the Clínica Sagrada Familia, Barcelona, Spain. All patients gave their written informed consent and the Ethical Review Board of the Hospital de Mataró approved the study on 25 March, 2009, registry number BBDD 15/09. The most frequent concurrent diseases were arterial hypertension, 18.9%; depression, 15.1%; diabetes, 13.2%, and asthma, 9.6%. Of the women, 81% had undergone childbirth, 66% of these had undergone episiotomy and 24%, hysterectomy. Up to 15% of patients -all women- presented minor episodes of faecal incontinence for gas and/or liquids (Wexner 2.2 ± 0.2) and 18.9%, irritable bowel

syndrome following Rome II criteria (66% with constipation subtype) in association with the AF. Up to 21.5% of patients reported a pattern of hard stools (Bristol 1-2) and 7.9%, loose stools (Bristol 6). Patients included in the study were separate in acute and chronic anal fissure groups based in the length of the symptoms and in the appearance of the lesion (Table 1). In the chronic AF group the treatment for AF was withdrawn 72 hrs prior to all physiologic studies.

**Table 1.** Clinical data of the anal fissure patient groups.

<b>Patients</b>	<b>Acute AF</b>	<b>Chronic AF</b>
Women	30 (49%)	42 (79%)
Men	31 (51%)	11 (21%)
Mean age (years)	51 ± 1.9	46.5 ± 2
Mean time of symptoms (weeks)	7.6 ± 0.6	96.8 ± 22.3
<b>Anal fissure location</b>		
Posterior midline	47 (77%)	42 (79%)
Anterior midline	13 (21%)	11 (21%)
Both position	1 (2%)	-
<b>Previous treatment</b>		
Glyceryl trinitrate 0.4%	-	75%
Local ointments (anaesthetics and corticoids)	-	16%
Lateral internal sphincterotomy	-	15%
Diltiazem 2%	-	13%
Anal dilatation	-	3%
<b>Concurrent anal diseases</b>		
Haemorrhoids (external and internal)	ND	62%
Sentinel pile	ND	42%
Fistula (intersphincteric or subcutaneous)	ND	26%

*AF indicates anal fissure, ND; not determined.*

## Methods

**Patients with Acute AF.** *Anorectal manometry and electromyography (EMG) physiologic examination:* Anorectal manometry was performed using a water-perfused 5 mm-diameter catheter with 4 perpendicular recording sites arranged at 90° located 1 cm from distal tip. We used the stationary pull through technique at 1 cm intervals. Simultaneous surface EMG electrodes were located in the perianal skin close to the anus. Pressure and EMG activity was simultaneously registered using a digital MP100 Series Polygraph (Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA) and recorded on a computer using the data acquisition software Acknowledge 3.7.2 (Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). Measurements: sphincter length; mean (MeRAP) and maximal (MRAP) resting anal pressure measured in the highest pressure zone of the anal canal; frequency and

amplitude of slow and ultraslow waves in this zone; maximal voluntary squeeze pressure (voluntary contraction) and maximal pressure during Valsalva (voluntary cough manoeuvre) at each cm interval, and kinesiological EMG signal (Diamant *et al.*, 1999).

**Patients with Chronic AF.** *High-resolution anorectal manometry (HRAM) physiologic study.* High-resolution anorectal manometry was performed using a water-perfused anorectal catheter (4.42 mm outer diameter) with 20 longitudinal recording sites separated at 3 mm intervals with spiroidal distribution and a chlorophrene balloon at the tip of the catheter (C7-R20-1000, Mui scientific®, Mississauga, Ontario, Canada). The catheter was positioned with the balloon in the rectum and the 20 longitudinal recording sites straddling the anal canal allowing measurements of the circumferential pressure throughout the anal canal (Jones *et al.*, 2007). Manometry profile was performed using a Solar GI HRAM (Medical Measurement Instrument (MMS®), Enschede, Netherlands) and tracings and pressure contours were analyzed with the Measurement & Analysis software provided by MMS (MMS®, Enschede, Netherlands). *HRAM protocol:* The resting anal canal pressure and the presence of slow and ultraslow waves were measured during a 15 minutes basal period. Next, maximal voluntary squeeze pressure (voluntary contraction) and maximal pressure during Valsalva (voluntary cough manoeuvre) were registered. Then the recto-anal inhibitory reflex (RAIR) was evaluated using 30 sec rectal balloon distentions of 20, 40, 60, 80 and 100 mL at 3 minute intervals. Finally, anal pressures were measured during two attempts of straining to evacuate the balloon (Azpiroz *et al.*, 2002).

*Ultrasonographic study.* We used a Hitachi ultrasound, model EUB-6500-HV and 360° endoanal transducer of 10 MHz (Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan). The thickness of the IAS was assessed in 4 perpendicular measurements (12h, 3h, 6h, 9h) at the upper level (puborectal muscle) and middle third of the anal canal. The presence of tears in the puborectal muscle and external anal sphincter was also assessed.

*Tissue processing for histopathological study.* Control tissue specimens from the IAS were obtained from 3 patients undergoing abdomino-perianal resections for rectal neoplasm (one woman and two men; mean age  $61.3 \pm 1.4$  years). Tissue specimens from the IAS of patients with chronic AF (n = 6; four women and two men; mean age  $45.1 \pm 4.2$  years) were obtained from patients undergoing lateral internal

sphincterotomy. IAS samples were fixed in paraformaldehyde 4% in phosphate buffer saline (pH 7.3), dehydrated and embedded in paraffin. We used hematoxylin-eosin (H&E) stain to assess the inflammatory infiltrates, S100 stain (Policlonal Rabbit Anti-Cow S-100) to assess the glial cells, the neuron-specific enolase stain (NSE, Monoclonal Mouse Anti-Human) for neural structures and Masson's trichrome stain kit (Artisan™) for the connective tissue, all of them from Dako (Glostrup, Demark) and performed with the Dako Autostainer (Glostrup, Demark) as previously described (Opazo *et al.*, 2010).

**Data analysis.** The following terms were used in this paper: *Sphincter length*, the distance in centimetres of the high resting pressure zone between the rectum and the anal verge; *Resting anal canal pressure*, the average pressure observed at rest after the probe is positioned in the anal canal during the basal period; *Mean resting anal pressure (MeRAP)*, the mean pressure of the highest-pressure zone; *Maximal resting anal pressure (MRAP)*, the maximal pressure of the highest-pressure zone; *Maximal squeeze anal pressure*, the maximal pressure during voluntary contraction, and *Valsalva anal pressure*, the maximal pressure during cough reflex (Diamant *et al.*, 1999; Sun and Rao, 2001). Values were referenced to the representative normative values from the AGA Technical Review of Anorectal Testing Techniques (Diamant *et al.*, 1999). Slow (SW) and ultraslow waves (USW) were identified according to accepted definitions (Sun and Rao, 2001). Two observers (MJF, AO) examined the histopathological samples. Continuous data are presented as mean  $\pm$  SEM and compared with the Mann-Whitney U test. GraphPad Prism version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis. "N" represents number of patients. A P value  $<$  0.050 was considered statistically significant.

## Results

### Patients with acute AF

The mean anal canal length of the group was  $3.4 \pm 0.1$  cm (N = 61), and was significantly shorter in women ( $3.27 \pm 0.1$  cm, N = 30) than men ( $3.64 \pm 0.1$  cm, N = 31, P = 0.0233). The highest pressure zone was located in the middle anal canal at 1.2 cm from the anal verge. The MeRAP for the group was  $106.4 \pm 3.6$  mmHg and the MRAP was  $161.5 \pm 5.6$  mmHg (N = 61). The maximal and mean anal canal pressures

were lower in women ( $P = 0.0336$  and  $P = 0.0378$  respectively, Table 2). SW were present in 95.1% ( $N = 58$ ) of patients and USW in 67.2% ( $N = 41$ , Figure 1). Amplitude and frequency of SW and USW are summarised in Table 3. We did not observe any change in EMG activity during SW or USW. Patients with USW ( $N = 41$ ) presented higher MeRAP and MRAP compared to patients without USW ( $N = 20$ ,  $P = 0.0092$  and  $P = 0.0097$  respectively, Figure 2).

Figure 3 and Table 4 depict the maximal squeeze and the valsalva anal pressure exerted by the external anal sphincter and show significantly greater pressures in men than women ( $P < 0.001$ ). A simultaneous increase of anal pressure and surface EMG activity was always observed during squeeze or Valsalva. Up to 19% of patients (8 womens, 6 of them with obstetric background, and 4 men, 2 of them with diabetes) presented maximal external anal sphincter pressures below reference values (Diamant *et al.*, 1999).

**Table 2.** Length (cm) and resting pressure (mmHg) of the anal canal by gender in acute and chronic anal fissure

	ACUTE AF			CHRONIC AF		
	Group	Women	Men	Group	Women	Men
Length	3.4± 0.1	3.27± 0.1	3.64±0.1*	3.1± 0.1	3.0± 0.1	3.7± 0.1*
MeRAP	106.4± 3.6‡‡	100.1± 4.9	112.6± 4.1*	92.4± 3.1	91.7± 3.8	95.1± 3.2ns
MRAP	161.5± 5.6‡‡‡	153.3± 8.1	169.6± 7.5*	117.5± 4.4	118.5± 5.5	113.7± 4.6ns

AF indicates anal fissure; MeRAP, mean resting anal pressure; MRAP, maximal resting anal pressure and ns, non-statistical. \*  $p < 0.05$  between gender in the same group, ‡‡  $p < 0.01$  between MeRAP and MRAP of acute vs. chronic AF.

**Table 3.** Frequency (waves/minute) and amplitude (mmHg) of the slow and ultraslow waves observed in acute and chronic anal fissure patient

	ACUTE AF		CHRONIC AF	
	Slow wave	Ultraslow	Slow wave	Ultraslow
Frequency	16.0 ± 0.4	1.3 ± 0.1	14.8 ± 0.4	1.3 ± 0.1
Amplitude	16.9 ± 1.1***	67.6 ± 4.9**	9.7 ± 0.5	40.2 ± 3.4

AF indicates anal fissure. \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$  between amplitude of slow and ultraslow waves from acute vs. chronic AF group.

**Table 4.** Maximal squeeze anal pressure and valsalva anal pressure by group and gender between acute and chronic anal fissure patients.

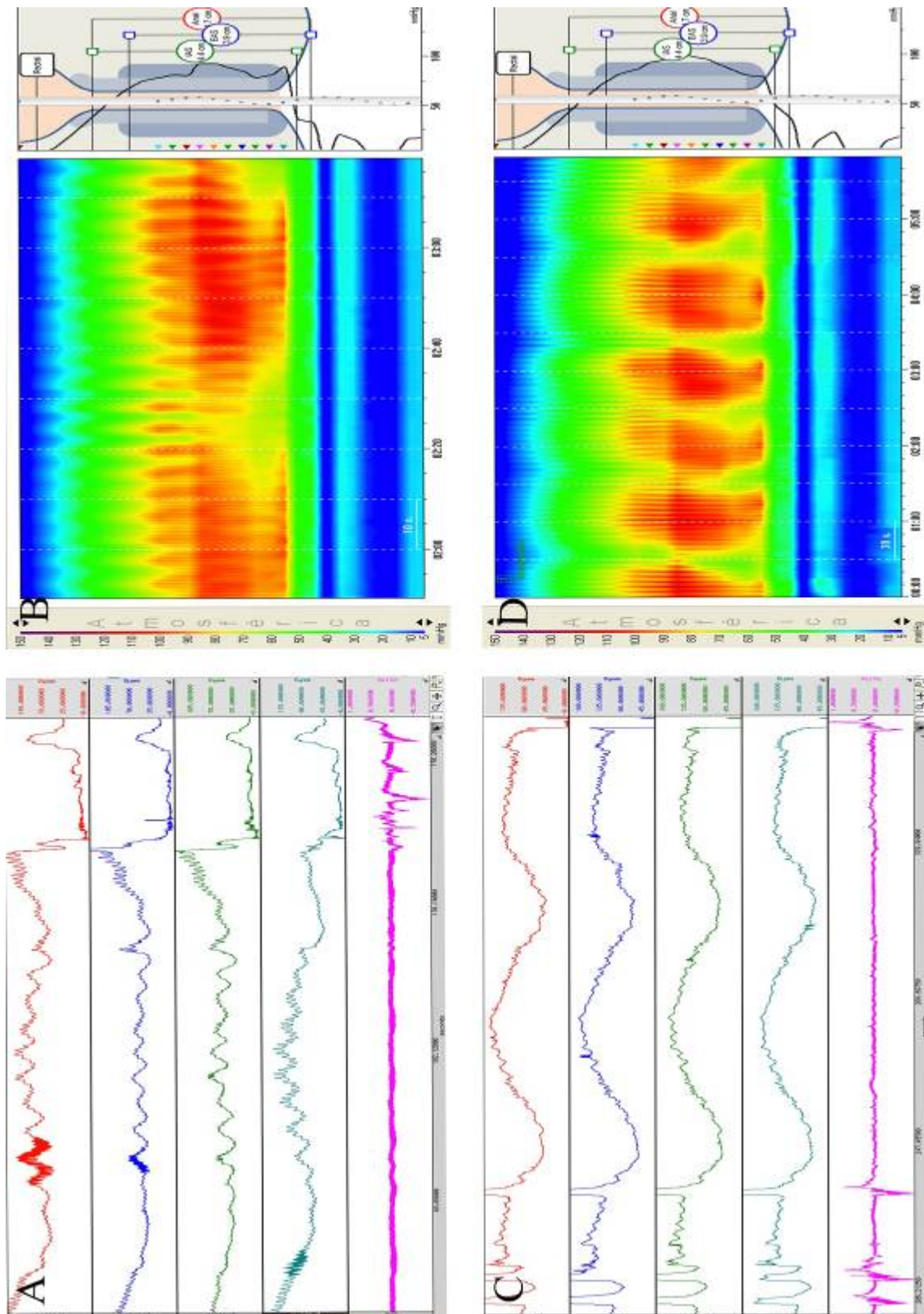
	ACUTE AF			CHRONIC AF		
	Group	Women	Men	Group	Women	Men
Squeeze	200.4 ±5.2	177.9 ±6.7	221.0 ±5.0*	188.8 ±8.6	171.9 ±7.7	253.3 ±19.9 *
Valsalva	193.8 ±6.9	165.7 ±8.7	211.2 ±6.9 *	172.0 ±6.9	163.7 ±7.6	202.3 ±11.9 *

AF indicates anal fissure. \*  $p < 0.05$  between gender in the same group

### Patients with chronic AF

The mean anal canal length was  $3.1 \pm 0.1$  cm (N = 53) and was significantly shorter in women ( $3.0 \pm 0.1$  cm, N = 42,) than in men ( $3.7 \pm 0.1$  cm, N = 11,  $P = 0.0026$ ). The MeRAP of the group was  $92.4 \pm 3.1$  mmHg (N = 53) and the MRAP for the group was  $117.5 \pm 4.4$  mmHg (N = 53) without differences by gender ( $P = 0.374$ ) but statistically lower compared to the acute AF group ( $P = 0.016$  and  $P < 0.0001$  respectively) (Table 1). SW was present in 94.3% (N = 50) of patients and USW in 69.8% (N = 37, Figure 1). Amplitude and frequency of SW and USW are summarised in Table 2, the amplitude of both waves being higher in the acute AF group. We found that SW were always simultaneous contractions of all the fibres of the IAS along the entire anal canal whereas USW were simultaneous in 66% of patients but in 33% presented either aboral or retrograde propagation. Patients with chronic AF and USW (N = 37), like those with acute AF, presented higher MeRAP and MRAP compared to patients without USW (N = 11,  $P < 0.001$ , Figure 2). The rectoanal inhibitory reflex (RAIR) was present in all patients with chronic AF. Patients with USW (N = 37) presented decreased amplitude and a reduced extension of IAS relaxation during RAIR compared with those without USW ( $P = 0.0318$ , Figure 4 and 5). In addition, an after-contraction or “overshoot phenomenon” of the IAS (mean amplitude of  $31.8 \pm 2.9$  mmHg) was more prevalent among patients with USW (76.9% vs. 23% in patients without, at 100 mL,  $P = 0.035$ , Figure 5).



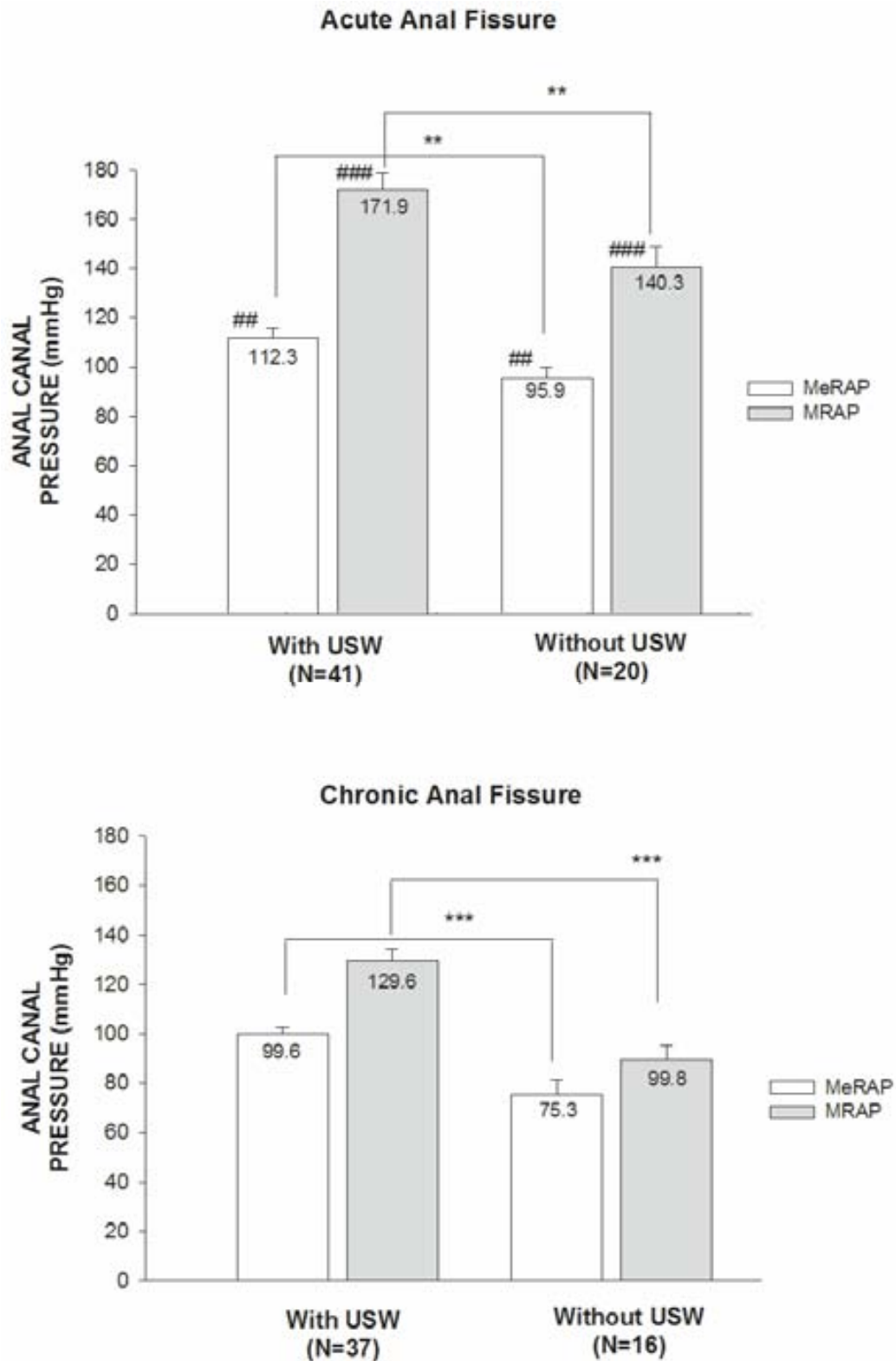


**Figure 1.** Representative tracings of slow (A and B) and ultraslow (C and D) waves in patients with acute and chronic anal fissure. Conventional anorectal manometry with surface EMG (A and C), and high-resolution anorectal manometry in contour plot mode (B and D). Slow waves are superimposed on ultraslow waves (C and D).

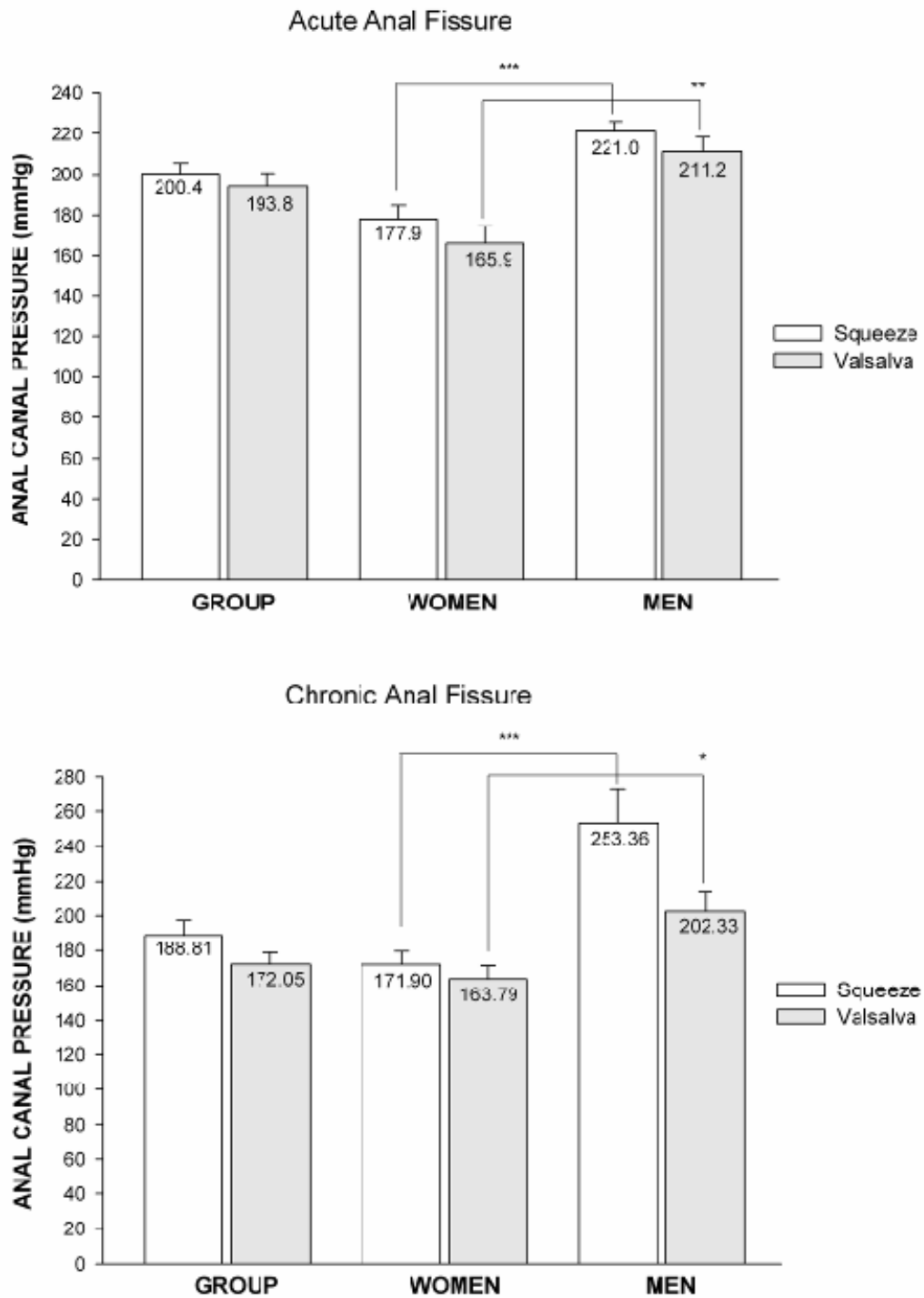
Figure 3 and Table 3 depict the maximal squeeze anal pressure and the Valsalva anal pressure exerted by the external anal sphincter showing significantly greater pressures in men than women ( $P < 0.001$ ). Up to 18.8% patients (7 women, all with obstetric background, and 3 men, 1 of them with diabetes) presented maximal external anal sphincter pressures below reference values (Diamant *et al.*, 1999). We also assessed the anal canal pressure during attempted defecation and found 62.3% ( $N = 33$ ) of patients with chronic AF presented type 1 dyssynergia, 7.5% ( $N = 4$ ) type 2, and 30.2% ( $N = 16$ ) had normal defecation manoeuvre (Rao, 2008).

The endoanal ultrasonographic study performed on chronic AF patients showed a hypoechoic internal anal sphincter with a mean width at the middle level of  $2.7 \pm 0.1$  mm and at the upper level of  $2.7 \pm 0.1$  mm, without statistical differences between genders or among patients with or without USW ( $P = 0.468$ ). We also observed that 50% ( $N = 21$ ) of the women presented tears in the striated part of the anal sphincter, 26.1% ( $N = 11$ ) in the puborectalis muscle and the external anal sphincter, 7.1% ( $N = 3$ ) only in the puborectalis muscle, and 16.6% ( $N = 7$ ) only in the external anal sphincter.

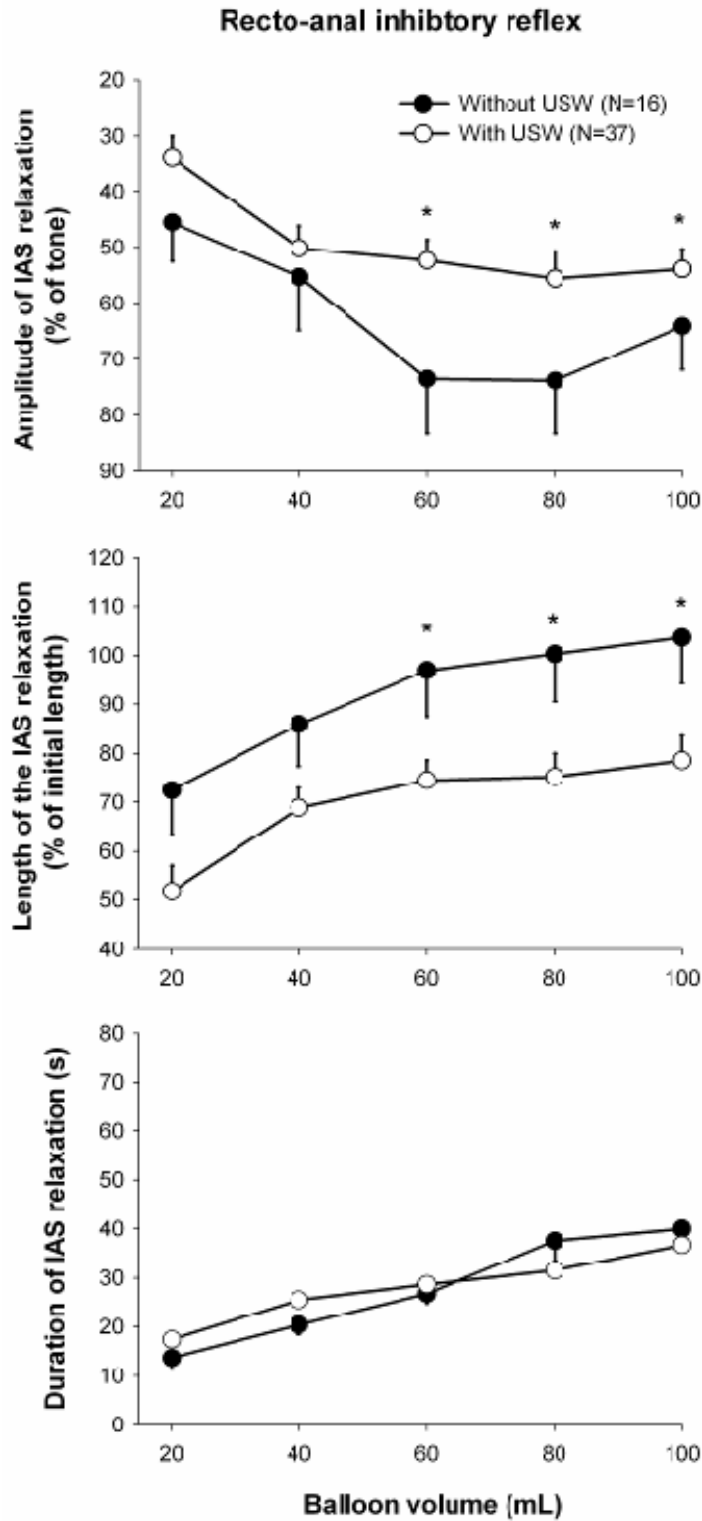
Finally, the main results of the histopathological study showed that all patients with AF presented a moderate to severe fibrosis between the muscular bundles of the IAS when compared to normal IAS muscle (Figure 6) and, in 4 of 6 biopsies, we also observed an inflammatory infiltrate with lymphocytes and neutrophils between the circular IAS smooth muscle fibres, especially around the vessels. We did not, however, observe major differences with the S100 stains for glial cells and NSE stains for neurons between controls and patients with AF.



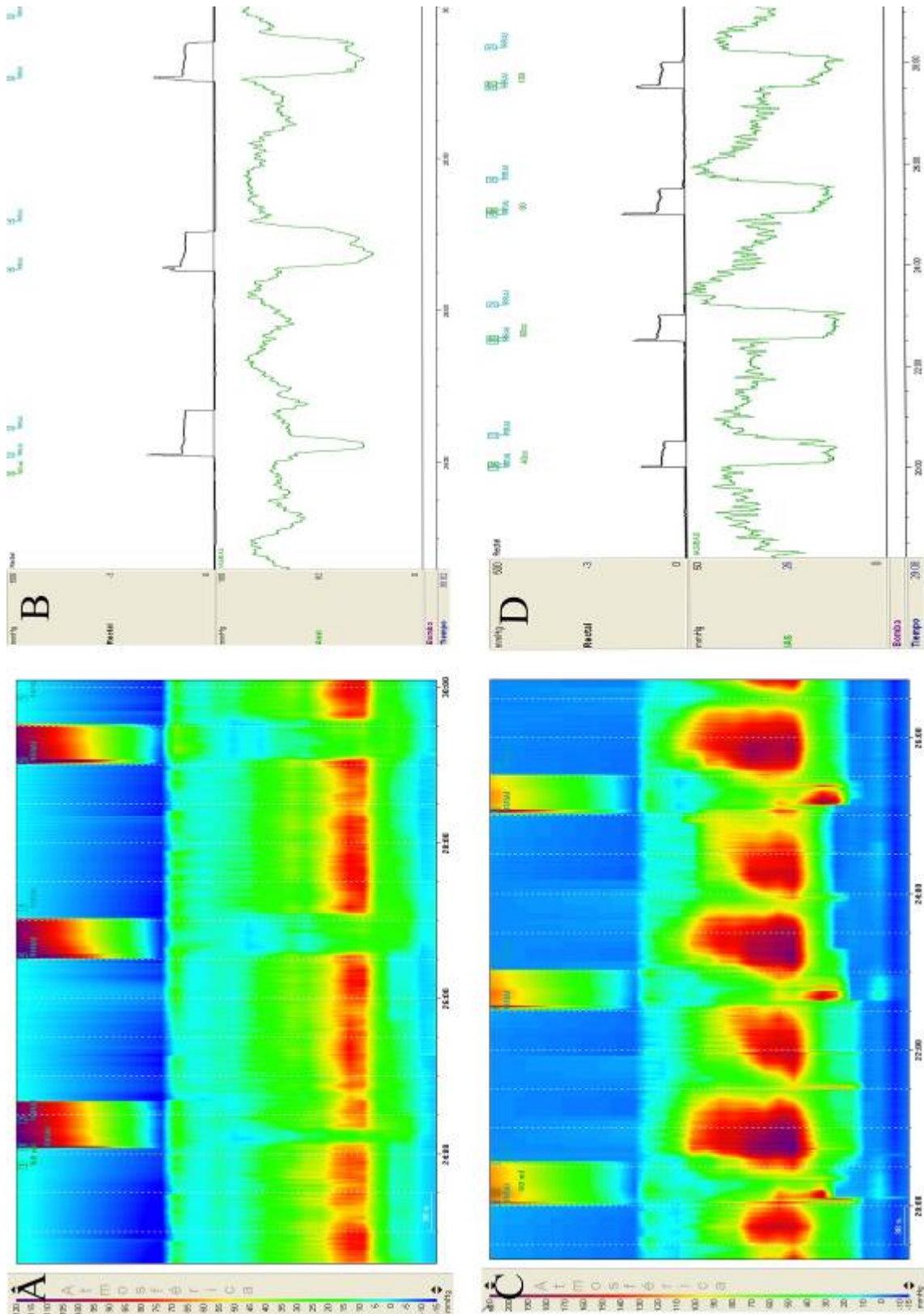
**Figure 2.** Graph bars showing the mean (MeRAP) and maximal anal canal pressure (MRAP) in patients with acute and chronic anal fissure stratified according to the presence of ultraslow waves (USW). MeRAP and MRAP are significantly increased in both acute and chronic patients with USW represented by \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  vs. without USW, and between MeRAP and MRAP of acute and chronic AF represented by ##,  $p < 0.01$ ; ###,  $p < 0.001$ .



**Figure 3.** Graph bar showing the external anal sphincter function in patients with acute (top) and chronic (bottom) anal fissure. Maximal anal pressure developed by voluntary contraction (squeeze) and cough reflex (Valsalva) is significantly reduced in women with acute or chronic anal fissure. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$  vs. woman.

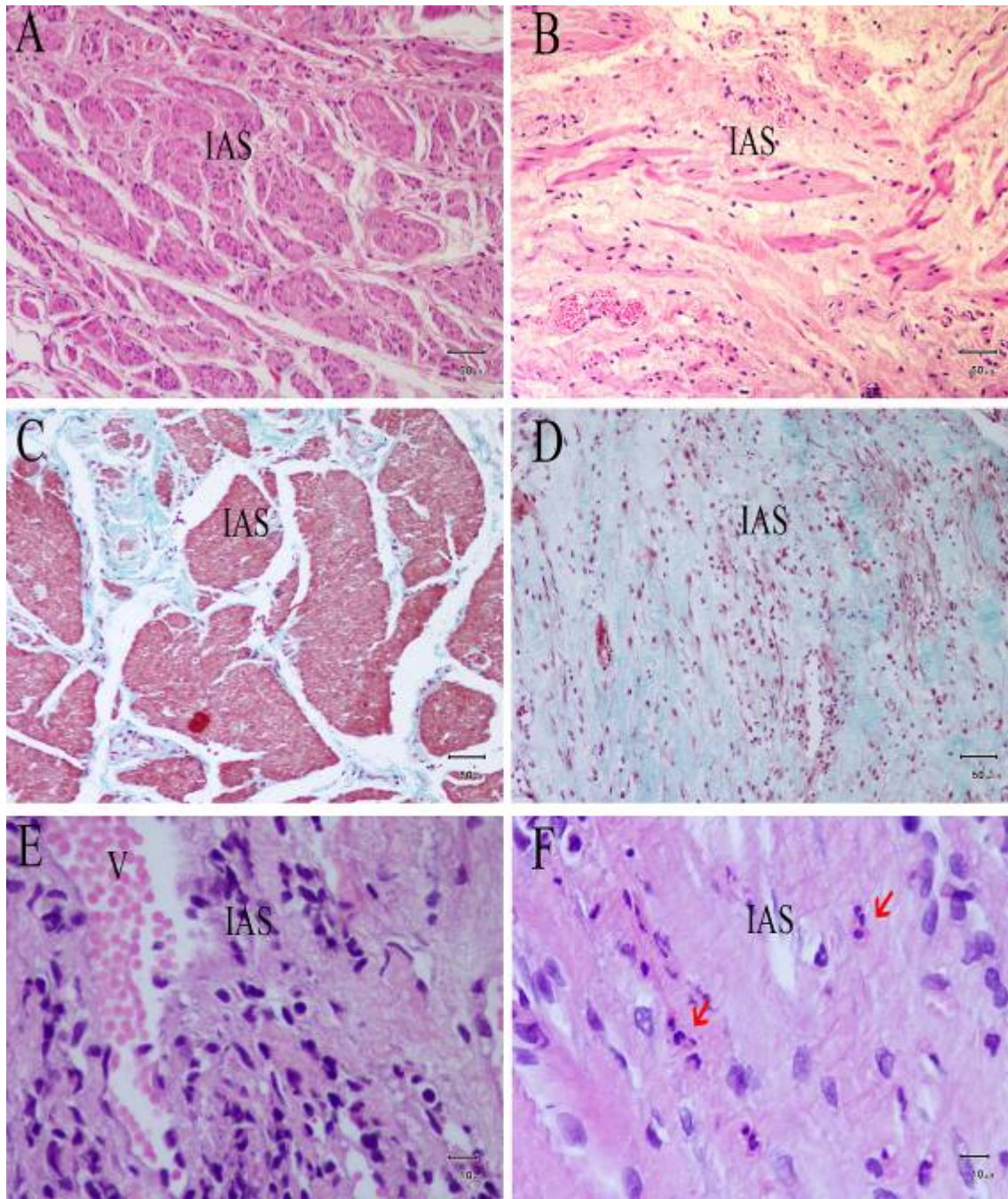


**Figure 4.** Recto-anal inhibitory reflex in patients with and without ultraslow waves (USW). Plot graph representing the amplitude of internal anal sphincter (IAS) relaxation (% tone), the length of the anal canal that relaxes (% length) and the duration of IAS relaxation during the recto-anal inhibitory reflex induced by rectal balloon distention. Patients with USW have decreased relaxation and caudal extension of induced-IAS relaxation \*,  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** Representative contour plot and manometric tracing showing the recto-anal inhibitory reflex in a patient without ultraslow waves (USW) (A, B), and in a patient with USW and the presence of after-contraction or overshoot phenomenon (C, D).





**Figure 6.** Histological aspects of internal anal sphincter (IAS) of chronic anal fissure patients and control subject. **(A)** Hematoxylin & eosin stain of control IAS showing the high density of circular smooth muscle bundles. **(B)** Hematoxylin & eosin stain of anal fissure IAS showing low density and irregular distribution of circular smooth muscle bundles. **(C)** Masson's trichrome stain showing the connective tissue between the circular smooth muscle of control IAS. **(D)** Masson's trichrome stain of anal fissure IAS showing the high proportion of connective tissue (green/blue) and the marked loss of circular smooth muscle. **(E)** Hematoxylin & eosin stain of anal fissure IAS showing infiltrative inflammatory polymorph-nuclear cells (arrows) and **(F)** lymphocytes in circular smooth muscle fibres. Scale bar of 50 µm for A, B, C and D, and 10 µm for E and F

## Discussion

In this study we found strong impairment of the motility patterns of the IAS patients with anal fissure (AF). The impairment of IAS motility is qualitatively similar

among patients with acute or chronic AF, but more severe in those with acute disease. We also found a physiological marker of disease severity as patients with AF (either acute or chronic) and ultraslow waves (USW) presented higher IAS hypertonicity and severe reduction of IAS relaxation during rectal distension. Taking together our present findings on humans and our previous *in vitro* basic studies on the physiology of the IAS (Opazo *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2010), we hypothesize that impairment in the nitrergic pathway of the inhibitory motor neurons to the IAS could be the main pathophysiological disturbance in most patients with AF. Another relevant finding is that up to 20% of patients with AF -most of them women- presented structural or functional damage in the external anal sphincter (EAS) and are at risk of faecal incontinence depending on the selected treatment.

Our patients presented increased resting anal canal pressure due to IAS hypertonicity above reference values (Diamant *et al.*, 1999) as has been reported in other studies (Stahl, 2006), and at similar values to those described in other studies on AF patients (Schouten and Blankensteijn, 1992; Xynos *et al.*, 1993; Bove *et al.*, 2004; Stahl, 2006). We also found that the IAS hypertonicity was more severe in patients showing USW (Schouten and Blankensteijn, 1992). This spontaneous and regular fluctuation in IAS activity was first described in the 1960s by Wankling *et al.* who studied the basal electrical activity in 20 healthy men and observed two main types of spontaneous oscillations: the SW and USW (Wankling *et al.*, 1968). Other studies observed these waves in healthy people as well as patients with anorectal disease (Kerremans, 1968; Hancock, 1976; Read *et al.*, 1982; Waldron *et al.*, 1989; Yoshino *et al.*, 2007). SW and USW are different patterns of IAS motility: SW are low-amplitude waves of 5 to 25 mmHg with a frequency of 6 to 20 waves per minute while USW display amplitude between 30 to 100 mmHg and frequency of less than 3 waves per minute (Sun and Rao, 2001). SW appear to be part of the normal physiology of the anal canal and originated by interstitial cells of Cajal (ICC) (Hagger *et al.*, 1998; Shafik *et al.*, 2006). In humans and animals, ICC are distributed from the rectum to the IAS in decreasing density. In the rectum, they are identified as networks between the longitudinal and circular muscle layer and in the submucous edge of the circular layer, while in the IAS they are sparse cells mainly found between the muscle bundles, and a few of them near the submucous or myenteric edge of the circular layer (Hagger *et al.*, 1998; Horiguchi *et al.*, 2003; Cobine *et al.*, 2010). Moreover, the time course and amplitude of pacemaker potentials change also from the rectum to the IAS. Finally, the



pacemaker potentials-SW activity of the rectum originates in the submucosa but emanate throughout the muscle in the IAS (Mutafova-Yambolieva *et al.*, 2003). It has been suggested that the role of the SW is physiological, helping preserve continence (Sorensen *et al.*, 1989) or prevent the desensitization of the sensitive anal epithelium by moving faecal material from the anal canal to the rectum (Sun and Rao, 2001). In contrast, USW are rarely observed in healthy people (Hancock, 1977; Gibbons and Read, 1986; Schouten and Blankensteijn, 1992; Xynos *et al.*, 1993) and are most commonly present in anorectal pathological conditions such as constipation, haemorrhoids, megacolon and AF (Hancock, 1977; Gibbons and Read, 1986; Waldron *et al.*, 1989; Schouten and Blankensteijn, 1992; Xynos *et al.*, 1993; Farouk *et al.*, 1994; Yoshino *et al.*, 2007); we observed USW in 68% of our patients with AF (acute or chronic). The role and implication of USW is still unknown. Our surface EMG recordings did not show changes during SW and USW, further showing they are not caused by the EAS (Sorensen *et al.*, 1989). Moreover, in *in vitro* studies, SW and USW in isolated human (Penninckx *et al.*, 1992) and porcine (Opazo *et al.*, 2009) IAS strips were unaffected by tetrodotoxin and abolished by nifedipine (linked to calcium fluxes), further suggesting their origin in the spontaneous activity of the IAS. In our study, the presence of USW is a marker of disease severity as patients with USW showed higher resting anal canal pressures (in acute and chronic AF) and severe impairment in IAS relaxation induced by rectal distension. High-resolution anorectal manometry revealed the propagation of the USW in oral and aboral directions along the anal canal. SW, however, are always simultaneous contractions without direction involving the circular fibres of the IAS.

The rectoanal inhibitory reflex (RAIR) is an intrinsic reflex originated by the stimulation of rectal mechanoreceptors which activate the intrinsic sensory neurons and inhibitory motor neurons in the myenteric plexus, inducing relaxation of the IAS (Jones *et al.*, 2003). Previous studies found RAIR in patients with AF and classified it as normal (Abcarian *et al.*, 1982; Keck *et al.*, 1995; Bove *et al.*, 2004; Stahl, 2006). Our patients with chronic AF presented RAIR with normal manometric morphology, (distention of the balloon induced a slight increase in anal canal pressure originated by the EAS, followed by a transient IAS relaxation). However, we observed that the amplitude of IAS relaxation and the length of the anal canal that participate in the relaxation were significantly smaller in patients with USW compared to those without USW.

We also observed that chronic AF patients developing USW had a higher prevalence of overshoot phenomenon of the IAS following rectal distension (67.4%) compared to those without USW (32.6%). The overshoot phenomenon was first described by Nothmann (Nothmann and Schuster, 1974) as an IAS reflex spasm after normal relaxation during RAIR, suggesting a role for it in the pathogenesis of the AF. This after-contraction was also described in AF patients at especially high volumes of rectal distention and attributed an IAS origin since this phenomenon mostly disappeared after lateral internal sphincterotomy (Abcarian *et al.*, 1982).

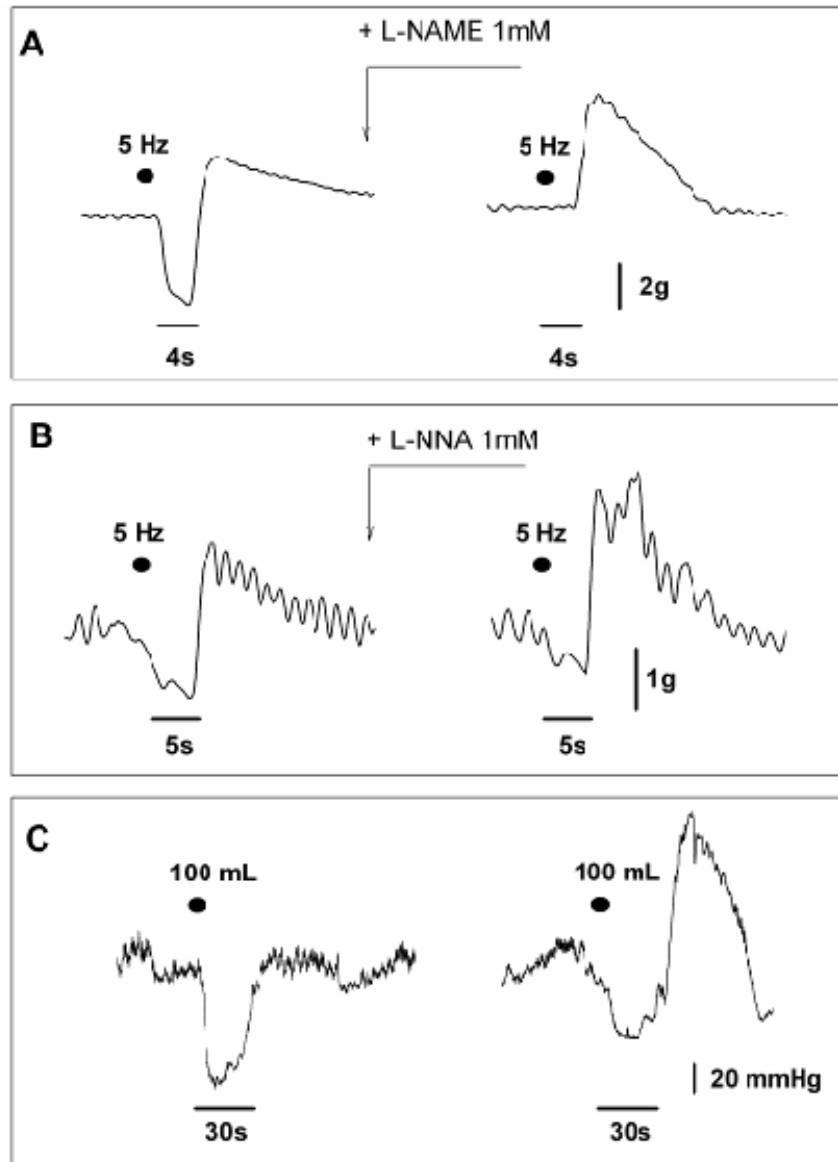
The IAS is considered abnormal or hypertrophic when it is thicker than 2.5 mm in patients  $\leq$  50 years old and 3 mm in patients  $>$  50 years old (Nielsen *et al.*, 1991; Gantke *et al.*, 1993; Schafer *et al.*, 1997). We did not find any difference in the IAS thickness by gender, USW, or age  $\leq/ >$  50 years. We only observed a structural difference when comparing the length of the anal canal between genders. Our results argue against a hypertrophic IAS in patients with AF. Nevertheless, hypertrophy of the IAS has been described in chronic AF patients (Pascual *et al.*, 2008), but the IAS has also been described as thicker in older patients (Burnett and Bartram, 1991) or in men compared to women (Regadas *et al.*, 2007). Studies have not found any correlation between genders, body weight or IAS thickness with anal canal pressure in healthy or anorectal patients (Burnett and Bartram, 1991; Gantke *et al.*, 1993; Pascual *et al.*, 2008). In our histological studies we found severely increased fibrosis and loss of the circular smooth muscle bundle structure, but we also found inflammatory infiltrative cells in the smooth muscle surrounding the vessels in our IAS biopsies from chronic AF. This fibrosis has been previously described suggesting that it could reduce the compliance of the IAS, but not preclude the ability of the muscle to be overactive or to relax in response to rectal distension (Brown *et al.*, 1989). We believe an inflammatory reaction in the IAS could affect the relative proportion of NOS isoenzymes as has been described in IBD rat model where cyclical up-regulated inducible NOS and long-term down-regulated neural NOS are the bases for relapse and quiescent phases in IBD (Porras *et al.*, 2006). A role for inflammation in the pathophysiology of AF could increase the expression of inducible NOS and reduce the expression of neural NOS, supporting our hypothesis as previous studies found reduced NOS in patients with AF (Lund, 2006).

Finally we also assessed the function and structure of EAS in our patients with AF. The EAS contraction was significantly higher in men compared to women during

squeeze or valsalva manoeuvres. We found 22 of 114 patients (19%) presented weak EAS contraction according to the reference values described in the AGA guideline (Diamant *et al.*, 1999) and 50% women with AF presented structural damage to the striated anal sphincters. It should be noted that up to 15% of AF patient -all women- presented minor episodes of faecal incontinence with functional or structural damage of the EAS and risk of severe incontinence if a lateral internal sphincterotomy is selected as treatment of the AF. Other important clinical data from our study show that only 20% of patients with AF presented hard stools or constipation while 70% presented dyssynergic defecation with paradoxical contraction of EAS. In a previous study (Clave *et al.*, 2004) we observed a very similar proportion of dyssynergic defecation among patients with functional constipation according to the Rome II criteria. Taken together, these data further confirm a central role of IAS dysmotility in the pathophysiology of AF and argue against the theories suggesting constipation, straining and/or the passage of hard stool as important factors in the pathophysiology and treatment of patients with AF.

To summarise, we found impaired IAS motility in AF patients with IAS hypertonicity and high prevalence of spontaneous rhythmic contractions (USW). We also found that patients with USW had more severe hypertonicity and impaired IAS relaxation, and enhanced after-contraction (overshoot phenomenon) after RAIR. These findings are very similar to those induced by NO synthesis inhibitors in our previous *in vitro* studies in porcine (Opazo *et al.*, 2009) and rat (Opazo *et al.*, 2010) IAS as L-NNA or L-NAME caused: a) increased IAS tone and depolarization of the membrane potential, b) decrease of the IAS relaxation induced by the electrical stimulation of the inhibitory motor neurons, and c) enhanced post-contraction (Figure 7). Taking our previous findings in *in vitro* studies and our present *in vivo* study on patients with AF together, we hypothesize that the pathophysiology of AF is caused by impairment of inhibitory motor neurons with reduction of neural nitric oxide synthase (Lund, 2006) associated with an inflammatory process leading to: a) a decrease in the tonic release of nitric oxide inducing the depolarization of the IAS smooth muscle cells and increasing the probability of opening of the calcium channels leading to enhanced tone and probably to the appearance of USW, and b) a decrease in the release of NO following stimulation of inhibitory neurons which leads to impaired IAS relaxation and enhanced after-contraction during RAIR. Further studies at the molecular level will help to characterize the origin and potential targets for the specific treatment of this very

prevalent anal disease.



**Figure 7.** Representative tracing of electrically-induced mechanical relaxation of (A) porcine internal anal sphincter and (B) rat internal anal sphincter (IAS) strips in Krebs condition and after NOS inhibition. (C) Representative tracing of IAS relaxation with and without overshoot phenomenon after recto-anal inhibitory relaxation induced by rectal balloon distention. These figures related the effect of *in vitro* blockade of nitric oxide and the subsequent reduction of electrical relaxation and increase of after-contraction with the reduced relaxation and overshoot phenomenon after RAIR found in patients with anal fissure.

## References

- Abcarian H, Lakshmanan S, Read DR and Roccaforte P (1982) The role of internal sphincter in chronic anal fissures. *Dis Colon Rectum* **25**:525-528.
- Acheson AG and Scholefield JH (2005) Anal fissure: the changing management of a surgical condition. *Langenbecks Arch Surg* **390**:1-7.
- Azpiroz F, Enck P and Whitehead WE (2002) Anorectal functional testing: review of collective experience. *Am J Gastroenterol* **97**:232-240.
- Bove A, Balzano A, Perrotti P, Antropoli C, Lombardi G and Pucciani F (2004) Different anal pressure profiles in patients with anal fissure. *Tech Coloproctol* **8**:151-156; discussion 156-157.
- Brown AC, Sumfest JM and Rozwadowski JV (1989) Histopathology of the internal anal sphincter in chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* **32**:680-683.
- Burnett SJ and Bartram CI (1991) Endosonographic variations in the normal internal anal sphincter. *Int J Colorectal Dis* **6**:2-4.
- Clave P, Saldana E, Montero E, Alonso S, Hernandez J and Serra-Prat M (2004) Prevalence of functional constipation and disordered defecation among healthy women. *Colorectal Dis* **6**:1-67.
- Cobine CA, Hennig GW, Bayguinov YR, Hatton WJ, Ward SM and Keef KD (2010) Interstitial cells of Cajal in the cynomolgus monkey rectoanal region and their relationship to sympathetic and nitrergic nerves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**:G643-656.
- De Godoy MA, Dunn S and Rattan S (2004) Evidence for the role of angiotensin II biosynthesis in the rat internal anal sphincter tone. *Gastroenterology* **127**:127-138.
- De Godoy MA, Rattan N and Rattan S (2009) Arachidonic acid metabolites follow the preferential course of cyclooxygenase pathway for the basal tone in the internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**:G727-734.
- De Godoy MA and Rattan S (2006) Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor subtype 1 inhibitors reconstitute hypertensive internal anal sphincter in the spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:725-734.
- Dhawan S and Chopra S (2007) Nonsurgical approaches for the treatment of anal fissures. *Am J Gastroenterol* **102**:1312-1321.

- Diamant NE, Kamm MA, Wald A and Whitehead WE (1999) AGA technical review on anorectal testing techniques. *Gastroenterology* **116**:735-760.
- Eckardt VF, Schmitt T and Bernhard G (1997) Anal ultra slow waves: a smooth muscle phenomenon associated with dyschezia. *Dig Dis Sci* **42**:2439-2445.
- Farouk R, Duthie GS, MacGregor AB and Bartolo DC (1994) Sustained internal sphincter hypertonia in patients with chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* **37**:424-429.
- Gantke B, Schafer A, Enck P and Lubke HJ (1993) Sonographic, manometric, and myographic evaluation of the anal sphincters morphology and function. *Dis Colon Rectum* **36**:1037-1041.
- Gibbons CP and Read NW (1986) Anal hypertonia in fissures: cause or effect? *Br J Surg* **73**:443-445.
- Hagger R, Gharaie S, Finlayson C and Kumar D (1998) Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* **73**:75-79.
- Hancock BD (1976) Measurement of anal pressure and motility. *Gut* **17**:645-651.
- Hancock BD (1977) The internal sphincter and anal fissure. *Br J Surg* **64**:92-95.
- Horiguchi K, Keef KD and Ward SM (2003) Distribution of interstitial cells of Cajal in tunica muscularis of the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G756-767.
- Jones MP, Post J and Crowell MD (2007) High-resolution manometry in the evaluation of anorectal disorders: a simultaneous comparison with water-perfused manometry. *Am J Gastroenterol* **102**:850-855.
- Jones OM, Brading AF and Mortensen NJ (2003) Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum* **46**:963-970.
- Keck JO, Staniunas RJ, Collier JA, Barrett RC and Oster ME (1995) Computer-generated profiles of the anal canal in patients with anal fissure. *Dis Colon Rectum* **38**:72-79.
- Kerremans R (1968) Electrical activity and motility of the internal anal sphincter: an "in vivo" electrophysiological study in man. *Acta Gastroenterol Belg* **31**:465-482.
- Klosterhalfen B, Vogel P, Rixen H and Mittermayer C (1989) Topography of the inferior rectal artery: a possible cause of chronic, primary anal fissure. *Dis Colon Rectum* **32**:43-52.

- Lund JN (2006) Nitric oxide deficiency in the internal anal sphincter of patients with chronic anal fissure. *Int J Colorectal Dis* **21**:673-675.
- Lund JN, Binch C, McGrath J, Sparrow RA and Scholefield JH (1999) Topographical distribution of blood supply to the anal canal. *Br J Surg* **86**:496-498.
- Lund JN and Scholefield JH (1996) Aetiology and treatment of anal fissure. *Br J Surg* **83**:1335-1344.
- Madoff RD and Fleshman JW (2003) AGA technical review on the diagnosis and care of patients with anal fissure. *Gastroenterology* **124**:235-245.
- McCallion K and Gardiner KR (2001) Progress in the understanding and treatment of chronic anal fissure. *Postgrad Med J* **77**:753-758.
- McDonnell B, Hamilton R, Fong M, Ward SM and Keef KD (2008) Functional evidence for purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**:G1041-1051.
- Mutafova-Yambolieva VN, O'Driscoll K, Farrelly A, Ward SM and Keef KD (2003) Spatial localization and properties of pacemaker potentials in the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**:G748-755.
- Nelson R (2004) A systematic review of medical therapy for anal fissure. *Dis Colon Rectum* **47**:422-431.
- Nielsen MB, Pedersen JF, Hauge C, Rasmussen OO and Christiansen J (1991) Endosonography of the anal sphincter: findings in healthy volunteers. *AJR Am J Roentgenol* **157**:1199-1202.
- Nothmann BJ and Schuster MM (1974) Internal anal sphincter derangement with anal fissures. *Gastroenterology* **67**:216-220.
- Opazo A, Lecea B, Admella C, Fantova M, Jiménez M, Martí-Ragué J and Clavé P (2009) A Comparative Study of Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter in Pigs. *Dis Colon Rectum* **52**:1902-1922.
- Opazo A, Lecea B, Gil V, Jimenez M, Clave P and Gallego D (2010) Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil.*
- Pascual M, Pares D, Pera M, Courtier R, Gil MJ, Puig S, Serrano A, Andreu M and Grande L (2008) Variation in clinical, manometric and endosonographic

- findings in anterior chronic anal fissure: a prospective study. *Dig Dis Sci* **53**:21-26.
- Patel CA and Rattan S (2007) Cellular regulation of basal tone in internal anal sphincter smooth muscle by RhoA/ROCK. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**:G1747-1756.
- Penninckx F, Lestar B and Kerremans R (1992) The internal anal sphincter: mechanisms of control and its role in maintaining anal continence. *Baillieres Clin Gastroenterol* **6**:193-214.
- Porras M, Martin MT, Torres R and Vergara P (2006) Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G423-430.
- Rao SS (2008) Dyssynergic defecation and biofeedback therapy. *Gastroenterol Clin North Am* **37**:569-586, viii.
- Read MG, Read NW, Haynes WG, Donnelly TC and Johnson AG (1982) A prospective study of the effect of haemorrhoidectomy on sphincter function and faecal continence. *Br J Surg* **69**:396-398.
- Regadas FS, Murad-Regadas SM, Lima DM, Silva FR, Barreto RG, Souza MH and Regadas Filho FS (2007) Anal canal anatomy showed by three-dimensional anorectal ultrasonography. *Surg Endosc* **21**:2207-2211.
- Schafer R, Heyer T, Gantke B, Schafer A, Frieling T, Haussinger D and Enck P (1997) Anal endosonography and manometry: comparison in patients with defecation problems. *Dis Colon Rectum* **40**:293-297.
- Schouten WR and Blankensteijn JD (1992) Ultra slow wave pressure variations in the anal canal before and after lateral internal sphincterotomy. *Int J Colorectal Dis* **7**:115-118.
- Schouten WR, Briel JW and Auwerda JJ (1994) Relationship between anal pressure and anodermal blood flow. The vascular pathogenesis of anal fissures. *Dis Colon Rectum* **37**:664-669.
- Schubert MC, Sridhar S, Schade RR and Wexner SD (2009) What every gastroenterologist needs to know about common anorectal disorders. *World J Gastroenterol* **15**:3201-3209.
- Shafik A, El Sibai O and Ahmed I (2006) The identification of specialized pacemaking cells in the anal sphincters. *Int J Colorectal Dis* **21**:453-457.



- Sorensen SM, Gregersen H, Sorensen S and Djurhuus JC (1989) Spontaneous anorectal pressure activity. Evidence of internal anal sphincter contractions in response to rectal pressure waves. *Scand J Gastroenterol* **24**:115-200.
- Stahl TJ (2006) Anorectal Physiologic Testing in Anal Fissure Disease. *Semin Colon Rectal Surg* **17**:140-146.
- Steele SR and Madoff RD (2006) Systematic review: the treatment of anal fissure. *Aliment Pharmacol Ther* **24**:247-257.
- Sun WM and Rao SS (2001) Manometric assessment of anorectal function. *Gastroenterol Clin North Am* **30**:15-32.
- Waldron DJ, Kumar D, Hallan RI and Williams NS (1989) Prolonged ambulant assessment of anorectal function in patients with prolapsing hemorrhoids. *Dis Colon Rectum* **32**:968-974.
- Wankling WJ, Brown BH, Collins CD and Duthie HL (1968) Basal electrical activity in the anal canal in man. *Gut* **9**:457-460.
- Xynos E, Tzortzinis A, Chrysos E, Tzovaras G and Vassilakis JS (1993) Anal manometry in patients with fissure-in-ano before and after internal sphincterotomy. *Int J Colorectal Dis* **8**:125-128.
- Yoshino H, Kayaba H, Hebiguchi T, Morii M, Ito W, Chihara J and Kato T (2007) Multiple clinical presentations of anal ultra slow waves and high anal pressure: megacolon, hemorrhoids and constipation. *Tohoku J Exp Med* **211**:127-132.

**Appendix III. Complementary figures of high-resolution anorectal manometry, endoanal ultrasonography and histology in patients with chronic anal fissure**

**Index:**

**A) High-Resolution Anorectal Manometry**

- i) Squeeze manoeuvres (normal and abnormal) (Complementary figure 1)
- j) Valsalva manoeuvres (normal and abnormal) (Complementary figure 2)
- k) Defecation manoeuvres (normal and abnormal) (Complementary figure 3)
- l) Patterns of ultraslow waves (Complementary figure 4)

**B) Endoanal Ultrasonography**

- d) Endoanal ultrasonographic at the middle level of the anal canal (Complementary figure 5)
- e) Graph of the length (mm) and the width (mm) of the internal anal sphincter structure (Complementary figure 6)
- f) Graph showing the prevalence of structural damage in women with anal fissure (Complementary figure 7)

**C) Proposed Pathophysiology of Impaired Internal Anal Sphincter in Patients with Anal Fissure**

- a) Graph of the proposed normal internal anal sphincter physiology and pathophysiology of anal fissure (Complementary figure 8)

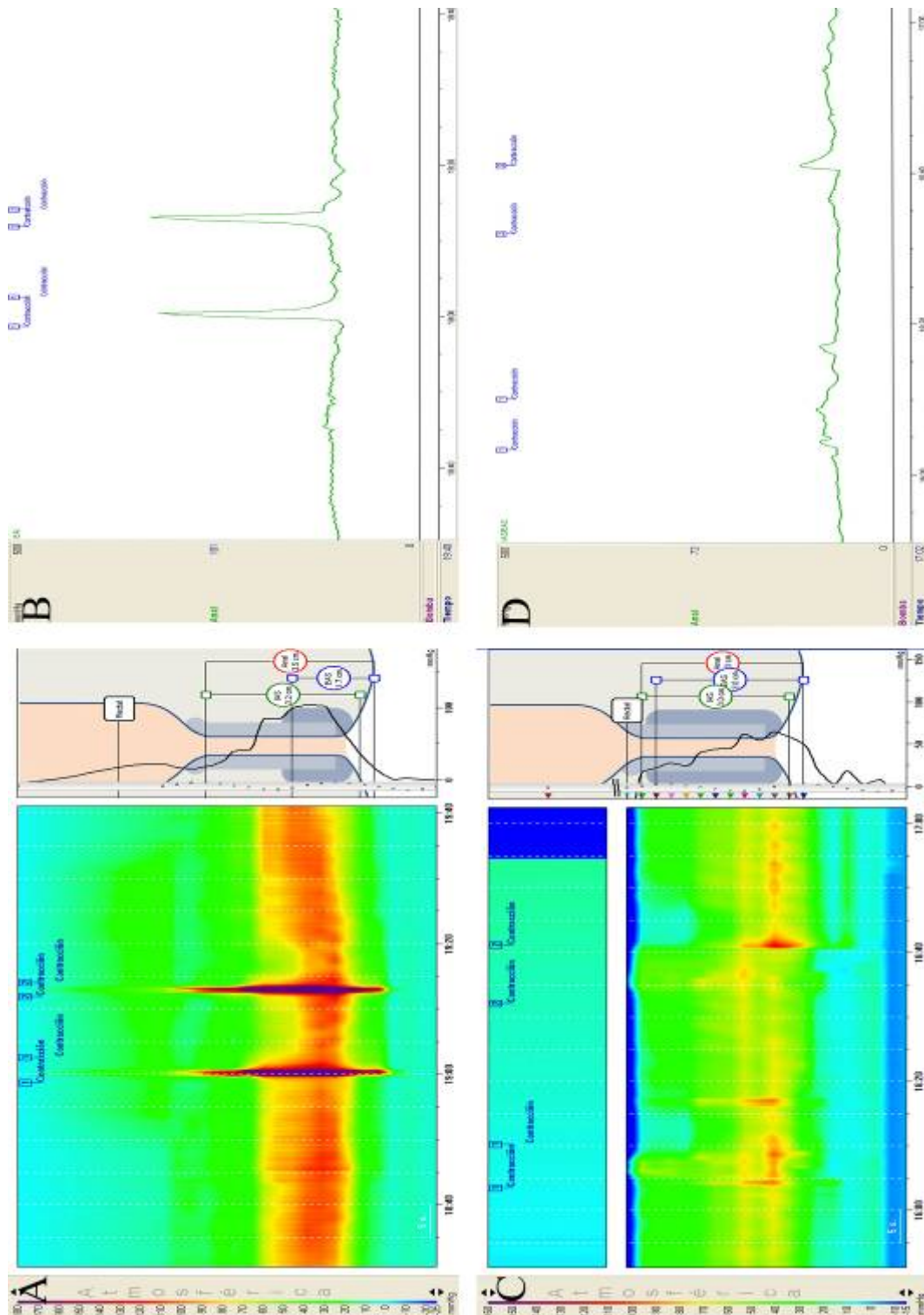
## **Summary**

This section shows complementary figures that were originated from the high-resolution anorectal manometry and endoanal ultrasonography from patients with anal fissure. Complementary figures 1 to 4 shows a representative contour plot and manometric tracing of a normal and an inefficient contraction of the external anal sphincter (EAS) induced by squeeze manoeuvres (Complementary figure 1) and valsalva manoeuvres (Complementary figure 2). In Complementary figure 3 we can observe the representative tracing of Dyssynergia type 1 and 2 observed in anal fissure patients. And the propagation of the ultraslow waves identified by high-resolution anorectal manometry in complementary figure 4).

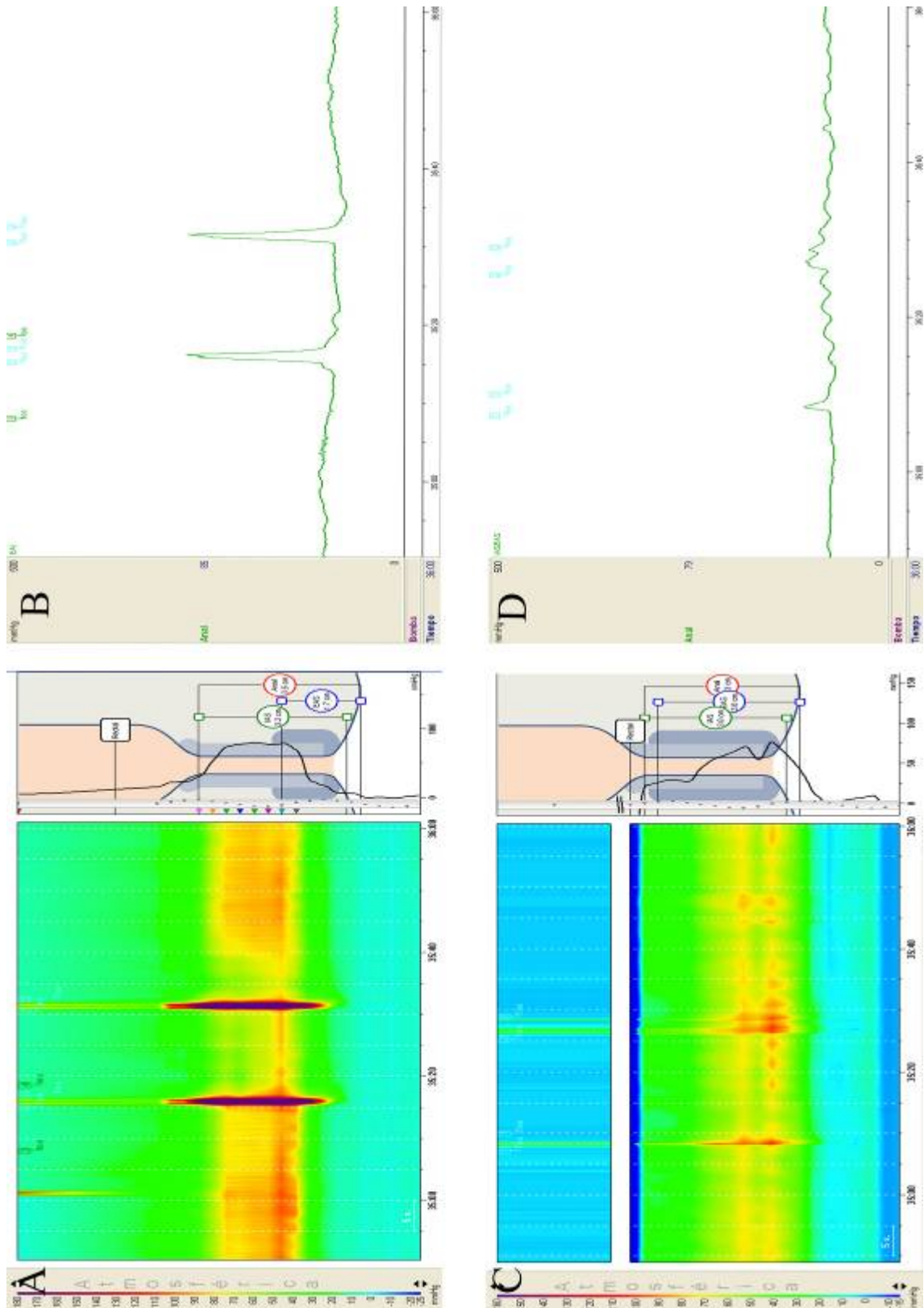
The endoanal ultrasonography shows the hypoechoic ring of the IAS and different tears in the external anal sphincter in anal fissure patient (Complementary figure 5). With this technique we measured the width of the IAS and the length of the anal canal (Complementary figure 6) and the tears in the EAS (Complementary figure 7).

Finally, the proposed schematic representation of our hypothesis of the pathophysiology of anal fissure (Complementary figure 8).

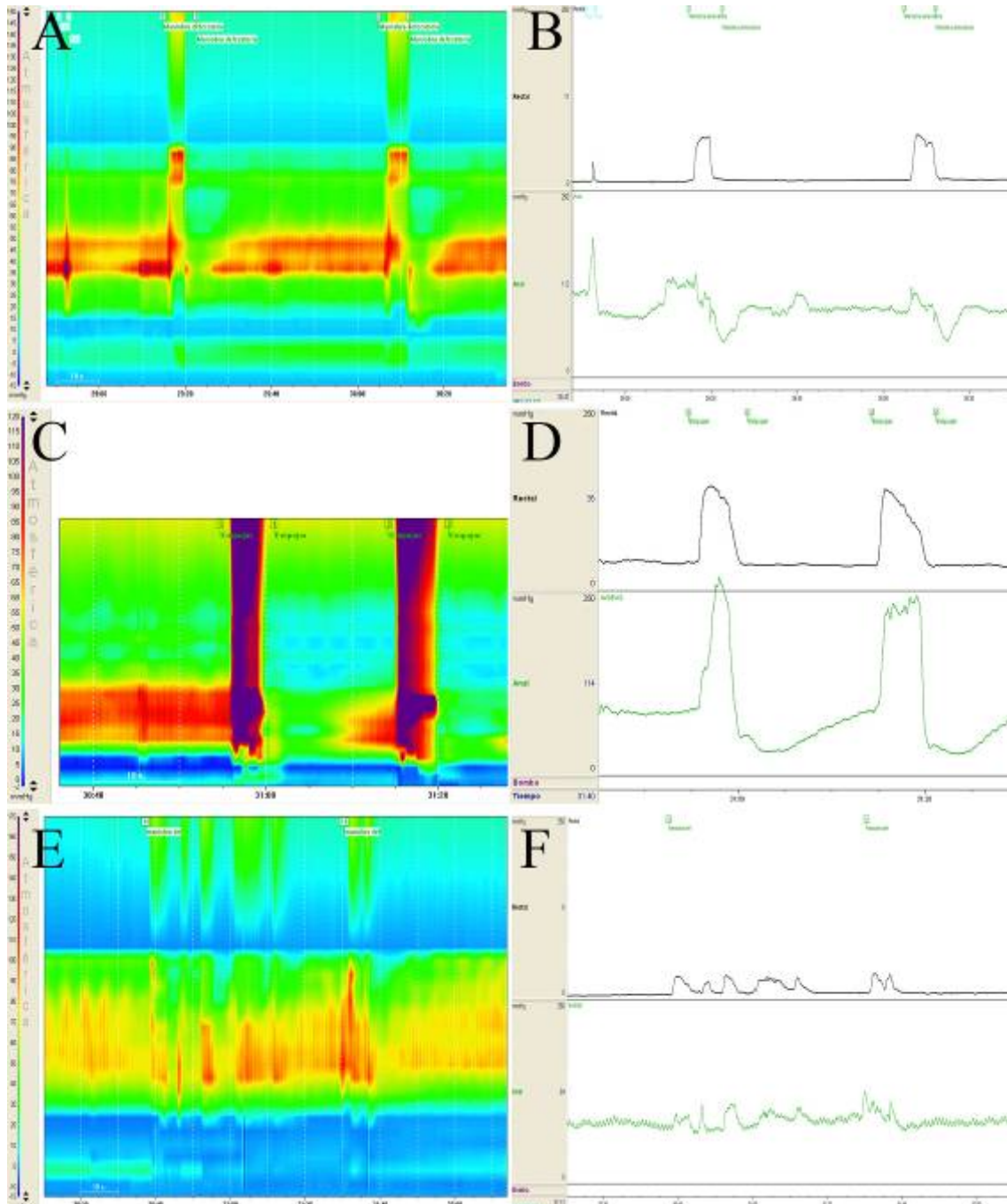
High-Resolution Anorectal Manometry



**Complementary figure 1.** Representative contour plot and manometric tracings of the contraction of the external anal sphincter (EAS) during squeeze manoeuvres in chronic anal fissure patients. (A and B) Normal increase in anal pressure during voluntary contraction of the EAS. (C and D) Weak increase in the anal canal pressure in an anal fissure patient with EAS insufficiency and mild faecal incontinence.

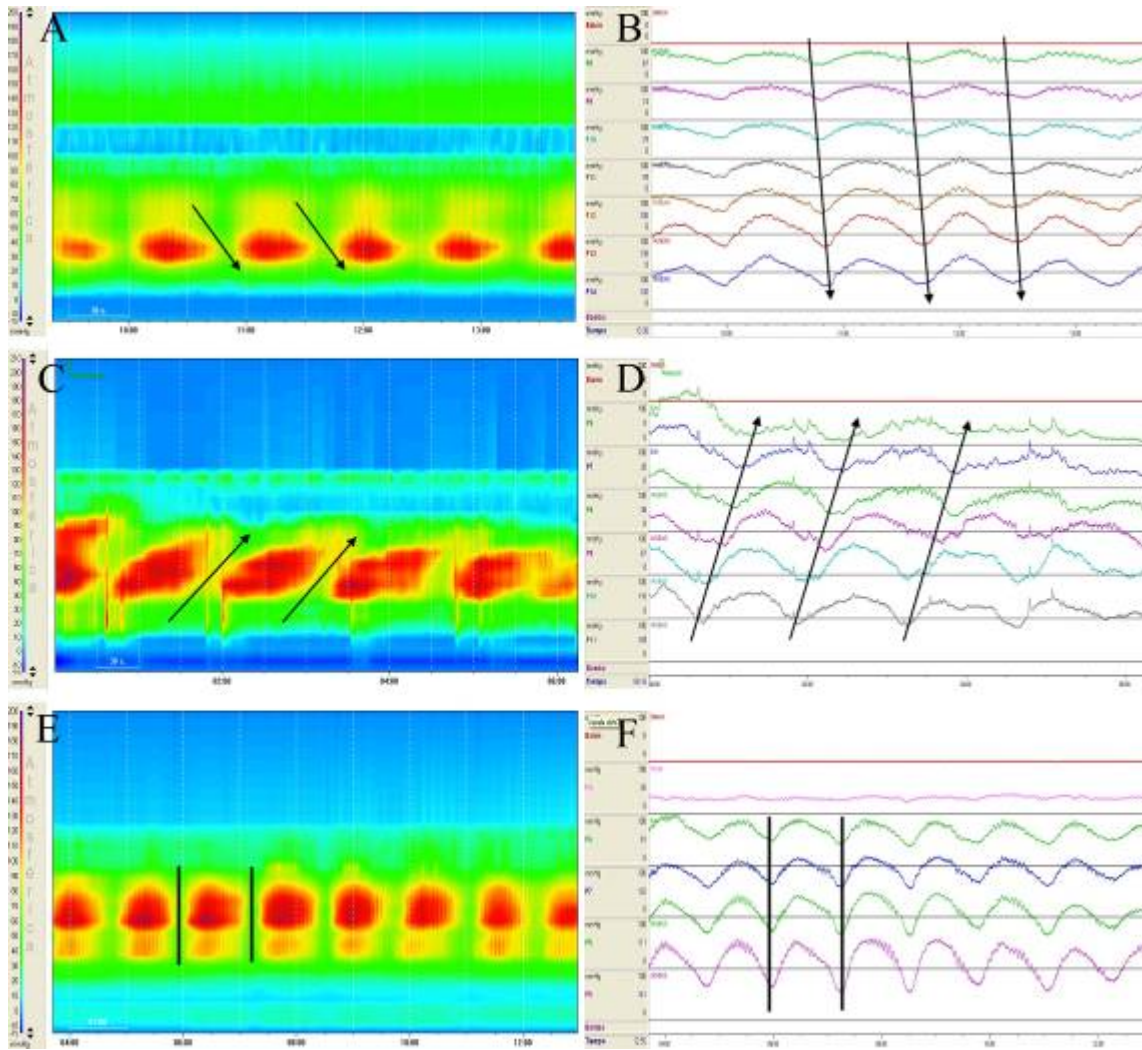


**Complementary figure 2.** Representative contour plot and manometric tracings of the contraction of the external anal sphincter (EAS) during Valsalva manoeuvres in chronic anal fissure patients. (A and B) Normal increase in anal pressure during involuntary contraction of the EAS. (C and D) Weak increase in anal canal pressure in an anal fissure patient with EAS insufficiency.



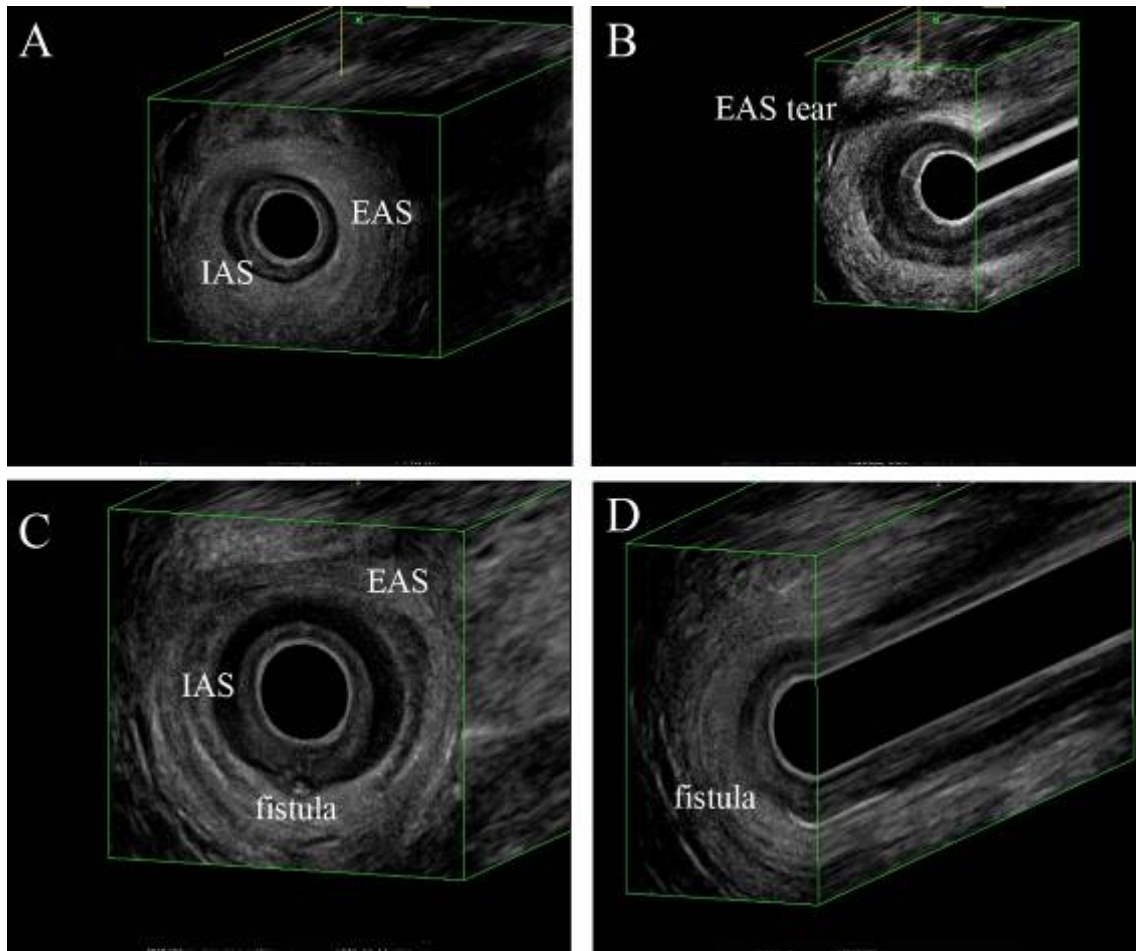
**Complementary figure 3.** Representative contour plot and manometric tracing of the defecation manoeuvres in chronic anal fissure patients. (A and B) Normal manoeuvre with internal anal sphincter relaxation during straining. (C and D) Dyssynergia type 1, patient generate adequate propulsive force (>40mmHg intra rectal pressure) along with paradoxical increase of anal sphincter pressure. (E and F) Dyssynergia type 2, patient is unable to generate adequate propulsive force and additionally there is paradoxical anal contraction.





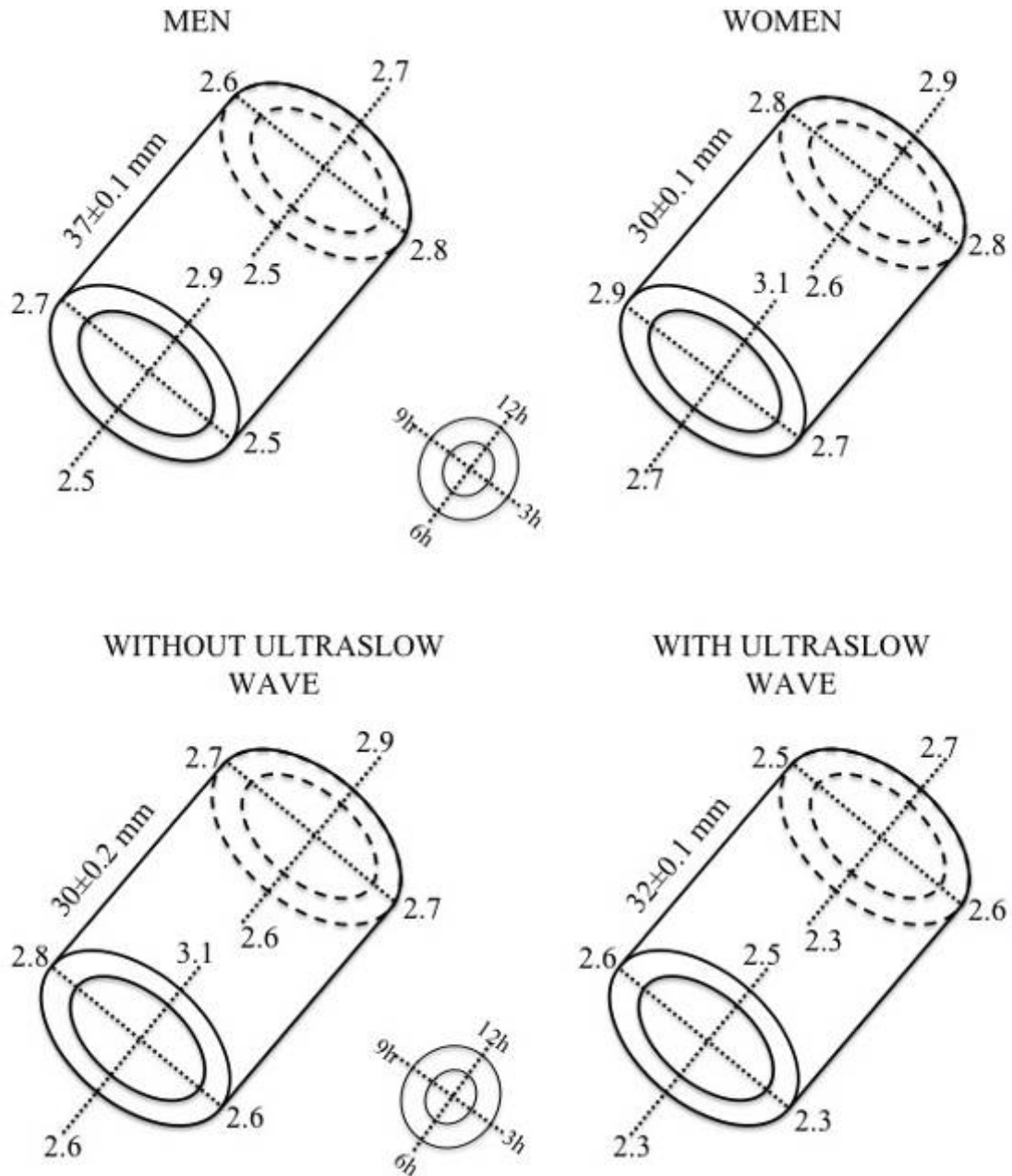
**Complementary figure 4.** Patterns of ultraslow waves (USW) by representative contour plot and manometric tracings in patients with chronic anal fissure assessed by high-resolution anorectal manometry. USW with aboral propagation (A, B); retrograde USW (C, D) and simultaneous USW (E, F). Arrows indicate the propagation direction.

**B) Endoanal Ultrasonography**

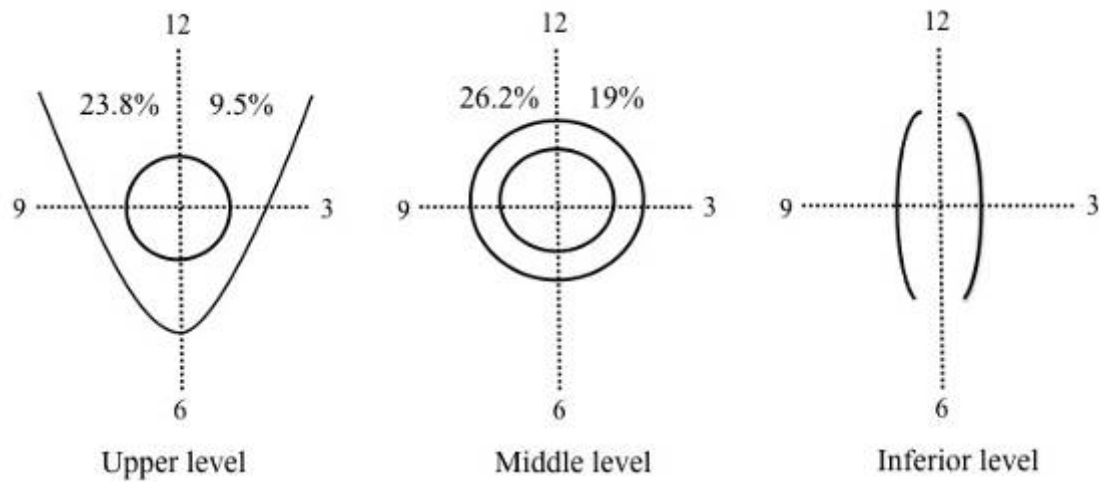


**Complementary figure 5.** Representative endoanal 3D ultrasonography images of chronic anal fissure patient. (A) The patient has a normal internal and external anal sphincter. (B) External anal sphincter tear. (C and D) Intersphincteric fistula in the posterior midline as a complication of anal fissure.

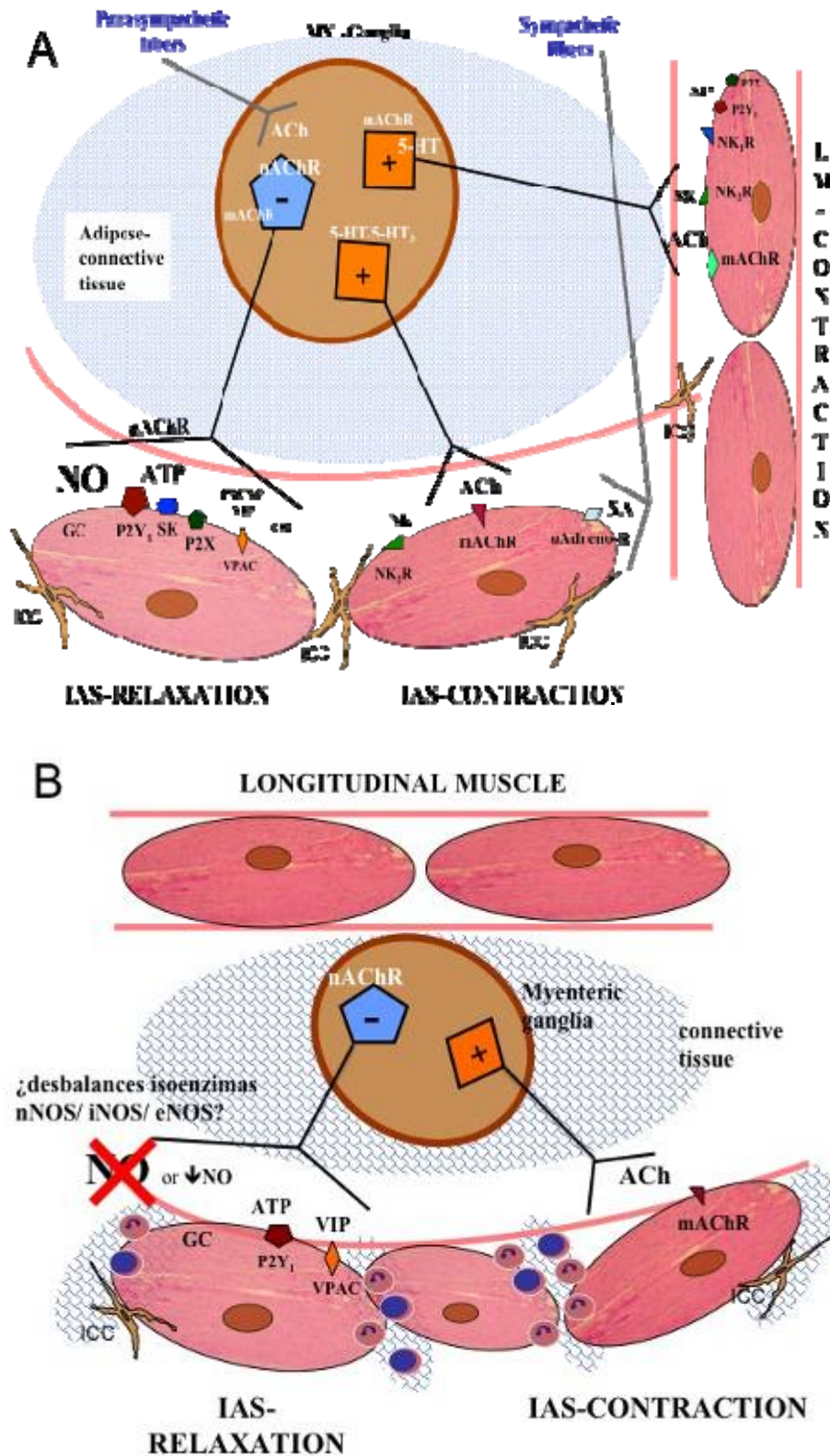




**Complementary figure 6.** Internal anal sphincter structure in patients with chronic anal fissure. The length (mm) was assessed by anorectal manometry and the width (mm) by ultrasonography in the upper and middle level of the anal canal. Results are stratified by gender and the presence of ultraslow waves. The only structural difference observed was the length which was statistically longer in men compared to women ( $P < 0.05$ ).



**Complementary figure 7.** Prevalence of structural damage in women with anal fissure (AF). Percentage of chronic AF patients that presented tears in ultrasonographic study in the striated muscle of the anal canal. Is important to said that only women presented tears in the puborectalis muscle (33% superior) and external anal sphincter (45.2% middle), secondary to childbirth.



**Complementary figure 8.** Proposed schematic representation of (A) normal internal anal sphincter physiology and (B) pathophysiology of anal fissure. nAChR indicates nicotinic receptor; Ach, acetylcholine; mAChR, muscarinic receptor; NO, nitric oxide; GC, guanilate cyclase; VPAC, VIP/PACAP receptors; ICC, interstitial cells of Cajal; nNOS, neural NOS and iNOS, inducible NOS.

## **DISCUSION GENERAL**

El canal anal es la porción distal del tracto digestivo y tiene la fundamental función de evitar las evacuaciones involuntarias o una defecación socialmente incorrecta, manteniendo constantemente la continencia fecal. El primer factor responsable del mecanismo de continencia es el esfínter anal interno (EAI) y su musculatura lisa circular, esfínter que mantiene alrededor del 70% del tono basal del canal anal, junto con la colaboración de un estado de contracción tónica de los músculos estriados del esfínter anal externo y del suelo pélvico que contribuyen al 30% restante. Tan importante como mantener la continencia es poder permitir la expulsión del bolo fecal del tracto digestivo durante la defecación, proceso que se lleva a cabo mediante el reflejo recto-anal inhibitorio (RAIR) y la maniobra defecatoria. El RAIR se desencadena por distensión rectal al alcanzar el umbral de almacenamiento de las heces en el recto, se estimulan las neuronas intrínsecas inhibitorias descendentes que producirán una relajación transitoria del EAI y la consiguiente defecación asociada a un pujo abdominal y la relajación voluntaria del esfínter anal externo. Todo este proceso que a simple vista parece sencillo, reviste una compleja interacción entre componentes musculares liso y estriado del aparato esfinteriano, inervación intrínseca y extrínseca, y neurotransmisión inhibitoria y excitatoria; o visto de manera global, una sincronización de la actividad autonómica con la actividad voluntaria. Para estudiar los mecanismos de relajación, contracción y control del tono del EAI, con el fin de conocer su fisiología y luego plantear teorías sobre la fisiopatología de la fisura anal, hemos utilizado dos modelos experimentales animales, el cerdo y la rata, y posteriormente en esta tesis doctoral hemos estudiado pacientes con fisura anal. De los modelos animales pudimos observar que la neurotransmisión nitrérgica y purinérgica tienen un rol fundamental en la relajación como en el control del tono del EAI, presentando una actividad complementaria y con funciones independientes para los neurotransmisores inhibitorios NO y el ATP (como se describen más adelante). Anatómicamente el canal anal de estos modelos y la fisiología del EAI es similar a la del humano pudiendo utilizarse como modelos experimentales, especialmente el porcino. Por último, con el estudio de los pacientes con fisura anal con técnicas funcionales (manometría anorrectal) e inmunohistoquímicas nos permitió integrar y relacionar los hallazgos de laboratorio con los que observamos en los pacientes y proponer una hipótesis fisiopatológica de la enfermedad. Los pacientes con fisura anal presentan un incremento significativo del tono del EAI, aquellos individuos que además desarrollaban un incremento en la actividad dinámica del EAI en forma de ondas superlentas presentaban mayor severidad en la

hipertonía, menor relajación del EAI y mayor post-contracción después del RAIR inducido por la distensión rectal. Si consideramos tanto los resultados encontrados en el estudio *in vivo* como los encontrados en los estudios *in vitro*, todo ello nos hace pensar que una alteración en la inervación nitrérgica del canal anal podría ser el mecanismo fisiopatológico responsable del desarrollo de la fisura anal, sin embargo, son necesarios estudios a nivel molecular para poder confirmar esta teoría y sobre todo comparar muestras de EAI humano (sano y patológico).

Los estudios básicos de fisiología en el EAI humano destinados a explorar su fisiología y explorar los neurotransmisores inhibitorios que participan en la relajación, cuales son los neurotransmisores excitatorios que producen contracción, o que mecanismo intra/extracelulares mantienen el tono miogénico del EAI son muy escasos. Esto ocasiona que a fecha de hoy la fisiopatología de dos enfermedades muy frecuentes y de gran coste social y sanitario como son la fisura anal y la incontinencia fecal sea poco conocida. A esto contribuye la lógica dificultad de obtención de muestras de EAI humano (tanto sano como patológico) que ha ocasionado que la gran mayoría de estudios se lleven a cabo en modelos animales (ratón, rata, porcino, cobaya, musaraña, etc.), asumiendo los inconvenientes fisiológicos al momento de extrapolar los resultados a la especie humana. Por otro lado la gran mayoría de los escasos estudios *in vitro* con EAI humano provienen de pacientes con neoplasia colorectal, situación que también conlleva inconvenientes cuando se quiere caracterizar la fisiología normal de éste esfínter. A pesar que de los neurotransmisores y los receptores del sistema nervioso entérico humano poseen grandes similitudes con los de otras especies, también se describen diferencias en la distribución de neurotransmisores, como ejemplo el monóxido de carbono (CO) en la rata se ha descrito que tiene una importante participación en la relajación del EAI (Rattan *et al.*, 2004). Sin embargo, en los experimentos con EAI porcino observamos que el CO tiene un papel secundario (Opazo *et al.*, 2009); la colocalización del VIP y la acetilcolintransferasa en el plexo submucoso humano no coincide con las neuronas secretomotoras identificadas en el tracto gastrointestinal de cobayo (Schemann & Neunlist, 2004). Las IPANs difieren en su codificación química, en la distribución en la red neuronal intestinal, en sus propiedades eléctricas y sinápticas entre los grandes y pequeños mamíferos (porcino vs. cobaya), así como, los receptores opioides de las motoneuronas aferentes del intestino delgado porcino son predominantemente las del tipo delta a diferencia del cobaya que son tipo mu (Brown & Timmermans, 2004). Por lo tanto, esta diferencias inter-especie demuestra la complejidad del sistema nervioso entérico, por lo que la correcta elección del modelo animal para suplir la limitada disponibilidad de tejido humano para estudios neurogastrointestinales es fundamental. Esto es especialmente importante para el desarrollo

de nuevas dianas farmacológicas para uso en humanos, debiendo escoger modelos animales con semejanza fisiológica y anatómica como sería el caso del porcino, el cual presenta una estructura y patrón neuroquímico muy similar al sistema nervioso entérico del hombre (Brown & Timmermans, 2004).

En esta tesis se utilizó tejido de tres especies distintas: en el capítulo 1 se utilizó tejido de porcino para caracterizar la neurotransmisión inhibitoria y excitatoria del EAI y del músculo longitudinal del canal anal; en el capítulo 2 se utilizó tejido de rata para correlacionar la neurotransmisión nitrérgica y purinérgica en la actividad mecánica y electrofisiológica del EAI; y en el último capítulo se estudiaron pacientes con fisura anal aguda y crónica, analizando las manometrías ano-rectales y realizando histologías de las biopsias del EAI obtenidas como parte del tratamiento de pacientes con fisura anal crónica. En esta tesis se utilizaron técnicas *in vitro* como baño de órgano, microelectrodos e inmunohistología, y una prueba funcional clínica *in vivo* como la manometría ano-rectal y de imagen como la ecografía endoanal.

**Técnicas de estudio.** Las técnicas que hemos utilizado para los estudios de fisiología son:

- *Baño de órgano.* Esta técnica permite estudiar de la actividad motora, el tono y la respuesta a estimulación eléctrica de campo de las motoneuronas del plexo mientérico con muestras de pequeño tamaño de músculo liso. Permite evaluar el efecto de la adición exógena de los posibles neurotransmisores, y utilizando antagonistas específicos evaluar la respuesta sobre el tono, estimulación eléctrica y la motilidad.
- *Microelectrodos.* Esta técnica electrofisiológica permite medir el potencial de membrana de una célula muscular lisa, estimular selectivamente las neuronas inhibitorias o excitatorias para observar una hiperpolarización o despolarización del potencial de membrana, IJPs inducidos o IJPs espontáneos. Permite evaluar el efecto por adición exógena de los posibles neurotransmisores sobre el potencial de membrana y el efecto de diferentes antagonistas sobre los IJPs.
- *Manometría ano-rectal convencional y de alta resolución.* Esta técnica evalúa la función motora del ano y recto *in vivo*, registrando los cambios de presión dentro del canal anal. Permite evaluar la actividad tónica o fásica del EAI, y por medio de diferentes maniobras evaluar la capacidad de relajación del esfínter anal interno o de contracción del esfínter anal externo. Por ejemplo, es una técnica fundamental para el diagnóstico de la enfermedad de Hirschprung donde hay una ausencia del reflejo recto-anal inhibitorio.

Para los estudios morfológicos hemos utilizado las siguientes técnicas:

- *Descripción anatómica comparada del canal anal.* Se hizo una descripción macroscópica de las estructuras encontradas en el canal anal porcino y rata, para compararlas con las estructuras anatómicas descritas en el canal anal humano.
- *Histología convencional e inmunohistoquímica.* Estas técnicas permiten estudiar la estructura microscópica de los tejidos estudiados, y utilizando anticuerpos que se unen de forma específica a un receptor, demostrando su presencia o ausencia en el tejido, permitiendonos estudiar la estructura del SNE del EAI.
- *Ecografía endoanal:* esta técnica permite evaluar la estructura del canal anal, pudiendo cuantificar grosor, longitud, posición de las distintas porciones como posibles alteraciones patológicas (cicatrices en músculo, trayectos fistulosos, etc.).

### **Tono basal del canal anal**

El canal anal mantiene la continencia fecal mediante la presión basal del EAI, y la participación complementaria del esfínter anal externo, del músculo puborectal y del músculo elevador del ano (estos tres últimos músculos de tipo estriado) que contribuyen en un 30% de la presión basal del canal anal. El esfínter anal externo envuelve al EAI y hace que la interpretación del origen del tono basal del canal anal en estudios *in vivo* en hombre o en modelo animal sea un poco más dificultosa (Frenckner & Euler, 1975; Bhardwaj *et al.*, 2000). Sin embargo, el tono de origen miogénico del EAI representa alrededor del 70% del tono basal del canal anal y es considerado como el factor primario en la continencia rectoanal en reposo (Bhardwaj *et al.*, 2000), seguido de una contribución parcial del esfínter anal externo que puede evaluarse mediante bloqueo anestésico espinal (Duthie & Watts, 1965; Culver & Rattan, 1986). El tono miogénico producido por la célula muscular lisa del EAI es dependiente del calcio extracelular que ingresa a la célula a través de los canales de calcio tipo L, como hemos observado en los estudios *in vitro* en porcino y rata, donde el bloqueo de estos canales por medio de una dihidropiridina como es la nifedipina o el diltiazem, o eliminando el calcio del medio extracelular utilizado en el baño de órgano, producen la inmediata caída del tono muscular, el cual es reversible al reintroducir el calcio (Opazo *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2010). Este principio lo vemos reflejado a su vez en el tratamiento clínico de la fisura anal, donde una de las medidas farmacológicas para disminuir la hipertonia del EAI es utilizar diltiazem. Ahora bien, se conoce la vía entrada de calcio en la célula muscular lisa pero los mecanismos intracelulares que mantienen el tono miogénico no están del todo caracterizados, aunque recientemente se ha identificado a las enzimas Rho kinasas y sus proteínas asociadas RhoA/ROCK como las principales moléculas en el mecanismo de control

de este tono miogénico (Rattan *et al.*, 2006; Patel & Rattan, 2007). Según estos estudios las proteínas RhoA/ROCK pueden estimular o inhibir la fosforilación de la “*myosin light chain*<sub>20</sub>” (MLC<sub>20</sub>) al activar la “*myosin light chain kinase*” (MLCK) para fosforilar (y producir contracción), o inhibiendo la “*myosin light chain phosphatase*” (MLCP) para desfosforilar (y producir relajación) la MLC<sub>20</sub>. Estos estudios abren nuevas vías para el conocimiento de la fisiología y sobretodo el manejo farmacológico de la presión basal del canal anal en el hombre, utilizando fármacos que nos permitan manipular farmacológicamente estos mecanismos intracelulares para disminuir (en fisura anal) o aumentar (en incontinencia fecal) el tono miogénico del EAI.

Además de los mecanismos intracelulares que mantienen el tono miogénico, el tono del EAI, también está modulado por la actividad tónica de las motoneuronas mientéricas y por la inervación simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo (Rattan & Shah, 1987; Shibamoto *et al.*, 1994; Brading & Ramalingam, 2006; Cobine *et al.*, 2007). La estimulación de los nervios simpáticos produce aumento del tono o contracción cuando se estimulan los receptores alfa-adrenérgicos (Burleigh, 1983; Yamato & Rattan, 1990), o una disminución del tono o relajación al estimular los receptores beta-adrenérgicos (Banwait & Rattan, 2003; Rathi *et al.*, 2003). En esta tesis hemos observado el antagonismo de la contracción o relajación inducida eléctricamente con fentolamina (bloqueador receptores alfa-adrenérgicos) o propranolol (bloqueador receptores beta-adrenérgicos) respectivamente en el EAI porcino. En cambio, la estimulación de los nervios parasimpáticos producen sólo relajación del EAI (Rattan & Shah, 1987). Los receptores nicotínicos son responsables de la conexión entre las fibras parasimpáticas y las motoneuronas entéricas, y en nuestros estudios hemos observado como la estimulación de estos receptores nicotínicos utilizando nicotina induce una intensa relajación del EAI porcino y una relajación e hiperpolarización del EAI de la rata, efectos antagonizados por hexametonio (un bloqueador de los receptores nicotínicos ganglionares y no de los receptores muscarínicos). Los receptores purinérgicos P2X pueden compartir estructura con los receptores nicotínicos ya que el lugar de unión del ligando (agonista) y el canal iónico son partes de una misma estructura y se localizan en las neuronas sinápticas tipo S (Galligan, 2002). Hemos observado que la adición exógena del agonista purinérgico  $\alpha\beta$ -Me-ATP produjo una relajación moderada de las tiras de EAI porcino, aunque es discutible la selectividad de éste fármaco ya que podría también estimular receptores P2Y. En nuestros estudios, esa relajación inducida en el EAI porcino por el  $\alpha\beta$ -Me-ATP la bloqueamos tanto con antagonistas de los receptores P2X (NF279) como P2Y<sub>1</sub> (MRS2179). Por otro lado, la estimulación de los receptores serotoninérgicos ionotrópicos (*ligand-gated ion channels*)



produjeron una contracción del EAI porcino, efecto parcialmente bloqueado con la neurotoxina TTX, indicando la presencia de estos receptores a nivel de las motoneuronas colinérgicas, y evidenciando un papel en la neurotransmisión sináptica.

### **Neurotransmisión inhibitoria del esfínter anal interno**

La relajación del EAI está mediada por la neurotransmisión inhibitoria intrínseca que se activa durante el reflejo rectoanal inhibitorio (O'Kelly, 1996), el cual es fundamental para una adecuada eliminación del bolo fecal. La neurotransmisión inhibitoria es una neurotransmisión compleja donde participan los neurotransmisores no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) (Burnstock, 2004; Rattan, 2005). En nuestros estudios *in vitro* hemos utilizado tanto la nicotina como la estimulación eléctrica de campo para producir la estimulación de las neuronas presentes en la preparación. Cabe destacar que la nicotina produjo una estimulación selectiva de las neuronas inhibitorias observando tanto relajación del EAI como hiperpolarización de la célula muscular lisa del EAI, a diferencia de la estimulación eléctrica transmural que estimuló tanto las neuronas inhibitorias como excitatorias observando relajación y contracción del EAI. De la respuesta observada con nicotina podemos inferir que las fibras parasimpáticas sacras estimularían los receptores nicotínicos ubicados sólo en las motoneuronas inhibitorias. La estimulación eléctrica transmural podría considerarse de forma general similar a lo que sucede en el reflejo rectoanal inhibitorio (Rattan & Singh, 2011), donde al inflar un balón rectal se activan los receptores mecánicos-sensoriales de la mucosa rectal estimulándose a su vez las neuronas intrínsecas que desencadenan la neurotransmisión inhibitoria.

Nuestros resultados sugieren que el principal neurotransmisor que participa en la relajación del EAI es el óxido nítrico (NO). Este gas soluble cumple con los distintos criterios para ser un neurotransmisor, como son: a) un efecto directo de relajación sobre el músculo liso del EAI o hiperpolarización de la célula muscular lisa; b) un bloqueo selectivo de la estimulación neural inhibitoria utilizando inhibidores selectivos de la sintasa del óxido nítrico; c) la presencia de la maquinaria para la biosíntesis, degradación y/o recirculación en las neuronas inhibitorias del EAI; d) la liberación del neurotransmisor desde la neurona inhibitoria y el mecanismo de acción del NO requieren la estimulación de un receptor o proteína enzimática en la membrana de la célula muscular lisa que desencadena una cascada de señales que producen la relajación del músculo liso, vía la GMP cíclico, seguido de una disminución del calcio intracelular, salida de potasio e hiperpolarización de la membrana celular, e inhibición de la maquinaria molecular que mantiene el tono basal (RhoA/ROCK) y

sus vías asociadas (Rattan, 2005; Patel & Rattan, 2007). Este papel fundamental del NO como principal neurotransmisor inhibitorio lo hemos visto tanto en nuestros experimentos en tejido porcino como en la rata. La relajación mecánica inducida eléctricamente o mediante la estimulación de los receptores nicotínicos en el EAI porcino y de la rata está mediada principalmente por NO, ya que al bloquear la NOS con la adición de L-NNA o L-NAME, la amplitud de la relajación se reduce en alrededor de un 50%. A su vez, la amplitud de la hiperpolarización inducida por nicotina también es disminuida por L-NNA, fármaco que también bloquea el componente lento de los IJPs inducidos eléctricamente. Ambos resultados sugieren que el NO es el neurotransmisor inhibitorio más importante en la relajación del EAI. Resultados similares han sido encontrados en otros modelos animales como en ratón (McDonnell *et al.*, 2008) o musaraña (Rattan *et al.*, 1992). Una estructura anatómica tan importante dentro del tracto digestivo como es el EAI no puede depender de un solo neurotransmisor para relajarse, ni de la liberación de un solo neurotransmisor desde las motoneuronas. Burnstock en los 70' describe los mecanismos de co-transmisión al observar la liberación de más de un neurotransmisor desde una neurona y la consiguiente acción de éstos sobre receptores postsinápticos, produciendo una respuesta excitatoria o inhibitoria (Burnstock, 2004). En el EAI y en distintos estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando diferentes especies animales y tejido humano, se ha descrito la participación de purinas (ATP), péptidos (VIP o PACAP) y monóxido de carbono (CO), principalmente. Como pudimos observar en nuestro primer estudio en porcino (Opazo *et al.*, 2009), VIP y PACAP producen una relajación sostenida y marcada, en cambio las purinas a través de los receptores P2Y<sub>1</sub> una relajación rápida y breve. Por otro lado, el CO no tuvo una acción significativa en nuestro estudio a diferencia de lo que describen en rata (Rattan *et al.*, 2004) donde produce una marcada relajación del EAI, evidenciando un posible efecto especie-dependiente de este neurotransmisor. Esto nos da una idea de la complejidad de la neurotransmisión NANC inhibitoria, y la posibilidad de interacción y participación de distintos neurotransmisores. En un estudio *in vivo* con manometría anorectal utilizando ratones knock-out para la sintasa de NO (incapaces por tanto de producir NO), se observó que la relajación del EAI inducida por el reflejo rectoanal inhibitorio era aparentemente normal, sugiriendo una compensación de la deficiencia del NO por parte de los otros neurotransmisores NANC –como el ATP, VIP o CO- (Jones *et al.*, 2003). En cambio, los pacientes con la enfermedad de Hirschsprung, que se caracterizan por la ausencia de los ganglios mientéricos a nivel recto-anal y la consecuente deficiencia completa de neurotransmisores inhibitorios, no presentan el reflejo rectoanal

inhibitorio (O'Kelly et al., 1994), demostrando la importancia de la inervación intrínseca y la interacción que existe entre los neurotransmisores NANC.

Siguiendo con la neurotransmisión inhibitoria en el segundo capítulo de la tesis estudiamos lo que a nuestro parecer consideramos las principales vías de neurotransmisión inhibitoria del EAI; la neurotransmisión nitrérgica y la purinérgica en un modelo experimental de rata. Para ello estudiamos tanto la respuesta mecánica como la electrofisiológica, incorporando la técnica de microelectrodos que nos permite estudiar las características eléctricas de la célula muscular lisa y de los cambios que se generan al utilizar fármacos (agonistas o antagonistas) en el potencial en reposo de la membrana celular o al estimular eléctricamente o mediante fármacos las motoneuronas de la preparación. Además, esta técnica nos permite correlacionar la actividad mecánica (relajación) obtenida en baño de órganos con la eléctrica (hiperpolarización) medida con microelectrodos. Por ello hemos realizado los mismos protocolos experimentales en ambas técnicas con el fin de correlacionar la respuesta eléctrica con la mecánica. En este estudio utilizamos un antagonista de los receptores P2Y<sub>1</sub> -el MRS2500- más selectivo y específico que el que habíamos utilizado previamente (el MRS2179), y que además, no se había utilizado anteriormente en estudios con EAI. Hasta ahora los antagonistas purinérgicos utilizados eran inespecíficos (como PPADS, suramina, apamina, etc.) o de menor selectividad o potencia (MRS2179). De nuestros resultados pudimos observar que la estimulación eléctrica de campo o la estimulación selectiva de las neuronas inhibitorias mediante nicotina produjeron una relajación o hiperpolarización mediada por una co-liberación de NO y ATP (o una purina relacionada), y que ambos neurotransmisores tienen funciones complementarias. El NO es liberado de forma tónica por parte de las motoneuronas inhibitorias regulando el tono del EAI y el potencial de membrana de la célula muscular lisa, además, y es el responsable del segundo componente (o lento) del IJP. En cambio, el ATP mediaría el primer componente (o rápido) del IJP y los IJPs espontáneos (Opazo *et al.*, 2010). Electrofisiológicamente es importante destacar que el EAI de la rata mantiene un potencial de membrana en reposo de -51mV en promedio, presentándose IJPs espontáneos de entre 1 a 10 mV de amplitud y potenciales de acción (spikes) de variada amplitud, a su vez, en el baño de órgano el EAI desarrolla actividad mecánica con contracciones fásicas espontáneas y tono miogénico. Tanto los spikes como las contracciones fásicas espontáneas, y no los IJPs espontáneos, fueron bloqueados con la nifedipina, sugiriendo que los canales de calcio tipo L juegan un papel importante en la génesis o regulación de las contracciones espontáneas y en cambio no participan en la liberación de neurotransmisores inhibitorios.

### **Neurotransmisión excitatoria del músculo longitudinal del canal anal y esfínter anal interno**

En el hombre, el músculo longitudinal del canal anal, la continuación de la capa muscular externa del recto está formado por musculatura lisa y algunas fibras de musculatura estriada, predominando histológicamente la musculatura lisa (Macchi *et al.*, 2008). Su fisiología es mayormente desconocida, existiendo muy pocos estudios que están orientados principalmente a determinar su estructura anatómica. En nuestros estudios mecánicos en baño de órganos del capítulo 1 pudimos observar que las tiras de músculo longitudinal del canal anal porcino no desarrollaron tono ni contracciones espontáneas y que la estimulación eléctrica de campo produjo una contracción frecuencia-dependiente. Más aún, al pre-contrair las tiras con carbacol (un agonista muscarínico) tampoco observamos relajación tras la estimulación eléctrica o al estimular los receptores nicotínicos con nicotina. Esta contracción eléctrica tiene un origen en las fibras neurales colinérgicas (al ser bloqueada por la neurotoxina TTX y por atropina), y no de las fibras alfa-adrenérgicas (al ser insensible a fentolamina). Esta respuesta farmacológica es interesante ya que podría indicarnos la función de éste músculo longitudinal dentro de la compleja fisiología del canal anal. Es bien sabido que la actividad parasimpática en los esfínteres (incluido el EAI) tiene un efecto inhibitorio mientras que en el tracto digestivo no esfinteriano, tiene un efecto excitatorio (Parks *et al.*, 1969; Bass *et al.*, 1970). Por lo tanto, si vemos la actividad de ambos músculos lisos de forma conjunta podríamos decir que al momento de la defecación estimulada por el reflejo rectoanal inhibitorio, el músculo longitudinal del canal anal se contraerá mientras que el EAI se relaja, produciendo un acortamiento del canal anal que favorece la expulsión de las deposiciones. En el apéndice 1, hemos incluido una figura (Complementary figure 12) que es un esquema representativo de la relación entre EAI y músculo longitudinal del canal anal porcino con la neurotransmisión que proponemos como modulación estas capas musculares.

Por otra parte, la neurotransmisión excitatoria del EAI estaría mediada principalmente con neurotransmisión colinérgica y alfa-adrenérgica (Bhardwaj *et al.*, 2000). En nuestro estudios también pudimos observar que la contracción inducida eléctricamente fue bloqueada tanto por atropina y fentolamina. Además, evidenciamos farmacológicamente la presencia de otros neurotransmisores excitatorios que producen contracción del EAI como son la serotonina y sustancia P (neurokinina). En el estudio con EAI porcino, la adición exógena de estos dos neurotransmisores produjo una contracción de las tiras de EAI, indicándonos esta respuesta que en el tejido encontramos receptores serotoninérgicos y receptores de neuroquinina, y al estimularlos se desencadena una respuesta a nivel muscular. Además, la

respuesta a serotonina fue bloqueada parcialmente por la neurotoxina TTX y la contracción inducida por sustancia P fue antagonizada al bloquear los receptores NK2. Esta respuesta de la sustancia P también ha sido descrito *in vitro* en colon sigma humano (Auli *et al.*, 2008). Estos neurotransmisores pueden participar tanto a nivel sináptico como neuroefector, habiéndose encontrado en diversas neuronas mientéricas con proyección de sus axones en sentido oral o aboral (Galligan & Parkman, 2007). Los receptores serotoninérgicos también han sido identificados en las células intersticiales de Cajal (ICC) indicando que podría modular la actividad rítmica y la neurotransmisión de la célula muscular lisa (Liu *et al.*, 2005). En otro estudio *in vitro* los autores demostraron que la serotonina favorecía la transmisión neuromuscular (Gonzalez & Puig, 1997), por lo que clínicamente se utilizan agonistas serotoninérgicos especialmente los 5HT<sub>4</sub> como procinéticos en pacientes con alteraciones de la motilidad gastrointestinal (Galligan & Vanner, 2005).

### **Anatomía e histología del canal anal**

El EAI es un anillo muscular liso visible como un engrosamiento de la porción final de la capa muscular lisa circular, y forma el cierre distal del aparato digestivo como pudimos observar en los distintos estudios realizados en los capítulos 1 y 2 (ver complementary figure 1 del apéndice 1 y 2). Al igual que en el resto del tubo digestivo, la musculatura lisa circular va acompañado externamente por el músculo longitudinal, y que la porción distal de sus fibras atraviesan la porción subcutánea del esfínter anal externo contactando con el tejido perianal. Existe discrepancia respecto a la morfología y estructura del músculo longitudinal del canal anal, encontrando estudios que lo describen como músculo estriado (Petros, 2004) o una fusión de fibras del músculo puborectal y muscular lisa proveniente del recto (Macchi *et al.*, 2008). Histológicamente nosotros observamos que el músculo longitudinal del canal anal en el cerdo está conformado mayormente por musculatura lisa y que la porción distal de sus fibras contienen abundante tejido conectivo que alcanza la dermis. Independientemente de esta discrepancia, hay que tener en cuenta que el músculo longitudinal del canal anal existe y puede tener una implicación significativa en la fisiopatología de algunas enfermedades ano-rectales benignas como por ejemplo el prolapso rectal o las hemorroides. Este músculo presenta diferencias mecánicas con la capa circular (como demostramos en el capítulo 1) donde la estimulación eléctrica de tiras de músculo longitudinal del canal anal produjo solo una contracción a diferencia de las tiras del EAI que presentan relajación seguida de contracción (Opazo *et al.*, 2009). El esfínter anal externo, muy importante en la continencia voluntaria, puede dividirse en tres (Fritsch *et al.*, 2002) o dos porciones (Uz *et al.*, 2004)

dependiendo del estudio: subcutánea, superficial y profunda. La porción profunda es la que está en controversia respecto a si forma parte del esfínter externo o al músculo puborectal. En las preparaciones utilizadas en los estudios del capítulo 1 y 2 se pudo observar fácilmente las porciones superficial y subcutánea del esfínter anal externo. La porción superficial del esfínter anal externo rodea de forma completa al EAI mientras que la porción subcutánea envuelve el extremo más distal del esfínter interno. Debido a la ubicación anatómica estas dos porciones permiten controlar y/o impedir una evacuación de forma voluntaria durante un período de tiempo limitado ya que estos fascículos están compuestos de fibras musculares fatigables de tipo “fast switch” (Bharucha, 2006).

De los estudios histológicos desarrollados en esta tesis podemos destacar que el EAI está formado por varios haces musculares envueltos por tejido conectivo que forman un gran músculo (Opazo *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2010). En cambio la capa longitudinal es una capa muscular compacta sin casi tejido conectivo entre sus fibras musculares. En una publicación reciente (Cobine *et al.*, 2010) hace referencia a esta distribución concluyendo que el EAI podría comportarse como un gran conjunto de subunidades musculares. Esta característica anatómica-histológica la hemos encontrado tanto en el EAI de la rata, del porcino y del hombre. Esta conformación podría tener una implicación del punto de vista funcional, ya que le permitiría seguir cumpliendo su función de mantener la continencia a pesar de presentar algún daño parcial en su estructura. Algunas diferencias anatómicas encontradas en el canal anal entre las tres especies utilizadas fue que en la rata, a diferencia del porcino y el ser humano, no presenta tejido adiposo entre la capa longitudinal y circular lisa mientras que el cerdo presenta un importante espacio interesfinteriano, y la ausencia de glándulas anales y de sus conductos atravesando el EAI. Del punto de vista clínico, estas glándulas tienen importancia ya que se cree son las originarias de las fístulas o abscesos anales en el hombre.

Mediante las técnicas inmuno-histoquímicas que utilizamos en muestras obtenidas de las tres especies pudimos inmunolocalizar:

- Fibras nerviosas y ganglios mientéricos del plexo mientérico entre la capa muscular circular y longitudinal, y fibras nerviosas entre las fibras musculares del EAI utilizando las tinciones anti-HuD, S100 o NSE.
- Células de la Glia en los ganglios mientéricos marcadas con la tinción S100. Con respecto a estas células se desconoce su implicación en la fisiología del EAI y menos aún en sus patologías. Sin embargo, de forma general se describe que tienen una función de soporte y nutrición a las fibras nerviosas del sistema nervioso autónomo. Pero este desconocimiento en la participación de estas células ha ido cambiando hace unos años, abriéndose varias

líneas de investigación para conocer el comportamiento de estas células en procesos inflamatorios intestinales (Wang *et al.*, 2010).

- Células intersticiales de Cajal (ICC) marcadas con la tinción CD-117, las encontramos ubicadas individualmente y en escaso número entre los paquetes musculares del EAI y en el plexo mientérico. Cabe mencionar que un estudio reciente realizado en la Clínica Mayo, la técnica de inmunomarcaje utilizando bloques de parafina fijados con formalina (que hemos realizado nosotros) quizás no es la más adecuada para realizar una cuantificación de ICC en la preparación, concluyendo que la técnica recomendada sería la inmunofluorescencia (Garrity *et al.*, 2009). Sin embargo, nosotros sólo queríamos determinar la presencia o ausencia de éstas células en la preparación de EAI y su localización, no cuantificarlas. Las ICC poseen tres funciones principales; generar un mecanismo marcapaso que media las contracciones espontáneas, facilitar la propagación de fenómenos eléctricos entre las células musculares ya que se encuentran unidas por uniones abiertas “gap-junctions” a ellas, que podrían mediar la neurotransmisión al encontrarles receptores para determinados neurotransmisores, y que podrían actuar como mecanoreceptores (Sanders *et al.*, 2010). Las ICC pueden encontrarse a lo largo de tracto digestivo formando una red extensa en los plexos nerviosos (mientérico o submucoso) o como células aisladas entre las fibras musculares. En un estudio reciente del 2010, se describió que en el EAI existe solo un tipo morfológico de ICC que tendría una función marcapaso al estar ubicada principalmente entre las fibras musculares lisas, y no estarían involucradas en la neurotransmisión inhibitoria al presentar una limitada relación anatómica con las estructuras neurales (Cobine *et al.*, 2010). De estos hallazgos más los descritos por Mutafova-Yambolieva (2003) en estudios en los que la frecuencia mecánica de las ondas lentas presentan una elevada correlación con las oscilaciones eléctricas registradas por microelectrodos (Mutafova-Yambolieva *et al.*, 2003), podríamos inferir que las ondas lentas desarrolladas *in vitro* por las tiras de EAI (porcino) o las ondas lentas observadas en las manometrías ano-rectales de los pacientes con fisura anal podrían ser originadas por las ICC.
- Por otro lado y por primera vez -hasta donde conocemos- hemos inmunolocalizados receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> en el EAI utilizando un anticuerpo anti-P2Y<sub>1</sub>. Estos receptores presentaron una amplia distribución en el canal anal, localizándose mayormente en el tejido muscular del EAI y del músculo longitudinal del canal anal, y en algunos ganglios del plexo mientérico. Pero además, con menor marcaje en el músculo estriado del esfínter anal externo y en la zona submucosa del canal anal (ver

Del estudio histológico del capítulo 3 es importante resaltar que el EAI de los pacientes con fisura anal crónica presentan cambios estructurales e histológicos importantes. Pensamos que estos cambios podrían tener una relevancia mayor a la atribuida hasta ahora a la fisiopatología de esta enfermedad. A mayor tiempo de evolución de la enfermedad se puede ver mayor pérdida de las fibras musculares del EAI siendo éstas reemplazadas por fibrosis. En los casos de fisura mas crónicos que observamos en el ultimo capítulo, la fibrosis podía alcanzar 2/3 de la biopsia y si recordamos que las biopsias eran obtenidas opuestamente a la ubicación de la fisura, esto nos muestra el daño que puede producirse en todo el EAI. Este cambio histológico se ha descrito que puede reducir la compliance del EAI pero no la capacidad de relajación neuromuscular (Brown *et al.*, 1989). Sin embargo, no se ha estudiado la correlación que pueda existir entre la pérdida de masa muscular con la pérdida de la inervación funcional (inhibitoria o excitatoria) al esfínter. Otro punto importante que observamos en estas histologías fue la presencia de un infiltrado inflamatorio de tipo leucocitario con predominio de neutrófilos y linfocitos entre las fibras muscular lisas del EAI. Esta infiltración inflamatoria si puede tener una implicancia directa en la fisiopatología de la fisura anal, ya que metabolitos de la COX-1 (De Godoy *et al.*, 2009a) como por ejemplo la prostaglandina F-2alfa producen aumento del tono en tiras de EAI *in vitro* como pudimos observar en el capítulo 2 del estudio en rata, o como describen en tiras de EAI de ratón (McDonnell *et al.*, 2008). Si esto lo extrapolamos al hombre, esta prostaglandina podría estimular receptores de membrana como las subunidades de la proteína G-alfa<sub>12/13</sub> que a su vez activan la vía RhoA/ROCK aumentando el tono basal del esfínter anal (De Godoy *et al.*, 2009a). Otra alternativa no estudiada todavía podría ser una alteración en el balance en la isoenzimas de la sintasa del óxido nítrico (NOS). En condiciones fisiológicas, la NOS-neural es fundamental para el correcto desarrollo del reflejo recto-anal inhibitorio y la NOS-endotelial regularía el tono del canal anal (Terauchi *et al.*, 2005). Sin embargo la actividad de la NOS-inducible en procesos inflamatorios del EAI no está descrita. En un estudio de enfermedad inflamatoria intestinal en rata, los autores demostraron que en las etapas activas de esta patología se produce una aumento de la NOS-inducible con hipomotilidad y una elevada infiltración inflamatoria con translocación bacteriana en el intestino (Porras *et al.*,



2006). Con estos antecedentes sería importante estudiar la relación de las isoenzimas de la NOS o de las COX en el EAI de individuos sanos y en pacientes con fisura anal. Además, si consideramos que en el tratamiento inicial de la fisura anal se utilizan pomadas con corticoides y que en algunos pacientes responden favorablemente, se debería abrir nuevas líneas de investigación en la vía inflamatoria y sus subproductos, para comprender más sus interacciones con el tono del esfínter anal. Finalmente, del punto de vista estructural e histológico estos dos modelos animales presentan una elevada similitud con el canal anal humano, pudiendo ser modelos animales validados para estudios de la fisiología del EAI, sobretodo considerando la dificultad que envuelve la obtención de tejido humano sano como patológico.

### **Fisura anal**

En el último capítulo hemos evaluado la función del EAI analizado la fisiología del EAI en pacientes con fisura anal aguda y crónica e interpretado los hallazgos encontrados y tratando de establecer una correlación fisiopatológica con los capítulos anteriores. Los pacientes con fisura anal presentan signos característicos de esta patología como son: una úlcera posterior a la unión muco-cutánea con sangramiento y dolor durante o posterior a la defecación, y una hipertonia del canal anal. Dependiendo del estado de la patología pueden aparecer lesiones secundarias producto de la cronicidad de la enfermedad (papiloma centinela, bordes de la úlcera fibrosado, hemorroides, etc.). Como esta patología se caracteriza por la hipertonia del canal anal el tratamiento está orientado principalmente a reducir el tono del EAI, utilizando herramientas farmacológicas (donante de óxido nítrico, bloqueadores canales de calcio, toxina botulínica) y en último caso procedimientos quirúrgicos como esfínterotomía lateral interna (Lund *et al.*, 2006).

Nuestros principales hallazgos de las manometrías anorectales de los pacientes con fisura anal fueron en primer lugar un incremento en la actividad tónica del EAI que ocasionó una elevada presión del canal anal, con una presión media de 100 mmHg y presión máxima en promedio de 140 mmHg. Teniendo en cuenta que la presión arterial es de 80 mmHg, esta hipertensión anal se ha descrito que colapsa las arterias anales distales impidiendo la irrigación sanguínea de la zona ano-cutánea (Schouten *et al.*, 1994; Lund *et al.*, 1999). Esta isquemia favorecería el desarrollo de la úlcera e impediría su correcta cicatrización. Se ha demostrado que al disminuir la hipertensión anal, farmacológica o quirúrgicamente, se facilita la cicatrización de la úlcera (Schouten *et al.*, 1996; Lund, 2006a). El segundo hallazgo es la presencia de aumento de la actividad fásica espontánea del EAI con desarrollo de ondas lentas

y ondas superlentas. Las ondas lentas como ya he mencionado anteriormente se evidencian en gran porcentaje en individuos sanos en cambio las segundas se presentan mayormente en procesos patológicos del canal anal. Las encontramos en el ~95% de nuestros pacientes con fisura, presentan una frecuencia de ~15 ondas/minuto y su origen puede ser, como ya mencioné anteriormente, en las ICC. En las tiras de EAI porcino, la frecuencia y amplitud de estas ondas no fueron afectadas por la neurotoxina TTX indicándonos que no son originadas a nivel neural y por tanto, apoyando nuestra hipótesis. Por otro lado, la ondas superlentas estaban presentes en el 69% de los pacientes con fisura, presentaban una frecuencia de 1,3 ondas/minuto, y teniendo como antecedente que se desarrollan mayormente cuando hay procesos patológicos del canal anal, decidimos estudiar si habían diferencias en la motilidad del canal anal entre los pacientes que presentaban ondas superlentas y los que no las presentaban, y observamos que los individuos con ondas superlentas presentaban:

1. una mayor hipertonia del canal anal,
2. una menor relajación del EAI inducida por el reflejo recto-anal inhibitorio,
3. una mayor prevalencia de post-contracción (*overshoot*) después del reflejo recto-anal inhibitorio, y
4. una extensión (longitud) menor del canal anal participa en la relajación.

Estos resultados podrían ser un indicador de un mayor daño del EAI, indicando gravedad o cronicidad de la fisura anal. Hasta ahora se desconoce el origen y función de las ondas superlentas, aunque están bien descritas en las patologías benignas del canal anal (Hancock, 1976; Read *et al.*, 1982; Waldron *et al.*, 1989; Yoshino *et al.*, 2007) y se sugiere que tienen un origen en el EAI (Schouten & Blankensteijn, 1992). Nosotros también creemos que las ondas superlentas tienen un origen en el EAI (dado que no observamos cambios en la actividad EMG de superficie) y probablemente se originan como consecuencia de un desequilibrio en el control o balance del calcio intracelular. Como hemos discutido anteriormente, el calcio ingresa a la célula muscular lisa a través de los canales de calcio voltaje dependientes como los de tipo L, estos están influenciados por el potencial de membrana de la célula muscular lisa, que a su vez se encuentra modulado por factores neurohumorales (angiotensinogeno), neurales (simpático o intrínseco) y/o por subproductos de la inflamación (COX, prostaglandina F2alfa). Además, estas ondas pudimos bloquearlas solo con la adición de nifedipina en el baño de órganos y no con la neurotoxina TTX, apoyando la teoría de su origen muscular. Como anécdota, en el Neurogastroenterology and Motility del 2009 en Chicago donde presentamos parte de los resultados del estudio de los pacientes con fisura anal y las ondas superlentas, tuvimos la oportunidad de compartir opinión con las Drs. C. Cobine y

K. Keef (investigadores de la universidad de Nevada USA que tienen una importante trayectoria en el estudio del EAI) respecto a cual podría ser el origen de estas ondas superlentas, compartiendo con nosotros, la posibilidad de un origen muscular en el EAI, pero manteniendo la incertidumbre sobre cual sería la causa desencadenante de estas ondas.

El tercer hallazgo es que todos los pacientes con fisura anal crónica desarrollaron un reflejo recto-anal inhibitorio (RAIR) después de inflar un balón rectal (a los casos agudos no se les realizó esta maniobra por el marcado dolor que se podía desencadenar). Esto indica que a pesar de existir esta hipertonia del EAI, la neurotransmisión inhibitoria intrínseca del canal anal en estos pacientes es capaz de producir la relajación del EAI. Lamentablemente no existen estudios donde se defina objetivamente un RAIR “normal”, especialmente la amplitud de la relajación inducida, el tiempo de duración y el regreso al tono previo del EAI. Lo que si se conoce bien es la morfología del RAIR, que consiste en que al inflar el balón rectal se produce un leve incremento de la presión anal inducida por el esfínter anal externo seguido de la relajación del EAI y caída de la presión anal, y finalmente un retorno a la presión anal previa relajación (Stahl, 2006). Por primera vez, nosotros describimos diferencias en el RAIR en los pacientes con fisura anal ya que los pacientes que presentaban las ondas superlentas tenían una menor amplitud y menor abertura longitudinal en la relajación del EAI. Esto sugiere que en pacientes con fisura anal y ondas superlentas, si pudiéramos correlacionar estos eventos, pueden presentar una deficiencia de NO o de la NOS-neural/endotelial, y que éstos son fundamentales para un correcto desarrollo del RAIR (Terauchi *et al.*, 2005). En este punto cabe recordar las posibles compensaciones que se podrían producir entre los distintos neurotransmisores inhibitorios que podrían desarrollar un RAIR y relajación del EAI aparentemente normal, a pesar de existir una deficiencia de algún neurotransmisor como se demostró con ratones knock-out para la NOS (Jones *et al.*, 2003). Cabe recordar que hemos observado la presencia de fibrosis e infiltrado inflamatorio con predominio de neutrófilos y linfocitos entre las fibras de músculo liso circular en las biopsias de EAI de pacientes con fisura anal crónica. Este hallazgo es relevante del punto de vista que si es una enfermedad inflamatoria, se producirán distintos metabolitos de la inflamación, que como ya mencioné anteriormente pueden afectar el tono del EAI, sobretodo prostaglandina F2alfa y tromboxano, o alteraciones en el balance de las isoenzimas de la sintasa de óxido nítrico. Además, hay que considerar que un 26% de pacientes con fisura anal presentan concomitantemente fístulas anales transfisurarias y un 42% papiloma centinela, lo cual favorece una respuesta inflamatoria. Sin embargo, se necesitan estudios con técnicas moleculares como RT-PCR que facilitarían la medición de las isoenzimas de la NOS como de las COX.

El último hallazgo relevante que observamos en los pacientes con fisura anal es que la capacidad de contracción del esfínter anal externo la encontramos deficiente en alrededor del 20% de los pacientes estudiados, predominando las mujeres en comparación a los hombres. Ello es debido a un daño del puborectal, esfínter externo y la musculatura pélvica estriada secundaria a lesiones obstétricas derivadas del parto, lesiones estructurales que confirmamos ecográficamente. Esto tiene una gran importancia en el momento de la elección del tratamiento de la fisura, sobretodo si nos planteamos una opción quirúrgica, ya que si una paciente presenta lesiones del esfínter anal externo o en el músculo puborectal y se le realiza una esfínterotomía, existe un alto riesgo de que desarrolle incontinencia fecal. Por lo tanto, se recomienda practicar una manometría ano-rectal para evaluar la función del esfínter externo a todos los pacientes (especialmente las pacientes) con fisura anal a los cuales se les realizará una esfínterotomía.

Para finalizar haré una propuesta fisiopatológica relacionando alguno de los hallazgos encontrados en las manometrías ano-rectales de los pacientes con fisura anal con alguno resultados obtenidos en los estudios *in vitro* de los capítulos 1 y 2 en porcino y rata, basándonos en nuestra hipótesis inicial, que la fisura anal se produciría por una deficiencia del óxido nítrico o de la NOS-neural:

1. *In vitro*, en las tiras de EAI porcino y de rata hemos demostrado que el bloqueo de la liberación tónica de NO por medio de L-NNA o L-NAME para inhibir la NOS produce una despolarización de la membrana celular de la célula muscular lisa y el consiguiente aumento del tono basal del EAI. En los pacientes con fisura anal se produce marcada hipertonía o aumento de la presión del canal anal, existiendo un estudio que demuestra una menor presencia de NOS en el EAI de pacientes con fisura comparado con EAI de individuos sano (Lund, 2006b).
2. *In vitro*, la relajación inducida eléctricamente se reduce de forma significativa después de bloquear la NOS con L-NNA o L-NAME, y la contracción observada después de la relajación se ve significativamente incrementada, en comparación a la respuesta encontrada en las tiras de EAI en situación control (sin antagonista). En algunos pacientes con fisura anal, principalmente aquellos que desarrollan ondas superlentas, presentan una menor relajación del EAI y además una mayor incidencia de post-contracción después de inducir el reflejo recto-anal inhibitorio. Muy similar a lo encontrado con el bloqueo de la NOS en los experimentos *in vitro*.

Por lo tanto, un posible teoría sobre la fisiopatología de la fisura anal podría ir orientada a que la elevada presión del EAI podría deberse a un potencial de membrana menos

negativo que podría aumentar la probabilidad de abertura de los canales de calcio voltaje dependientes, permitiendo una corriente de calcio que favorece los spikes e incrementa el tono miogénico. Al producirse un estímulo *in vitro* como la estimulación eléctrica transmural o *in vivo* como reflejo rectoanal inhibitorio, se estimulan las motoneuronas inhibitorias liberando neurotransmisores inhibitorios, una sincronización de los IJPs espontáneos y la relajación del EAI. Ahora bien, esto no deja de ser una visión resumida de la fisiopatología de esta enfermedad, porque resulta difícil concluir desde estudios *in vitro* mecánicos y eléctricos, los diversos y complejos mecanismos fisiológicos que interaccionan en el control del tono del EAI, como las posibles interacciones de las sustancias neurohumorales que pueden producirse en un proceso inflamatorio como las COX (De Godoy *et al.*, 2009a), sistema renina-angiotensina (De Godoy & Rattan, 2005) y las Rho kinasa (Patel & Rattan, 2007; Rattan *et al.*, 2010), las cuales pueden modificar o alterar de forma directa o indirecta los niveles de calcio intracelular, el responsable final de la contracción muscular.

Con respecto a las posibles implicaciones terapéuticas en pacientes con fisura anal para disminuir la hipertonía del EAI, podemos decir que nosotros en los estudios *in vitro* utilizamos diferentes principios activos que produjeron una caída reversible del tono del EAI. La **nicotina** produjo una estimulación selectiva de las motoneuronas inhibitorias y una potente relajación del EAI porcino como de la rata, mediada principalmente por los neurotransmisores NANC. En tiras de EAI humano (Burleigh *et al.*, 1979) también observó que la relajación inducida por nicotina era también mediada por neurotransmisores NANC. Sin embargo, este agonista no ha sido probado en casos clínicos para conocer su potencial uso farmacológico en patologías anales que cursan con hipertonía. La **nifedipina** y **diltiazem** son dihidropiridinas que produjeron una caída importante del tono del EAI porcino de tipo reversible, indicándonos una participación fundamental de los canales de calcio tipo L en la génesis del tono miogénico (ver complementary figure 7 apéndice 1). El **agonista selectivo de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>** (ADPβS por ejemplo) produce una relajación del EAI de menor potencia y menor duración que las dihidropiridinas o el NO. Así mismo, al antagonizar estos receptores purinérgicos también se produce una disminución de la relajación inducida eléctricamente. Pero su acción farmacológica ha sido probada en modelos animales *in vitro* como *in vivo* pero no en estudios en pacientes o individuos sanos. Los **inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA)** o los **bloqueadores de los receptores AT1** (como el losartan) son otras vías farmacológicas interesantes que por ahora han sido probados en estudios *in vivo* con ratas hipertensas, mostrando resultados positivos en disminuir la presión sanguínea y colateralmente disminuyendo la presión del canal anal (De Godoy &

Rattan, 2006). Como antecedente en el hombre, en un estudio *in vitro* e *in vivo* se ha observado que losartan fue capaz de inhibir la contracción inducida por angiotensina II en el cuerpo esofágico y en el esfínter esofágico humano (Casselbrant *et al.*, 2007), pero faltan estudios específicos en el EAI en pacientes con fisura anal y en individuos sanos para determinar su actividad. Por todo esto, siguen habiendo opciones para desarrollar nuevas vías terapéuticas para el tratamiento de la fisura anal, teniendo en cuenta además, que según una revisión de la Cochrane solo los donantes de NO, los bloqueadores de canales de calcio y la toxina botulínica fueron significativamente superiores (pero de forma marginal, sólo un 10% de efecto terapéutico adicional) que el placebo en cicatrizar la fisura anal, pero que además, presentan una elevada recurrencia del 50% los pacientes con fisura anal (Nelson, 2006). Nos agradecería que un día nuestros estudios incluidos en esta tesis contribuyeran al hallazgo de un tratamiento más específico para los muchos pacientes que sufren esta enfermedad.

**Bibliografía**

- Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M & Clave P. (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.
- Banwait KS & Rattan S. (2003). Role of nitric oxide in beta3-adrenoceptor activation on basal tone of internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G547-555.
- Bass DD, Ustach TJ & Schuster MM. (1970). In vitro pharmacologic differentiation of sphincteric and non-sphincteric muscle. *Johns Hopkins Med J* **127**, 185-191.
- Bhardwaj R, Vaizey CJ, Boulos PB & Hoyle CH. (2000). Neuromyogenic properties of the internal anal sphincter: therapeutic rationale for anal fissures. *Gut* **46**, 861-868.
- Bharucha AE. (2006). Pelvic floor: anatomy and function. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 507-519.
- Brading AF & Ramalingam T. (2006). Mechanisms controlling normal defecation and the potential effects of spinal cord injury. *Prog Brain Res* **152**, 345-358.
- Brown AC, Sumfest JM & Rozwadowski JV. (1989). Histopathology of the internal anal sphincter in chronic anal fissure. *Dis Colon Rectum* **32**, 680-683.
- Brown DR & Timmermans JP. (2004). Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 50-54.
- Burleigh DE. (1983). Non-cholinergic, non-adrenergic inhibitory neurons in human internal anal sphincter muscle. *J Pharm Pharmacol* **35**, 258-260.
- Burleigh DE, D'Mello A & Parks AG. (1979). Responses of isolated human internal anal sphincter to drugs and electrical field stimulation. *Gastroenterology* **77**, 484-490.
- Burnstock G. (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* **4**, 47-52.
- Casselbrant A, Edebo A, Wennerblom J, Lonroth H, Helander HF, Vieth M, Lundell L & Fandriks L. (2007). Actions by angiotensin II on esophageal contractility in humans. *Gastroenterology* **132**, 249-260.
- Cobine CA, Fong M, Hamilton R & Keef KD. (2007). Species dependent differences in the actions of sympathetic nerves and noradrenaline in the internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **19**, 937-945.
- Cobine CA, Hennig GW, Bayguinov YR, Hatton WJ, Ward SM & Keef KD. (2010). Interstitial cells of Cajal in the cynomolgus monkey rectoanal region and their relationship to sympathetic and nitrenergic nerves. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G643-656.

- Culver PJ & Rattan S. (1986). Genesis of anal canal pressures in the opossum. *Am J Physiol* **251**, G765-771.
- De Godoy MA, Rattan N & Rattan S. (2009). Arachidonic acid metabolites follow the preferential course of cyclooxygenase pathway for the basal tone in the internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**, G727-734.
- De Godoy MA & Rattan S. (2005). Autocrine regulation of internal anal sphincter tone by renin-angiotensin system: comparison with phasic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G1164-1175.
- De Godoy MA & Rattan S. (2006). Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor subtype 1 inhibitors reconstitute hypertensive internal anal sphincter in the spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 725-734.
- Duthie HL & Watts JM. (1965). Contribution of the External Anal Sphincter to the Pressure Zone in the Anal Canal. *Gut* **6**, 64-68.
- Frenckner B & Euler CV. (1975). Influence of pudendal block on the function of the anal sphincters. *Gut* **16**, 482-489.
- Fritsch H, Brenner E, Lienemann A & Ludwikowski B. (2002). Anal sphincter complex: reinterpreted morphology and its clinical relevance. *Dis Colon Rectum* **45**, 188-194.
- Galligan JJ. (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**, 611-623.
- Galligan JJ & Parkman H. (2007). Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility and functional bowel disorders. *Neurogastroenterol Motil* **19 Suppl 2**, 1-4.
- Galligan JJ & Vanner S. (2005). Basic and clinical pharmacology of new motility promoting agents. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 643-653.
- Garrity MM, Gibbons SJ, Smyrk TC, Vanderwinden JM, Gomez-Pinilla PJ, Nehra A, Borg M & Farrugia G. (2009). Diagnostic challenges of motility disorders: optimal detection of CD117+ interstitial cells of Cajal. *Histopathology* **54**, 286-294.
- Gonzalez AA & Puig MM. (1997). Ondansetron facilitates neuromuscular transmission in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* **328**, 201-206.
- Hancock BD. (1976). Measurement of anal pressure and motility. *Gut* **17**, 645-651.
- Jones OM, Brading AF & Mortensen NJ. (2003). Role of nitric oxide in anorectal function of normal and neuronal nitric oxide synthase knockout mice: a novel approach to anorectal disease. *Dis Colon Rectum* **46**, 963-970.
- Liu M, Geddis MS, Wen Y, Setlik W & Gershon MD. (2005). Expression and function of 5-HT4 receptors in the mouse enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G1148-1163.



- Lund JN. (2006a). 0.4% nitroglycerin ointment in the treatment of chronic anal fissure pain : a viewpoint by Jonathan N. Lund. *Drugs* **66**, 350-352.
- Lund JN. (2006b). Nitric oxide deficiency in the internal anal sphincter of patients with chronic anal fissure. *Int J Colorectal Dis* **21**, 673-675.
- Lund JN, Binch C, McGrath J, Sparrow RA & Scholefield JH. (1999). Topographical distribution of blood supply to the anal canal. *Br J Surg* **86**, 496-498.
- Lund JN, Nystrom PO, Coremans G, Herold A, Karaitianos I, Spyrou M, Schouten WR, Sebastian AA & Pescatori M. (2006). An evidence-based treatment algorithm for anal fissure. *Tech Coloproctol* **10**, 177-180.
- Macchi V, Porzionato A, Stecco C, Vigato E, Parenti A & De Caro R. (2008). Histo-topographic study of the longitudinal anal muscle. *Clin Anat* **21**, 447-452.
- McDonnell B, Hamilton R, Fong M, Ward SM & Keef KD. (2008). Functional evidence for purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the mouse internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G1041-1051.
- Mutafova-Yambolieva VN, O'Driscoll K, Farrelly A, Ward SM & Keef KD. (2003). Spatial localization and properties of pacemaker potentials in the canine rectoanal region. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G748-755.
- Nelson R. (2006). Non surgical therapy for anal fissure. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003431.
- O'Kelly TJ. (1996). Nerves that say NO: a new perspective on the human rectoanal inhibitory reflex. *Ann R Coll Surg Engl* **78**, 31-38.
- O'Kelly TJ, Davies JR, Tam PK, Brading AF & Mortensen NJ. (1994). Abnormalities of nitric-oxide-producing neurons in Hirschsprung's disease: morphology and implications. *J Pediatr Surg* **29**, 294-299; discussion 299-300.
- Opazo A, Lecea B, Admella C, Fantova M, Jiménez M, Martí-Ragué J & Clavé P. (2009). A Comparative Study of Structure and Function of the Longitudinal Muscle of the Anal Canal and the Internal Anal Sphincter in Pigs. *Dis Colon Rectum* **52**, 1902-1922.
- Opazo A, Lecea B, Gil V, Jimenez M, Clave P & Gallego D. (2010). Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil*.
- Parks AG, Fishlock DJ, Cameron JD & May H. (1969). Preliminary investigation of the pharmacology of the human internal anal sphincter. *Gut* **10**, 674-677.
- Patel CA & Rattan S. (2007). Cellular regulation of basal tone in internal anal sphincter smooth muscle by RhoA/ROCK. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1747-1756.

- Petros PE. (2004). *The Female Pelvic Floor: Function, Dysfunction and Management According to the Integral Theory*.
- Porras M, Martin MT, Torres R & Vergara P. (2006). Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G423-430.
- Rathi S, Kazerounian S, Banwait K, Schulz S, Waldman SA & Rattan S. (2003). Functional and molecular characterization of beta-adrenoceptors in the internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **305**, 615-624.
- Rattan S. (2005). The internal anal sphincter: regulation of smooth muscle tone and relaxation. *Neurogastroenterol Motil* **17 Suppl 1**, 50-59.
- Rattan S, Al Haj R & De Godoy MA. (2004). Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G605-611.
- Rattan S, De Godoy MA & Patel CA. (2006). Rho kinase as a novel molecular therapeutic target for hypertensive internal anal sphincter. *Gastroenterology* **131**, 108-116.
- Rattan S, Phillips BR & Maxwell PJt. (2010). RhoA/Rho-kinase: pathophysiologic and therapeutic implications in gastrointestinal smooth muscle tone and relaxation. *Gastroenterology* **138**, 13-18 e11-13.
- Rattan S, Sarkar A & Chakder S. (1992). Nitric oxide pathway in rectoanal inhibitory reflex of opossum internal anal sphincter. *Gastroenterology* **103**, 43-50.
- Rattan S & Shah R. (1987). Influence of sacral nerves on the internal anal sphincter of the opossum. *Am J Physiol* **253**, G345-350.
- Rattan S & Singh J. (2011). Basal internal anal sphincter tone, inhibitory neurotransmission, and other factors contributing to the maintenance of high pressures in the anal canal. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 3-7.
- Read MG, Read NW, Haynes WG, Donnelly TC & Johnson AG. (1982). A prospective study of the effect of haemorrhoidectomy on sphincter function and faecal continence. *Br J Surg* **69**, 396-398.
- Sanders KM, Hwang SJ & Ward SM. (2010). Neuroeffector apparatus in gastrointestinal smooth muscle organs. *J Physiol* **588**, 4621-4639.
- Schemann M & Neunlist M. (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 55-59.
- Schouten WR & Blankensteijn JD. (1992). Ultra slow wave pressure variations in the anal canal before and after lateral internal sphincterotomy. *Int J Colorectal Dis* **7**, 115-118.

- Schouten WR, Briel JW & Auwerda JJ. (1994). Relationship between anal pressure and anodermal blood flow. The vascular pathogenesis of anal fissures. *Dis Colon Rectum* **37**, 664-669.
- Schouten WR, Briel JW, Auwerda JJ & De Graaf EJ. (1996). Ischaemic nature of anal fissure. *Br J Surg* **83**, 63-65.
- Shibamoto T, Chakder S & Rattan S. (1994). Role of hypogastric nerve activity in opossum internal anal sphincter function: influence of surgical and chemical denervation. *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 277-284.
- Stahl TJ. (2006). Anorectal Physiologic Testing in Anal Fissure Disease. *Semin Colon Rectal Surg* **17**, 140-146.
- Terauchi A, Kobayashi D & Mashimo H. (2005). Distinct roles of nitric oxide synthases and interstitial cells of Cajal in rectoanal relaxation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G291-299.
- Uz A, Elhan A, Ersoy M & Tekdemir I. (2004). Internal anal sphincter: an anatomic study. *Clin Anat* **17**, 17-20.
- Waldron DJ, Kumar D, Hallan RI & Williams NS. (1989). Prolonged ambulant assessment of anorectal function in patients with prolapsing hemorrhoids. *Dis Colon Rectum* **32**, 968-974.
- Wang H, Hughes I, Planer W, Parsadonian A, Grider JR, Vohra BP, Keller-Peck C & Heuckeroth RO. (2010). The timing and location of glial cell line-derived neurotrophic factor expression determine enteric nervous system structure and function. *J Neurosci* **30**, 1523-1538.
- Yamato S & Rattan S. (1990). Role of alpha adrenoceptors in opossum internal anal sphincter. *J Clin Invest* **86**, 424-429.
- Yoshino H, Kayaba H, Hebiguchi T, Morii M, Ito W, Chihara J & Kato T. (2007). Multiple clinical presentations of anal ultra slow waves and high anal pressure: megacolon, hemorrhoids and constipation. *Tohoku J Exp Med* **211**, 127-132.

## **CONCLUSIONES**

1. La motilidad de la capa circular del esfínter anal interno porcino incluye un tono miogénico, una relajación mediada por la estimulación de motoneuronas inhibitorias que liberan óxido nítrico y una purina (ATP) que actúa a través de receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub> situados en las células musculares lisas. Y una contracción fásica mediada por motoneuronas colinérgicas y fibras simpáticas a través de receptores alfa-adrenérgicos.
2. La motilidad del músculo longitudinal del canal anal porcino se limita a una contracción mediada principalmente por la estimulación de neuronas colinérgicas sobre receptores muscarínicos. La acción complementaria del EAI sugiere que el músculo longitudinal se contrae durante la relajación del esfínter anal interno, acortando el canal anal y favoreciendo la expulsión del material fecal.
3. En la relajación del esfínter anal interno de la rata se produce una co-transmisión funcional entre las vías nitrérgica y purinérgica (a través de receptores P2Y<sub>1</sub>), con una actividad complementaria y específica con las siguientes características:
  - a. El óxido nítrico es liberado de forma tónica controlando el tono miogénico y el potencial de la membrana celular, produciendo una relajación del esfínter anal interno y una hiperpolarización de la célula muscular lisa, además, participa en el segundo componente de los IJPs.
  - b. El ATP (o un componente purinérgico similar) se libera de forma fásica y a través de los receptores P2Y<sub>1</sub> controla los IJPs espontáneos y el componente rápido de los IJPs.
4. Estructuralmente e histológicamente el canal anal porcino presenta una elevada similitud con el canal anal humano; el canal anal de la rata se diferencia con el canal anal porcino y humano, por no presentar glándulas anales ni sus conductos. Sin embargo, ambos modelos animales (porcino y rata) son útiles para su utilización en estudios de fisiología y función del esfínter anal interno humano.

5. Los pacientes con fisura anal aguda y crónica presentan una motilidad del esfínter anal interno alterada, con un incremento de la actividad tónica (hipertonía, aumento del tono basal) y un aumento en la actividad rítmica espontánea representada por las ondas lentas y superlentas.
6. Los pacientes con fisura anal que presentan ondas superlentas presentan una alteración motora más severa con mayor hipertonia del esfínter anal interno, una menor relajación del esfínter anal interno en respuesta a la distensión rectal (reflejo rectoanal inhibitorio) y un incremento de la amplitud de la post-contracción después de inducir el reflejo rectoanal inhibitorio por distensión rectal.
7. Histológicamente el esfínter anal interno de pacientes con fisura anal crónica presentan una marcada fibrosis con una pérdida de músculo liso circular, y la presencia de un infiltrado celular inflamatorio con predominio de neutrófilos y linfocitos.
8. Nuestro estudio sugiere que el principal mecanismo para la disfunción del esfínter anal interno en los pacientes con fisura anal sería una alteración en la vía nitrérgica intrínseca inhibitoria. Una alteración en la liberación tónica de óxido nítrico favorecería el desarrollo de las ondas superlentas y lentas, mientras que un daño en la liberación fásica de este neurotransmisor sería el responsable de la disminución de la relajación del esfínter anal interno.