



**CONSORCI SANITARI  
DEL MARESME**



**Universitat Autònoma de Barcelona**

# **Estudio in vitro de la fisiología del esfínter esofágico inferior y de la motilidad del cuerpo esofágico humano y porcino**

**Memoria presentada por María Begoña Lecea López  
para optar al grado de Doctor**

**Programa de Doctorado en Neurociencias**

**Hospital de Mataró, mayo 2013**

**HOSPITAL DE MATARÓ  
Unitat d'Exploracions Funcionals Digestives**

**CIBEREHD  
Centro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas  
Instituto de Salud Carlos III**

**FACULTAT DE VETERINÀRIA  
Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i d'Immunologia  
Universitat Autònoma de Barcelona**

**Tesis doctoral dirigida por Dr. Pere Clavé i Civit  
Tutora de la tesis doctoral: Dra. Patrocínio Vergara Esteras**

**María Begoña Lecea López**

**Director de la tesis doctoral: Dr. Pere Clavé i Civit**

**Tutora de la tesis doctoral: Dra. Patrocinio Vergara Esteras**



CONSORCI SANITARI  
DEL MARESME



Universitat Autònoma de Barcelona

PERE CLAVÉ i CIVIT, Coordinador de la Unitat d'Exploracions Funcionals Digestives de l'Hospital de Mataró, Consorci Sanitari del Maresme y Profesor asociado del Departament de Cirurgia de la Universitat Autònoma de Barcelona

HAGO CONSTAR

Que la memoria titulada *“Estudio in vitro de la fisiología del esfínter esofágico inferior y de la motilidad del cuerpo esofágico humano y porcino”* presentada por MARÍA BEGOÑA LECEA LÓPEZ para optar al grado de Doctor, llevada a cabo 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 veintisiete de mayo de 2013

Dr. Pere Clavé i Civit, MD, PhD<sup>1,3</sup>.  
Director de la tesis

Dra. Patrocinio Vergara Esteras, DMV, PhD, DipECLAM<sup>2,3</sup>  
Tutora de la tesis

<sup>1</sup>Unitat d'Exploracions Funcionals Digestives–Departament de Cirurgia de l'Hospital de Mataró  
Profesor Asociado. Departament de Cirurgia, Universitat Autònoma de Barcelona

<sup>2</sup>Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i D'immunologia. Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona

<sup>3</sup>CIBEREHD, Centro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Instituto de Salud Carlos III



**El dibujo/imagen de la portada es un esquema de la anatomía y de la fisiología del esófago humano. A la derecha, se observan los trazados representativos que muestran la morfología de las respuestas mecánicas inducidas mediante estimulación eléctrica de campo (EFS) de las motoneuronas (MNs) del plexo mientérico (MP) en el cuerpo esofágico (EB) y en el esfínter esofágico inferior (LES) humanos.**



## AGRADECIMIENTOS

*Cómo empezar los agradecimientos en una tesis doctoral...qué difícil y emocionante a la vez, es como hacer un viaje en el tiempo. Solo comenzar a recordar y ya tengo un nudo en la garganta, mejor dicho, un nudito esofágico que en este caso quedaría más apropiado. Y creo que voy a hacerlo cronológicamente como si contara una historia, ya que así sucedió. Lo que son las cosas, todo empezó con un grano en un pie, así entré en el laboratorio 115.*

*Al **Dr. Pere Clavé**, director de la tesis, en primer lugar muchas gracias por darme la oportunidad de cumplir un sueño, la tesis doctoral. Gracias por todos los consejos, por las correcciones, por las revisiones de los manuscritos, por tu disponibilidad ante cualquier duda o cuestión que te planteara. Gracias por llevarme al matadero porque soy muy consciente de lo difícil que era cuadrar tu agenda. Y sobretodo por darme siempre tu opinión.*

*A la **Dra. Patri Vergara**, tutora de la tesis, muchas gracias por aceptar ser mi tutora. Gracias por tus consejos tanto científicos como personales.*

*A los miembros del tribunal, muchas gracias por aceptar la invitación y por el esfuerzo que conlleva.*

*A la **Fundación de Gastroenterología Dr. Francisco Vilardell**, por hacer posible que yo pudiera hacer esta tesis.*

*A los profesionales de los diferentes hospitales gracias a los cuales pude estudiar tejido humano: En el Hospital de Bellvitge, el **Dr. Leandre Farran** y las patólogas **Dra. M<sup>a</sup> José Paules** y **Dra. Teresa Serrano**. Y en particular, muchas gracias M<sup>a</sup> José por tu amabilidad, por preocuparte siempre tanto de las muestras como de mi, por tus ánimos y consejos. En el Hospital Clínic, el **Dr. Agustín Franco**, **Dr. Lluís Peri** y equipo. Muchas gracias por vuestra colaboración, por hacer todo lo posible para que todo fuera bien, por los experimentos compartidos en el 115, por vuestra amabilidad. En el Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, el profesor **Dr. Jaime Fernández-LLamazares**. En el Hospital del Mar, los doctores **Dr. Manuel Pera Román**, **Dra. Sonia Puig**, **Dr. Manuel Vial** y las patólogas **Dra. Mar Iglesias** y la **Dra. Laura López**. En el Hospital de Mataró, los doctores **Dr. Oscar Estrada**, **Dr. Fran Espín**, las patólogas **Dra. Carme Admella**, **Dra. M<sup>a</sup> José Fantova** y los técnicos **Jesús, Estíbaliz**, en particular gracias a **Óscar** y **Fran** por sus colaboraciones, a **Fran** por su buen humor, sus consejos y por hacer que la gente se sienta bien. A **Carme** y **M<sup>a</sup> José**, muchas gracias por vuestra amabilidad, por los consejos, por lo bien que nos sentíamos en Anatomía, por la sinceridad y honestidad, y por vuestra colaboración. A **Jesús**, mil gracias por hacer que mi trabajo fuese mucho más sencillo, por facilitarme cualquier cosa que necesitara aún invadiendo su espacio, por explicarme todo lo que desconocía y que necesitaba para el tratamiento de las muestras, por su simpatía y amabilidad. A **Esti**, muchas gracias también por ayudarme en lo que necesité, por tener siempre una palabra amable y por hacer que todo fuera más fácil.*

*Al **Escorxador Frigorífic Avinyó** por darme de forma desinteresada el tejido porcino utilizado en los capítulos primero y último de la tesis, a los veterinarios **Sr. Joan** y **Sr. Jordi**, a los profesionales **Lola**, **Neus** y **Mónica**. Muchas gracias por recibirme siempre con una sonrisa, por colaborar conmigo en todo aquello que os pidiera, porque siempre nos preguntabais por nosotros y por nuestro trabajo, e incluso por todos los que nos precedieron. Gracias por tratarme siempre tan bien.*

*Al **Sr. Jordi Cortés** de Bionic, muchas gracias por toda la ayuda que nos prestaste con los baños de órganos, porque cuando teníamos un momento crítico durante un experimento siempre podíamos contar con tu asesoramiento. Por tu paciencia al explicarnos los programas, por tu amabilidad. Al **Sr. José Cañis** de Cibertec, por conseguir construir unos magníficos electrodos y darnos todas las explicaciones necesarias requeridas por mí, con celeridad y mucha simpatía.*

*El 115 fue mi 1<sup>a</sup> segunda casa: allí compartí horas y horas, en épocas distintas, con Ricard, Emma, Mariona, Álvaro y Lorena como “residentes con mesa y super-silla” en el 115. En mis primeros tiempos,*

también estaban allí Ana Alcántara, Anna Domènech, Elena. Y cómo no, Diana, Víctor y Claudia también “bañistas”, aparte de “super-microelectrónicos”, compartiendo micropipetas que yo siempre olvidaba dejárselas a mano. ¡Qué momentazos con todos los “timers” sonando a la vez! Y en los últimos tiempos con Miriam.

En el departamento compartí también el tiempo tesinero con **Los becarios** (¡cual grupo de rock!), que pasaron de estar en una sala a estar en dos, y en un orden también cronológico, Hernán, Mónica, Yoli, Alicia, Gloria, Esther Jorge, Estefanía, Joan, Carol, Lina, Joan Antoni, Ferrán, compartimos cenas, salidas, amigos invisibles, merendolas en vuestra antigua sala-única de becarios, cumpleaños y vuestros propias tesis y proyectos. También allí en el departamento recordar a Antonio, Pepe y David. Y cómo no a Maite, Marcel, Patri, Jordi Aleu, los profesores del departamento que también han formado parte de esta tesis.

¡Qué deciros! Allá voy: a **Ana A.** te agradezco tu simpatía, energía y que siempre tuvieras una palabra amable. A ti **Anna D.**, todos los días que compartimos experimentos, las charlas sobre Coldplay y Orlando Bloom y los ánimos para sobrellevar los eternos días de experimento en el baño. Contigo **Elena** coincidí poquito en el 115, fue en mis inicios en el laboratorio y recuerdo, con una sonrisa, tu recibimiento y te agradezco esos primeros días en un lugar nuevo de trabajo.

A ti **Emma**, gracias por enseñarme todos los trucos del funcionamiento del baño de órganos, a lidiar con las disecciones del LES y a que siempre tuviera seda del nº 2. Tu ayuda inicial te la agradezco de veras. Contigo **Ricard**, compartí más la época en la que yo estaba a lucha batiente con el Bioensayo y menuda paciencia tuviste conmigo al respecto, muchas gracias por ello. Pero cómo olvidar las sesiones de música en el 115, con Sabina pero sobretudo con aquel “gran cantante” que le dedicaba una canción ¡al abuelo de Heidi! Gracias por tu apoyo a este trabajo desde Bélgica y por tus consejos, pero como ves soy cabezota como la que más. A ti **Mariona**, qué puedo decirte que tú no sepas, que eras nuestro “Sensei”, que fue fantástico trabajar contigo, no sabes cómo te agradezco que me enseñaras a organizar y encaminar los diferentes estudios. ¡Madre mía!, cuántas horas estuvimos ahí, codo con codo, currando, ¡con un record establecido a las 23.30h acabando un abstract! Tu apoyo, paciencia y capacidad de estar a 200 cosas a la vez ¡¡no tiene precio!! Por llevarme al matadero a por tejido en el Punto verde, escuchando seguramente a Coldplay. Y qué bonito era aquel atajo por aquel camino de árboles. ¡Muchas gracias! Los conciertos de Coldplay, Red Hot, y los musicales como Fama, Grease, José y la túnica multicolor, La Bella y la Bestia, Mamma Mía, Hoy no me puedo levantar.....gracias, de verdad. ¡Y por las horas y horas de darle a la sin hueso para arreglar el mundo! Gracias jefa por tu amistad. Y qué decir del viaje a Nueva York con vosotros, **Ricard** y **Mariona**, estuvo realmente muy bien y pedazo de “hotel” en Times Square ¡Gracias chicos! A ti **Victor**, ¡qué te voy a decir del 115! Muchas gracias por los millones de momentos alegres que nos regalabas en el laboratorio, los chistes buenos, malos y únicos que sólo tu podías contar, las bromas, las canciones. Porque compartir el 115 contigo ha sido un lujo, respecto al material, fármacos, tiempo, y sobretudo por las charlas serias y distendidas que allí tenían lugar, siempre que yo no llevara mis “auriculares mágicos”, je, je... Y sobretudo, muchas gracias por tu apoyo cuando fue necesario. A ti **Miriam**, muchas gracias por las interesantes conversaciones que teníamos, por los cafés y los momentos en el 115.

¡A vosotros **Álvaro** y **Diana** os veo luego en el apartado del beer-club! A ti **Lorena** también te veo luego.

Con vosotros **Hernán** “company”, **Mónica**, **Yoli**, **Estefanía**, **Esther** gracias por los buenos momentos en los congresos, a ti **Hernán** por tu cordialidad y por las visitas que nos hacías al 115. A vosotras **Mónica** y **Yoli** porque me acogisteis estupendamente en el grupo desde el principio y era genial hablar con vosotras de cualquier tema. A ti **Alicia**, por tu simpatía y la energía positiva que nos transmitías. A ti **Gloria**, por tu cordialidad, por tener siempre una palabra amable. A ti **Esther**, por las interesantes conversaciones que teníamos contigo, por contagiarnos tu fuerza y sobretudo por confiar en nosotros en el momento preciso, eso **Esther**, te lo agradeceré siempre. A ti **Estefanía**, por las conversaciones sobre libros, por darnos un ejemplo de fortaleza inmenso, por tu simpatía y por lo bien que siempre me trataste. A ti **Joan**, por tu sentido del humor, por las conversaciones superoriginales en las comidas y por tu amabilidad. A ti **Carol**, por tu sinceridad, tus bromas, tu honestidad y por las conversaciones sobre Coverdale & Page ¡y que viva el rock de los grandes! A ti **Lina**, por el cariño que siempre me transmitiste, por las veces que



hablamos de nuestras tesis, y los buenos consejos que saqué de ello. A ti **Joan Antoni**, por las horas que compartimos, tú en la “ussing chambers” y yo en el baño y que nos permitió hablar de todo lo relacionado con la tesis, por mostrarnos que con tenacidad y constancia se llega al final, por tu buen carácter. A ti **Ferrán**, por la música que ponías en el 115, por tu sentido del humor personal.

Contigo **Maite**, cuántas charlas tuvimos en cenas, cumpleaños, cafés y descansos en Fisio y que fue todo muy, muy agradable. Muchas gracias por tu confianza e interés por mis cosas, tus buenos consejos cuando los necesité. Por las conversaciones literarias, porque seguí tus recomendaciones y las tengo en lista de espera, especialmente “Lo que el viento se llevó”. Porque siempre encontrabas una palabra de ánimo. Mil gracias. A ti **Marcel**, te agradezco tu franqueza, tus bromas que nos permitían relativizar las cosas. Tu cooperación en los capítulos indicados, los consejos científicos, y tu ayuda siempre que te lo he pedido. Y sobretodo, gracias por el apoyo que nos brindaste cuando fue necesario. A ti **Patri**, te agradezco de nuevo, que hayas accedido a ser mi tutora. Tu sinceridad y consejos que nos dabas sobretodo cuando nos recordabas cómo era la investigación para las científicas años atrás. A ti **Jordi A.**, gracias por todos los buenos momentos que compartimos contigo, por las charlas de sobremesa y por los consejos. A ti **Ester**, te agradezco tu amabilidad, siempre preguntabas cómo iban las cosas y tenías una respuesta positiva.

A ti **Antonio**, muchísimas gracias por tu respuesta instantánea a cualquier problema que te planteara, y que además siempre era crítico ¡y un drama! Porque siempre encontrabas una solución que me permitía seguir con el experimento, que seguro que para mí era crucial. Así que gracias por tu paciencia, porque a pesar de los post-its que te dejaba en la mesa, de las veces que te pedía ayuda, incluso antes de que llegaras a sentarte en tu mesa a primera hora, siempre has sido afable, amable y cordial. Gracias por salvar mis momentos críticos. A ti **Pepe**, cómo olvidar tus bromas y sustos cuando entrabas al 115, es lo que tiene trabajar de espaldas a la puerta, por tu paciencia ante la cantidad de veces que te interrumpía al entrar en el despacho. A ti **David**, te agradezco tu amabilidad y buena disposición frente a cualquier cuestión que pudiera plantearte.

El Hospital de Mataró fue mi 2ª segunda casa: allí estuve trabajando los últimos años de la tesis.

Con **Viri**, **Lucía**, **Marisa**, **Irene**, **Laia**, **Dra. Silvia Jané**, **Cristina**, **Elisabet**, **Berta**, **Dr. Mateu Serra**, **Jane Lewis**, compartí momentos desde los primeros días, en una pequeña sala hasta estar ya instalados en el laboratorio del S2.

Contigo **Viri**, compartimos días de sigma plot en plenas Navidades cuando el 115 estaba helado como un témpano, conversaciones alegres y muy agradables en Mataró, en el tren, en el bus, y escapamos por muy poco a la super-nevada que colapsó Barcelona. Muchas gracias por escucharme, aconsejarme, opinar y apoyarme, y por tantos y tantos días en el hospi. Gracias. A tí **Lucía**, te agradezco tu sinceridad, tu genial sentido del humor, la cantidad de veces que conseguías arrancarnos una carcajada y tus prácticos consejos en los inicios. A ti **Marisa**, te agradezco tu honestidad y lo fácil y agradable que era compartir laboratorio contigo, tu disposición inmediata cuando necesitaba ayuda de cualquier tipo sobretodo relacionado con el etiquetado de farmacia. Por las anécdotas que nos contabas, así de repente, y que nos permitían desconectar de un gráfico “diabólico” o de un abstract que se nos resistía. A ti **Jane**, mil gracias por tus correcciones del inglés, por leer con todo detalle y paciencia manuscritos, abstracts y demás que te hacía llegar, dándome consejos y sugerencias y por los ánimos en cada manuscrito. ¡A ti **Laia**, te veo en el beer-club! A la **Dra. Silvia Jané**, muchas gracias por tu cordialidad y por tus consejos.

A ti **Cristina**, gracias por hacer que con tu trabajo, el mío fuera siempre mucho más sencillo. Porque a cada mail que yo te mandaba, daba igual sobre qué fuera, “comandes”, dudas, congresos, problemas con proveedores, contestabas siempre ipso-facto y resolviéndolo todo. Pero lo que recuerdo con más cariño es tu cordialidad, y amabilidad, vía mail o cada vez que yo iba a Recerca, siempre con prisa, y dejabas lo que estabas haciendo para ayudarme. Gracias **Cristina**, por conseguir que la logística no fuese mi peor pesadilla. Contigo **Elisabet**, compartí momentos en Recerca, con el sigma-plot y conversaciones agradables, muchas gracias por tu sinceridad y por hacernos un hueco en vuestro despacho. A ti **Berta**, gracias por compartir también un espacio del despacho, por las charlas espontáneas en el pasillo del hospi, por tener siempre mucho ánimo y dárnoslo a nosotros, por tu simpatía. A ti **Mateu**, muchas gracias por escucharme, aconsejarme y por tu amabilidad.

Contigo **Irene**, compartí muchos días de experimentos que fueron muy agradables. Gracias por las conversaciones en el baño, en la máquina de café, por tu comprensión, paciencia, tus ganas de trabajar y aprender, tu afán de superación, por el cariño que siempre me has demostrado y porque era muy fácil trabajar contigo. Gracias, de verdad.

A **Lorena** y **Claudia** quería hacerles una mención especial. A ti **Claudia**, infinitas gracias por tu capacidad para anticiparte a lo que era necesario, por tu fantástico buen humor, por poner siempre al mal tiempo buena cara, por tu sensibilidad y carácter, tu apoyo constante e incondicional. Siempre podía contar contigo **Claudia**, muchas gracias, de todo corazón. ¡Y porque siempre conseguías descifrar mis desvarios cuando yo estaba en pleno experimento a 4 timers! Y sobretodo, gracias por el apoyo cuando fue necesario. Gracias, por todo. A ti **Lorena**, gracias, gracias mil, porque llegaste en el momento oportuno al 115, por apoyarme en todo sin vacilar un ápice, por estar ahí las horas que hicieran falta y con una entrega incondicional, por tu comprensión y por querer ayudar en todo lo que pudieras y más. Te agradezco doblemente, y me quedo corta, los viajes al matadero a por tejido. Porque hacíamos los experimentos en los baños a dos manos, como “Nacho Cano” en concierto, y oye, nos apañamos la mar de bien. Un placer trabajar contigo **Lorena**, muchas, muchas gracias.

**The Beer-Club**: ¡Hola chicos! Nunca me cansaré de decirlo, qué buena idea son las reuniones del beer-club ¡Brindo por ellos, por ellos, y por nosotros! ¡Aquí estamos, y cuántas cosas me vienen a la memoria! ¡Hemos hablado, reído, contado chistes, discutido resultados, arreglado abstracts, diseñado estrategias, vuelto la tesis del derecho y del revés, encontrado soluciones, arreglado el mundo, el espacio, el universo y el infinito y más allá, hecho “terapia”, practicado “momentos zen”!

**Álvaro**, las veces que hablamos de este momento y lo lejos que lo veíamos, compartí contigo desde el minuto uno de la tesis, los cursos de doctorado, grande el de neuroquímica, los laboratorios, los viajes en todo tipo de transporte público, ¡sólo nos faltó un globo aerostático!, los viajes al matadero, las disecciones a contrarreloj, ¡las excel de los artículos!, el factor sorpresa, las risas, los llantos, los congresos, el 115, Recerca, el hospi.... Muchas gracias por el sinfín de consejos que me diste, por conseguir que un abstract no fuera la Espasa-Calpe, por la paciencia, por darnos siempre una perspectiva personal de las cosas y ¡que siempre funcionaba!, por sacarnos de nuestras conversaciones-bucle, porque conseguiste que recogiera cada vez más rápido, je,je, por las conversaciones sinfín, y mira que teníamos temas ¡eh!, por tus opiniones y tu apoyo, mil gracias.

¡Ay **Diana**! Qué días de experimentos compartimos, menudas maratones esofágicas vivimos, millones de gracias por tener siempre, a pesar de la complejidad de la situación, un ánimo superlativo que conseguía que yo me contagiara cuando el “timer” ya había sonado más de cuarenta veces ó cuando llegaba al 115 a contrarreloj. Muchas gracias por tu colaboración en los capítulos 2 y 3 por apoyarme en las revisiones, por ayudarme siempre que podías y cuando no podías, también. Por preocuparte por mí, por mi salud y por todas las “paranoias” que me solían asaltar, y que intentabas quitarle hierro con infinita paciencia. Muchas gracias por tus consejos, tu sinceridad, honestidad y porque siempre me has dicho las cosas como son. Porque ha sido genial trabajar contigo, hablar durante horas de todo lo que se nos pasaba por la cabeza, ¡incluso en el metro! Muchas gracias, **Diana**, por el apoyo cuando fue necesario. Por estar siempre dispuesta a colaborar para que todo fuera más agradable, cordial y amable laboral y personalmente. Gracias mil por tu amistad, así con mayúsculas, por estar ahí cuando mis neuronas se hicieron un nudo y no había forma de deshacerlo, por confiar en mis fuerzas, más incluso que yo misma. Por todo **Diana**, ¡gracias!

¡**Laia**! Cuántos días pasamos en el hospi y casi sin movernos de la silla, muchas gracias por hacer que trabajar en el hospi fuera muy, muy agradable, y mira que yo te interrumpía cada dos por tres. Un placer trabajar contigo, **Laia**, por tu serenidad, tus siempre acertados consejos y por ser mi correctora personal del catalán, porque siempre encuentras las palabras adecuadas y por ese sentido del humor que tiene su máximo exponente en los mails. Gracias, **Laia**, por el apoyo cuando fue necesario. Y mil gracias por escuchar, ayudar siempre que podías y más, porque podía contar contigo y, sobretodo, porque tú contabas con la gente. Por traernos tantos días desde el hospi, que hacía que viajáramos en un solo medio de transporte en vez de en tres, y además, era más divertido con música. Muchas gracias por animarme

también cuando mis neuronas se hicieron un nudito. Por estar ahí, por tu amistad gracias. ¡Y porque estamos de acuerdo que Tim Burton es muy grande! Y porque ponías una nota de cordura en estos miembros del *The Beer-Club*. Ha sido fantástico vivir esta tesis con vosotros.

Me gustaría dar las gracias de una forma especial al departamento de Electromedicina que me arreglaba los electrodos, me daban solución a cualquier problema que les planteara y todo con una amabilidad y cordialidad entrañables. También al grupo de trabajadores del Magatzem, porque me proporcionaban el material que necesitaba con un buen rollo y alegría que era muy divertido ir a buscar agujas, folders, postits, markers y demás.

Gracias también a la compañía de la luz por darle a esta tesis un toque de aventura, y por desarrollar mi capacidad de improvisación ya que siempre que se “fundían los plomos” yo, casualmente, tenía experimento, eso sí, cumplía a la perfección las leyes de Murphy, sin dejarme ni una.

Esta tesis no hubiera existido sin el apoyo incondicional de mi familia, ya que la frase que más han oído en estos últimos años ha sido “¡No puedo, tengo cosas que hacer de la tesis!”.

A todos mis primos **Ana** y **Guille**, **Nando** y **Mónica**, **Eduarne** e **Iñaki**, **Laura** y **Lucho**, **Iranzu**, **Iosune**, **Patxi Javi** y **Laura**, **Esti**, gracias por estar ahí, por los chistes, los mails; y tíos, **Nando** y **Rosy**, **Nieves** y **Luís**, **Ignacio**, **Joaquín** porque cada uno a vuestra manera me habeis apoyado y animado, y a los peques de la familia, **Bruno**, **Luna**, **Cristian**, **Kevin**, **Alain**, **Saioa**, **Naiara**, **Oiane** y **Martín** por darme toda su alegría, que es mucha, su ilusión, por reñirme por estar siempre trabajando, por los regalitos que me hicieron para mi mesa de trabajo, por ser unos soletes. A los amigos de la familia, **M<sup>a</sup> Dolors**, **Adolfo**, **Ferrán** y **Marta**, por preocuparos y estar ahí. Al resto de amigos, gracias también.

A mi tío **Joaquín**, porque a pesar de ser doctor en otros ámbitos, me has dado muy buenos consejos para esta tesis, gracias por escucharme y por las conversaciones más que interesantes sobre ciencia y religión y sobre los temas más diversos, por tus consejos literarios que me permitieron adentrarme en la historia y olvidar por un momento la ciencia. Porque puedo contar contigo, muchas, muchas gracias.

A mi hermano **Álex**, muchas gracias por tu paciencia, por todas las veces que me has salvado informáticamente hablando, incluso de madrugada, resolviendo cualquier problema que surgía, que fueron muchos y de lo más variado. Porque has estado ahí en los muchos imprevistos que han surgido en los últimos tiempos y que, a veces, no me facilitaban la concentración con normalidad. Por ayudarme con tu sentido práctico a no darle tantas vueltas a las cosas que me preocupan. ¡Y por todos los libros fantásticos que me has regalado!, y que me han permitido desconectar y adentrarme en otros mundos. Por ayudarme sin hacer preguntas y animarme siempre porque sabías lo que esta tesis significa para mí. ¡Mil gracias, **Alex!**

Y a mi madre, **M<sup>o</sup> Pilar** porque esta tesis no habría sido posible sin ella. Muchas gracias porque desde el primer momento en el que decidí embarcarme en esta aventura, dijiste “¡adelante!”. Por las miles de veces que escuchaste todas mis preocupaciones, y eran muchas, respecto a los experimentos, artículos, revisiones, esta memoria, congresos y que cuando ya pensabas que el tema no daba más de sí, yo volvía a retomararlo si cabe con más fuerza. ¡Qué paciencia! Porque con tu sentido práctico me has ayudado a tomar las cosas con más calma, y a tener otra perspectiva porque, a veces, las cosas vistas desde fuera tienen otro color. Y si algo me has enseñado es que cuesta muy poco hacer las cosas bien y agradecer todo lo bueno que nos llega en la vida. Muchas gracias, **mama**, por tu generosidad, tu paciencia, por aguantar como una jabata mis malos humores, pero también por celebrar conmigo mis alegrías, las publicaciones, congresos que eso siempre hace más ilusión. Y lo que no tiene precio, muchas gracias porque gracias a ti he podido cumplir este sueño, la tesis doctoral. Ojalá algún día pueda devolvarte todos tus desvelos volviendo a Guatemala, pero esta vez en Semana Santa. Nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que me has ayudado durante estos años. Gracias. Y a mi padre **Serafín**, porque le habría encantado estar aquí.

Querría dar las gracias también a un grupo de gente muy especial con intereses histórico-literarios, los hislibreños, y que gracias a ellos he podido desconectar, ha mejorado exponencialmente mi pequeña biblioteca y aprendido mucho, ¡muchas gracias por tener siempre una palabra de ánimo! A **Abraham**,

*Akawi, Antígono el Tuerto, Aretes, Ariodante, Asiriaazul, Ausente, Balbo, Barto, Caliban66, Cavilius, Clío, Davout, Elena, Eodromaeuso, Equix, Farsalia, Guizmo, Guayo, Hahael, Hagakure, Hindeburg, Horus-Chan, Íñigo, Javi\_LR, Juanrio, Koenig, Lantaquet, Laurence, Likine, Lopekan, Lucía, Lucie, Nausícaa, Nes, Nuruialwen, Pamplinas, Publio, Raskolnikov, Rodrigo, Rosalía de Bringas, Saporo, Semíramis, Toni, Trece, Urogallo, Valeria, Vorimir, Zen.*

*Y toda aventura llega a su fin. Yo no viajaré desde los Puertos Grises hacia las Tierras Imperecederas, pero como afirmaba Gandalf el Gris "Solo tú puedes decidir qué hacer con el tiempo que se te ha dado". A todos, gracias por todo,*

**Dedicada a Pilar López Losada y Alejandro Lecea López**

**Y a la memoria de Serafín Lecea Pellicer**

*“La ciencia es el cincel y el martillo, que se quieren emplear para producir un objeto hermoso ó útil: conocimiento, por sí mismo o como conocimiento útil; pero la piedra – ¡ay! – a veces se resiste, en su dureza, a ser modelada. Exactamente igual que tantas veces ha ocurrido en nuestra historia: fueron muchos los que entendieron que el conocimiento científico constituía – que podía y debía constituir – un magnífico cincel y martillo para construir un país mejor; cultural, social, intelectual, moral y políticamente. Pero muchas veces la piedra, la sociedad, se resistió. ¡Ojalá que la piedra se convierta pronto en arcilla!”*

**José Manuel Sánchez Ron**

(Extraído del libro “Cincel, martillo y piedra. Historia de la ciencia en España (siglos XIX y XX)”, con el permiso del Profesor José Manuel Sánchez Ron)

*“Los escritores deberían aprender a investigar delante de un microscopio, de igual manera que los científicos tendrían que acostumbrarse a observar la realidad, leyendo buena literatura. Las buenas novelas realistas del pasado- minuciosas y precisas en el detalle-nos enseñaban a observar la vida. Y la ciencia no progresa solamente por observación y por experimentación, como suelen decir los manuales de manera muy simplista, sino porque el genio es capaz de crear en su imaginación ciertas asociaciones que luego pueden probarse en la realidad.”*

**Mauricio Wiesenthal**

(Extraído del libro “Siguiendo mi camino”, con el permiso del Profesor Mauricio Wiesenthal)

## Whole Summary of the Doctoral Thesis

The aim of this Doctoral Thesis was to study, *in vitro*, the physiology of the **esophageal body (EB)** and the **lower esophageal sphincter (LES)** with tissue from human and porcine species. To do these we used *organ baths* and *microelectrodes*, which have allowed us: To study both the neurotransmitters and the mechanisms that control the responses induced by stimulation of inhibitory and excitatory motoneurons (MNs) of the myenteric plexus (MP) in the human and animal esophagus (**LES** and **EB**). The porcine model is considered as a homologous animal model to human, as both species have many functional and structural similarities regarding the gastrointestinal tract.

The aim of the first study was to assess the effect of selective stimulation of inhibitory and excitatory MNs in **porcine LES** through nicotinic acetylcholine receptors (**nAChRs**), **5-HT<sub>3</sub>** and **P2X** receptors. Circular **LES** strips from adult pigs were studied in *organ baths*. We compared the effects of stimulation of MNs by electrical field stimulation (**EFS**: 26V, 0.3-20Hz); nicotine (1-300μM; 5-HT and 2-Me-5-HT (1nM-30μM) and α,β-meATP (1-100μM) in standard Krebs solution, a non-adrenergic non-nitroergic non-purinergeric (NANNNP) solution and a non-adrenergic non-cholinergic (NANC) solution. Our results suggest selective mechanisms for stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine **LES**. Inhibitory MNs are strongly stimulated by **nAChRs** and do not respond to stimulation of **5-HT<sub>3</sub>** and **P2X** receptors. By contrast, excitatory MNs are stimulated through **5-HT<sub>3</sub>** and **P2X** receptors, stimulation through **nAChRs** being difficult and causing a weak response.

The aim of the second study was to explore the myenteric mechanisms of control of **human esophageal motility** and the effect of nitroergic and nonnitroergic neurotransmitters. Human circular esophageal strips were studied in *organ baths* and with *microelectrodes*. Responses following electrical field stimulation (**EFS**) of enteric motoneurons (MNs) or through nicotinic acetylcholine receptors (**nAChRs**) were compared in the **esophageal body (EB)** and in **clasp** and **sling** regions in the **lower esophageal sphincter (LES)**. Our study shows a regional specialization to stimulation of EMNs in the human esophagus, with stronger inhibitory responses in **clasp LES** fibers and stronger cholinergic excitatory responses in the **EB**. Inhibitory responses are mainly triggered by nitroergic enteric MNs mediating the *inhibitory junction potentials (IJP)* in the **LES** and **EB**, **EFS on-relaxation** in **clasp** and **sling LES** sides, and *latency* in the **EB**. We also found a minor role for purines (through P2Y<sub>1</sub> receptors) and vasoactive intestinal peptide-mediating part of nonnitroergic **clasp LES** relaxation.

The aim of the third study was to characterize the neurotransmitters involved in the origin and modulation of circular smooth muscle esophageal body (**EB**) contractions in the **porcine esophagus**. Responses of porcine **EB** strips to electrical stimulation of motoneurons (MNs) were assessed in *organ baths* and with *microelectrodes*. The effect of antagonists of inhibitory (L-NAME 1mM, MRS2179 10μM) and excitatory neurotransmitters (atropine 1μM; SR140333 1μM-NK<sub>1ra</sub>-, GR94800 1μM-NK<sub>2ra</sub>-) and of ganglionic neurotransmitters (hexamethonium 100μM, ondansetron 1μM, NF279 10μM) were characterized. Our results suggest that *timing (latency)* and *amplitude* of esophageal contractions are determined by a balance of complex interactions between excitatory and inhibitory MNs. *Latency* depends on the activation of inhibitory MNs releasing NO and a minor purinergeric contribution through P2Y<sub>1</sub> receptors, and excitatory MNs releasing ACh. *Amplitude* depends on a major contribution of excitatory MNs releasing ACh and tachykinins, and also on inhibitory MNs releasing NO, ATP or related purines, and peptidergic neurotransmitters acting as strong modulators of the excitatory neuroeffector transmission.

## **Resumen completo de la Tesis Doctoral**

El objetivo general de esta tesis consistió en el estudio, *in vitro* (*baño de órganos* y *microelectrodos*), de la fisiología del **cuerpo esofágico (EB)** y del **esfínter esofágico inferior (LES)** con tejido de dos especies, humana y porcina. Permitiendo: Estudiar los neurotransmisores y mecanismos que controlan las respuestas inducidas por la estimulación de las motoneuronas (MNs) inhibitorias y excitatorias del plexo mientérico (MP) en el esófago (**LES** y **EB**) humano y animal. El modelo porcino está considerado como un modelo animal homólogo, ya que ambas especies tienen muchas similitudes tanto funcionales como estructurales respecto al tracto gastrointestinal.

El objetivo del primer estudio, fue evaluar el efecto de la estimulación selectiva de las MNs inhibitorias y excitatorias en el **LES porcino** a través de los receptores **nAChRs**, **5-HT<sub>3</sub>** y **P2X**. Se estudiaron tiras de **LES** circular, de cerdos adultos, en *baño de órganos*. Se compararon los efectos de la estimulación de las MNs mediante estimulación eléctrica de campo (**EFS**:26V, 0.3-20Hz); nicotina (1-300µM); 5-HT y 2-Me-5-HT (1nM-30µM) y  $\alpha,\beta$ -meATP (1-100µM) en tres soluciones: Krebs estándar, solución no-adrenérgica no-nitrérgica no-purinérgica (NANNNP) y solución no-adrenérgica no-colinérgica (NANC). Los resultados sugieren mecanismos selectivos para estimular las vías motoras inhibitoria y excitatoria en el **LES** porcino. Las MNs inhibitorias se estimulan intensamente mediante los receptores **nAChRs** y no responden a la estimulación de los receptores **5-HT<sub>3</sub>** y **P2X**. Por contra, las MNs excitatorias se estimulan a través de los receptores **5-HT<sub>3</sub>** y **P2X**, la estimulación a través de los **nAChRs** es difícil causando una respuesta débil.

El objetivo del segundo estudio, fue explorar los mecanismos mientéricos de control de la **motilidad esofágica humana** y el efecto de los neurotransmisores nitrérgicos y no-nitrérgicos, mediante tiras esofágicas circulares en *baño de órganos* y *microelectrodos*. Se compararon las respuestas obtenidas tras la **EFS** de las MNs entéricas ó a través de los receptores **nAChRs** en el **cuerpo esofágico (EB)** y en las regiones **clasp** y **sling** del **LES**. Los resultados muestran una **especialización regional** en la estimulación de las MNs entéricas en el esófago humano, con respuestas inhibitorias más intensas en las fibras **clasp** del **LES** y respuestas excitatorias colinérgicas más intensas en el **EB**. Las respuestas inhibitorias están desencadenadas principalmente por las MNs entéricas nitrérgicas que median los *potenciales postunión inhibitorios (IJP)* en el **LES** y en el **EB**, la **relajación-on** inducida por **EFS** en las zonas **clasp** y **sling** del **LES** y la **latencia** en el **EB**. También se encontró un papel menor para las purinas (a través de receptores P2Y<sub>1</sub>) y el VIP mediando parte de la **relajación no-nitrérgica** en la zona **clasp** del **LES**.

El objetivo del tercer estudio, fue caracterizar los neurotransmisores implicados en el **origen** y **modulación** de las contracciones del músculo liso circular del **EB porcino**. Se estudiaron las respuestas al **EFS** de las MNs de las tiras de **EB** en *baño de órganos* y *microelectrodos*. Se caracterizó el efecto de los antagonistas de los neurotransmisores inhibitorios (L-NAME 1mM, MRS2179 10µM) y excitatorios (atropine 1µM; SR140333 1µM-NK<sub>1ra</sub>-, GR94800 1µM-NK<sub>2ra</sub>-) y gangliónicos (hexamethonium 100µM, ondansetron 1µM, NF279 10µM). Los resultados sugieren que el **timing** (**latencia**) y **amplitud** de las contracciones esofágicas están determinadas por un **equilibrio de interacciones complejas** entre las MNs inhibitorias y excitatorias. La **latencia** depende de la activación de las MNs inhibitorias liberando NO y una contribución purinérgica menor a través de receptores P2Y<sub>1</sub>, y de las MNs excitatorias liberando ACh. La **amplitud** depende de una contribución principal de las MNs excitatorias liberando ACh y taquiquininas, y también de las MNs inhibitorias liberando NO, ATP o una purina relacionada y neurotransmisores peptidérgicos actuando como fuertes moduladores de la transmisión neuroefectora excitatoria.

## Abreviaturas

<b>2-Me-5-HT</b> , 2-metil-5-hidroxitriptamina	<b>ICC-SMP</b> , ICC del plexo submucoso
<b>5-HT</b> , 5-hidroxitriptamina, serotonina	<b>iGluR</b> , receptor de glutamato ionotrópico
<b><math>\alpha,\beta</math>-meATP</b> , $\alpha,\beta$ -metilenadenosina 5'-trifosfato	<b>IJPs</b> potencial postunión inhibitorio
<b><math>\alpha</math>-CT</b> , $\alpha$ -quimotripsina	<b>IJPf</b> , potencial postunión inhibitorio rápido
<b><math>\omega</math>-CTX (GVIA)</b> , $\omega$ -conotoxina (GVIA)	<b>IJP<sub>s</sub></b> , potencial postunión inhibitorio lento
<b>AC</b> , adenilato ciclasa	<b>iNOS</b> , sintasa de óxido nítrico inducible
<b>ACh</b> , acetilcolina	<b>IP<sub>3</sub></b> , inositol trifosfato
<b>ADP</b> , adenosina bifosfato	<b>IPAN</b> , neurona intrínseca aferente primaria
<b>ADP<math>\beta</math>S</b> , adenosina 5'-[ $\beta$ -tio]difosfato	<b>LEC</b> , (músculo) esofágico inferior circular
<b>AMP</b> , adenosina monofosfato	<b>LES*</b> , esfínter esofágico inferior, <i>lower esophageal sphincter</i>
<b>AMPc</b> , adenosín monofosfato-3',5' cíclico	<b>LGIC</b> , canal iónico ligando dependiente
<b>ANS</b> , sistema nervioso autónomo	<b>LMNs</b> , neuronas motoras inferiores
<b>APA</b> , apamina	<b>L-NAME</b> , N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina metil éster
<b>ATP</b> , adenosina 5'-trifosfato	<b>L-NNA</b> , N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
<b>ATR</b> , atropina	<b>LOS*</b> , esfínter esofágico inferior, <i>lower oesophageal sphincter</i>
<b>CCh</b> , carbacol	<b>M**</b> , mol L <sup>-1</sup>
<b>cDMN</b> , núcleo motor dorsal caudal	<b>mAChR</b> , receptor colinérgico muscarínico
<b>CGRP</b> , péptido relacionado con el gen de la calcitonina	<b>MN</b> , motoneurona
<b>CNS</b> , sistema nervioso central	<b>MP</b> , plexo mientérico
<b>CNT</b> , cinitaprida	<b>MRS2179</b> , 2'-deoxi-N <sup>6</sup> -metiladenosina 3',5'-bisfosfato
<b>CO</b> , monóxido de carbono	<b>MRS2279</b> , (1R*,2S*)-4-[2-Cloro-6-(metilamino)-9H-purin-9-il]-2-(fosfonooxi)biciclo[3.1.0]hexane-1-metanol dihidrógeno fosfato éster
<b>CORM-1</b> , molécula liberadora de CO	<b>MRS2500</b> , (1R*,2S*)-4-[2-Yodo-6-(metilamino)-9H-purin-9-yl]-2-(fosfonooxi)biciclo[3.1.0]hexane-1-metanol dihidrógeno fosfato éster
<b>ChAT</b> , colina acetiltransferasa	<b>NA</b> , núcleo ambiguo
<b>DAG</b> , diacilglicerol	<b>nAChR</b> , receptor colinérgico nicotínico
<b>DES</b> , espasmo esofágico difuso	<b>NADPH</b> , nicotiamida-adenina dinucleótido fosfato
<b>DMN</b> , núcleo motor dorsal	<b>NANC</b> , no-adrenérgico, no-colinérgico
<b>DRG</b> , ganglio de la raíz dorsal	<b>NANNNP</b> , no-adrenérgico, no-nitrérgico, no-purinérgico
<b>EB</b> , cuerpo esofágico	<b>NF279</b> , ácido 8,8'-[Carbonilbis(imino-4,1-fenilencarbonilimino)-bis-1,3,5-naftalentrissulfónico]
<b>EFS</b> , estimulación eléctrica de campo	<b>NIC</b> , nicotina
<b>EG</b> , glia entérica	<b>NK<sub>1ra</sub></b> , antagonista del receptor NK <sub>1</sub>
<b>EMN</b> , motoneurona entérica	<b>NK<sub>2ra</sub></b> , antagonista del receptor NK <sub>2</sub>
<b>eNOS</b> , sintasa de óxido nítrico endotelial	<b>NKA</b> , neuroquinina A
<b>ENS</b> , sistema nervioso entérico	<b>NKB</b> , neuroquinina B
<b>EtOH</b> , etanol	<b>nNOS</b> , sintasa de óxido nítrico neuronal
<b>fEPSPs</b> , potenciales postsinápticos excitatorios rápidos	<b>NO</b> , óxido nítrico
<b>GABA</b> , ácido $\gamma$ -aminobutírico	<b>NOS</b> , sintasa de óxido nítrico
<b>GCs</b> , guanilato ciclasa soluble	<b>NT</b> , neurotransmisor
<b>GEJ</b> , unión gastroesofágica	<b>NTS</b> , núcleo del tracto solitario
<b>GERD</b> , enfermedad por reflujo gastroesofágico	<b>ODQ</b> 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3- $\alpha$ ]quinoxalin-1-one
<b>GI</b> , gastrointestinal	<b>PACAP</b> , polipéptido activador de la adenilil ciclasa pituitaria
<b>GlyR</b> , receptor de glicina	<b>PLA2</b> , fosfolipasa 2
<b>GMPc</b> , guanosin monofosfato cíclico	<b>PLC</b> , fosfolipasa C
<b>GR38032</b> , ondansetron	<b>PKC</b> , proteinquinasa C
<b>GR94800</b> , N-(Bz)-Ala-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH <sub>2</sub>	<b>rDMN</b> , núcleo motor dorsal rostral
<b>HEX</b> , hexametonio	<b>RMP</b> , potencial de membrana en reposo
<b>HO-2</b> , heme oxigenasa del tipo 2	<b>SD-sIJP</b> , desviación estándar del IJP espontáneo
<b>IAS</b> , esfínter anal interno	
<b>ICC</b> , células intersticiales de Cajal	
<b>ICC-DMP</b> , ICC del plexo muscular profundo	
<b>ICC-IM</b> , ICC intramuscular	
<b>ICC-MY</b> , ICC de la capa intermuscular a nivel del MP	
<b>ICC-SEP</b> , ICC de la septa	



**sGC**, guanilato ciclasa soluble  
**sIJP**, IJP espontáneo  
**SKCa ó K<sub>(Ca, slow)</sub>**, canales de potasio de baja conductancia activados por calcio  
**SMP**, plexo submucoso  
**SNP**, nitroprusiato de sodio  
**SP**, substancia P  
**SR140333**, besilato de noltipantium  
**TLESR**, relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior  
**TMS**, estimulación de campo transmural  
**TTX**, tetrodotoxina  
**UES**, esfínter esofágico superior  
**UDP**, uridina bifosfato  
**UTP**, uridina trifosfato  
**VIP**, péptido intestinal vasoactivo

\* En esta tesis he empleado las abreviaturas **LES** (ortografía de inglés americano, USA) y **LOS** (ortografía inglesa, UK). La abreviatura **LES** utilizada en los Capítulos 2 y 3 y la abreviatura **LOS** utilizada en el Capítulo 1. Aunque los capítulos 1 y 3 se han publicado en la misma revista, *Neurogastroenterology and Motility*, en el 2011, año de publicación del capítulo 3, la norma ortográfica había cambiado. Tanto en la Introducción como en la Discusión General he empleado únicamente la abreviatura **LES**.

\*\* En esta tesis he empleado la abreviatura **M** (unidad de concentración, mol L<sup>-1</sup>) en el Capítulo 2 manteniendo la nomenclatura de la revista *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* en la que ha sido publicado. En los Capítulos 1 y 3 he mantenido la nomenclatura propia de la revista *Neurogastroenterology and Motility* en la que se publicaron, siendo M≡mol L<sup>-1</sup>.



## Lista de Publicaciones

Los estudios de esta tesis se han publicado en los siguientes artículos:

Lecea B, Martínez E, Aulí M, Opazo Á & Clavé P (2009). Selective stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 1342-e130.

Lecea B, Gallego D, Farré R, Opazo Á, Aulí M, Jiménez M & Clavé P (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitrergic and nonnitrergic neurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**: G782-94.

Lecea B, Gallego D, Farré R & Clavé P (2012). Origin and modulation of circular smooth muscle layer contractions in the porcine esophagus. *Neurogastroenterol Motil* **24**: 779-89, e355.

Y en forma de abstract:

Lecea B, Farré R, Martínez E, Aulí M, Suñol X & Clavé P (2006). Mecanismos de estimulación selectiva de las motoneuronas excitadoras e inhibitoras en el esfínter esofágico inferior (EEI). *Rev Esp Enferm Dig* **Vol 98 (Supl. I)**: (1-28) pág. 7.

Estrada O, Lecea B, Aulí M, Farré R, Suñol X & Clavé P (2006). Inhibitory purinergic neurotransmission in human lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **Vol 18 (8)**, (663-798) pág. 780.

Lecea B, Aulí M, Farré R, Martínez E, Opazo Á & Clavé P (2006). Selective stimulation of excitatory and inhibitory motor neurons in porcine lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **Vol 18 (8)**, (663-798) pág. 780.

Estrada O, Lecea B, Aulí M, Farré R, Suñol X & Clavé P (2006). Inhibitory purinergic neurotransmission in human lower esophageal sphincter. *Journal of Clinical Gastroenterology* **Vol 40**: pág. S173.

Estrada O, Farré R, Aulí M, Lecea B, Suñol X & Clavé P (2006). Intrinsic vertical and transversal functional specialization in human esophagus. *Journal of Clinical Gastroenterology* **Vol 40**: pág. S173-S174.

Lecea B, Farré R, Martínez E, Aulí M, Suñol X & Clavé P (2006). Selective stimulation of excitatory and inhibitory motor neurons in porcine lower esophageal sphincter. *Journal of Clinical Gastroenterology* **Vol 40**: pág. S172-S173.

Lecea B, Farré R, Aulí M, Martínez E, Opazo Á & Clavé P (2007). Effects of stimulation of ligand-gated ion channels in the porcine lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **Vol 19**: (38-77) pág. 38.

Lecea B, Farré R, Martínez E, Opazo Á, Aulí M, Jiménez M & Clavé P (2008). Mecanismos de especialización funcional y regional del esófago humano. *Rev Esp Enferm Dig* **Vol 100 (Supl. I)**: (1-179) pág. 98.

Lecea B, Martínez A, Opazo Á, Aulí M, Suñol X & Clavé P (2008). Mecanismos de estimulación selectiva de las motoneuronas excitadoras e inhibitoras en el esfínter esofágico inferior (EEI) porcino. *Gastroenterol Hepatol* **Vol 31 (3)**: (111-205) pág. 136.

Lecea B, Aulí M, Martínez E, Opazo Á, Farré R, Sugñol X & Clavé P (2008). Regional functional specialization and inhibitory purinergic neurotransmission in human lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **Vol 20 (Supplement s2)**: pág. 20.

## Publicaciones

---

Clavé P, Lecea B, Aulí M, Martínez E, Sugñol X & Clavé P (2008). Selective stimulation of excitatory and inhibitory motor neurons in porcine lower esophageal sphincter. *Dysphagia* Vol 23: (423-436) pág. 424.

Lecea López B, Opazo Valdés Á, Aulí Casacuberta M, Suñol X & Clavé P (2009). Efecto de los receptores 5-HT3 en el Esfínter Esofágico Inferior (EEI) porcino. *Rev Esp Enferm Dig* Vol 101 (Supl. I): (1-232) pág. 89.

Lecea López B, Opazo Valdés Á, Suñol X & Clavé P (2010). Origen de la actividad peristáltica en el esófago porcino. *Rev Esp Enferm Dig* Vol 102 (Supl. I): (19-172) pág. 77.

### Premios recibidos:

Outstanding Poster Award: **Effects of stimulation of ligand-gated ion channels in the porcine lower esophageal sphincter**. 21<sup>st</sup> International Symposium on Neurogastroenterology and Motility, September 2007. Jeju, Korea.

Segundo Premio “DRS 2<sup>nd</sup> Place Scientific Abstract: Oral Presentation” por la presentación oral: “**Selective stimulation of excitatory and inhibitory motor neurons in porcine lower esophageal sphincter**”. En el Sixteenth Annual Dysphagia Research Society Meeting en Isle of Palms, South Caroline en Marzo del 2008.

Premi “Manuel Corachán” corresponent a la convocatòria del Curs Acadèmic 2010-11, al treball: “**Regional functional specialization and inhibitory nitrergic and non nitrergic coneurotransmission in the human esophagus**”. Atorgat per La Societat Catalana de Cirurgia, Barcelona, octubre de 2011.



## Introducción

1. General	1
2. Anatomía muscular esofágica (desde el UES hasta el LES)	1
2.1. Esfínter esofágico superior (UES)	2
2.2. Cuerpo esofágico (EB)	3
2.3. Esfínter esofágico inferior (LES)	4
3. Inervación esofágica	6
3.1. Inervación extrínseca del esófago y del LES	6
3.1.1. Inervación sensitiva	6
3.1.2. Inervación motora	7
3.2. Inervación intrínseca: plexo mientérico y plexo submucoso	9
3.2.1. General	9
3.2.2. Glia	9
3.2.3. Células intersticiales de Cajal (ICC): localización y función	10
3.2.4. Tipos de neuronas entéricas	11
3.2.5. Neuronas motoras y neurotransmisores neuromusculares	12
3.2.5.1. Neurotransmisores inhibitorios NANC en el esófago (respuesta inhibitoria)	12
3.2.5.1.1. Óxido nítrico (NO)	12
3.2.5.1.2. Purinas	13
3.2.5.1.3. VIP/PACAP	14
3.2.5.1.4. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	15
3.2.5.1.5. Monóxido de carbono (CO)	15
3.2.5.2. Neurotransmisores excitatorios en esófago (respuesta excitatoria)	16
3.2.5.2.1. Acetilcolina (ACh)	16
3.2.5.2.2. Taquiquininas	17
3.2.5.3. Co-neurotransmisión e interacciones	17
3.2.5.3.1. Co-transmisión e interacciones entre neurotransmisores inhibitorios	18
3.2.5.3.2. Co-transmisión e interacciones entre neurotransmisores excitatorios	19
3.2.6. Neurotransmisores neuro-neuronales	20
3.2.6.1. Receptores tipo canal iónico dependiente de ligando (LGIC)	20
3.2.6.1.1. La Superfamilia de receptores que se asemejan a los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR): GlyR, GABAR, nAChR y 5-HT <sub>3</sub> R	21
3.2.6.1.2. La Superfamilia de los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR)	22
3.2.6.1.3. Los receptores purinérgicos que unen ATP (P2XR)	23
4. Técnicas de estudio in vitro	24
5. Fisiología normal del esófago y del LES. Control de la actividad motora	24
5.1. Peristalsis en el músculo estriado	24
5.2. Peristalsis en el músculo liso	25
5.2.1. Peristalsis primaria en el músculo liso	25
5.2.2. Peristalsis secundaria en el músculo liso	26
5.3. Relajación del esfínter esofágico inferior (LES)	27
6. Trastornos de la motilidad esofágica	28
6.1. Clasificación fisiopatológica de los trastornos de la porción de músculo liso esofágico	28
6.1.1. Trastornos de la inervación inhibitoria: acalasia, espasmo esofágico difuso, relajaciones del esfínter esofágico inferior transitorias	29
6.1.2. Trastornos de la inervación excitatoria y del músculo liso: hipertensivo, hipotensivo	30
6.1.3. Esófago escleroderma	31
6.1.4. Esfínter esofágico inferior (LES) incompetente y GERD	31

6.2. Trastornos en la contracción del músculo longitudinal.....	32
Referencias.....	33
<b>Objetivos.....</b>	<b>49</b>
<b>Capítulos.....</b>	<b>50</b>
<b>Capítulo 1. Selective Stimulation of Intrinsic Excitatory and Inhibitory Motor Pathways in Porcine Lower Oesophageal Sphincter.....</b>	<b>50</b>
Abstract.....	50
Introduction.....	50
Materials and Methods.....	51
Preparations.....	51
Drugs.....	51
Experimental Design.....	51
Electrical field stimulation of MNs.....	51
Selection of conditions to specifically explore the effect of stimulation of excitatory or inhibitory MNs.....	52
Characterization of the responses induced by stimulation of LGICs.....	52
Data Analysis.....	52
Results.....	52
Responses induced by electrical stimulation of MNs.....	52
Effect of stimulation of nAChRs.....	54
Effect of stimulation of 5-HT receptors.....	56
Effect of stimulation of P2X receptors.....	57
Discussion.....	58
References.....	60
<b>Appendix I: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Porcine Lower Oesophageal Sphincter (LOS).....</b>	<b>63</b>
<b>Capítulo 2. Regional Functional Specialization and Inhibitory Nitroergic and Nonnitroergic Coneurotransmission in the Human Esophagus.....</b>	<b>83</b>
Abstract.....	83
Introduction.....	83
Methods.....	84
Preparations.....	84
Solutions and Drugs.....	84
Techniques.....	84
Organ bath studies.....	84
Electrophysiological studies.....	85
Experimental Design.....	85
Organ bath studies.....	85
Electrophysiological studies.....	85
Data Analysis.....	86
Results.....	87
Organ Bath Studies in the LES: <i>basal tone, EFS-responses, nicotine-responses, effect of putative inhibitory neurotransmitters in the LES</i> .....	87
Organ Bath Studies in the EB.....	91
Electrophysiological Studies in the LES and EB.....	93
Discussion.....	96
References.....	98

**Appendix II: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Human Esophagus (Esophageal Body, EB; Lower Esophageal Sphincter, LES).....102**

**Capítulo 3. Origin and Modulation of Circular Smooth Muscle Layer Contractions in the Porcine Esophagus.....119**

Abstract..... 119

Introduction..... 119

Materials and Methods..... 120

    Preparations..... 120

        Organ bath studies..... 120

        Electrophysiological studies..... 120

Solutions and Drugs..... 120

Experimental Design..... 121

    Organ bath studies..... 121

*Neural origin of electrical field stimulation-induced responses*..... 121

*Neurotransmitters involved in the origin of esophageal responses following stimulation of inhibitory and excitatory enteric motor neurons by electrical field stimulation*..... 121

*Modulation of responses to electrical field stimulation of enteric motor neurons by antagonist of ganglionic neurotransmitters*..... 121

*Effect of the prokinetic agent cinitapride*..... 121

    Electrophysiological studies..... 121

Data Analysis and Statistics..... 122

Results..... 122

    Organ bath studies in the distal esophageal body..... 122

*Neural origin of electrical field stimulation-induced responses*..... 122

*Neurotransmitters involved in the origin of esophageal responses following stimulation of inhibitory and excitatory enteric motor neurons by electrical field stimulation*..... 122

*Modulation of responses induced by electrical field stimulation of motor neurons by antagonists of ganglionic neurotransmitters*..... 126

*Effect of the 5-HT<sub>4</sub> agonist cinitapride*..... 126

    Organ bath studies in the proximal smooth-muscle esophageal body..... 128

    Electrophysiological studies in the esophageal body..... 129

Discussion..... 130

References..... 132

**Appendix III: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Porcine Esophageal Body.....135**

**Discusión General.....157**

1. Anatomía y estructura comparada del esófago humano y porcino adulto..... 158

2. Neurotransmisores implicados en la motilidad del LES..... 161

    2.1. Neurotransmisión neuroefectora..... 161

        2.1.1. LES humano..... 161

*Primer objetivo: asimetría funcional*..... 161

*Segundo objetivo: origen de la asimetría funcional*..... 162

*Tercer objetivo: estudiar el componente no-nitrérgico de la relajación en la zona clasp del LES*..... 163

*Cuarto objetivo: estudiar las respuestas electrofisiológicas en las zonas clasp y sling del LES*..... 164



---

2.2. Neurotransmisión neuro-neuronal.....	166
Ligand-gated ion channels (LGIC).....	166
2.2.1. <u>LES porcino</u> .....	167
<i>Primer objetivo</i> : estudio de los LGIC en el LES (clasp) porcino: medio Krebs estándar.....	167
<i>Segundo objetivo</i> : estudio de la respuesta a la estimulación selectiva de las motoneuronas inhibitorias ó excitatorias a través de los LGIC en el LES (clasp).....	170
2.2.1.1. <b>Medio NANC (no-adrenérgico no-colinérgico)</b> .....	170
2.2.1.2. <b>Medio NANNP (no-adrenérgico no-nitrérgico no-purinérgico)</b> .....	172
3. Cuerpo esofágico humano y porcino.....	173
3.1. <u>EB humano</u> .....	173
<i>Primer objetivo</i> : estudio de la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica y no-nitrérgica en baño de órganos y microelectrodos.....	174
<i>Segundo objetivo</i> : asimetría vertical, EB <i>versus</i> LES (baño de órganos).....	176
3.2. <u>EB porcino</u> .....	177
3.2.1. Estudios de baño de órganos (resultados mecánicos).....	177
3.2.2. Estudios de microelectrodos (resultados electrofisiológicos).....	179
3.2.3. Función de los LGIC en las respuestas contráctiles del EB porcino.....	180
3.2.4. Función de la cinitaprida, agonista del receptor 5-HT <sub>4</sub> , en las respuestas contráctiles del EB porcino.....	182
Referencias.....	185
<b>Conclusiones</b> .....	<b>191</b>



# Introducción

## 1. GENERAL

El aparato digestivo es un conjunto de órganos a través de los cuales se efectúa la absorción y digestión de los alimentos. En la especie humana consta de:

(i) una parte principal, el tubo digestivo o tracto gastrointestinal (GI), que se abre en ambos extremos del cuerpo por dos orificios (boca y ano) y se divide en diferentes tramos, y

(ii) y de una parte anexa, formada por varias glándulas (glándulas salivales, hígado y páncreas) que segregan diferentes secreciones que participarán en la acción digestiva.

El tracto GI consta, anatómicamente, de: boca, esófago, estómago, intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), intestino grueso (colon porción ascendente, transversa, descendente y sigma) y recto. En la boca se inicia la digestión, el alimento se tritura y se forma el bolo alimenticio que cruza la faringe, sigue por el esófago y llega al estómago. En éste se mezcla y digiere, y gracias a los jugos gástricos se convierte en el quimo y entra en el intestino delgado. En él, el bolo se degrada y transforma en sustancias solubles (proceso de digestión). Luego pasa al intestino grueso donde el agua de los alimentos no digeridos se reabsorbe. Finalmente, los restos indigeribles de los alimentos se almacenan en el recto y se eliminan por el ano. Las funciones del aparato digestivo son: el transporte de los alimentos, la secreción de los jugos gástricos, la absorción de los nutrientes y la excreción mediante el proceso de defecación.

El tracto GI está formado histológicamente por capas que, desde el interior de la luz al exterior, se denominan y distribuyen de la forma siguiente:

-*Mucosa*, capa formada por epitelio y el tejido conjuntivo subyacente. Presenta funciones de protección, secreción y absorción, estando especializada en cada tramo del tracto gastrointestinal. Presenta una fina capa de músculo liso, *muscularis mucosae*, y de tejido conjuntivo, la *lámina propia*.

-*Submucosa*, situada bajo la mucosa, está formada por tejido conjuntivo y con presencia de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibras nerviosas y prolongación de glándulas de la

mucosa. Contiene el *Plexo Submucoso* ó de *Meissner*, componente del Sistema Nervioso Entérico (ENS) y que controla principalmente las actividades secretoras glandulares.

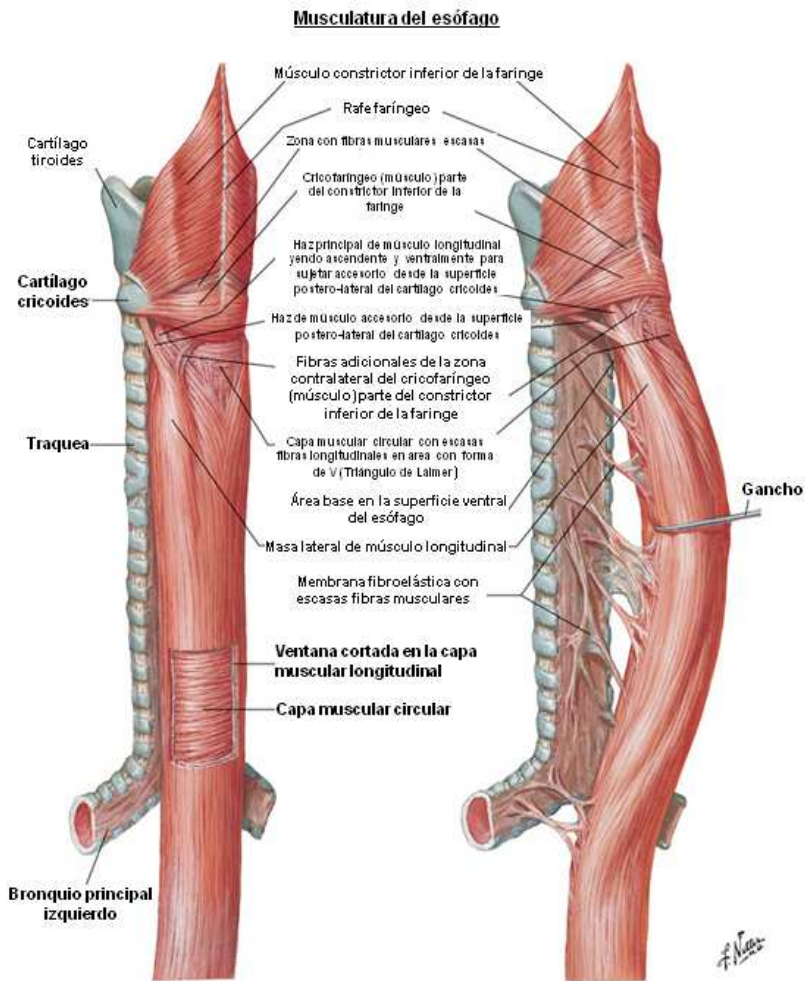
-*Capa muscular externa* compuesta por músculo liso y formada por las capas *circular* interna y *longitudinal* externa (excepto en el tercio proximal del esófago donde están también formadas por musculatura estriada). Los fenómenos de contracción-relajación coordinada de estas dos capas se denominan *peristalsis* y permite la propulsión del bolo.

En algunas regiones como el esfínter esofágico inferior (LES), las fibras musculares lisas están divididas por septos, tejido conjuntivo que contienen vasos y axones que las envuelven. Entre las dos capas musculares está el *Plexo Mientérico (MP)* ó de *Auerbach*, que contiene estructuras nerviosas organizadas en acúmulos de células ganglionares parasimpáticas y haces nerviosos interconectados. Dichas fibras postganglionares se dirigen principalmente hacia las fibras musculares adyacentes y su función principal es el control de la motilidad intestinal.

-*Serosa* ó *adventicia*, según la región del tracto digestivo que revista, intraperitoneal (serosa) o retroperitoneal (adventicia) como en el esófago. Es la capa más externa y está conformada por tejido conectivo laxo.

## 2. ANATOMÍA MUSCULAR ESOFÁGICA (desde el UES hasta el LES)

El esófago es una estructura tubular muscular de 18 a 26 cm que se extiende desde la hipofaringe hasta la unión gastroesofágica (GEJ) debajo del diafragma, y conecta la faringe con el estómago. Funcionalmente, el esófago comprende el esfínter esofágico superior (UES), el esfínter esofágico inferior (LES) y el cuerpo esofágico (EB). Las funciones de las regiones UES, cuerpo esofágico y LES son: 1) facilitar el transporte aboral (desde la boca) de la comida hacia el interior del estómago una vez abandona la orofaringe; 2) y prevenir el escape oral (hacia la boca) de contenidos gástricos hacia el esófago y la faringe (Clouse & Diamant, 2006). Entre degluciones el esófago se colapsa, pero el lumen puede distenderse hasta 2 cm en la dimensión anterior-posterior y a 3 cm lateralmente para acomodar al bolo deglutido (Long & Orlando, 2002).



**Figura 1. Musculatura del esófago.** La capa muscular está compuesta por una capa externa de fibras longitudinales y una interna de fibras circulares. Las fibras longitudinales se distribuyen, de forma proximal, en tres fascículos (haces de fibras musculares), y descienden a lo largo del esófago combinándose para formar una capa uniforme que cubre la superficie exterior del esófago. (Adaptada de Kuo & Urma, 2006, Netter medical illustration).

## 2.1 ESFÍNTER ESOFÁGICO SUPERIOR (UES)

Fisiológicamente, el UES es una zona de alta presión intraluminal que separa la faringe del esófago. Es una estructura musculocartilaginosa compuesta en su cara anterior por la superficie posterior del cartilago tiroideo y cricoideo, y tres haces musculares: cricofaríngeo, tirofaríngeo y fibras del esófago cervical craneal. Cada músculo desempeña un papel diferente en la función del UES (Sivarao & Goyal, 2000). Actuando como barrera entre la faringe y el esófago, el UES previene la entrada de aire en el tracto digestivo y del reflujo del material del esófago hacia la faringe en la deglución, y permite la liberación de material intraesofágico al eructar o devolver (Singh & Hamdy, 2005).

Aunque el UES se define en términos fisiológicos, sus correlaciones anatómicas son muy evidentes:

- i) la región de 1 cm de presión máxima corresponde a la localización del músculo cricofaríngeo (Kahrilas *et al.*, 1988);
- ii) en la zona de 2-4 cm de alta presión también están implicados otros músculos y estructuras locales rodeando la región representada por el músculo cricofaríngeo, serían la hipofaríngea cartilaginosa y el músculo constrictor faríngeo inferior (Clouse & Diamant, 2006). Los músculos tiroideo y genioideo están implicados en la apertura activa del esfínter con las degluciones (Lang & Shaker, 1994) (Figura 1).

## 2.2 CUERPO ESOFÁGICO (EB)

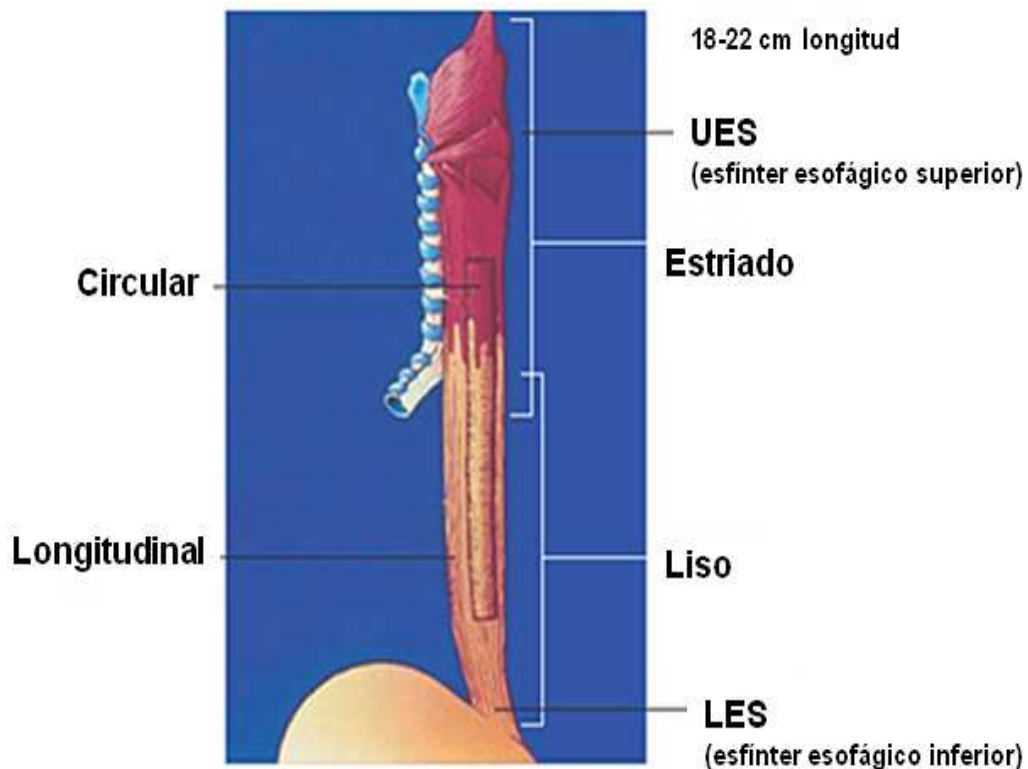
El cuerpo esofágico puede dividirse en tres segmentos según su localización: cervical, torácico y abdominal. Histológicamente, el EB se divide en un segmento formado por musculatura estriada como continuación de las fibras musculares de la hipofaringe que ocupa el tercio proximal, y un segmento formado por musculatura lisa que ocupa los dos tercios distales (Figura 2). Se denomina zona de transición a la región de unión entre ambas áreas en las que se mezclan las fibras lisas con las estriadas. La longitud promedio del EB medido manométricamente es de 18 a 21 cm (Clouse & Staiano, 1991; Clouse & Staiano, 1993).

*Cuerpo esofágico estriado*, las fibras musculares en la parte cervical y en una pequeña parte torácica del esófago (que incluye el UES) están formadas por músculo estriado).

*Zona de transición*, es el segmento de unión que contiene ambos músculos estriado y liso, puede tener una longitud de 4-6 cm y está presente, normalmente, sobre el nivel del arco aórtico. Esta zona de unión es el área con contracciones peristálticas de fuerza más débil.

*Cuerpo esofágico liso*, los dos tercios inferiores del esófago (partes torácica y abdominal que contiene el LES), incluyendo ambas capas musculares, están compuestas por músculo liso (Kuo & Urma, 2006).

El EB presenta dos capas musculares, la capa interna está formada por fibras musculares dispuestas circularmente, o ligeramente inclinadas, mientras que las fibras de la capa externa recorren longitudinalmente todo el esófago.



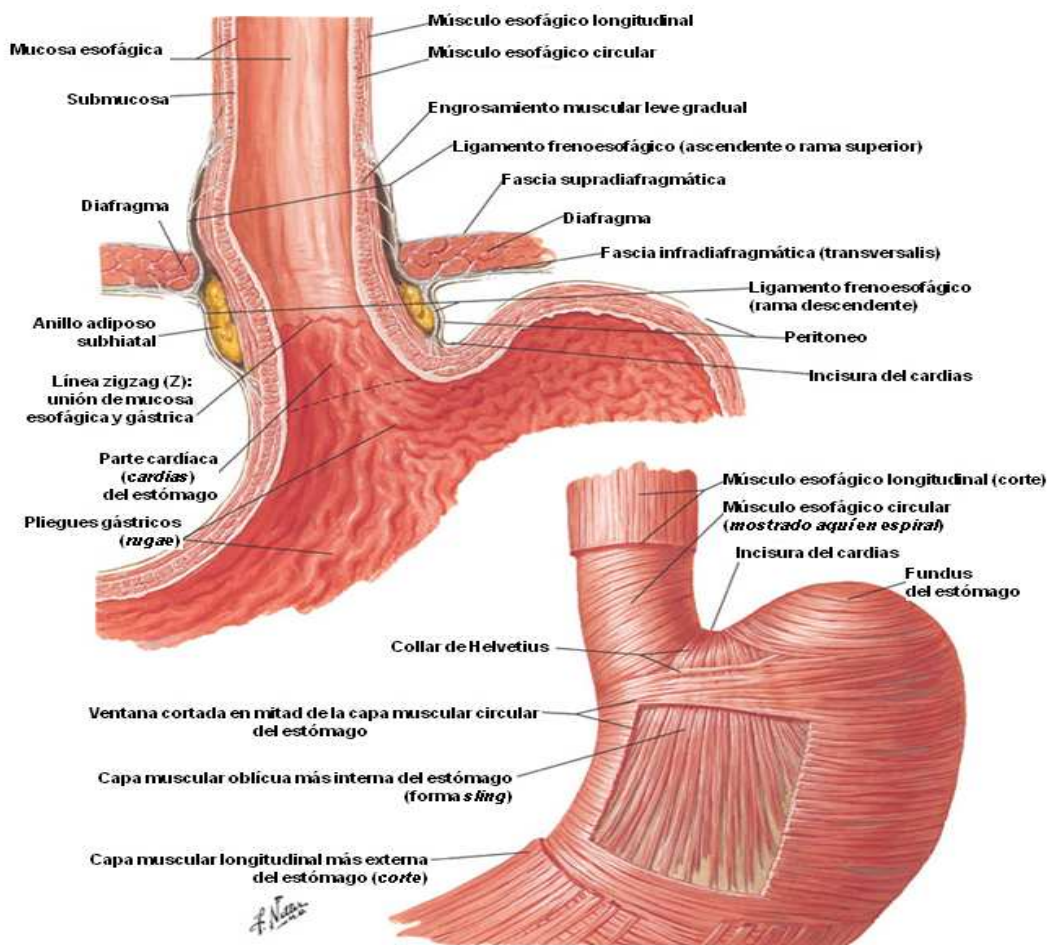
**Figura 2. Características anatómicas del esófago.** El esófago cervical y la pequeña parte del esófago torácico que incluye el UES, están compuestos por músculo estriado. Los dos tercios esofágicos inferiores, torácico y abdominal que incluye el LES, están compuestos por músculo liso (Adaptada de Mashimo & Goyal, 2006).

### 2.3 ESFÍNTER ESOFÁGICO INFERIOR (LES)

El esfínter esofágico inferior (LES) es una zona de alta presión localizada donde se unen el esófago y el estómago. El LES es una unidad funcional formada por componentes intrínsecos y extrínsecos:

(i) La estructura intrínseca del LES consiste en fibras musculares lisas esofágicas y con control neurohormonal;

(ii) El componente extrínseco consiste en el pilar derecho del diafragma crural, que funciona como un esfínter externo coadyuvante que aumenta la presión en el esófago distal en relación con los movimientos de la respiración y los incrementos de presión intraabdominal (Delattre et al., 2000) (Figura 3).

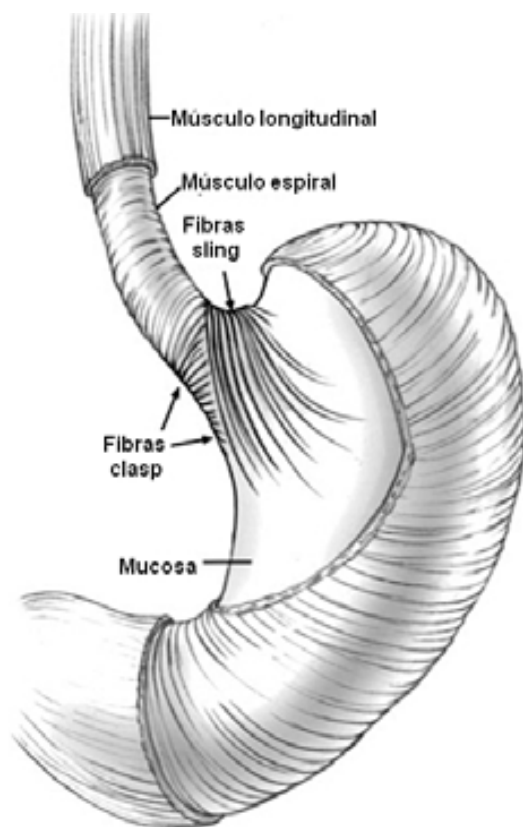


**Figura 3. Unión de la mucosa gastroesofágica y distribución muscular en el esófago inferior.** El esfínter esofágico inferior es una zona de alta presión localizada donde el esófago se une al estómago. El LES es una unidad funcional compuesta por fibras musculares esofágicas (estructura intrínseca) y por el músculo del diafragma (componente extrínseco) que funciona como esfínter coadyuvante que incrementa la presión en el esófago terminal relacionado a los movimientos de la respiración. (Adaptado de Kuo & Urma, 2006, Netter medical illustration).

El equivalente anatómico del LES es un engrosamiento de la capa muscular circular que tiene características ultraestructurales diferentes del músculo liso del cuerpo esofágico (Christensen & Roberts, 1983; Seelig & Goyal, 1978). A nivel del cuerpo esofágico, las fibras circulares forman anillos que abrazan completamente la luz esofágica. A nivel del LES, el componente muscular intrínseco del mismo está compuesto por dos semicircunferencias de fibras circulares.

(i) A la izquierda, fibras musculares **sling** localizadas a nivel de la curvatura mayor del estómago formando bandas oblicuas largas que no rodean completamente al esófago distal y se extienden a ambos lados de la curvatura mayor del estómago (Liebermann-Meffert *et al.*, 1979).

(ii) A la derecha, fibras **clasp** cortas, a nivel de la curvatura menor, formando anillos semicirculares cuyos extremos terminan en las paredes anterior y posterior del esófago y se extienden a ambos lados de la curvatura menor (Liebermann-Meffert *et al.*, 1979) (Figura 4).



Empleando la técnica de imagen de manometría 3D in vivo se demostró que el LES humano tampoco es un anillo circular (Stein *et al.*, 1995). Vicente *et al.*, demostraron que el cerdo es el animal que presenta una arquitectura muscular de la estructura gastroesofágica idéntica a la de la especie humana anatómica y fisiológicamente. En su estudio anatómico confirmaron que la distribución de las fibras musculares en el área era prácticamente igual: el músculo era más grueso en la zona en la que se concentraban las fibras clasp (lado derecho) y sling (izquierdo). En el estudio manométrico obtuvieron las mismas asimetrías axiales y radiales en la zona de alta presión del esófago distal, y observaron que tenía dos componentes claramente identificables: (i) interno ó esfintérico, y; (ii) externo ó crural. Además, el esfínter se relajaba tras la deglución siguiendo patrones idénticos a los vistos en humanos (Vicente *et al.*, 2001).

En un estudio in vitro reciente sobre las propiedades funcionales de ambas zonas clasp y sling del LES porcino, Farré *et al.*, han mostrado una disposición anatómica de dichas fibras musculares en la unión gastroesofágica, tanto en un plano frontal como transversal, muy similar también a la descrita en humanos (Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Korn *et al.*, 1997). En el cerdo, Farré *et al.*, identificaron dichas fibras como una banda engrosada de músculo liso semicircular adyacente a las curvatura mayor y menor del estómago, respectivamente (Farré *et al.*, 2007a).

El músculo circular del LES forma un anillo completo, en el LES canino (Friedland *et al.*, 1971), en el de la zarigüeya (Christensen & Torres, 1975), en el del gato (Friedland *et al.*, 1971; Preiksaitis *et al.*, 1994a).

Además de la similitud anatómica y estructural, ambas especies (porcina y humana) pueden considerarse homólogas con respecto a la estructura y código neuroquímico de las neuronas del sistema nervioso entérico (Brown & Timmermans, 2004).

**Figura 4. Esquema de disposición de las fibras musculares clasp y sling en la unión gastroesofágica.** Las fibras lisas circulares del LES se disponen: en la curvatura menor, las fibras musculares clasp transversales; y en la curvatura mayor (zona izquierda del LES) las oblicuas y largas fibras sling. (Adaptado de Miniarez & Jobe, 2006, Source: Jobe *et al.*, 1998).



### 3. INERVACIÓN ESOFÁGICA

#### 3.1 Inervación extrínseca del esófago y del LES

El esófago, igual que el resto de vísceras digestivas, recibe una **inervación sensitiva dual** conocida tradicionalmente como *parasimpática* y *simpática*, sin embargo sería más adecuada la denominación *vagal* y *espinal* ya que se basa en los nervios reales (Goyal & Sivarao, 1999).

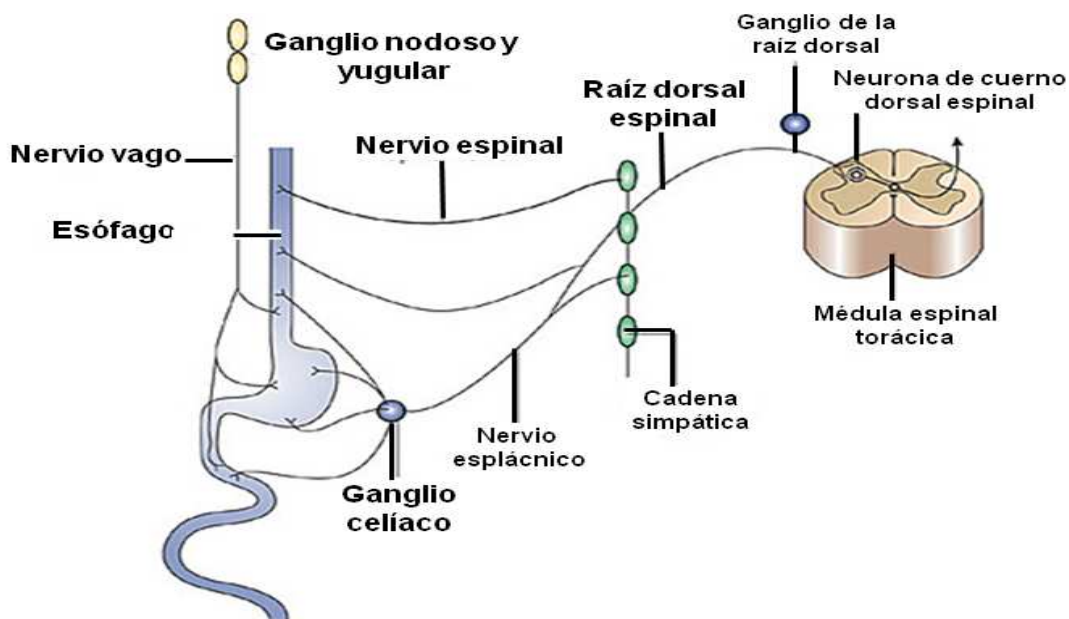
##### 3.1.1 Inervación Sensitiva

Las **neuronas aferentes vagales** (parasimpática) componen el 80% del tronco vagal y tienen sus cuerpos celulares en el **ganglio nodoso** y proyectan hacia el **núcleo del tracto solitario**. Las **vagales aferentes** que confluyen desde la capa muscular lisa esofágica son sensibles a la distensión mecánica porque los receptores de distensión estarían situados en sus terminales nerviosos y cercanos a dicha musculatura, mientras que las **aferentes vagales polimodales** (responden a múltiples modalidades de estímulos) con campos receptivos en la mucosa son sensibles a varios estímulos intraluminales (osmótico, químico, térmico, mecánico) (Fass, 2004). En general, las **aferentes vagales** no juegan un papel directo en la transmisión del dolor visceral,

pero transducen la presión a sensaciones dolorosas a través de los mecanorreceptores (Goyal & Sivarao, 1999).

Las **neuronas aferentes espinales** (simpáticas) tienen sus cuerpos celulares en el **ganglio de la raíz dorsal (DRG)** y terminan en la columna espinal y en el **núcleo gracilis** y **cuneiforme** en el tronco del encéfalo. Desde aquí, proyectan a través del tálamo, a las áreas cortical insular y sensitiva primaria (Aziz & Thompson, 1998).

Las **neuronas aferentes espinales** que confluyen desde los terminales nerviosos en la capa muscular y la serosa actúan como nociceptores para la percepción del malestar y del dolor y son mecanosensitivas (Mayer & Gebhart, 1994). Las **aferentes espinales** que confluyen de los terminales nerviosos intraepiteliales están implicadas en la mediación del dolor inducido por el ácido durante la exposición tópica al ácido intraluminal, como por ejemplo, durante los episodios de reflujo gastroesofágico (Fass *et al.*, 1998). Muchas **aferentes espinales** contienen CGRP y substancia P (SP), que son neurotransmisores importantes en la mediación de la nocicepción visceral (Goyal & Sivarao, 1999; Fass, 2004) (Figura 5).



**Figura 5. Diagrama esquemático de la inervación vagal y espinal esofágica.** El esófago está doblemente inervado por aferentes sensitivas primarias de los nervios espinal y vagal. Los cuerpos celulares de las aferentes vagales se localizan en el ganglio yugular y nodoso, los de las aferentes espinales en el ganglio de la raíz dorsal cervical y torácica (Adaptado de Sengupta, 2006).



### 3.1.2 Inervación Motora

La inervación motora extrínseca del esófago está formada por el **nervio vago**.

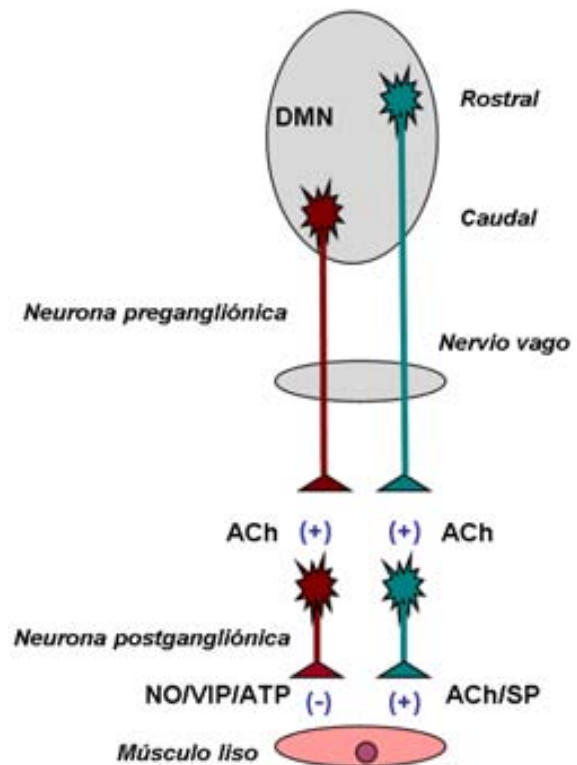
*Esófago estriado*, los cuerpos celulares de las fibras **eferentes vagales**, que inervan el UES y el músculo estriado proximal esofágico, surgen en el **núcleo ambiguo (NA)**, las **eferentes postgangliónicas** surgen desde las **neuronas motoras inferiores (LMNs)** en el **núcleo retrofacialis** y la formación compacta del **núcleo ambiguo (NA)**. Estos nervios están mielinizados, contienen ChAT y CGRP (Lee *et al.*, 1992; Sang & Young, 1998), y realizan contacto directo sobre las fibras musculares estriadas individuales vía placas motoras (Zhou *et al.*, 1996).

El principal neurotransmisor en la placa motora es la ACh, que actúa sobre los receptores colinérgicos nicotínicos en el músculo estriado para iniciar la contracción muscular (Kerr *et al.*, 1995). El esófago cervical también tiene plexo mientérico (MP), poco denso e irregular (Izumi *et al.*, 2002), con un alto número de neuronas, que contienen la enzima de síntesis de óxido nítrico (NOS), galanina, CGRP (Kuramoto *et al.*, 1999) y VIP (Sang & Young, 1997), que se piensa que reciben un input pregangliónico desde el **núcleo motor dorsal (DMN)** del vago. El óxido nítrico (NO) podría inhibir la liberación de acetilcolina (ACh) desde la placa motora (Izumi *et al.*, 2003). No se conoce con exactitud la función del MP del esófago cervical.

*Esófago liso y LES*, las **fibras vagales pregangliónicas** destinadas para el segmento de músculo liso distal y del LES tienen su origen en el **núcleo motor dorsal (DMN)** del nervio vago. Estas **fibras nerviosas pregangliónicas** forman el MP y entran en el esófago en varios niveles.

Las fibras viajan pocos centímetros dentro de la pared del esófago, y entonces conectan con las **neuronas postgangliónicas** (motoneuronas (MNs) inhibitorias y excitatorias) en los plexos intramurales, a diferencia de la musculatura estriada las **eferentes vagales** no inervan directamente la musculatura lisa.

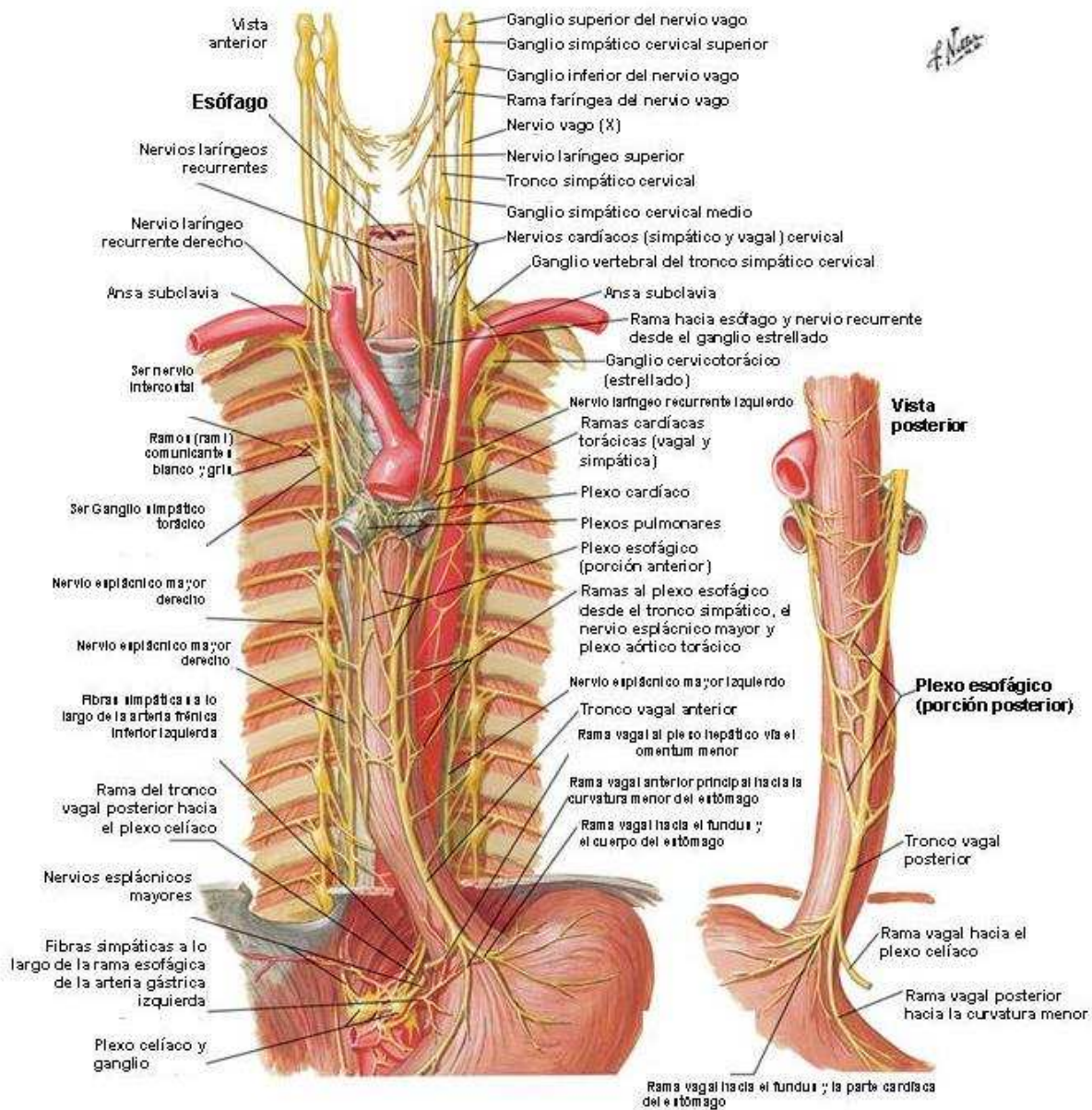
En el LES la distribución de los cuerpos de las motoneuronas en el **DMN** es: (i) en el **DMN rostral (rDMN)** se localizan las neuronas de la vía excitatoria, (ii) en la parte **caudal** del **DMN (cDMN)** están presentes las neuronas de la vía inhibitoria (Rossiter *et al.*, 1990) (Figura 6).



**Figura 6. Inervación excitatoria e inhibitoria paralela del músculo liso esofágico.** La vía excitatoria incluye a las neuronas pregangliónicas vagales localizadas en la parte rostral del DMN. Proyectan sobre las neuronas postgangliónicas excitatorias que contienen ACh y SP. La vía inhibitoria incluye fibras vagales pregangliónicas localizadas en la parte caudal del DMN. Proyectan hacia neuronas inhibitorias postgangliónicas que contienen NO, VIP y ATP. (Adaptado de Goyal & Chaudhury., 2008).

El esófago recibe también inervación *parasimpática* y *simpática* que regula la secreción glandular, el calibre de los vasos sanguíneos y la actividad del músculo liso y estriado: (i) la provisión de *nervios parasimpáticos* procede del **núcleo ambiguo (NA)** y del **núcleo motor dorsal (DMN)** del nervio vago y proporciona inervación motora a la capa muscular esofágica e inervación secretomotora a las glándulas; (ii) la provisión de *nervios simpáticos* procede de la cadena simpática torácica y cervical (segmentos espinales T1-T10) y se dirigen al **ganglio torácico, cervical** y posiblemente **celíaco**. Las fibras adrenérgicas postgangliónicas que surgen de estos **ganglios simpáticos** viajan en los **nervios espláncnicos mayor y menor** que termina en las MNs en el MP, no terminan en las células musculares lisas. Las fibras simpáticas regulan la constricción de los vasos sanguíneos, el tono de los esfínteres esofágicos y de la actividad peristáltica y glandular (Kuo & Urma, 2006).

**Nervios del esófago**



**Figura 7. Inervación parasimpática y simpática en el esófago.** El esófago recibe una doble inervación sensitiva, tradicionalmente llamada parasimpática y simpática. (Adaptado de Kuo & Urma., 2006).

## 3.2 Inervación intrínseca: plexo mientérico y plexo submucoso

### 3.2.1 General

La actividad motora del tracto GI es crítica para vivir (Huizinga & Lammers, 2009). Es un proceso complejo que implica múltiples tipos celulares tales como: (i) las neuronas entéricas, que pueden detectar el contenido del tracto GI, integrar información y crear un patrón motor adecuado; (ii) las ICC, que generan una ritmicidad eléctrica intrínseca; y (iii) las células musculares lisas, que pueden integrar una amplia selección de inputs excitatorios e inhibitorios y desarrollan las respuestas apropiadas (Sanders & Ward, 2007).

El Sistema Nervioso Entérico (ENS) está considerado como un “minicerebro” y tiene unos 100.000 millones de neuronas. Se clasifica como una parte separada del Sistema Nervioso Autónomo (ANS) y está constituido por una colección de neuronas que pueden funcionar independientemente del Sistema Nervioso Central (CNS), pero se comunica con él a través de las fibras aferentes y eferentes simpáticas y parasimpáticas. Sus funciones son controlar o modular la motilidad, las secreciones endocrinas y exocrinas, la microcirculación y los procesos inflamatorios e inmunes. Se localiza en las paredes del tracto GI desde el esófago hasta el ano, las glándulas asociadas (glándulas salivares, páncreas) y la vesícula biliar.

El ENS es un sistema nervioso integrador y funciona con neuronas sensitivas, interneuronas y motoneuronas. Los cuerpos celulares de las neuronas se localizan en ganglios situados en el interior de las paredes musculares de la mayor parte del tracto digestivo. Los ganglios están interconectados mediante extensiones de fibras interganglionares formando plexos ganglionados. Éstos son continuos y están distribuidos en todo el perímetro y a lo largo de cada uno de los órganos especializados que conforman el tracto digestivo (Wood, 2006).

El ENS humano está compuesto por el plexo mientérico (MP) ó *Plexo de Auerbach*, y el plexo submucoso (SMP) ó *Plexo de Meissner*.

El plexo mientérico es el plexo de mayor extensión en el ENS, está localizado entre las capas musculares circular y longitudinal del tracto GI, y en los humanos se extiende desde el esófago medio hasta el esfínter anal (Brookes & Costa, 2006).

El plexo submucoso es un plexo ganglionado situado por todo el espacio submucoso entre la mucosa y la capa muscular circular. Es más importante como red ganglionada en los intestinos grueso y delgado. En el esófago no existe un plexo submucoso ganglionado, y en el estómago los

ganglios están dispersos en el espacio submucoso. En los grandes mamíferos (como cerdos y humanos) el plexo submucoso está formado por el plexo submucoso interno (*Plexo de Meissner*) situado en el lado seroso de la musculares mucosa, el plexo submucoso externo (*Plexo de Schabadasch ó Henle*) directamente adyacente al lado luminal de la capa muscular circular y un Plexo Intermedio localizado entre los dos (Hoyle & Burnstock, 1989; Timmermans *et al.*, 1997).

La función y organización básica del sistema nervioso entérico es muy parecida en todas las especies. Existe una clara semejanza entre el ENS porcino y humano, al menos en lo que se refiere a la organización anatómica y a la presencia de subtipos neuronales identificados neuroquímicamente (Hens *et al.*, 2000). Este hecho y su similitud anatómica han permitido considerar al cerdo como un excelente modelo de estudio de la neurogastroenterología humana (Brown & Timmermans, 2004).

Aunque se debe tener en cuenta, que las respuestas farmacológicas en el ENS son específicas para las especies y regiones, ya que difiere en la expresión de los receptores funcionales (Furness, 2000; Timmermans *et al.*, 1992).

### 3.2.2 Glia

La Glia entérica (EG) forma parte activa e integral de una red formada por glia, neuronas, células epiteliales, células mesenquimales y células inmunes. Todas ellas están implicadas en interacciones multidireccionales concertadas con precisión, siendo esenciales para un intestino sano y funcional (Rühl, 2005). Tradicionalmente, se suponía que la glia entérica servía sólo como soporte ó como elemento nutritivo para las neuronas entéricas. Sin embargo, estudios recientes indican que la EG puede desempeñar un papel más activo en la fisiología y fisiopatología del tracto GI (Rühl *et al.*, 2004).

**Funciones:** (i) la EG contiene precursores de neurotransmisores, (ii) presentan la maquinaria para la absorción y degradación de neuroligandos, (iii) expresan receptores de neurotransmisores, haciéndolos adecuados como intermediarios en la neurotransmisión entérica y en el procesamiento de información en el ENS, (iv) tienen un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la barrera de mucosa del intestino, (v) finalmente, también sirve como unión entre los sistemas nervioso e inmune en el intestino, por su potencial de síntesis de citocinas, la presencia de antígenos y respuesta a fenómenos inflamatorios.

### **Interacciones en el intestino entre glia-neuronas:**

La EG es crucial para el mantenimiento neuronal. Teóricamente, la glia entérica podría mantener la integridad neuronal mediante: (i) la provisión de soporte estructural (Gabella, 1981; Gabella, 1990), (ii) la liberación de factores neurotróficos, ó (iii) asegurando un microentorno protector eliminando el exceso de cationes.

**Interacciones glia entérica-neurotransmisión:** La glia podría tener dos funciones en la neurotransmisión entérica: (i) participaría en la síntesis i/o inactivación de neurotransmisores, ó (ii) podría responder a las moléculas de señalización y participar directamente en la transmisión sináptica (Rühl *et al.*, 2004).

Estudios inmunohistoquímicos muestran que la EG expresa la *glutamina sintetasa* (Bradley *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2003). También sería fuente de glutamina para el glutamato neuronal así como para la resíntesis de GABA (Galligan *et al.*, 2000). Estudios recientes le confieren también funciones de inactivación y eliminación de neuropéptidos en la transmisión neuropeptidérgica (Rühl *et al.*, 2005). Y también estaría implicada en la neurotransmisión nitrérgica ya que la células gliales entéricas, y no las neuronas, presentan inmunoreactividad en exclusiva para la L-arginina (precursor del NO) lo que indicaría que la síntesis de NO depende parcialmente de la liberación de L-arginina glial (Nagahama *et al.*, 2001).

### **3.2.3 Células Intersticiales de Cajal (ICC): Localización y función**

En 1911, Ramón y Cajal describió un tipo celular al que atribuyó la contracción del músculo liso (Cajal, 1911). Estas células, se localizaban entre los terminales nerviosos y las células del músculo liso del tracto GI de ahí que las denominara *intersticiales*. En las décadas de los años 70 y 80, los investigadores se centraron en dichas células y sugirieron la posibilidad de que participaran en los patrones de contracciones rítmicas del intestino (El-Sharkawy *et al.*, 1978; Fausone-Pellegrini *et al.*, 1977; Fausone-Pellegrini & Thuneberg, 1999; Thuneberg, 1982). Las ICC se encuentran a lo largo de todo el tracto GI desde el esófago hasta el esfínter anal interno (IAS) (Daniel & Posey-Daniel, 1984; Hagger *et al.*, 1998). Aunque son un componente menor de la capa muscular del tracto GI (sólo sobre un 5% de las células presentes) (Ordög *et al.*, 2004), estas células tienen roles fisiológicos muy importantes en su motilidad (Sanders & Ward, 2007).

**Funciones de las ICC:** Las ICC tienen, al menos, cuatro funciones específicas: (i) generan la onda lenta eléctrica que se transmite de forma pasiva al músculo liso GI (Huizinga *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1994); (ii) podrían participar en la neurotransmisión nitrérgica y colinérgica (Burns *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 1994); (iii) establecen el potencial de membrana del músculo liso y el gradiente de membrana (Farrugia *et al.*, 2003; Sha *et al.*, 2007); (iv) podrían estar implicadas en la mecanotransducción (Strege *et al.*, 2005; Thuneberg & Peters, 2001; Wang *et al.*, 2005; Won *et al.*, 2005).

**Clasificación de las ICC:** existe más de un tipo de ICC respecto a su morfología y su función. Siempre se las ha clasificado respecto a su localización, sin embargo Farrugia (Farrugia, 2008) considera importante revisar dicha clasificación y orientarla hacia la función de estas células, sugiriendo como un inicio razonable el subdividir las ICC en: (i) aquellas que tienen la maquinaria para generar ondas lentas, y (ii) aquellas que no la tienen. Estudios morfológicos apoyados por algunas evidencias funcionales recientes sugieren que existen, al menos, tres grupos de ICC funcionales independientes:

1) En muchas regiones del tracto GI, se localiza una red de ICC en el espacio intermuscular a nivel del MP (**ICC-MY**) entre las capas musculares circular y longitudinal. Las **ICC-MY** son las células marcapasos en estómago e intestino delgado, que desencadenan la generación de ondas lentas en la capa muscular (Ward *et al.*, 2000).

2) Una segunda población de ICC (conocida como **ICC intramuscular** ó **ICC-IM**) se encuentran en las capas musculares del tracto GI y están inervadas preferentemente por nervios motores entéricos (Ward *et al.*, 2000). Las **ICC-IM** están estrechamente asociadas tanto con los nervios motores entéricos como con los nervios aferentes vagales.

3) Una tercera población de ICC serían las **ICC-SEP** (Horiguchi *et al.*, 2001), sitas en la septa dentro de los haces musculares circulares: podrían tener un papel en la conducción de la información eléctrica desde las **ICC-MY** hacia el interior de los distantes haces musculares circulares.

Las ICC expresan el receptor c-kit (Huizinga *et al.*, 1995), por tanto la presencia de este receptor se utiliza como marcador para el marcaje de estas células. Recientemente se ha identificado otra proteína expresada por las ICC, el Anol. Gomez-Pinilla *et al.*, realizaron un estudio inmunohistoquímico con anticuerpos contra Anol y en combinación con anticuerpos contra Kit, en distintas partes del tracto GI del ratón y del humano (estómago, intestino delgado y colon) que les permitió identificar al Anol como nuevo marcador

molecular altamente específico para todas las clases de ICC con la ventaja añadida sobre el Kit de que no marca mastocitos (Gomez-Pinilla *et al.*, 2009).

Por otro lado, se han realizado estudios utilizando animales (roedores) que presentan mutaciones en el gen que codifica dicho receptor. Ward *et al.*, utilizaron ratones W/W<sup>v</sup> (carencia de ICC intramusculares (ICC-IM)) y observaron una reducción en la neurotransmisión nitrérgica del LES (Ward *et al.*, 1998). Farré *et al.*, utilizando ratas mutantes Ws/Ws (carencia de ICC c-kit positivas), estudiaron los neurotransmisores implicados en la relajación y contracción del LES en respuesta a la estimulación eléctrica, y demostraron que la carencia de ICC c-kit positivas incrementaba la tensión basal y la motilidad espontánea, pero no limitaba la presencia de una inervación intrínseca inhibitoria y excitatoria viable y funcional (Farré *et al.*, 2007b).

A diferencia del LES y de otras regiones del tracto GI, no existe aún evidencia fisiológica de que las ICCs estén implicadas en la transmisión neuromuscular en el EB. Esto se debe, en gran parte, a que los ratones deficientes de ICC que se han utilizado para los estudios fisiológicos no tienen un cuerpo esofágico de músculo liso. Se ha especulado que las ICCs del cuerpo esofágico podrían estar implicadas en la transmisión neuromuscular, o servir como receptores de tensión que entonces transmitirían información a las neuronas intrínsecas o extrínsecas (Paterson, 2006). Estudios morfológicos han mostrado intercalado de ICCs entre las terminales nerviosas y las células musculares lisas esofágicas en la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1987a; Daniel & Posey-Daniel, 1984).

En resumen, se han descrito dos tipos de interacción entre las varicosidades terminales de las neuronas motoras entéricas y las células musculares lisas del tracto GI:

a) mediante interposición de las ICC-IM, ya que están en contacto muy estrecho con las varicosidades y forman uniones gap con las células musculares, hecho que se ha demostrado morfológicamente con microscopía electrónica en el LES, esófago, estómago, intestino delgado y colon (Daniel & Posey-Daniel, 1984; Faussonne-Pellegrini & Cortesini, 1985; Faussonne-Pellegrini, 1987), observación que ha sugerido a algunos autores que las ICC pueden participar en la neurotransmisión, aunque se dispone de escasas evidencias funcionales;

b) las varicosidades pueden contactar directamente con las células musculares lisas sin la presencia de ICC, que es en la actualidad el modelo más aceptado (Mitsui & Komuro, 2002).

### 3.2.4-Tipos de Neuronas Entéricas

Las neuronas entéricas pueden clasificarse según su morfología (Dogiel tipos I-VII), sus propiedades eléctricas (tipos S y AH), su código químico (transmisores u otros marcadores) o su función. Siguiendo una clasificación funcional se han descrito:

-**Neuronas sensitivas:** también conocidas como IPAN (*Intrinsic Primary Afferent Neurons*) porque son intrínsecas a la pared del intestino y traducen estímulos físicos en actividad eléctrica (Brookes & Costa, 2006). Tienen en sus terminales en la luz intestinal, receptores especializados para detectar cambios a diferentes estímulos. Los receptores sensitivos en el tracto digestivo están clasificados según la energía que detectan: termorreceptores, quimiorreceptores y mecanorreceptores. Las regiones sensoriales del receptor, transforman los cambios en la energía del estímulo en potenciales de acción que se transmiten a lo largo de las fibras nerviosas sensitivas a otros puntos del ENS e inician diferentes reflejos digestivos (Wood, 2006).

-**Interneuronas:** Están interconectadas unas con otras formando redes que procesan la información procedente de las neuronas sensitivas y controlan el comportamiento de las motoneuronas (MNs) hacia los sistemas efectores (Wood, 2006). Son ascendentes (sentido oral) y descendentes (sentido aboral) formando dichas cadenas de interconexión. Las neuronas ascendentes son principalmente colinérgicas, mientras que las descendentes tienen una codificación química más compleja que incluye ACh, NO, VIP, 5-HT y somatostatina (Furness, 2000).

-**Neuronas motoras:** Constituyen la vía final de la transmisión de las señales que controlan los sistemas efectores, agrupándose en tres tipos: 1) MNs musculares (inervan fibras musculares): inervan tanto las capas musculares, longitudinal y circular, como la muscular de la mucosa a lo largo de todo el tracto digestivo (Furness, 2000). Se subdividen en MN excitatorias cuando liberan neurotransmisores que estimulan la contracción muscular y la secreción glandular; y MN inhibitorias cuando liberan transmisores que relajan las células musculares lisas (Wood, 2006). Mediante estudios inmunohistoquímicos, mecánicos y electrofisiológicos se ha determinado que las *neuronas excitatorias* presentan una transmisión **colinérgica** muscarínica predominante en todo el tracto digestivo (Ratcliffe *et al.*, 1998) y también taquiquinérgica (**SP, NKA y NKB**) (Cao *et al.*, 2000; El-Mahmoudy *et al.*, 2003; Krysiak & Preiksaitis, 2001). Además, se ha descrito un componente excitatorio residual mediado por el



**ATP** actuando a través del receptor P2X<sub>1</sub> (Lecci *et al.*, 2002). Las *neuronas inhibitorias* codifican como neurotransmisores inhibitorios el óxido nítrico (**NO**) (Aulí *et al.*, 2008; Farré *et al.*, 2006; Opazo *et al.*, 2009; Preiksaitis *et al.*, 1994b; Todorov *et al.*, 2003) el monóxido de carbono (**CO**) (Watkins *et al.*, 2004; Werkstrom *et al.*, 1997; Xue *et al.*, 2000a), los péptidos **VIP**, **PACAP**, **CGRP** (Uc *et al.*, 1997; Uc *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2000a) y el **ATP** (De Man *et al.*, 2003; Mule & Serio, 2003; Pluja *et al.*, 1999); 2) MNs secretomotoras y vasomotoras que controlan las secreciones y el torrente sanguíneo, respectivamente; 3) MNs que inervan las células enterocromafines (células especializadas de la mucosa) (Hansen, 2003).

### 3.2.5 Neuronas motoras y neurotransmisores neuromusculares

#### 3.2.5.1 Neurotransmisores Inhibitorios NANC en el Esófago (Respuesta Inhibitoria)

En el tracto GI los neurotransmisores inhibitorios que presentan tal efecto son el óxido nítrico (**NO**), el monóxido de carbono (**CO**), el péptido intestinal vasoactivo (**VIP**), el péptido activador de la adenil ciclasa pituitaria (**PACAP**), la adenosina-5-trifosfato (**ATP**), y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (**CGRP**). En cada especie su contribución particular a la relajación muscular es específica, y presentan contribuciones variables en función de la región anatómica y la especie animal.

##### 3.2.5.1.1 Óxido Nítrico (NO)

El NO es un gas radical libre cuya molécula es altamente inestable en presencia de oxígeno.

Se sintetiza por acción de una familia de enzimas conocidas como *sintasa de óxido nítrico (NOS)* en una reacción en la que el aminoácido L-arginina se convierte en NO y L-citrulina, requiriendo la presencia de un cofactor (NAPDH, nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido, nad-fosfato reducido) en presencia de oxígeno (Burnstock, 2009).

Hay tres isoformas de la NOS que son producto de distintos genes:

1) La NOS inducible (iNOS) que, en condiciones fisiológicas, no está presente normalmente en los tejidos pero se induce en la inflamación o daño del tejido. 2 y 3) Existen dos tipos de NOS constitutiva que participan en las respuestas fisiológicas normales, cada uno con una distribución específica: 2) La NOS neuronal (nNOS) se localiza en las neuronas intramurales y terminales nerviosos

dirigidos hacia las células musculares lisas (Chakder *et al.*, 1997); 3) La NOS endotelial (eNOS), localizada en las células musculares lisas (Makhlouf & Murthy, 1997).

El NO es una molécula de señalización que no se almacena en la neurona ya que difunde libremente a través de la membrana plasmática. Este neurotransmisor no actúa sobre receptores extracelulares de la membrana postunión de la diana, sino que lo hace en sitios intracelulares. La diana principal del NO es la *guanilato ciclasa soluble (GCs)*. El NO se une y activa la GC, aumentando la conversión de GTP a GMP cíclico. El GMPc actúa en su kinasa, la *protein kinase G (PKG)*, con cascadas de fosforilación llevando a un número de acciones fisiológicas (Shah *et al.*, 2004). Sin embargo, en condiciones fisiopatológicas y probablemente en ciertas condiciones fisiológicas normales la señalización mediada por NO puede ser independiente de la activación de la GC. El NO regula, directamente, la función de canales iónicos (tanto por apertura de canales de K<sup>+</sup> (Cayabyab & Daniel, 1995; Koh *et al.*, 1995) como por cierre de canales de Cl<sup>-</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> (Cl<sub>(Ca)</sub>) (Zhang *et al.*, 1998), enzimas y otras tantas proteínas.

En 1990, Bult *et al.* propusieron que el NO podía actuar como neurotransmisor NANC inhibitorio en el tracto GI (Bult *et al.*, 1990). Murray *et al.*, en 1991 fueron los primeros que sugirieron el importante papel del NO en la relajación del LES, estudiando el efecto de los inhibidores de la NOS sobre las tiras musculares del LES (Murray *et al.*, 1991); más tarde, se confirmó en el LES humano (Oliveira *et al.*, 1992; Preiksaitis *et al.*, 1994b; Tøttrup *et al.*, 1993). Diferentes estudios en diversas especies en modelo animal mostraron que el NO es el principal neurotransmisor que media la relajación del músculo liso del LES: en el perro (De Man *et al.*, 1991); en la zarigüeya (Murray *et al.*, 1991); el gato (Kortezova *et al.*, 1996); la cobaya (Yuan *et al.*, 1998); el cerdo (Farré *et al.*, 2006) y la rata (Farré *et al.*, 2007b). También se mostró que el NO desempeña un importante papel en las respuestas mediadas por nervios NANC en el cuerpo esofágico de la zarigüeya tanto in vitro (Christinck *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1991) como in vivo (Yamato *et al.*, 1992b).

Experimentos in vivo mostraron que los inhibidores de la NOS podían abolir o reducir la relajación del LES inducida por deglución en la zarigüeya, (Yamato *et al.*, 1992a), el gato (Xue *et al.*, 1996), el humano (Konturek *et al.*, 1997) y el ratón (Sivarao *et al.*, 2001).

En uno de los primeros estudios morfológicos de la inervación nitrérgica del esófago

humano, Singaram *et al.*, mostraron, mediante técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, que el 55% de la población neuronal mientérica eran neuronas nitrérgicas. Éstas, inervaban el músculo esofágico circular y el longitudinal (Singaram *et al.*, 1994). Por otro lado, Mearin *et al.*, confirmaron que la sintasa de óxido nítrico estaba presente en el MP de la GEJ en pacientes control mientras que estaba ausente en los pacientes con acalasia (Mearin *et al.*, 1993). En un estudio morfológico reciente en las fibras clasp (región del LES sita en la curvatura menor del estómago) y sling (región del LES sita en la curvatura mayor del estómago) humanas en el que determinan la morfología y posición de las MNs excitatorias e inhibitorias, demostraron que la mayoría de las MNs de las fibras clasp eran principalmente neuronas inhibitorias positivas a NOS, muchas de ellas procedentes del esófago (Liu *et al.*, 2011). En cuanto a estudios en diversos modelos animales, en un estudio regional en el esófago de gato observaron variaciones en la densidad de los nervios que contienen NOS. Así, la densidad de inmunoreactividad a NOS era similar en la región del LES y a un nivel 2 cm proximal a éste, pero marcadamente menor, a un nivel 7 cm proximal al mismo. Mientras que la capa muscular circular mostraba una inmunoreactividad a NOS abundante, la de la capa muscular longitudinal era escasa (Ny *et al.*, 1995a). En la cobaya, encontraron que las neuronas mientéricas positivas a NADPH-diaforasa contribuyen a la inervación del músculo estriado del esófago y del músculo liso del LES. Las neuronas positivas representaban un 69% del total de neuronas mientéricas (Morikawa & Komuro, 1998).

Rodrigo *et al.* encontraron fibras nerviosas inmunoreactivas distribuidas a lo largo del esófago del gato y del mono, formando parte de los ganglios intramurales y de los plexos que invaden sus diferentes capas. En el esófago felino, los tercios medio e inferior contenían más fibras nerviosas, ganglios y neuronas inmunoreactivas que el tercio superior esofágico, más abundantes en la región cercana al LES. El 30-45% de las neuronas eran inmunoreactivas a la NOS. En el mono, la inervación nitrérgica era menos importante, pero también era mayor en los tercios medio e inferior de la pared esofágica, la capa muscular lisa estaba intensamente inervada por fibras nerviosas inmunoreactivas (Rodrigo *et al.*, 1998).

### 3.2.5.1.2 Purinas

Geoffrey Burnstock estableció, en los años 80, una clasificación formal de los receptores de la adenosina y el ATP (Burnstock, 1980). Los receptores de purinas se clasifican de la siguiente manera:

i) Los receptores P1: activados por adenosina, de los que se han descrito cuatro subtipos  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ . Están acoplados a proteína G, ya sea disminuyendo ( $A_1$  y  $A_3$ ) o aumentando ( $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ ) y la producción de AMP-c por efecto de la regulación de la adenilato ciclasa (AC). También se ha descrito que pueden activar la vía de la fosfolipasa C (PLC) produciendo los segundos mensajeros inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacilglicerol (DAG). El  $IP_3$  estimula la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular por la interacción con receptores específicos del retículo sarcoplásmico. Este aumento de  $Ca^{2+}$  puede estimular diferentes vías tales como la de la proteína kinasa C (PKC), la de la fosfolipasa A2 (PLA2), los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  y la sintasa de óxido nítrico.

ii) Los receptores P2: activados por ATP, ADP, UTP y UDP. Los receptores P2 se dividen en 2 familias: la familia P2X, canales iónicos dependientes de ligando (LGIC) cuya activación produce una respuesta rápida (~10 ms); se han descrito siete receptores P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub> todos ellos unidos a canales catiónicos para  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$ ; y la familia P2Y, que son receptores acoplados a proteína G de los que se han descrito 8 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>. Son receptores metabotrópicos de respuesta lenta (< 100 ms) y actúan vía proteína G acoplada a la activación de PLC, produciendo la formación de  $IP_3$  y la movilización del  $Ca^{2+}$  intracelular. También se ha descrito que algunos pueden estar unidos a proteínas G que activan la AC incrementando el AMPc (Ralevic & Burnstock, 1998).

Ambos grupos de receptores P2X/P2Y juegan un papel muy importante en la modulación de la motilidad en el tracto GI.

Estudios electrofisiológicos en el intestino humano (Xue *et al.*, 1999) y en el colon de ratón (Serio *et al.*, 2003) demostraron que el ATP o una purina relacionada es la responsable del componente rápido (IJPf) de las hiperpolarizaciones del músculo liso ó IJP (potenciales postunión inhibitorios) en ambos tejidos, mientras que se propuso que el óxido nítrico mediaría la parte lenta ó hiperpolarización sostenida del IJP (IJP<sub>s</sub>) en estas especies.

Diferentes estudios en el LES de la zarigüeya, observaron que el ATP, ADP y la adenosina disminuyen su tensión (Rattan & Goyal, 1980), e inducen la hiperpolarización (Daniel *et al.*, 1983). Farré *et al.*, demostraron que el ATP también relaja las tiras de músculo liso en el LES porcino, mediante un componente rápido seguido de un periodo de relajación lento (Farré *et al.*, 2006). Se han empleado diferentes antagonistas para el estudio de los receptores y vías de acción del ATP y

análogos. Estudios electrofisiológicos y mecánicos en el LES de la cobaya (Imaeda *et al.*, 1998); y del cerdo (Farré *et al.*, 2006) encontraron que la suramina (antagonista inespecífico de los receptores P2) y la apamina (bloqueador de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de baja conductancia ( $K_{(Ca, slow)}$ )) reducen la hiperpolarización y relajación inducida por el ATP en el músculo liso del LES de la cobaya (Imaeda *et al.*, 1998) y el cerdo (Farré *et al.*, 2006). Además, la apamina bloquea el componente rápido de la relajación inducida por ATP (Alexander *et al.*, 2011).

La relajación del músculo liso a lo largo de todo el tracto GI incluye un componente sensible a apamina que puede implicar como mediador al ATP o a purinas relacionadas (Costa *et al.*, 1986), en el fundus gástrico de rata (Lefebvre *et al.*, 1991), en el de la cobaya (Ohno *et al.*, 1996) y en el IAS de la rata (Rae & Muir, 1996). El componente sensible a apamina se describió en la relajación de las tiras musculares del LES, inducida por estimulación eléctrica de campo (EFS), después del bloqueo de la NOS. Esta observación se realizó en diferentes especies tales como la cobaya (Imaeda *et al.*, 1998), el humano (González *et al.*, 2004), el cerdo (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006) y la rata (Farré *et al.*, 2007b). También se observó durante la estimulación vagal de la cobaya (Yuan & Brookes, 1999; Yuan *et al.*, 1998).

El desarrollo de fármacos específicos, tanto con efecto agonista como antagonista, permiten dilucidar la naturaleza de la vía purinérgica. Mediante antagonistas específicos como el MRS2179 (antagonista selectivo de los receptores  $P2Y_1$ ) se ha visto que bloquea el componente rápido de la relajación inducida por ATP en el LES porcino (Farré *et al.*, 2006). El componente no-nitrérgico podía reducirse con MRS2179 en el cerdo (Farré *et al.*, 2006). También se ha utilizado en el colon (Aulí *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2008a; Gallego *et al.*, 2006), en intestino delgado (Gallego *et al.*, 2008b), en el IAS porcino (Opazo *et al.*, 2009) y en la rata (Opazo *et al.*, 2011). Recientemente, el MRS2500 y MRS2279 (bloqueador del receptor  $P2Y_1$  con mayor potencia) han demostrado ser más potentes que el MRS2179 en la caracterización de la respuesta inhibitoria purinérgica del colon humano (Gallego *et al.*, 2011). También en el IAS de rata el MRS2500 demostró ser más potente que el MRS2179 (Opazo *et al.*, 2011).

Además, el agonista del receptor  $P2Y_1$  ADP $\beta$ S y el 2-MeSATP inducen una relajación de las tiras musculares humanas del LES (Farré *et al.*, 2006). Todos estos resultados sugieren que el ATP o purinas relacionadas juegan un papel en el componente no-nitrérgico de la relajación del LES actuando a través de receptores  $P2Y_1$  y activando

canales ( $K_{(Ca, slow)}$ ). Se desconoce el tipo de receptores purinérgicos implicados en la relajación del LES humano inducida por la deglución o por las relajaciones transitorias.

### 3.2.5.1.3 VIP/PACAP

Geoffrey Burnstock mostró en los años 70 el papel del ATP como neurotransmisor de la vía inhibitoria no-adrenérgica y en consecuencia, a esta vía se la denominó Vía Purinérgica (Burnstock, 1979). Más tarde, y de igual modo, se defendió la idea de un neurotransmisor peptidérgico, el péptido intestinal vasoactivo (VIP), debido a tres tipos de observaciones: 1) su localización en los nervios que inervan al músculo liso circular, 2) su liberación desde los nervios inhibitorios no-adrenérgicos por estimulación eléctrica y, 3) a su capacidad para producir la relajación del músculo liso circular (Bitar & Makhoulouf, 1982).

El VIP es un péptido de 28 aminoácidos que pertenece a la familia de péptidos reguladores y que está presente en el sistema nervioso central y periférico (Rekik *et al.*, 1996). El Péptido Activador de la Adenil Ciclasa Pituitaria (PACAP) se ha identificado en extractos del intestino en dos formas amida, un péptido de 38 aminoácidos (PACAP-38) y otro de 27 aminoácidos (PACAP-27), aunque parece que predomina el PACAP-38 (Baccari & Calamai, 2001).

En el LES felino y humano, Ny *et al.*, hallaron que, en ambas especies, la concentración de PACAP-38 en el tejido era mayor que la del PACAP-27, sin embargo, mientras que las estructuras nerviosas inmunoreactivas a PACAP-27 presentaban una incidencia de moderada a abundante, los experimentos preliminares con antiserum de PACAP-38 fueron infructuosos (Ny *et al.*, 1995b).

El PACAP humano y el VIP poseen un alto grado de homología de secuencia (68% entre PACAP-27 y VIP) y por tanto se identifica al PACAP como miembro de la Superfamilia VIP-secretina-GHRH-glucagon (Vaudry *et al.*, 2009). El VIP y su homólogo estructural se consideran, entre los polipéptidos, como los principales neurotransmisores inhibitorios liberados desde fibras NANC (Rekik *et al.*, 1996). En el MP, el VIP juega el papel de neurotransmisor inhibitorio liberado por neuronas no-adrenérgicas no-colinérgicas (NANC) (Goyal *et al.*, 1980).

Mediante la caracterización farmacológica y basándose en sus afinidades relativas para VIP y PACAP, se ha determinado la existencia de dos tipos de *sitios de unión* (**binding site**): a) *Sitio de unión Tipo-I* que exhibe mayor afinidad por PACAP-38 y PACAP-37 y mucho menor por VIP; b) *Sitio de unión Tipo-II* que posee una afinidad



similar por VIP y PACAP. Siendo éste más abundante en órganos periféricos varios (Vaudry *et al.*, 2009). Los subtipos de receptores para VIP y PACAP definidos por la IUPHAR (International Union of Pharmacology) presentan la siguiente nomenclatura: PAC1-R que exhibe afinidad alta por PACAP y baja por VIP; y VPAC1-R, VPAC2-R que tienen altas y similares afinidades por VIP y PACAP (Harmar *et al.*, 1998).

En cuanto al mecanismo de transducción, los tres receptores presentan un mecanismo principal en el que están acoplados a la familia de proteínas Gs que estimula la AC y la producción de AMPc. El mecanismo secundario del PAC1-R emplea como transductor una proteína G (de identidad desconocida) que estimula la fosfolipasa C. El del VPAC1-R emplea como posibles transductores la familia  $G_i/G_o$ ,  $G_q/G_{11}$  ó una proteína G que estimula la fosfolipasa C, la fosfolipasa D. El del VPAC2-R emplea una proteína G de identidad desconocida que estimula la fosfolipasa C y la fosfolipasa D (Harmar *et al.*, 2011; Vaudry *et al.*, 2009).

A lo largo de todo el tracto GI se ha encontrado gran cantidad de PACAP. La presencia de cuerpos celulares inmunoreactivos a PACAP se ha observado en los ganglios mientéricos. También se han visualizado numerosas fibras que contienen PACAP a lo largo de las fibras musculares circulares y en la capa muscular lisa longitudinal del esófago (Köves *et al.*, 1993; Olsson & Holgrem, 1994; Uddman *et al.*, 1991). En el LES de diferentes especies, las fibras inmunoreactivas a PACAP están en la capa muscular circular (Ny *et al.*, 1995b; Uddman *et al.*, 1991). Aunque debido a las diferencias entre especies, el PACAP tiene un papel controvertido en la neurotransmisión del LES.

Diversos estudios de esófago en diferentes especies ya sea animales, tales como la rata, el cerdo (Uddman *et al.*, 1978) y la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1987b) como en humanos (Aggestrup *et al.*, 1983), han encontrado nervios hacia ambas capas musculares (longitudinal y circular) que son inmunoreactivos a VIP. El VIP estaría contenido tanto en los nervios con cuerpos celulares extrínsecos, como en los terminales de las neuronas intrínsecas (Singaram *et al.*, 1991).

El VIP está presente en las neuronas mientéricas del LES humano (Aggestrup *et al.*, 1985; Uddman *et al.*, 1991), del felino (Ny *et al.*, 1995a; Uddman *et al.*, 1991), de la cobaya y el bovino (Uddman *et al.*, 1991).

En estudios in vivo se ha demostrado que el VIP disminuye la presión del LES (Guelrud *et al.*, 1992; Rattan *et al.*, 1982), y en estudios in vitro, el VIP induce la relajación del músculo liso del LES del perro (Jury *et al.*, 1992), de la zarigüeya (Jury *et al.*, 1992; Uc *et al.*, 1999), del conejo (Kohjitani *et al.*, 1996) del gato (Kortezova *et al.*, 1996) y del cerdo (Farré *et al.*, 2006). En el cuerpo esofágico, sin embargo, existen evidencias que describen un efecto excitatorio del VIP en el esófago intacto de la zarigüeya (Rattan *et al.*, 1982).

Respecto al PACAP, diversos estudios in vitro en diferentes especies tanto en animales como en humanos, tales como el gato y el humano (Ny *et al.*, 1995b) y el cerdo (Farré *et al.*, 2006), han demostrado que el PACAP-27 y el PACAP-38 relajan las tiras musculares circulares del LES.

#### 3.2.5.1.4 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) se produce en dos formas diferentes (O'Halloran & Bloom, 1991). En el intestino, las neuronas entéricas producen la forma  $\beta$  del CGRP (Mulder *et al.*, 1988). En el LES de la zarigüeya están presentes las neuronas inmunoreactivas a CGRP (Rattan *et al.*, 1988), in vivo se vio que el CGRP disminuye la presión del LES (Parkman *et al.*, 1989; Rattan *et al.*, 1988).

Diferentes estudios in vitro mostraron que el efecto del CGRP varía en función de la especie, el CGRP no relaja las tiras musculares del LES de conejo (Kohjitani *et al.*, 1996) ni del cerdo (Farré *et al.*, 2006) pero induce una relajación concentración-dependiente en las tiras musculares del LES de la zarigüeya que se antagoniza con CGRP 8-37. En la misma especie, este antagonista, sin embargo, no evita la relajación inducida por EFS (Uc *et al.*, 1997; Uc *et al.*, 1999). Aunque aún se desconoce el papel del CGRP, los datos actuales no apoyan la hipótesis de que el CGRP sea un mediador principal en la relajación del LES inducida por la estimulación de las MNs inhibitorias.

#### 3.2.5.1.5 Monóxido de Carbono (CO)

El monóxido de carbono (CO) es un gas que produce su efecto debido a la activación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) y la producción de GMPc (Ny *et al.*, 1996). Este enzima está formado por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$ , su ensamblaje es limitante para que la activación por sus ligandos produzca GMPc (Lucas *et al.*, 2000). Se ha sugerido que este gas podría jugar un papel en la relajación del músculo liso en diferentes áreas del tracto GI (Lim *et al.*, 2005; Watkins *et al.*, 2004).

Aún así, no se ha estudiado el rol del CO en la relajación de forma extensiva siendo resultados no concluyentes. El enzima constitutivo responsable de la síntesis del CO, haem oxygenase type 2, está presente en el ENS del LES colocalizándose en las neuronas que contienen NOS y VIP (Ny *et al.*, 1996). Tanto el CORM-1, molécula que libera CO,

como el CO puro pueden relajar las tiras musculares del LES de la zarigüeya, el gato y el cerdo, sin embargo el inhibidor selectivo de la haem oxygenase, *zinc protoporphyrin IX*, no modifica la relajación inducida por EFS (Fan *et al.*, 1998; Farré *et al.*, 2006; Ny *et al.*, 1996). No se ha aclarado completamente el rol del CO como neurotransmisor inhibitorio NANC en el LES.

### 3.2.5.2 Neurotransmisores excitatorios en el Esófago (Respuesta Excitatoria)

#### 3.2.5.2.1 Acetilcolina (ACh)

La acetilcolina (ACh) es el principal neurotransmisor excitatorio en el tracto GI. Existen dos tipos de receptores que median la transmisión colinérgica en el ENS, los receptores nicotínicos (nAChR) y los muscarínicos (mAChR) siendo éstos últimos los que están implicados en las respuestas contráctiles del músculo liso. Los mAChR pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína-G; todos son receptores de membrana con una estructura común, con siete dominios transmembrana y los extremos, tanto amino como carboxilo terminal, en el lado extra e intracelular, respectivamente. Existen 5 subtipos de mAChRs (M1, M2, M3, M4, M5), la unión de la ACh en los M1r, M3r y M5r se produce vía  $G_q/G_{11}$ , mientras que los M2r y M4r vía  $G_{i/o}$  (Caulfield & Birdsall, 1998).

Uno de los primeros estudios de localización de mAChR en el ENS, mediante la unión de radio-ligandos no selectivos, demostró que la mayoría de los mAChR estaban asociados a la musculatura más que a los plexos nerviosos (Buckley & Burnstock, 1984); aunque Buckley *et al.*, también los localizaron en las neuronas mientéricas (Buckley & Burnstock, 1986). En el músculo liso del tracto GI está expresada una población heterogénea de mAChR que presenta un papel muy importante en la mediación de la transmisión desde las motoneuronas finales hacia el músculo. Los receptores M2 y M3 están presentes en la membrana celular de las células musculares lisas. Estudios funcionales y anatómicos en el músculo intestinal muestran proporciones de receptores muscarínicos M2r de 70-80%, de M3r de 20-30% y proporciones no medibles de M1r y M4r (Giraldo *et al.*, 1988; Gomez *et al.*, 1992; Iino & Nojyo, 2006; Ladinsky *et al.*, 1988).

Funcionalmente, los mAChR localizados en el músculo tienen un papel importante en la mediación de la contracción muscular inducida colinérgicamente (Tonini *et al.*, 1981), por la mediación, predominantemente, del efecto directo de la ACh en los reflejos musculares. Aunque en las

células musculares lisas el M3r es menos abundante que el M2r, funcionalmente es el receptor predominante en la mediación de la contracción muscular (Matsui *et al.*, 2002; Uchiyama & Chess-Williams, 2004). La ACh estimula los receptores-M3 y provoca una contracción directa del músculo liso, la activación de M3r está unido a  $G_q/G_{11}$ , altera la actividad celular estimulando la fosfolipasa C (PLC) y generando el segundo mensajero inositol trifosfato ( $IP_3$ ), el cual induce la liberación de calcio desde depósitos intracelulares del retículo sarcoplásmico y diacilglicerol (DAG) que causa el influjo del calcio extracelular que induce la respuesta contráctil (Caulfield & Birdsall, 1998). La ACh vía receptores M2 también induce la contracción indirectamente, M2r se une a proteínas  $G_{i/o}$  para inducir respuestas vía inhibición de adenilato ciclasa (AC), la reducción de los niveles de AMPc y de la relajación del músculo liso. Los M3r también modularían las respuestas obtenidas por la activación de los M2r. La activación de estos últimos inicia la abertura de canales catiónicos, que producen depolarización (Bolton & Zholos, 1997). Se cree que el M3r modularía la actividad de estos canales. En cuanto a los mAChR localizados en las fibras nerviosas que inervan el músculo, su relevancia funcional consistiría en la regulación de la cantidad de ACh liberada hacia el músculo. Dicha regulación puede ser negativa ó positiva, como se vio en el ileon de la cobaya, negativa porque los M2r pre-sinápticos en las fibras nerviosas inhiben la liberación de ACh (Kilbinger & Wagner, 1975), ó positiva porque el M1r facilita la liberación de ACh desde los nervios al músculo (Kawashima *et al.*, 1990; Schuurkes *et al.*, 1988; Soejima *et al.*, 1993).

La colina acetiltransferasa (ChAT), enzima catalítico implicado en la síntesis de la ACh, se ha utilizado extensamente para marcar neuronas colinérgicas en el ENS (Furness *et al.*, 1984; Schemann *et al.*, 1993). En el MP del LES están presentes MNs excitatorias que son inmunoreactivas para la ChAT (Seelig *et al.*, 1984). En el estudio del efecto de agonistas y antagonistas colinérgicos sobre las tiras musculares del LES, se vio que agonistas como **carbacol** (CCh) y **betanecol** inducen una contracción del músculo liso de forma concentración-dependiente (Hubert *et al.*, 1993; Smid & Blackshaw, 2000). Así mismo el antagonista **atropina** inhibe la **contracción-off** de las tiras musculares del LES inducida por la estimulación eléctrica (EFS) (Farré *et al.*, 2007a; González *et al.*, 2004). Estudios del LES en diferentes especies mostraron que en la zarigüeya los receptores muscarínicos M2 están localizados directamente en el músculo liso (Gilbert *et al.*, 1984), en el gato, sin embargo, las contracciones inducidas por **CCh** parecen estar mediadas por

receptores M3, como sugería la sensibilidad de estas respuestas a los antagonistas **metoctramina** (antagonista M2r), **4-DAMP** (antagonista M3r), y **pirenzepina** (antagonista M1r) (Preiksaitis *et al.*, 1994a; Sohn *et al.*, 1993) corroboraron estos resultados con experimentos, en dicha especie, en células musculares aisladas cuya contracción se inhibió con el antagonista del receptor muscarínico M3 **p-fluoro-hexa-hidro-sila-difenidol**. Sin embargo, en células aisladas del músculo liso esofágico, es el receptor M2 el que media las respuestas contráctiles (Preiksaitis & Laurier, 1998).

Recientemente, un estudio en tejido humano ha demostrado que son los receptores M2 y M3 los que contribuyen a la contracción tónica de todo el músculo liso del esófago. Sin embargo, mientras que el receptor muscarínico M2 juega un papel más importante en la mediación de la contracción de las fibras clasp (derecha) y sling (izquierda) del LES, el receptor M3 lo hace en las fibras del esófago más proximal (Braverman *et al.*, 2009). Vegesna *et al.*, comparando las respuestas de las dos regiones clasp (derecha) y sling (izquierda) del LES de tejidos humano y porcino, demostraron que en ambas especies existe una mayor densidad de receptores M2 que M3, y que estos receptores median la contracción esofágica (Vegesna *et al.*, 2010).

### 3.2.5.2.2 Taquiquininas

Las taquiquininas son una familia de péptidos que comparte una secuencia de aminoácidos carboxi-terminal (Phe-X-Gly-Leu-MetNH<sub>2</sub>), secuencia mínima para inducir actividad biológica en los receptores taquiquinérgicos. Las primeras taquiquininas descubiertas en los mamíferos fueron péptidos cortos de diez-once aminoácidos que se expresaban en neuronas sensoriales y en neuronas del CNS y del ENS. Son los neuropéptidos conocidos como substancia P (SP), neuroquinina A (NKA) y neuroquinina B (NKB) (Lecci *et al.*, 2006). Ejercen sus efectos a través de receptores neuroquinina (NK) específicos que estudios moleculares, de unión de ligando y funcionales, clasifican como NK<sub>1</sub> (con mayor afinidad por la SP), NK<sub>2</sub> (con especial afinidad por NPK y NKA) y NK<sub>3</sub> (con alta afinidad por la NKB). Los tres son receptores taquiquinérgicos que pertenecen a la familia de receptores unidos a proteína-G. Todas las taquiquininas actúan como agonistas completos en los tres receptores y es la proteína-G implicada en la transducción de la señal la que marca la diferencia de potencia entre ellos (Holzer & Holzer-Petsche, 1997).

Posteriormente, se identificaron el neuropéptido K (NPK) y el neuropéptido-gamma

(NPγ), formas alargadas de la NKA; y más recientemente se identificó la hemoquinina-1 humana (hHK-1) (Lecci *et al.*, 2006). En el tracto GI las taquiquininas participan en la contracción NANC y contribuyen a la peristalsis que es insensible a la atropina (Krysiak & Preiksaitis, 2001). Hay indicios que sugieren que la estimulación de la actividad motora gastrointestinal por parte de la taquiquinina depende de la activación directa del músculo a través de los receptores NK<sub>1</sub> i/ó NK<sub>2</sub>, pero también implica la estimulación de receptores NK<sub>1</sub> i/ó NK<sub>3</sub> de los nervios entéricos (Holzer & Holzer-Petsche, 1997).

Estudios en el esófago de la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1989), la cobaya (Leander *et al.*, 1982), el conejo (Keast *et al.*, 1987), el cerdo (Aggestrup *et al.*, 1986) y el humano (Aggestrup *et al.*, 1986; Singaram *et al.*, 1991; Wattachow *et al.*, 1987) han localizado neuronas positivas a SP tanto en el MP como en el SMP; mientras en el esófago del gato estas neuronas positivas a SP sólo están presentes en el MP (Leander *et al.*, 1982). Estas neuronas intrínsecas emiten fibras inmunoreactivas a SP que van en los mismos plexos e inervan el músculo longitudinal, el músculo circular y la musculares mucosae pero no las capas musculares estriadas del esófago. Kovac *et al.*, demostraron que en el músculo liso esofágico humano, las taquiquininas actúan a través de receptores NK<sub>2</sub> localizados en las células musculares. El mecanismo de excitación implica la combinación de la liberación de calcio (Ca<sup>2+</sup>) desde depósitos intracelulares, un influjo/entrada a través de canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L, y la activación de corriente de cationes no-selectivos (Kovac *et al.*, 2006).

Estudios en el LES humano, porcino (Aggestrup *et al.*, 1986) y canino (Sandler *et al.*, 1991) mostraron fibras inmunoreactivas a SP y NKA. La SP, NKA y NKB inducen una respuesta contráctil de forma concentración-dependiente en las tiras musculares del LES humano con un rango de orden de potencia NKA > NKB > SP. La respuesta de la NKA se inhibe con el antagonista selectivo del receptor NK<sub>2</sub> (SR48968) y no lo hace con el antagonista selectivo del receptor NK<sub>1</sub> (CP-96345) (Huber *et al.*, 1993). Esto sugiere que la contracción del LES inducida por taquiquininas está mediada por la estimulación del receptor taquiquinérgico NK<sub>2</sub>.

### 3.2.5.3 Co-transmisión e interacciones

Durante muchos años, la neurotransmisión se interpretó en base al *Principio de Dale* (Sir Henry Hallett Dale), que mantenía que una neurona liberaba solamente un único neurotransmisor. Esta idea surgió a partir de una mala interpretación ampliamente extendida de la Teoría de Dale de 1935, que exponía que el mismo neurotransmisor

estaba almacenado y liberado desde todos los terminales de una neurona sensitiva única. Fue en 1957, cuando **Sir John Carew Eccles** introdujo el término *Principio de Dale* y el concepto de que las neuronas utilizan un único transmisor, que prevaleció hasta mediados de los años 70. En ese momento, surgieron varias evidencias contradictorias con este principio, y Geoffrey Burnstock introdujo el concepto de cotransmisión en 1976, afirmando que algunas fibras nerviosas sintetizan, almacenan y liberan más de un neurotransmisor que produce cambios en la actividad postunión vía receptores postunión específicos (Burnstock, 1976). Actualmente se sabe que las neuronas individuales en los sistemas nerviosos central y periférico contienen y pueden liberar un número grande y variado de sustancias que son capaces de influir en las células diana (Burnstock, 2007). El **código químico**, combinación precisa de neurotransmisores (y neuromoduladores) contenidos en las neuronas individuales y sus proyecciones y conexiones centrales, se ha definido gracias a estudios del ENS (Furness & Costa, 1987).

Para poder establecer que compuestos localizados en los nervios son realmente cotransmisores, deben satisfacer varios criterios: (i) La sustancia se sintetiza y almacena en el terminal nervioso; (ii) la sustancia se libera tras la estimulación nerviosa; (iii) deben identificarse receptores específicos para la sustancia en sitios postunión que, al ocuparse, inducen cambios en la actividad postunión; (iv) debe estar presente un sistema de transporte para la propia sustancia o para sus productos de descomposición, la captación de los mismos conduce a la renovación del almacenamiento del mensajero en los terminales nerviosos (Burnstock, 2004).

### 3.2.5.3.1 Co-transmisión e interacciones entre los neurotransmisores inhibitorios

Los neurotransmisores propuestos para las MN entéricas inhibitorias en el tracto GI son el NO, el VIP, el ATP, el PACAP, el CO y la CGRP. Mediante estudios inmunohistológicos y morfológicos se ha descrito la co-localización de los mismos y/o de sus enzimas de síntesis en las MN entéricas inhibitorias del tracto GI superior, incluyendo al LES (Ny *et al.*, 1994; Ny *et al.*, 1995a; Uc *et al.*, 1997; Werkstrom *et al.*, 1997). Las sustancias co-localizadas pueden actuar como neuromodulador, neurotransmisor o con efectos tróficos (Burnstock, 2004). Se han propuesto varios mecanismos de interacción entre los neurotransmisores:

a) La liberación *en paralelo* de dichas sustancias, presentando acciones independientes en los sitios específicos postunión (conocida como **co-transmisión**) (Burnstock, 2004);

b) Vías acopladas *en serie* (modelo cascada) con liberación de otros neurotransmisores, ó modulación preunión y/o postunión de la síntesis de una sustancia concreta a través de otros neurotransmisores.

**INTERACCIÓN VIP-NO:** se ha descrito que la interacción entre VIP y NO puede producirse: (i) VIP y NO actúan *en paralelo* a través de distintos mecanismos de relajación dependiendo de la actividad de la adenilato ciclasa y de la guanilato ciclasa, respectivamente (Barbier & Lefebvre, 1993; Boeckxstaens *et al.*, 1992; Farré *et al.*, 2006; Keef *et al.*, 1994; Tøttrup *et al.*, 1991); (ii) VIP y NO actúan *en serie*, donde el VIP liberado por las neuronas estimula la producción de NO, tanto en las células musculares lisas como en los terminales neuronales nerviosos, induciendo una relajación mediada por NO a través de la guanilato ciclasa (Ergun & Ogulener, 2001; Grider, 1993; Grider *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 1993).

**INTERACCIÓN PACAP-NO:** Al igual que el VIP, se ha demostrado que también el PACAP es capaz de estimular *en serie* la formación de NO en las células musculares del estómago de la cobaya, ya que la relajación inducida, de forma exógena, por PACAP se inhibía parcialmente con un inhibidor de la síntesis de NO (Katsoulis *et al.*, 1996).

La vía por la que VIP y PACAP estimulan la formación de NO en las células musculares es: VIP y PACAP interaccionan con un receptor específico, (receptor acoplado a una proteína G (G<sub>11-2</sub>) sensible a la toxina pertussis), que está acoplado a la activación de la sintasa de NO unida a la membrana plasmática de las células musculares lisas y a la estimulación del influjo de Ca<sup>2+</sup>. La NOS y la calmodulina están fuertemente unidas entre ellas en la membrana. El incremento de Ca<sup>2+</sup> conduce a la activación de la NOS y a la síntesis de NO. El NO activa la guanilato ciclasa soluble (GCs) llevando a la síntesis de GMP cíclico y a la activación de la proteína kinasa dependiente de CMPC (CG-kinasa) (Murthy *et al.*, 1996; Murthy & Makhlof, 1994).

**INTERACCIÓN PURINAS-NO:** Existe un papel secundario para otros neurotransmisores, las purinas actúan *en paralelo* con el NO en el estómago (Mule & Serio, 2003) e intestino (De Man *et al.*, 2003) de ratón, y en el colon de rata (Pluja *et al.*, 1999). También en el LES porcino el ATP actúa *en paralelo* con NO y VIP (Farré *et al.*, 2006). Sin embargo, el ATP puede inducir la producción de

NO en las células musculares lisas del yeyuno del perro (Xue *et al.*, 2000b).

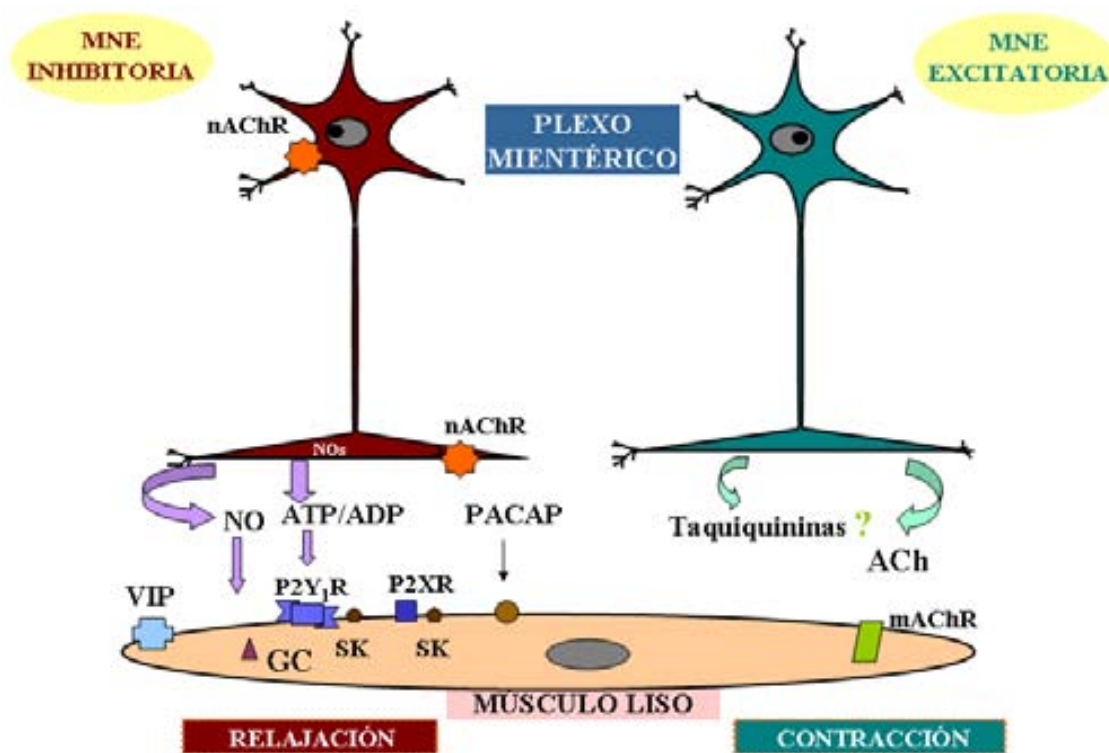
**INTERACCIÓN NO-CO:** Diversos análisis inmunohistoquímicos de la distribución de la hemoxygenase-2 (HO-2, que sintetiza el CO) y de la nNOS en el tracto intestinal humano (Miller *et al.*, 2001), felino y canino (Ny *et al.*, 1997), y de ratones (Zakhary *et al.*, 1997) demostraron la co-localización de nNOS y HO-2 en los ganglios del MP, implicando que el CO y el NO pueden ser producidos por las mismas neuronas. Xue *et al.*, en un estudio funcional (mecánico y electrofisiológico) del músculo liso intestinal de ratones carentes (knockout) de nNOS, carentes de HO-2 o ambas opciones simultáneamente, demostraron que la relajación muscular y la neurotransmisión inhibitoria estaba reducida en dichos ratones mutantes. En las preparaciones carentes de HO-2, las respuestas a la estimulación eléctrica estaban casi abolidas a pesar de la expresión persistente de la nNOS, mientras que el CO exógeno restablecía las respuestas normales, indicando que el sistema NO no funciona en ausencia de la generación de CO (Xue *et al.*, 2000a).

### 3.2.5.3.2 Co-transmisión e interacciones entre los neurotransmisores excitatorios

La acetilcolina (ACh) y la sustancia P (SP) son co-transmisores en las neuronas excitatorias entéricas (Burnstock, 2009). En distintas preparaciones de músculo liso gastrointestinal (GI) se ha demostrado que la ACh, la SP y la NKA presentan una co-localización y co-liberación neuronal (Holzer & Holzer-Petsche, 1997; Lippi *et al.*, 1998; Maggi *et al.*, 1993). La ACh es el principal neurotransmisor excitatorio en el tracto GI y las taquiquininas pueden tener un papel más o menos importante en la contracción dependiendo de la porción del tracto GI estudiada (Cao *et al.*, 2000; El-Mahmoudy *et al.*, 2003; Krysiak & Preiksaitis, 2001). Respecto al esófago, diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la presencia de SP en los nervios que inervan el músculo liso en el gato (Leander *et al.*, 1982), la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1989) y el humano (Krysiak &

Preiksaitis, 2001; Singaram *et al.*, 1991; Singaram *et al.*, 1994; Wattchow *et al.*, 1987; Wattchow *et al.*, 1988).

Domoto *et al.*, realizaron un estudio mecánico e inmunohistoquímico de diferentes capas musculares esofágicas de la zarigüeya. Determinaron que: 1) los transmisores utilizados en la unión neuromuscular de la muscularis mucosa eran la ACh y un mediador tipo-SP actuando en receptores separados; 2) la ACh liberada de los nervios intrínsecos inhibe la liberación del neurotransmisor tipo-SP; y 3) ambos mediadores están presentes en las mismas varicosidades nerviosas y liberados *en serie* por la actividad nerviosa (Domoto *et al.*, 1983).



**Figura 8. Representación esquemática de las dos vías paralelas principales de la neurotransmisión neuroefectora en el LES porcino.** La relajación del LES está mediada por: (i) el NO a través de la señalización de la guanilato ciclasa y mecanismos insensibles a la apamina; (ii) el ATP o una purina relacionada actuando sobre los receptores P2Y<sub>1</sub>, pero también con una menor contribución de los receptores purinérgicos P2X y el PACAP. La contracción del LES está mediada por: (i) la ACh en mayor medida; (ii) las taquíquininas. GC: guanilato ciclasa; NOS: sintasa de óxido nítrico; SK: canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia K<sub>(Ca, slow)</sub> (Farré *et al.*, 2006).

### 3.2.6 Neurotransmisores neuro-neuronales

#### 3.2.6.1 Ligand gated ion channels (LGIC)

Los receptores tipo canales iónicos dependientes de ligando (LGIC) son el segundo gran grupo de receptores del ENS: Los LGIC son proteínas de membrana integrales que contienen un poro que permite el flujo de determinados iones a través de la membrana plasmática. Este flujo es pasivo y se impulsa por un gradiente electroquímico para los iones permeables. Los canales se abren o se cierran, por la unión de un neurotransmisor a un *sitio(s) ortostérico* (sitio habitual) desencadenando un cambio conformacional que produce un estado de conducción, porque cambia la permeabilidad del canal a un ion o iones específicos. No pueden pasar iones a través del canal cuando está inactivo, pero

cuando se une el ligando se permite el paso a su través de 10<sup>7</sup> iones por segundo.

La modulación del *gating* (apertura/activación ó cierre/desactivación de canales iónicos) puede producirse por la unión de moduladores endógenos o exógenos a los *sitios alostéricos* (sitio de unión fuera del sitio habitual).

Los LGIC median la transmisión sináptica rápida (ms, en escala de tiempo) en el sistema nervioso y en la unión neuromuscular somática (músculo estriado). Esta transmisión implica la liberación de un neurotransmisor desde una neurona pre-sináptica y la posterior activación de receptores localizados post-sinápticamente que median una señal eléctrica rápida y fásica (*el potencial postsináptico excitatorio ó inhibitorio*).

Sin embargo, además de su papel tradicional en la neurotransmisión **fásica**, se ha establecido actualmente que algunos LGIC median una forma **tónica** de regulación neuronal que se produce por la activación de receptores extra-sinápticos debido a

niveles ambientales bajos de neurotransmisor (Alexander *et al.*, 2011).

Los LGIC pueden clasificarse en tres superfamilias: teniendo en cuenta que presentan similares secuencias de aminoácidos. Una familia se compone por receptores que están codificados por genes distintos aunque similares y que reaccionan básicamente a través del mismo mecanismo con el mismo neurotransmisor. Una superfamilia, es un conjunto de familias de receptores que presentan funciones y mecanismos diferentes, muchas veces reaccionando a neurotransmisores diferentes, pero que parecen evolucionar de un ancestro común. Las tres superfamilias de LGIC son (Hucho & Weise, 2001):

### **3.2.6.1.1) La Superfamilia de receptores que se asemejan a los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChR)**

Consta de: (i) los receptores glicina (**GlyR**), (ii) los receptores GABA<sub>A</sub> (**GABA<sub>A</sub>R**), (iii) los receptores de acetilcolina de tipo nicotínico (**nAChR**), y (iv) algún receptor de serotonina (**5-HT<sub>3</sub>R**). Presentan una arquitectura básica de pentámero (Hucho & Changeux, 1973). Tienen similares lazos peptídicos formados por puentes disulfuro, patrón de glicosilación y distribución de los residuos prolina y Ser/Thr (en un dominio específico que forma la pared del canal). Todos los receptores tienen cuatro secuencias de aminoácidos hidrofóbicos, que cruzan la membrana plasmática, se denominan “receptores con cuatro secuencias transmembrana (4TM)”. Todos presentan estructuras terciaria y cuaternaria similares.

(i) **Receptor glicina**: Los GlyR se expresan en algunas neuronas mientéricas. En estudios *in vitro*, la glicina induce contracciones bifásicas y sensibles a la neurotoxina tetrodotoxina (TTX) en tiras musculares circulares del colon de la cobaya (Pritchett *et al.*, 1989). En este mismo modelo animal, estudios electrofisiológicos intracelulares en colon y estómago muestran que la glicina depolariza neuronas mientéricas (en este estudio clasificadas como neuronas tipo-S (interneuronas, motoneuronas) y tipo-AH (neuronas sensoriales intrínsecas) (Neunlist *et al.*, 2001). El GlyR es un receptor tipo canal iónico con permeabilidad al anión Cl<sup>-</sup>. El antagonista del receptor de la glicina es la *estricnina*. El origen de la glicina endógena que activa los GlyR de las neuronas sería no-neuronal, ya que no se dan respuestas sinápticas sensibles a *estricnina* en las neuronas mientéricas. La glicina que activaría el receptor procedería de fuentes alimenticias (Pritchett *et al.*, 1989).

(ii) **Receptor GABA<sub>A</sub>**: El GABA y el enzima responsable de su síntesis, la *ácido glutámico decarboxilasa*, se localizan en algunas neuronas entéricas (Jessen *et al.*, 1986). Las neuronas entéricas también expresan un sistema de recaptación de GABA de alta afinidad, y la liberación de GABA es sensible a la neurotoxina tetrodotoxina y dependiente de calcio (Kerr & Krantis, 1983; Taniyama *et al.*, 1983). Aunque el receptor GABA<sub>A</sub> se localiza en las neuronas sensitivas también se ha encontrado GABA en neuronas que inervan las capas musculares intestinales, y no se ha encontrado en los terminales nerviosos en los ganglios (Furness *et al.*, 1989; Pompolo & Furness, 1990). Por tanto, no está clara la fuente endógena de GABA que sería necesaria para la activación fisiológica de los receptores GABA<sub>A</sub> en las neuronas sensitivas.

En los mamíferos, se han descrito secuencias de seis  $\alpha$ , tres  $\beta$ , tres  $\gamma$ , un  $\delta$ , tres  $\rho$ , un  $\epsilon$ , un  $\pi$  y un  $\theta$  subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>.

Los GABA<sub>A</sub> son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Cl<sup>-</sup>. Los agonistas del receptor gabaérgico GABA<sub>A</sub> en el ENS son: *GABA*, *muscimol*. Los antagonistas del receptor glutamatérgico GABA<sub>A</sub> en el ENS son: *Picrotoxin*, *bicuculline* (Galligan, 2002).

(iii) **Receptor nAChR**: Propiedades de los nAChRs entéricos: existen diferentes subtipos de nAChRs neuronales con propiedades específicas en función de su composición, que viene dada por la combinación de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Colquhoun & Patrick, 1997; Lindstrom *et al.*, 1996). Estudios inmunohistoquímicos en el intestino de la cobaya revelan que muchas neuronas entéricas expresan las subunidades  $\alpha 3$  y  $\alpha 5$  mientras que sólo algunas, así como fibras nerviosas, expresan la  $\alpha 7$  (Kirchgeßner & Liu, 1998; Zhou *et al.*, 2002). Las neuronas de los ganglios autonómicos expresan típicamente nAChRs compuestos por subunidades  $\alpha 3$  combinados con  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$  y/o  $\beta 4$  (Wang *et al.*, 1996). En las neuronas mientéricas están presentes las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 2$  (Zhou *et al.*, 2002). Las neuronas entéricas no expresan nAChRs funcionales que contengan la subunidad  $\alpha 7$  (Barajas-López *et al.*, 2001; Töröscik *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2002). Los nAChRs son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>. Los agonistas del receptor colinérgico nicotínico en el ENS son: *acetilcolina (ACh)*, *nicotina* y *DMPP*. Los antagonistas de los nAChRs en el ENS son: *hexametonio*, *mecamilamina* (antagonista más potente en nAChRs con subunidades  $\beta 4$ ) y *DH $\beta$ E* (dihidro- $\beta$ -erythroidine) (Harvey & Luetje, 1996). La  *$\alpha$ -bungarotoxina* es un antagonista de los nAChRs compuestos por subunidades  $\alpha 7$  que no tiene efecto

en las respuestas mediadas por nAChRs en el intestino (Barajas-López *et al.*, 2001; Töröscik *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2002). nAChRs presinápticos: los nAChRs están localizados en la región somatodendrítica de las interneuronas y las motoneuronas donde median la excitación de las mismas (Kunze & Furness, 1999; Töröscik *et al.*, 1991). Sin embargo, también pueden localizarse nAChRs en los terminales nerviosos donde estos receptores median la liberación de neurotransmisores por un mecanismo no dependiente de la transmisión de un potencial de acción y por tanto insensible a la TTX (MacDermott *et al.*, 1999; McGehee *et al.*, 1995; Wonnacott, 1997).

(iv) **Receptor 5-HT<sub>3</sub>**: Localización y función de los receptores 5-HT<sub>3</sub> entéricos: En el intestino delgado y en el colon, los 5-HT<sub>3</sub>R se localizan en los terminales nerviosos sensitivos entéricos de la mucosa (Bertrand *et al.*, 2000; Foxx-Orenstein *et al.*, 1996). La serotonina (5-HT), liberada de las células enterocromafines en la mucosa, inicia reflejos intestinales, en parte, por la activación de los 5-HT<sub>3</sub>R en las terminaciones de la mucosa de las neuronas sensitivas mientéricas (IPAN), con posterior activación de las MNs e interneuronas del MP. En el intestino delgado, los 5-HT<sub>3</sub>R también están localizados en los cuerpos celulares nerviosos de las MNs, interneuronas y las IPAN del ENS produciendo depolarizaciones desensibilizantes y de desarrollo rápido (Crist & Surprenant, 1988; Derkach *et al.*, 1989; Zhai *et al.*, 1999; Zhou & Galligan, 1999). En el estómago, combinando estudios electrofisiológicos con marcaje retrógrado, mostraron que las neuronas mientéricas gástricas con proyecciones ascendentes expresan receptores 5-HT<sub>3</sub> funcionales (Michel *et al.*, 1997). Las neuronas que expresan 5-HT<sub>3</sub>R son colinérgicas y contienen también SP (Michel *et al.*, 1997). Por tanto, los 5-HT<sub>3</sub>R podrían participar en el control neural de la motilidad gástrica.

La 5-HT actuando sobre 5-HT<sub>3</sub>R también puede participar en la transmisión gangliónica en el MP.

Los 5-HT<sub>3</sub>R son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>. Los agonistas del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>3</sub> en el ENS son: *5-HT*, *2-Me-5-HT*. Los antagonistas de los 5-HT<sub>3</sub>R en el ENS son: *ondansetron*, *granisetron*, *alosecron* (Galligan, 2002).

Se han clonado cinco subtipos de receptores 5-HT<sub>3</sub> humanos (5-HT<sub>3A-E</sub>), siendo caracterizados con detalle los complejos homo-oligoméricos de 5-HT<sub>3A</sub> y hetero-oligoméricos con subunidades 5-HT<sub>3A</sub> y 5-HT<sub>3B</sub>. Las subunidades 5-HT<sub>3C</sub>, 5-HT<sub>3D</sub> y 5-HT<sub>3E</sub>, igual que la subunidad 5-HT<sub>3B</sub>, no forman homómeros funcionales, pero se asocian con la

subunidad 5-HT<sub>3A</sub> para influir más en su expresión funcional que en su perfil farmacológico (Alexander *et al.*, 2011).

### **3.2.6.1.2) La Superfamilia de los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR)**

Presenta tres secuencias transmembrana (3TM: M1, M3 y M4). Una cuarta secuencia hidrofóbica entra y sale de la membrana plasmática desde el lado citoplasmático, de ese modo se forma un lazo (lazo reentrante, dominio M2) que bordea el canal. Los GluR son tetrámeros. Las tres familias de receptores ionotrópicos de glutamato son AMPA, Kainato y NMDA (Bigge, 1999).

Diferentes estudios en preparaciones in vitro músculo-nervio en el intestino de la cobaya demostraron que las neuronas mientéricas expresan receptores NMDA funcionales (Luzzi *et al.*, 1988; Wiley *et al.*, 1991). Estudios inmunohistológicos posteriores, mostraron que las neuronas entéricas expresan inmunoreactividad a subunidades del receptor AMPA, alrededor del 25-30% de las neuronas mientéricas y sobre el 50% de las neuronas de la submucosa contienen dichas subunidades. Casi en cada neurona mientérica puede encontrarse inmunoreactividad para el receptor NMDA (Liu *et al.*, 1997).

Los NMDA son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>. Los agonistas del receptor glutamatérgico NMDA en el ENS son: *glutamato*, *NMDA*. Los antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA en el ENS son: *AP-5*, *MK-80*.

Los AMPA son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>. Los agonistas del receptor glutamatérgico AMPA en el ENS son: *glutamato*, *AMPA*. Los antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA en el ENS son: *CNQX*, *DNQX*.

Los receptores NMDA se asocian como heterómeros de las subunidades GluN1, GluN2A-GluN2D, GluN3A-GluN3B. Los receptores AMPA se asocian como homómeros, ó heterómeros de las subunidades GluA1, GluA2, GluA3, GluA4.

Los receptores Kainato se asocian como homómeros de las subunidades GluK1, GluK2, GluK3B (Alexander *et al.*, 2011).



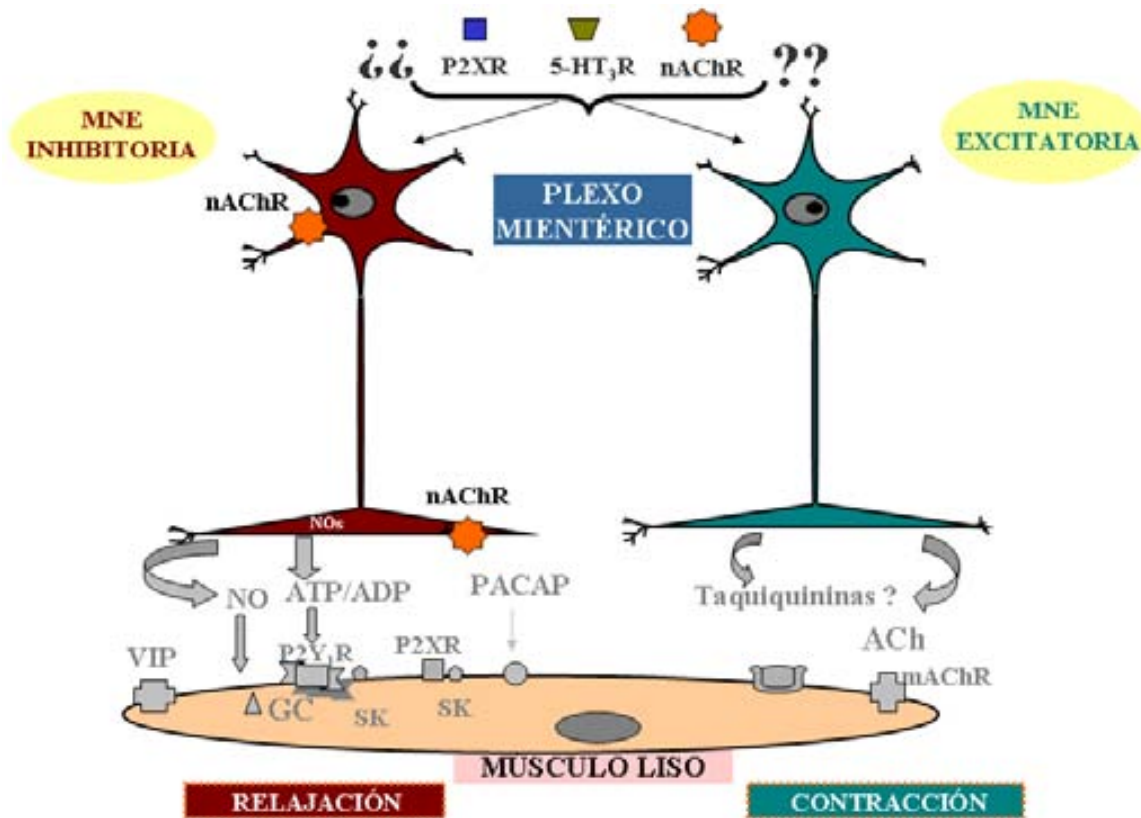
**3.2.6.1.3) Los receptores purinérgicos que unen ATP (P2X)**

Son miembros de la familia de los receptores tipo LGIC que se abren como respuesta al ATP extracelular. Los receptores P2X (P2XR) contienen dos secuencias transmembrana (2TM). Tienden a formar homotrimeros estables (subunidades idénticas) y también pueden existir como heterómeros (P2X<sub>1-7</sub>) (Nicke *et al.*, 1998; North & Surprenant, 2000; Robertson *et al.*, 2001). Todas las subunidades pueden formar receptores homoméricos excepto el P2X<sub>6</sub>.

Los P2XR son receptores tipo canales iónicos con permeabilidad a los cationes Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y excepcionalmente al anión Cl<sup>-</sup>. Los agonistas de los P2XR en el ENS son: *ATP* (ligando endógeno), *2-Me-S-ATP*, *α,β-meATP*. Los antagonistas de los P2X en el ENS son: *PPADS*, *suramin*, *TNP-ATP* (Galligan, 2002).

Estudios de la excitación sináptica rápida (fEPSP) en preparaciones del plexo mientérico del intestino de la cobaya (íleon, yeyuno, colon proximal y distal) mostraron que estas fEPSP tenían un componente mediado por los receptores P2X, aunque éste era más importante en el íleon (LePard *et al.*, 1997). Los receptores P2X también participan en la activación de las neuronas sensitivas intrínsecas e inician los reflejos motores intestinales (Bertrand & Bornstein, 2002).

Los P2XR se distribuyen de forma extensa por todo el cuerpo, incluyendo los sistemas nerviosos autónomo y periférico, el músculo liso, el corazón y los leucocitos. Están implicados en un rango de procesos fisiológicos tales como la modulación de la transmisión sináptica, el tono vascular, el ritmo cardíaco y la contractibilidad y nocicepción.



**Figura 9. Representación esquemática de los posibles receptores tipo LGIC de las vías motoras inhibitoria y excitatoria en el esófago porcino.** Los LGIC que se expresan en las motoneuronas del sistema nervioso entérico son: (i) los receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs); (ii) los receptores purinérgicos P2X; y (iii) los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>. Se ha descrito que estos LGIC participan en la transmisión a las motoneuronas entéricas inhibitorias y excitatorias (Galligan, 2002).

### **4. TÉCNICAS DE ESTUDIO IN VITRO**

Para el estudio de los neurotransmisores implicados en la transmisión neuroefectora y neuro-neuronal en tejidos del tracto GI (desde el esófago hasta el esfínter anal) de diferentes especies se emplean técnicas in vitro como son: (i) el *Baño de Órganos*, y (ii) la técnica electrofisiológica de *Microelectrodos*.

(i) La **Técnica de Baño de Órganos**, permite el estudio de la motilidad de preparaciones de músculo liso. Se estudia la respuesta mecánica, registrándose los cambios de tensión en el tono, es decir permite la evolución de la relajación o contracción del músculo liso como respuesta a la estimulación eléctrica o farmacológica de los diferentes elementos de la preparación. Se estimula la preparación de dos maneras diferentes, por un lado, se emplea la estimulación eléctrica de campo (EFS) de las MNs del MP contenidas en el segmento estudiado, y por otro, se emplea la estimulación farmacológica, mediante la adición exógena de agonistas de receptores musculares o neuronales. En ambos casos, se estudian los efectos sobre el tono. Se utilizan antagonistas para evaluar la liberación endógena de neurotransmisores en las respuestas inducidas por la estimulación eléctrica de las MNs. también se emplean para estudiar su efecto sobre el tono.

(ii) La **Técnica de Microelectrodos**, se aplica a las células musculares lisas del tracto GI, y mide el potencial de membrana de las mismas gracias a la inserción de un electrodo muy fino dentro de la célula (o microelectrodo) junto con un electrodo de referencia extracelular. Permite medir la hiperpolarización del potencial de membrana (RMP, *resting membrane potential*), conocida como potencial postunión inhibitorio (IJP, *inhibitory junction potential*) de las células musculares, debido a la estimulación selectiva de las neuronas inhibitorias mediante diferentes tipos de pulsos eléctricos. Permite estimar los efectos tanto de los posibles neurotransmisores sobre el RMP (hiperpolarización el caso de los NANC inhibitorios), mediante su adición exógena, como de los diferentes antagonistas sobre los IJPs obtenidos.

### **5. FISIOLÓGÍA NORMAL DEL ESÓFAGO Y DEL LES. CONTROL DE LA ACTIVIDAD MOTORA**

Tanto en la deglución como en el periodo entre degluciones, tiene lugar una actividad motora coordinada para conseguir funciones motoras esofágicas normales. El UES y el LES se relajan

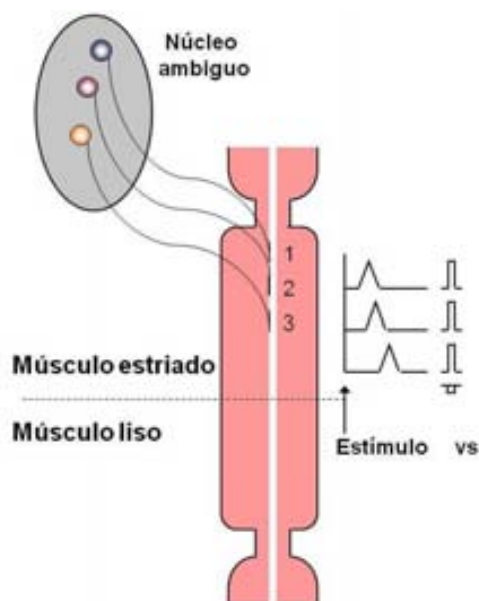
durante la deglución, y el EB secuencia adecuadamente una contracción peristáltica para ayudar al transporte aboral del bolo hacia el estómago. En el periodo entre degluciones, los esfínteres mantienen el tono para prevenir el movimiento oral de los contenidos esofágicos ó gástricos, y el cuerpo esofágico se mantiene colapsado y vacío. Las acciones motoras esofágicas coordinadas iniciadas por la acción voluntaria de la deglución se denominan *peristalsis primaria*. La contracción progresiva del cuerpo esofágico inducida mediante la distensión (reflejo local) por la comida mal aclarada o por contenidos gástricos refluídos se denomina *peristalsis secundaria*, y comienza en la zona del estímulo intraluminal ó por encima de éste (Clouse & Diamant, 2006).

La *peristalsis terciaria* es un mecanismo intramural local que, en ausencia de conexiones con el centro de la deglución, puede actuar a veces como un mecanismo de reserva para producir peristalsis en el segmento esofágico de músculo liso.

#### **5.1 Peristalsis en el músculo estriado**

La peristalsis esofágica comienza en la región del músculo estriado del EB como una progresión de la actividad muscular programada centralmente en la faringe y el UES. La coordinación de la contracción del músculo estriado está totalmente bajo control del CNS que dirige: (i) el inicio de la onda peristáltica primaria y secundaria (Roman & Gonella, 1981; Ryan *et al.*, 1977). La peristalsis en esta porción del esófago está generada por el núcleo ambiguo (NA) y mediada por las neuronas motoras inferiores (LMNs) vagales; (ii) y la naturaleza secuencial de la contracción. Es el NA el que genera una activación secuencial de las LMNs vagales, las cuales, una a una producen contracciones anulares sucesivamente más distales en el esófago estriado. Son las *neuronas de deglución promotoras* en el subnúcleo central del NTS (núcleo del tracto solitario) las que inician una activación secuencial de las LMNs vagales mediante descargas sumamente organizadas y ordenadas. Esta activación en serie de las neuronas que inervan progresivamente regiones distales produce ondas ordenadas de contracciones de músculo estriado en dirección craneocaudal que constituyen la contracción peristáltica.

La peristalsis en esta región es abolida por vagotomía o enfriamiento vagal bilateral (Roman & Gonella, 1981; Ryan *et al.*, 1977). La estimulación eléctrica directa de las eferentes LMN vagales sólo puede generar contracciones simultáneas en todos los niveles del músculo estriado, lo que indica la relevancia de los mecanismos centrales (Grundy, 1988) (Figura 10).



**Figura 10. Peristalsis en la porción de músculo estriado del esófago.** La peristalsis secundaria inducida por distensión y la propulsión esofágica en la porción del músculo estriado están mediadas por reflejos centrales. Se piensa que la inhibición deglutida en el esófago cervical está mediada centralmente inhibiendo a las LMNs en la formación compacta del NA. Se desconoce si las neuronas positivas a NOS, intramurales en el MP dentro del músculo estriado, juegan un papel en la peristalsis y en la inhibición deglutida. Se piensa que un disparo secuencial central de neuronas motoras vagales con fibras nerviosas independientes yendo de forma progresiva y distal en el esófago conduce a la peristalsis en la porción de músculo estriado esofágica. (Adaptado de Mashimo & Goyal., 2006).

## 5.2 Peristalsis en el músculo liso

El control de la peristalsis en la porción esofágica de músculo liso es más complicado, ya que es necesaria una combinación integrada de los mecanismos tanto central como intramural o intrínseco. El CNS es necesario para la activación de la *peristalsis primaria* y ejercer algún control sobre la secuenciación de las contracciones peristálticas. Sin embargo, la peristalsis puede también producirse independientemente del CNS, lo que destaca la importancia del mecanismo neuromuscular intrínseco de la pared esofágica en la generación de la onda peristáltica (Paterson, 2006).

### 5.2.1 Peristalsis primaria en el músculo liso

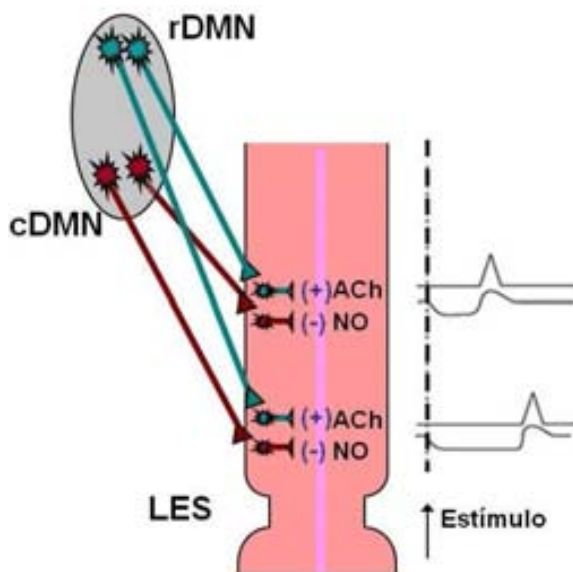
En la porción esofágica de músculo liso, la deglución produce el reflejo peristáltico que se genera centralmente y está mediado por las

neuronas vagales pregangliónicas del núcleo motor dorsal (DMN) (Figura 11). La peristalsis inducida por deglución se denomina *peristalsis primaria*. Ésta, es abolida por vagotomía bilateral. Las neuronas eferentes pregangliónicas vagales estimulan la peristalsis activando y modificando el reflejo peristáltico esofágico intrínseco (*peristalsis secundaria*).

El reflejo deglutorio que provoca la *peristalsis primaria* está organizado en el centro de deglución (localizado en el tronco del encéfalo) y se comunica con el músculo liso esofágico mediante las neuronas pregangliónicas: (i) se inicia la deglución y se activan primero las **eferentes pregangliónicas** que proyectan hacia las **neuronas postgangliónicas NANC**. Estas **eferentes** causan una rápida inhibición (< 1 s del inicio de la deglución) de todo el músculo liso esofágico, fenómeno conocido como *inhibición deglutoria*. El grado y la duración de la inhibición son mayores en el extremo distal del esófago, debido a un gradiente de influencia NANC creciente que describiré más adelante en este mismo capítulo (descripción del mismo en el apartado *Peristalsis secundaria en el músculo liso*, pág.26); este gradiente se conoce, también, como **gradiente de latencia**; (ii) tras la respuesta inhibitoria se produce una *contracción rebote* con *latencias* incrementadas progresivamente a lo largo del esófago; (iii) la deglución inicia también la activación secuencial de un segundo grupo de **fibras eferentes pregangliónicas** con periodos de *latencia* registrados de entre 1s y 5s. Se piensa que estas fibras con *latencias* de mayor duración proyectan hacia las **neuronas excitatorias del MP** esofágico.

Durante la deglución, la secuencia de excitación colinérgica está programada para que se superponga a la **contracción rebote NANC**, esto hace que aumente la *amplitud* y modula el *gradiente de latencia* de la contracción peristáltica primaria (Gidda & Goyal, 1984).

En los humanos, si al beber realizan tragos (degluciones) sucesivos y rápidos del orden de un trago cada 2 s, se observa claramente la inhibición deglutoria que precede a la *peristalsis primaria*, ya que cada trago sucesivo inhibe la contracción peristáltica de la deglución anterior y el esófago permanece inhibido hasta la última deglución a la que sigue la contracción peristáltica (Sifrim *et al.*, 1992).



**Figura 11. Control central de la peristalsis en la porción esofágica de músculo liso.** Tras la deglución, se activan primero las neuronas de la vía inhibitoria en el DMN caudal (cDMN), que produce la inhibición simultánea de todas las zonas esofágicas, siendo más larga en la zona inferior que en la superior. Cuando ésta finaliza, la activación secuencial de las neuronas excitatorias (incluyendo colinérgicas) en el DMN rostral (rDMN) produce una onda de contracción de naturaleza peristáltica. Las neuronas inhibitorias mientéricas actúan liberando un neurotransmisor inhibitorio NANC, el NO. (Adaptado de Mashimo & Goyal, 2006).

### 5.2.2 Peristalsis secundaria en el músculo liso

Se denomina *peristalsis secundaria* a la producida por los reflejos locales (intrínsecos). La **peristalsis esofágica intrínseca** está mediada por las **neuronas mientéricas excitatorias colinérgicas** e **inhibitorias NANC** actuando de forma conjunta. Aunque normalmente se las denomine como “inhibitorias”, la estimulación de las **neuronas NANC (motoneuronas inhibitorias)** en las tiras de músculo liso produce una respuesta bifásica que consiste en: (i) una inhibición, (ii) seguida de una contracción rebote:

En los músculos lisos que no tienen tono basal (caso del cuerpo esofágico), la inhibición se manifiesta sólo como un *periodo de latencia* durante el periodo de estimulación nerviosa. La

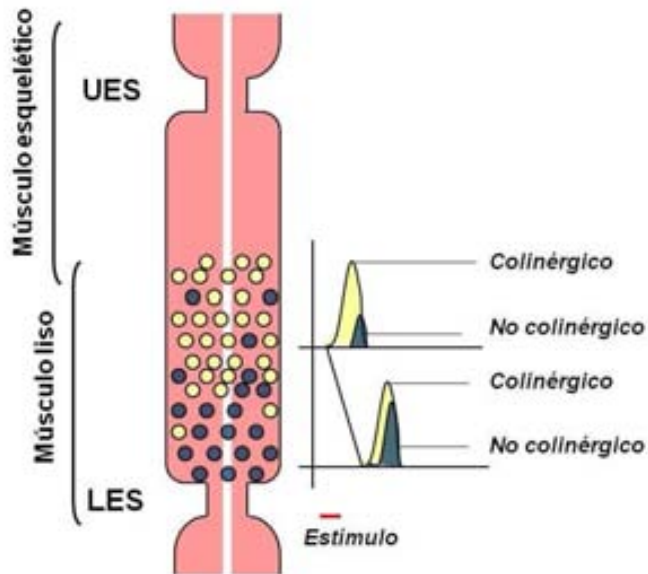
contracción del músculo liso se produce al final de un estímulo prolongado y se denomina **contracción rebote** ó **contracción-off** (Christensen & Lund, 1969). Weisbrodt & Christensen, (Weisbrodt & Christensen, 1972) estudiaron tiras de músculo circular esofágico de la zarigüeya, y describieron que las *latencias* de la **contracción-off (rebote)** aumentaban progresivamente en la orientación craneocaudal. Estos autores propusieron, pues, que los nervios NANC son los que generan el **gradiente de latencia** a lo largo del esófago. Estudios posteriores demostraron que el NO era el neurotransmisor NANC responsable de esta respuesta bifásica (Christinck *et al.*, 1991; Knudsen *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1991; Preiksaitis *et al.*, 1994b).

Estudios in vitro (Murray *et al.*, 1991) e in vivo (Yamato *et al.*, 1992b) en la zarigüeya demostraron que los inhibidores de la NOS suprimen la *latencia* y el **gradiente de latencia** de las contracciones esofágicas producidas por la estimulación de los nervios NANC en diferentes niveles del esófago, originando la aparición de contracciones simultáneas no progresivas.

Las neuronas excitatorias del MP esofágico son de naturaleza colinérgica, ya que emplean la ACh como neurotransmisor. En estudios in vitro empleando la estimulación nerviosa:

(i) de corta duración, aparece primero la respuesta inhibitoria NANC seguida de la contracción colinérgica, que puede solapar a la contracción rebote NANC; (ii) de duración prolongada, la contracción colinérgica y la contracción rebote NANC pueden aparecer por separado. La contracción colinérgica se produce cercana al inicio del estímulo y se denomina **contracción-on**; la contracción rebote NANC se produce al finalizar el estímulo y se denomina **contracción-off** (Crist *et al.*, 1984a). De forma similar a las neuronas NANC, las neuronas colinérgicas forman un **gradiente colinérgico** pero en este caso su influencia decrece distalmente a lo largo del esófago (Crist *et al.*, 1984b). Crist *et al.* presentaron un modelo que incorporaba los **gradientes de influencias NANC creciente y colinérgica decreciente** a lo largo del esófago para explicar la *amplitud* y la *latencia* de la peristalsis esofágica (Figura 12). Este modelo permite explicar: (a) los mecanismos periféricos del comportamiento tipo-peristáltico de las tiras musculares circulares esofágicas in vitro; (b) y la peristalsis esofágica producida por la estimulación in vivo de las eferentes vagales.





**Figura 12. Gradiente de nervios inhibitorio no colinérgico y excitatorio colinérgico en la porción esofágica del músculo liso.** La inervación excitatoria colinérgica (color crema) es más marcada en la zona proximal y decrece gradualmente en la parte distal. La inervación inhibitoria (color azul) se incrementa distalmente a lo largo del esófago. Tras la estimulación, la *latencia* de la contracción aumenta gradualmente de forma distal a lo largo del esófago, resultando en una contracción de secuencia peristáltica enteramente localizada localmente en la pared del esófago. (Adaptado de Crist *et al.*, 1984b).

### 5.3 Relajación del Esfínter Esofágico Inferior

El LES está formado por músculo liso tónico con propiedades miogénicas intrínsecas, que en condiciones basales, mantienen dicho esfínter permanentemente cerrado. Desde el punto de vista manométrico, el LES se muestra como una zona de alta presión presente en el extremo inferior del esófago. Este tono miogénico está modulado tanto por las vías vagales excitatorias como por las inhibitorias. En estudios *in vivo*, se ha demostrado que cuando las influencias excitatorias e inhibitorias son iguales, ni la vagotomía bilateral (Rattan & Goyal, 1974) ni el empleo de la neurotoxina tetrodotoxina (TTX) cambian la presión del LES (Goyal & Rattan, 1976). Por otro lado, el antagonismo selectivo de una sola de las vías lleva a efectos sin oposición de la otra vía. Esto quiere decir que el bloqueo de la vía excitatoria colinérgica mediante agentes anticolinérgicos (Dodds *et al.*, 1981) o toxina botulínica (Pasricha *et al.*, 1993) disminuye la presión del LES debido a una acción sin oposición de los nervios inhibitorios. En cambio, el bloqueo de la vía inhibitoria nitrérgica con inhibidores de la NOS produce un aumento de la presión del LES debido a una acción sin oposición de los nervios excitatorios (Xue *et al.*, 1996; Yamato *et al.*, 1992a).

La activación selectiva de la vía inhibitoria vagal puede generar el reflejo de relajación del LES asociado con la deglución. La relajación del LES es una parte integral de la *peristalsis primaria inducida por la deglución*: con el inicio de la deglución, el LES relaja la presión intragástrica

durante 8-10s y posteriormente se produce una postcontracción en la parte rostral/proximal del LES, que es la continuación de la contracción peristáltica en el EB. Esta serie de hechos permiten el paso del bolo deglutido a través del LES de alta presión con una resistencia mínima, y restituye la barrera al contenido gástrico de forma inmediata tras su paso. La relajación del LES es el componente más sensible del reflejo peristáltico primario (*peristalsis primaria*), ya que la relajación puede producirse sin peristalsis faríngea ó esofágica asociada. La relajación del LES producida por distensión de la porción lisa del esófago, con o sin peristalsis secundaria asociada, es consecuencia de reflejos locales intramurales, y no se afecta por vagotomía.

Las vías excitatorias e inhibitorias vagales hacia el LES se activan selectivamente en un número de reflejos motores que implican al LES. La estimulación de las **aférentes vagales abdominales** y la distensión del estómago proximal disparan la vía inhibitoria que produce la relajación del LES. Reflejos vago-vagales como eructar y las *relajaciones transitorias del esfínter (TLESR)* también dependen de la integridad de la vía inhibitoria para generar la relajación del LES (Chang *et al.*, 2003).

## 6. TRASTORNOS DE LA MOTILIDAD ESOFÁGICA

Los trastornos motores de la porción esofágica de músculo liso pueden clasificarse de diversas maneras: (i) por la presencia de hipo- ó hipermotilidad; (ii) en función del síntoma principal; (iii) por el síndrome clínico; (iv) por hallazgos de motilidad esofágica; (v) por transporte esofágico del bolus; (vi) por fisiopatología; ó (vii) por la zona anatómica de mayor implicación. Las clasificaciones más recientes utilizan los elementos fisiopatológicos que causan estas alteraciones como mecanismo de ordenación.

También, en la actualidad, se ha descrito la Clasificación de Chicago para los trastornos motores esofágicos diagnosticados con manometría de alta resolución (Bredenoord *et al.*, 2012). Esta clasificación se encuentra actualmente en fase de validación y aunque abre un extraordinario campo de interés para la motilidad esofágica a nivel clínico, no es objeto de discusión en esta tesis.

### 6.1 Clasificación fisiopatológica de los trastornos de la porción de músculo liso esofágico

Basados en el tipo de inervación afectada, los trastornos de la motilidad esofágica pueden clasificarse, en líneas generales:

(i) Trastornos de la inervación inhibitoria (nitrérgica); ó (ii) Trastornos de la inervación excitatoria (colinérgica ó no-colinérgica).

(i) **Trastornos de la inervación inhibitoria:** son aquellos trastornos asociados con una función reducida ó incrementada de la misma: i.1) Una función nerviosa inhibitoria disminuida/reducida incluye tanto al **espasmo esofágico difuso** cuando la reducción es parcial y está implicado, principalmente, el EB, como a la **acalasia**, cuando la reducción es completa y están implicados el LES y el EB; i.2) Una función incrementada de los nervios inhibitorios nitrérgicos se manifiesta mediante las **relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior (TLESR)** y **LES hipotenso**. Ambas anomalías están asociadas con la **enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD)**.

(ii) **Trastornos de la inervación excitatoria:** son aquellos que pueden incluir aquellos trastornos asociados con una función reducida ó incrementada de la misma: ii.1) Manifestaciones de una función nerviosa excitatoria disminuida/reducida son similares a aquellas que presentan una función miogénica disminuida. Incluyen la **peristalsis “hipotensiva”** en el esófago y **LES hipotenso** y **LES con un reflejo contráctil pobre**. Todas estas anomalías están asociadas con el **GERD**; ii.2) Los nervios excitatorios con una función incrementada, podrían ser responsables de **las contracciones peristálticas esofágicas hipertensas / hipertensas (esófago en cascanueces)** ó **LES hipertensivo** y **LES hiper contráctil** (Paterson *et al.*, 2006) (Figura 13).



Figura.13-Clasificación fisiopatológica de los trastornos motores de la porción esofágica de músculo liso. DES, espasmo esofágico difuso; TLESR, relajaciones transitorias del esfínter esofágico inferior (Adaptada de Paterson *et al.*, 2006).

Síntomas	Trastornos clínicos	Diagnóstico Manométrico	Tránsito Esofágico	Fisiopatología	Localización anatómica
Disfagia y dolor torácico	Acalasia	Acalasia	Muy lento	↓Nervios Inhibitorios	Esófago torácico, LES
	DES	DES	Lento	↓Nervios Inhibitorios	Esófago torácico
		Peristalsis Hipotensiva	Lento (posicional)	↑Nervios Inhibitorios ↓Nervios Excitatorios ↓Miogénico	Esófago torácico
Ardor de estómago y regurgitación	GERD	TLESR	Reflujo	↑Nervios Inhibitorios	LES
		LES Hipotensivo	Reflujo	↑Nervios Inhibitorios ↓Nervios Excitatorios ↓Miogénico	LES
		Reflejo de contracción de LES disminuido	Reflujo	↓Nervios Excitatorios ↓Miogénico	LES
		Peristalsis Hipotensiva	Lento (posicional)	↑Nervios Inhibitorios ↓Nervios Excitatorios ↓Miogénico	Esófago torácico
Dolor torácico (¿disfagia?)		Peristalsis Hipertensiva (Esófago en cascanueces)	Normal	↑Nervios Excitatorios	Esófago torácico
		LES hipertensivo	Normal	↑Nervios Excitatorios	LES
		LES hipercontráctil	Normal	↑Nervios Excitatorios	LES

**Tabla.1-** Muestra la correlación entre la presentación/tipo clínico del trastorno motor (primario ó secundario) y las vías motoras afectadas propuesta por William G Paterson (Porción esofágica de músculo liso) (Adaptada de Paterson *et al.*, 2006).

### 6.1.1 Trastornos de la inervación inhibitoria

#### ACALASIA

La **acalasia** es un trastorno motor causado por una degeneración de las neuronas del MP intramural. Se debe a una influencia neuronal inhibitoria deficiente que implica tanto al EB como al LES.

Se caracteriza por la presencia de contracciones no-peristálticas en el segmento de músculo liso esofágico, pérdida de la secuencia peristáltica de las contracciones esofágicas debido a la pérdida del **gradiente de latencia** de las mismas.

Así como de una relajación del LES ausente o incompleta como respuesta a la deglución, hecho que la distingue de otros trastornos con aperistalsis (Clavé & Castellvi, 2004).

Está causada por una pérdida de neuronas en el MP. En las fases iniciales de la enfermedad se pierden, predominantemente, las neuronas inhibitorias que contienen VIP (Aggestrup *et al.*, 1983; Sigala *et al.*, 1995) y la sintasa de NO (Lui *et al.*, 1997; Mearin *et al.*, 1993), pero cuando la enfermedad está en una fase avanzada también se perderían las neuronas excitatorias que contienen ACh (Wattchow & Costa, 1996).

Las causas propuestas para la **acalasia primaria** (ó idiopática, causa desconocida) serían:

degeneración neuronal, infección viral, herencia genética y enfermedad autoinmune. Se ha sugerido que la lesión inicial del esófago, quizá una infección viral o algún factor medioambiental, produciría la inflamación del MP. Dicha inflamación causaría una respuesta autoinmune en la población susceptible predispuesta genéticamente. Posteriormente, la inflamación crónica destruiría las células gangliónicas mientéricas inhibitorias produciendo un síndrome clínico de **acalasia idiopática** (Park & Vaezi, 2005).

Los síntomas que presenta son disfagia, dolor torácico y regurgitación.

### **DES (*Diffuse esophageal spasm*)**

El **espasmo esofágico difuso (DES)** es un trastorno de los nervios inhibitorios que causa una inhibición deglutoria deficiente induciendo contracciones simultáneas no-peristálticas en la porción esofágica de músculo liso. Pueden darse de forma espontánea ó en respuesta a la deglución. Las contracciones inducidas por deglución pueden tener una tensión normal, incrementada ó disminuida. La relajación del LES suele ser normal, aunque puede producirse una disfunción de la misma en menor grado (Paterson *et al.*, 2006).

No se conoce bien la patología del **DES**. Los pocos estudios histopatológicos disponibles muestran una degeneración neuronal irregular localizada en los procesos nerviosos, y no en los cuerpos celulares nerviosos (como es el caso de la **acalasia**). Konturek *et al.*, demostraron que los pacientes con **DES** presentaban una disfunción en la síntesis o degradación del NO endógeno (Konturek *et al.*, 1995). También se desconoce su etiología. Se piensa que, al menos en algunos pacientes, podría representar el estadio inicial de una enfermedad de denervación del MP, ya que este trastorno puede evolucionar a **acalasia clásica**.

Los síntomas más usuales son disfagia a sólidos y líquidos y dolor torácico.

### **TLESR (*Transient Lower Esophageal Sphincter Relaxation*)**

Se denomina **TLESR** al reflejo de las **relajaciones transitorias del LES (TLESR)** que se produce de forma no asociada a la deglución ó a peristalsis esofágica. Es un reflejo vago-vagal mediado centralmente, se activan las vías sensitivas que van hacia el núcleo del tracto solitario (NTS) y se activa después la vía eferente del núcleo motor dorsal (DMV) del nervio vago que inerva al MP, donde hace sinapsis con las MNs inhibitorias y excitatorias que inervan el LES.

El **TLESR** es el mecanismo fisiológico por el que se permite eliminar los gases del estómago (eructo) y por el que se produce el reflujo gastroesofágico en la población sana (reflujo

fisiológico). Sin embargo, cuando la frecuencia de las **TLESR** se ve incrementada puede conducir a la **enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD)**. Las **TLESR** están asociadas, más a menudo, con episodios de reflujo gastroesofágico en presencia del LES con un tono reducido (hipotenso) (Clavé *et al.*, 1998).

## **6.1.2 Trastornos de la inervación excitatoria y del músculo liso**

### ***Hipertensivo***

PERISTALSIS ESOFÁGICA HIPERTENSIVA (ESÓFAGO EN CASCANUECES), LES HIPERCONTRÁCTIL Y LES HIPERTENSO

La **peristalsis hipertensiva** (también conocida como *Esófago en cascanueces*, “*nutcracker esophagus*”), la **hipertensión del LES aislado** y el **LES hipercontráctil** son diagnósticos manométricos que presentan una importancia clínica no suficientemente clara.

Se diagnostican cuando la amplitud de las contracciones peristálticas, la *post-contracción (after-contraction)* del LES ó la presión basal del LES excede los valores normales.

El **gradiente de latencia** está preservado, así que no es probable que estos trastornos impliquen una pérdida de inervación inhibitoria nitrérgica sino que se debe a una hiperactividad de los nervios excitatorios ó a una hiperactividad de respuesta del músculo liso a los nervios excitatorios. El estudio inmunohistoquímico de pacientes con **esófago en cascanueces** demostró que presentan un número de neuronas mientéricas inmunoreactivas a la enzima colina acetiltransferasa (ChAT) mayor de lo habitual, la ratio ChAT/NOS era significativamente mayor tanto en el MP como en el músculo circular. Existe un desequilibrio entre la inervación excitatoria e inhibitoria del esófago (Kim *et al.*, 2008).

Es importante subrayar que, tanto la **peristalsis hipertensiva** como la **hipertensión del LES aislado**, son anomalías manométricas y no entidades clínicas con secuelas funcionales predecibles. De hecho, pueden ser fenómenos transitorios relacionados con el estrés. Aunque la anomalía manométrica más común encontrada en pacientes con dolor torácico sea la **peristalsis hipertensiva**, raramente coincide el dolor torácico con los incrementos en la *amplitud* de la contracción. Se cree que las contracciones hipertensivas son un probable epifenómeno, ó un indicador de hipersensibilidad o un esófago hiperreactivo (Paterson *et al.*, 2006).



## Hipotensivo

### PERISTALSIS ESOFÁGICA HIPOTENSIVA

El **esófago hipotensivo** se caracteriza por una presión basal del LES reducida y unas contracciones peristálticas esofágicas de baja amplitud (< 30 mmHg), por debajo de ese valor el tránsito esofágico y el aclarado de contenido refluido son inefectivos. El tono basal reducido del LES favorece el reflujo gastroesofágico causando **GERD**. A menudo, las contracciones peristálticas hipotensivas están asociadas con contracciones no-peristálticas hipotensivas. Las contracciones esofágicas hipotensivas también se conocen recientemente como *motilidad esofágica inefectiva*, particularmente en el contexto de pacientes con reflujo gastroesofágico.

La fisiopatología de la **peristalsis hipotensiva** o de las contracciones no-peristálticas puede implicar la supresión de la actividad excitatoria colinérgica o una fuerza defectuosa de la contracción del músculo circular (atrofia muscular). Una influencia colinérgica reducida causa tanto reducciones en la fuerza de la contracción como la pérdida de la secuencia peristáltica. Entre el 25-40% de los pacientes con **GERD** presentan **peristalsis** con alteraciones secundarias de la motilidad del cuerpo esofágico caracterizadas por ondas esofágicas de magnitud disminuida ó por la interrupción de la progresión de la *onda peristáltica* esofágica hasta el esófago distal (*breaks*).

No se sabe si es el resultado o la causa de la esofagitis por reflujo. Causas secundarias de las **contracciones esofágicas hipotensivas** incluirían el uso de fármacos con efectos anticolinérgicos, enfermedad vascular del colágeno (incluyendo **escleroderma**) y enfermedades infiltrativas (amiloidosis).

El síntoma que presentan es disfagia a sólidos debido a un tránsito defectuoso de la comida deglutida porque las contracciones peristálticas no tienen la fuerza necesaria para ocasionar una propulsión esofágica eficaz (Paterson *et al.*, 2006).

### LES HIPOTENSIVO

Se caracteriza por un tono basal del LES reducido, de manera que el gradiente de presión entre el fundus gástrico y el LES es menor de 10mmHg. Esto puede causar reflujo del ácido gástrico hacia el esófago cada vez que la presión del estómago sobrepasa la del LES. Aunque la causa de la **hipotensión del LES** puede ser una disfunción del mecanismo colinérgico que regula la presión del LES (Higgs *et al.*, 1976), muchos casos están causados por un tono miogénico del LES defectuoso. Puede producirse por miotomía quirúrgica ó dilatación para la acalasia, por inflamación (esofagitis) asociada al reflujo. Los

casos graves de **GERD** presentan, a menudo, **LES hipotenso** (Paterson *et al.*, 2006).

### 6.1.3 Esófago Escleroderma

El **esófago escleroderma** es parte de un trastorno del tejido conectivo, que lleva a la atrofia del músculo liso esofágico con la consiguiente pérdida del tono del LES y de la peristalsis esofágica. De lo trastornos motores secundarios que afectan al esófago, es uno de los más importantes.

La patología se caracteriza por una atrofia del músculo liso del esófago y del LES con una deposición de colágeno asociada entre las fibras de músculo liso. Se desconoce su etiología, pero se cree que debe ser de naturaleza autoinmune.

Existen evidencias de disfunción neuronal en la fase inicial del **esófago escleroderma**, posiblemente debido a la microcirculación defectuosa hacia las neuronas intramurales. Posteriormente, se da una marcada atrofia del músculo liso esofágico con una fibrosis importante. Ésto produce una pronunciada hipotensión del LES y una pérdida de las contracciones peristálticas en el segmento de músculo liso esofágico. Debido al escaso tono del LES y al defectuoso aclarado esofágico, normalmente, se produce reflujo.

Los pacientes pueden presentar síntomas ó no presentarlos, ó tener síntomas de reflujo, dolor torácico y regurgitación de ácido. También es común la disfagia. Muchos pacientes tienen asociado el fenómeno Raynaud. También pueden tener síntomas respiratorios (Paterson *et al.*, 2006).

### 6.1.4 LES incompetente y GERD

El **LES incompetente** es una de las causas más importante de los mecanismos de barrera antirreflujo defectuosos en la unión gastroesofágica (GEJ), y de desarrollo de la **enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD)**.

La incompetencia del LES puede deberse a su hipotensión, a una elevada presión intraabdominal que desborda a un cercano LES normal y a **TLESR**. Otros factores que pueden desempeñar un papel importante en el reflujo gastroesofágico serían una reducida respuesta contráctil del diafragma crural y la presencia de una hernia de hiato.

### GERD

La **enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD)** se produce debido a una complicación de las defectuosas barreras anti-reflujo en la GEJ. Las barreras anti-reflujo inefectivas pueden ser vulnerables debido a la hipotensión y a las relajaciones transitorias del LES que se producen con una frecuencia mayor en pacientes con GERD y además se asocian más frecuentemente a episodios de reflujo.

La dislocación del LES en el tórax y la hernia de hiato también pueden perjudicar la competencia del LES, dado que permiten la disociación entre los componentes extrínseco (diafragma crural) e intrínseco del LES.

El aclarado esofágico defectuoso de los contenidos gástricos refluídos debido a contracciones hipotensivas ó no-peristálticas puede empeorar el daño en la mucosa esofágica causado por el reflujo del ácido.

La **enfermedad por reflujo gastroesofágico (GERD)** está asociada con síntomas de pirosis (sensación de ardor en la región del esternón) y regurgitación. Algunos casos presentan síntomas debidos a factores laríngeos y faríngeos y síntomas pulmonares debido a la lesión del ácido gástrico. En los casos más graves pueden darse sangrado esofágico, constricción péptica y metaplasia intestinal con sus complicaciones asociadas.

### RELAJACIONES TRANSITORIAS DEL LES (TLESR)

La deglución está asociada con una relajación transitoria del LES y con contracciones peristálticas esofágicas. Las **TLESRs** están inducidas por un reflejo vagal en el que la información aferente de los receptores en el fundus gástrico y la faringe se integra a nivel del sistema nervioso central (CNS) y las descargas eferentes mediadas por el vago activan las neuronas inhibitorias para relajar el LES (Mittal *et al.*, 1995). Las **TLESRs** se producen tras las comidas y la distensión gástrica ó la estimulación faríngea, y son el mecanismo fisiológico que permite eructar (Dent *et al.*, 1980; Mittal *et al.*, 1995; Schoeman *et al.*, 1995). La frecuencia postprandial de las TLESRs también puede modularse mediante diferentes propiedades de la ingesta, como la composición de grasa y la liberación de CCK (Clavé *et al.*, 1998). Si aumenta la frecuencia del reflejo de relajación del LES de manera que se incrementan los episodios de TLESR puede derivar en la **enfermedad de reflujo gastroesofágico (GERD)**.

### DISMINUCIÓN TONO LES

Como el LES es la principal barrera anti-reflujo, cuando presenta una presión reducida permite el paso del contenido gástrico hacia el esófago, siempre que la presión del estómago sobrepase a la del LES. Esto sucede en una pequeña proporción de casos de **GERD**.

### VACIAMIENTO GÁSTRICO RETARDADO

El vaciamiento gástrico retardado supone que el volumen del fluido gástrico se ve incrementado. Se cree que el vaciamiento gástrico retardado contribuye en una pequeña proporción de casos de **GERD** debido a un incremento del fluido

disponible para refluir. (Cadiot *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 2003).

### ACLARADO ESOFÁGICO INEFECTIVO

El aclarado esofágico inefectivo de la comida ó de otros contenidos puede darse con contracciones hipotensivas ó con contracciones no-peristálticas (**espasmo difuso esofágico**) ó en ausencia de contracción peristáltica debido a la pérdida del reflejo deglutorio. Las contracciones peristálticas con amplitud < 30 mmHg son inefectivas para propulsar contenidos esofágicos. Puede asociarse con síntomas de disfagia que, tras una deglución líquida, se produzca un incremento en la frecuencia de las contracciones peristálticas de baja amplitud ó de las contracciones no-peristálticas en el esófago distal. Sin embargo, son anomalías manométricas comunes encontradas en pacientes con esofagitis por reflujo, y también en pacientes sin indicios de enfermedad por reflujo (Paterson *et al.*, 2006).

## 6.2 Trastornos en la contracción del músculo longitudinal

No se conoce bien el papel del músculo liso longitudinal en las funciones esofágicas. Esto se debe, principalmente, a que la actividad de este músculo no produce cambios en la presión intraluminal, y por ello, no puede detectarse mediante *Manometría Intraluminal*. Se ha sugerido que la contracción del músculo liso longitudinal facilita el tránsito del bolo mediante el acortamiento esofágico. Empleando la técnica de *Ultrasonido de alta frecuencia* para estudiar la contracción del músculo longitudinal esofágico, se observó que una contracción anormal de esta capa muscular estaba implicada en la patogénesis de la **hernia de hiato** y en el **dolor torácico** (Paterson *et al.*, 2006).

## Hernia de hiato y contracción del músculo longitudinal

La **hernia de hiato** puede dañar la barrera anti-reflujo en la GEJ y potenciar el reflujo gastroesofágico (GER). Esto puede producirse de muchas formas incluso causando la incompetencia del LES debido a su dislocación desde el abdomen hasta el tórax.

Tanto en modelos animal (Paterson, 1998; Paterson & Kolyn, 1994; White *et al.*, 2001) como humano (Dunne & Paterson, 2000), se ha demostrado que el ácido intraluminal induce el reflejo de la contracción de músculo liso longitudinal.

Esta observación ha llevado a especular que esa contracción del músculo liso longitudinal inducida por un reflujo ácido sostenido produce un acortamiento esofágico que podría contribuir a la génesis de la hernia de hiato.

En estudios previos en el esófago de la zarigüeya, Paterson *et al.*, propusieron un mecanismo por el cual las alteraciones de la contractibilidad de la capa longitudinal participaban en la aparición y el desarrollo de la hernia Hiatal. Estos autores demostraron un reflejo intramural que llevaba a una contracción longitudinal y subsiguiente acortamiento secundario debido a la exposición al ácido, y que se antagonizaba con estabilizadores de mastocitos (Paterson WG, 1998; Paterson & Kolyn., 1994). Más tarde, White *et al.*, llevaron a cabo un modelo de esofagitis por la perfusión repetida de ácido intraluminal y observaron un marcado acortamiento del esófago, que estaba asociado a una hiperexcitabilidad de la capa muscular longitudinal. Dicha hiperexcitabilidad de la capa de músculo longitudinal estaba relacionada con un cambio drástico en las propiedades de la membrana celular. Tal cambio podía deberse a una alteración de la composición de los mediadores del fluido extracelular (incluyendo los mediadores liberados por los mastocitos) y la vía por la que estos mediadores interactúan con la membrana, cambios en la expresión de los canales iónicos de membrana o por algún mecanismo desconocido. En este estudio proporcionan la evidencia de que la esofagitis de reflujo *per se* produce acortamiento esofágico, que podría contribuir a la formación y desarrollo de la hernia de Hiato (White *et al.*, 2001). Recientes estudios de Farré *et al.*, ha confirmado la alteración de la permeabilidad de la mucosa esofágica en pacientes sanos en continua exposición a soluciones ácidas (Farré *et al.*, 2010).

Esta línea argumental sugiere que la hernia de hiato sería una patología adquirida que puede desarrollar un reflujo gastroesofágico secundario y entonces, una vez desarrollado, puede agravar más la **enfermedad por reflujo gastroesofágico** (Heine & Mittal, 1991; Mittal *et al.*, 1987; Sloan *et al.*, 1992).

### **Dolor torácico y contracción del músculo longitudinal**

Son estudios que emplean la *técnica de ultrasonido intraluminal de alta frecuencia* (técnica que mide el grosor de la pared esofágica y permite el cálculo de la contracción esofágica del músculo longitudinal, la bioméfica de la pared esofágica y su comportamiento durante la hipertrofia o la distensión inducida por reflujo) (Mittal *et al.*, 2005).

En estos estudios con dolor torácico atípico, una proporción significativa de episodios de dolor espontáneos parece correlacionarse temporalmente con contracciones sostenidas del músculo longitudinal. Además, el dolor inducido por la perfusión de ácido esofágico también se

correlaciona, a menudo, con la contracción provocada por la capa muscular longitudinal.

### **REFERENCIAS**

Aggestrup S, Uddman R, Jensen SL, Håkanson R, Sundler F, Schaffalitzky de Muckadell O, & Emson P (1986). Regulatory peptides in lower esophageal sphincter of pig and man. *Dig Dis Sci* **31**: 1370-1375.

Aggestrup S, Uddman R, Jensen SL, Sundler F, Schaffalitzky de Muckadell O, Holst JJ, Håkanson R, Ekman R & Sørensen HR (1985). Regulatory peptides in the lower esophageal sphincter of man. *Regul Pept* **10**: 167-178.

Aggestrup S, Uddman R, Sundler F, Fahrenkrug J, Håkanson R, Sørensen HR & Hambræus G (1983). Lack of vasoactive intestinal polypeptide nerves in esophageal achalasia. *Gastroenterology* **84**: 924-927.

Alexander SPH, Mathie A & Peters JA (2011). Guide to receptors and channels (GRAC), 5<sup>th</sup> edition. *Br J Pharmacol* **164** (Suppl. 1): S1-S324.

Aulí M, Martínez E, Gallego D, Opazo A, Espín F, Martí-Gallostra M, Jiménez M & Clavé P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in Vitro. *Br J Pharmacol* **155**: 1043-1055.

Aziz Q & Thompson DG (1998). Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology* **114**: 559-578.

Baccari MC & Calamai F (2001). Modulation of nitergic relaxant responses by peptides in the mouse gastric fundus. *Regul Pept* **98**: 27-32.

Barajas-López C, Karanjia R & Espinosa-Luna R (2001). 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* **414**: 113-23.

Barbier AJ & Lefebvre RA (1993). Involvement of the L-arginine: nitric oxide pathway in non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the cat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* **266**: 172-178.

Bertrand PP & 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.

## Introducción

---

- Bertrand PP, Kunze WA, Furness JB & Bornstein JC (2000). The terminals of myenteric intrinsic primary afferent neurons of the guinea-pig ileum are excited by 5-hydroxytryptamine acting at 5-hydroxytryptamine-3 receptors. *Neuroscience* **101**: 459-469.
- Bigge C (1999). Ionotropic Glutamate Receptors. *Curr Opin Chem Biol* **3**: 441-447.
- Bitar KN & Makhlouf GM (1982). Relaxation of isolated gastric muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* **216**: 531-533.
- Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, De Man JG, Bult H, Herman AG & Van Maercke YM (1992). Evidence for a differential release of nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide by a non-adrenergic non-cholinergic nerves in the rat gastric fundus *Arch Int Pharmacodyn* **318**: 107-115.
- Bolton TB & Zholos AV (1997). Activation of M2 muscarinic receptors in guinea-pig ileum opens cationic channels modulated by M3 muscarinic receptors. *Life Sci* **60**: 1121-1128.
- Bradley JS Jr, Parr EJ & Sharkey KA (1997). Effects of inflammation on cell proliferation in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* **289**: 455-461.
- Braverman AS, Miller LS, Vegesna AK, Tiwana MI, Tallarida RJ & Ruggieri MR (2009). Quantitation of the contractile response mediated by two receptors: M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> muscarinic receptor-mediated contractions of human gastroesophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **329**: 218-224.
- Bredenoord AJ, Fox M, Kahrilas PJ, Pandolfino JE, Schwizer W & Smout AJ: International High Resolution Manometry Working Group (2012). Chicago classification criteria of esophageal motility disorders defined in high resolution esophageal pressure topography. *Neurogastroenterol Motil* **24**: 57-65.
- Brookes SJH & Costa M (2006). Functional histoanatomy of the enteric nervous system. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, ed. by Johnson LR, **chapter 21**, 577-595.
- Brown DR & Timmermans JP (2004). Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16** (Suppl 1): 50-54.
- Buckley N & Burnstock G (1984). Autoradiographic localisation of muscarinic receptors in guinea-pig intestine: distribution of high and low affinity agonist binding sites. *Brain Res* **294**: 15-22.
- Buckley N & Burnstock G (1986). Localization of muscarinic receptors on cultured myenteric neurons: a combined autographic and immunocytochemical approach. *B J Neurosci* **6**: 531-540.
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM & Herman AG (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**: 346-347.
- Burns AJ, Lomax AE, Torihashi S, Sanders KM & Ward SM (1996). Interstitial cells of Cajal mediate inhibitory neurotransmission in the stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12008-12013.
- Burnstock G (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* **1**: 239-48.
- Burnstock G (1979), in *Physiological and Regulatory Functions of Adenosine and Adenine Nucleotides*, H.P. Baer and G.I. Drummond, Eds. Raven, New York (1979).
- Burnstock G (1980). Purinergic nerves and receptors. *Prog Biochem Pharmacol* **16**: 141-154.
- Burnstock G (2004). Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 47-52.
- Burnstock G (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* **87**: 659-797.
- Burnstock G (2009). Autonomic neurotransmission: 60 years since Sir Henry Dale. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **49**: 1-30.
- Cadiot G, Bruhat A, Rigaud D, Coste T, Vuagnat A, Benyedder Y, Vallot T, Le Guludec D & Mignon M (1997). Multivariate analysis of pathophysiological factors in reflux oesophagitis. *Gut* **40**: 167-174.
- Cajal RR. *Rev Clin*. 5<sup>th</sup> edn. Madrid: 1911: 206-209.
- Cao W, Pricolo VE, Zhang L, Behar J, Biancani P & Kirber MT (2000). Gq-linked NK(2) receptors mediate neurally induced contraction of human sigmoid circular smooth muscle. *Gastroenterology* **119**: 51-61.

- Caulfield M & Birdsall NJM (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 279-290.
- Cayabyab FS & Daniel EE (1995). K<sup>+</sup> channel opening mediates hyperpolarizations by nitric oxide donors and IJPs in opossum esophagus. *Am J Physiol* **268**: G831-G842.
- Chakder S, Bandyopadhyay A & Rattan S (1997). Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle. *Am J Physiol* **273**: C1868-C1875.
- Chang HY, Mashimo H & Goyal RK (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G357-G366.
- Christensen J & Lund (1969). Esophageal responses to distension and electrical stimulation. *J Clin Invest* **48**: 408-418.
- Christensen J, Rick GA & Soll DJ (1987). Intraluminal nerves and interstitial cells revealed by the Campy-Maillet stain in the opossum esophagus. *J Auton Nerv Syst* **19**: 137-151.
- Christensen J & Roberts RL (1983). Differences between esophageal body and lower esophageal sphincter in mitochondria of smooth muscle in opossum. *Gastroenterology* **85**: 650-656.
- Christensen J & Torres EI (1975). Three layers of the opossum stomach: responses to nerve stimulation. *Gastroenterology* **69**: 641-648.
- Christensen J, Williams TH, Jew J & O'Dorisio TM (1987). Distribution of vasoactive intestinal peptide immunoreactive structures in the opossum esophagus. *Gastroenterology* **92**: 1007-1018.
- Christensen J, Williams TH, Jew J & O'Dorisio TM (1989). Distribution of immunoreactive substance P in opossum esophagus. *Dig Dis Sci* **34**: 513-520.
- Christinck F, Jury J, Cayabyab F & Daniel EE (1991). Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* **69**: 1448-1458.
- Clavé P & Castellví JM (2004). Acalasia. Estrategia diagnóstica. *Gastroenterología y Hepatología continuada* **3**: 52-58.
- Clavé P, González A, Moreno A, López R, Farré A, Cusso X, D'Amato M, Azpiroz F & Lluís F (1998). Endogenous cholecystokinin enhances postprandial gastroesophageal reflux in humans through extrasphincteric receptors. *Gastroenterology* **115**: 597-604.
- Clouse RE & Diamant NE (2006). Motor function of the esophagus. *Physiology of the Gastrointestinal Tract* 4<sup>th</sup> ed. Johnson LR, **chapter 36**, 913-926.
- Clouse RE & Staiano A (1991). Topography of the esophageal peristaltic pressure wave. *Am J Physiol* **261**: G677-G684.
- Clouse RE & Staiano A (1993). Topography of esophageal motility in patients with normal and high-amplitude esophageal peristalsis. *Am J Physiol* **265**: G1098-G1107.
- Colquhoun LM & Patrick JW (1997). Pharmacology of neuronal nicotinic receptor subtype. *Adv Pharmacol* **39**: 191-220.
- Costa M, Furness JB & Humphreys CM (1986). Apamin distinguishes two types of relaxation mediated by enteric nerves in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **332**: 79-88.
- Crist J, Gidda JA & Goyal RK (1984a). Characteristics of "on" and "off" contractions in esophageal circular muscle in vitro. *Am J Physiol* **246**: G137-G144.
- Crist J, Gidda JA & Goyal RK (1984b). Intramural mechanism of esophageal peristalsis: roles of cholinergic and noncholinergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **81**: 3595-3599.
- Crist J, S & Surprenant A (1988). Electrophysiological characterization of functionally distinct 5-hydroxytryptamine receptors on guinea-pig submucous plexus. *Neuroscience* **24**: 283-295.
- Daniel EE, Helmy-Elkholy A, Jager LP & Kannan MS (1983). Neither a purine nor VIP is the mediator of inhibitory nerves of opossum oesophageal smooth muscle. *J Physiol* **336**: 243-260.
- Daniel EE & Posey-Daniel V (1984). Neuromuscular structures in opossum esophagus: role of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* **246**: G305-G315.

- Delattre JF, Avisse C, Marcus C & Flament JB (2000). Functional anatomy of the gastroesophageal junction. *Surg Clin North Am.* **80**: 241-260.
- De Man JG, de Winter BY, Seerden TC, De Schepper HU, Herman AG & Pelckmans PA (2003). Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neurotransmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and P2Y purinoceptors involved. *Br J Pharmacol* **140**: 1108-1116.
- De Man JG, Pelckmans PA, Boeckstaens GE, Bult H, Oosterbosch L, Herman AG & Van Maercke YM (1991). The role of nitric oxide in inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the canine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **103**: 1092-1096.
- Dent J, Dodds WJ, Friedman RH, Sekiguchi T, Hogan W, Arndorfer RC & Petrie D (1980). Mechanism of gastroesophageal reflux in recumbent asymptomatic human subjects. *J Clin Invest* **65**: 256-267.
- Derkach V, Surprenant A & North RA (1989). 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* **339**: 706-9.
- Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ & Arndorfer RC (1981). Effect of atropine on esophageal motor function in humans. *Am J Physiol* **240**: G290-G296.
- Domoto T, Jury J, Berezin I, Fox JET & Daniel EE (1983). Does substance P mediate with acetylcholine in nerves of opossum esophageal muscularis mucosa?. *AJP* **245**: G19-G28.
- Du C, Murray J, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: Mediator of NANC hyperpolarization of opossum esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* **261**: G1012-G1016.
- Dunne D & Paterson WG (2000). Acid-induced esophageal shortening in humans: a cause of hiatus hernia. *Can J Gastroenterol* **14**: 847-850.
- El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Khalifa M, Shimizu Y & Takewaki T (2003). Tachykinins mediate non-adrenergic, non-cholinergic excitatory neurotransmission to the hamster ileum via NK1 and NK2 receptors. *Life Sci* **73**: 1939-1951.
- El-Sharkawy TY, Morgan KG & Szurszewski JH (1978). Intracellular electrical activity of canine and human gastric smooth muscle. *J Physiol* **279**: 291-307.
- Ergun Y & Ogulener N (2001). Evidence for the interaction between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in the mouse gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* **299**: 945-950.
- Fan YP, Chakder S & Rattan S (1998). Inhibitory effect of zinc protoporphyrin IX on lower esophageal sphincter smooth muscle relaxation by vasoactive intestinal polypeptide and other receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 468-474.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Estrada O, Suñol X & Clavé P (2007a). Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**: 1427-1436.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Martínez E & Clavé P (2006). Pharmacological characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-1248.
- Farré R, Fornari F, Blondeau K, Vieth M, De Vos R, Bisschops R, Mertens V, Pauwels A, Tack J & Sifrim D (2010). Acid and weakly acidic solutions impair mucosal integrity of distal exposed and proximal non-exposed human oesophagus. *Gut* **59**: 164-169.
- Farré R, Wang XY, Vidal E, Domènech A, Pumarola M, Clavé P, Huizinga JD & Jiménez M (2007b). Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **19**: 484-496.
- Farrugia G (2008). Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 54-63.
- Farrugia G, Lei S, Lin X, Miller SM, Nath KA, Ferris CD, Levitt M & Szurszewski JH (2003). A major role for carbon monoxide as an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **100**: 8567-8570.
- Fass R (2004). Sensory testing of the esophagus. *J Clin Gastroenterol* **38**: 628-641.
- Fass R, Naliboff B, Higa L, Johnson C, Kodner A, Munkata J, Ngo J & Mayer EA (1998). Differential effect of long-term esophageal acid exposure on mechanosensitivity and chemosensitivity in humans. *Gastroenterology* **115**: 1363-1373.
- Faussone-Pellegrini MS (1987). Comparative study of interstitial cells of Cajal. *Acta Anat (Basel)* **130**: 109-126.

- Faussone-Pellegrini MS & Cortesini C (1985). Ultrastructural features and localization of the interstitial cells of Cajal in the smooth muscle coat of human esophagus. *J Submicrosc Cytol* **17**: 187-197.
- Faussone-Pellegrini MS, Cortesini C & Romagnoli P (1977). [Ultrastructure of the tunica musculares of the cardiac portion of the human esophagus and stomach, with special referente to the so-called Cajal's interstitial cells]. *Arch Ital Anat Embriol* **82**: 157-177.
- Faussone-Pellegrini MS & Thuneberg L (1999). Guide to the identification of interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* **47**: 248-266.
- Foxx-Orenstein AE, Kuemmerle JF & Grider JR (1996). Distinct 5-HT receptors mediate the peristaltic reflex induced by mucosal stimuli in human and guinea-pig intestine. *Gastroenterology* **111**: 1281-1290.
- Friedland GW, Kohatsu S & Lewin K (1971). Comparative anatomy of feline and canine gastric sling fibers. Analogy to human anatomy. *Am J Dig Dis* **16**: 493-507.
- Furness JB (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**: 87-96.
- Furness JB & Costa M (1987). Identification of transmitters of functionally defined enteric neurons. *Handbook of Physiology-The Gastrointestinal System I*, pp. 387-402. Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc.
- Furness JB, Costa M & Keast JR (1984). Choline acetyltransferase-and peptide immunoreactivity of submucous neurons in the small intestine of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* **237**: 329-336.
- Furness JB, Trussell DC, Pompolo S, Bornstein JC, Maley BE & Storm-Mathisen J (1989). Shapes and projections of neurons with immunoreactivity for gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res* **256**: 293-301.
- Gabella G (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience* **6**: 425-436.
- Gabella G (1990). On the plasticity of form and structure of enteric ganglia. *J Auton Nerv Syst* **30** (Suppl.1): S59-S66.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Aulí M, Clavé P & Jiménez M (2008a). Purinergic and nitregeric junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G584-G594.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Martínez-Cutillas M, Clavé P & Jiménez M (2011). Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **23**: 792-e338.
- Gallego D, Hernández P, Clavé P & Jiménez 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, Farré R, Tack J & Jiménez M (2008b). P2Y1 receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission and enteric neuronal activation in small intestine. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 159-168.
- Galligan JJ (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**: 611-623.
- Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA & Zhou X (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**: 97-103.
- Gidda JS & Goyal RK (1984). Swallow-evoked action potentials in vagal preganglionic efferents. *J Neurophysiol* **52**: 1169-1180.
- Gilbert R, Rattan S & Goyal RK (1984). Pharmacologic identification, activation and antagonism of two muscarine receptor subtypes in the lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **230**: 284-291.
- Giraldo E, Vigano MA, Hammer R & Ladinsky H (1988). Characterization of muscarinic receptors in guinea pig ileum longitudinal smooth muscle. *Mol Pharmacol* **33**: 617-625.
- Gómez A, Martos F, Bellido I, Márquez E, García AJ, Pavia J & Sánchez de la Cuesta F (1992). Muscarinic receptor subtypes in human and rat colon smooth muscle. *Biochem Pharmacol* **3**: 2413-2419.
- Gómez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, Van de Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T & Farrugia G (2009). Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse

- gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**: G1370-G1381.
- González AA, Farré R & Clavé 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* **12**: 539-546.
- Goyal RK & Chaudhury A (2008). Physiology of normal esophageal motility. *J Clin Gastroenterol* **42**: 610-619.
- Goyal RK & Rattan S (1976). Genesis of basal sphincter pressure: effect of tetrodotoxin on lower esophageal sphincter pressure in opossum in vivo. *Gastroenterology* **71**: 62-67.
- Goyal RK, Rattan S & Said SI (1980). VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurons. *Nature* **288**: 378-380.
- Goyal RK & Sivarao D (1999). Functional anatomy and physiology of swallowing and esophageal motility. In: Castell OD, Richter JE, eds. *The esophagus*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 24-26.
- Grider JR (1993). Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol* **264**: G334-G340.
- Grider JR, Murthy KS, Jin JG & Makhlouf G (1992). Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am J Physiol* **262**: G774-G778.
- Grundy D (1988). Vagal control of gastrointestinal function. *Baillieres Clin Gastroenterol* **2**: 23-43.
- Guelrud M, Rossiter A, Souney PF, Rossiter G, Fanikos J & Mujica V (1992). The effect of vasoactive intestinal polypeptide on the lower esophageal sphincter in achalasia. *Gastroenterology* **103**: 377-382.
- Hagger R, Gharai S, Finlayson C & Kumar D (1998). Distribution of the interstitial cells of Cajal in the human anorectum. *J Auton Nerv Syst* **73**: 75-79.
- Hansen BM (2003). The Enteric Nervous System I: Organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* **92**: 105-113.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said SI, Sreedharan SP, Wank SA & Waschek JA (1998). International Union of Pharmacology. XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclise-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* **50**: 265-270.
- Harmar A, Fahrenkrug J, Goetzl EJ, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Said SI, Vaudry D, Vaudry H & Waschek JA (2011). VIP and PACAP receptors: VPAC<sub>1</sub>. *IUPHAR database (IUPHAR-DB)*.
- Harvey SC & Luetje CW (1996). Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor subunits. *J Neurosci* **16**: 3798-806.
- Heine KJ & Mittal RK (1991). Crural diaphragm and lower esophageal sphincter as antireflux barriers. *Viewpoints Dig Dis* **23**: 1-6.
- Hens J, Schrodler F, Brehmer A, Adriansen D, Neuhuber W, Scheuermann W, Scheeman M & Timmermans JP (2000). Mucosal projections of enteric neurons in the porcine small intestine. *J Comp Neurol* **421**: 429-436.
- Higgs RH, Castell DO & Eastwood GL (1976). Studies on the mechanism of oesophagitis-induced lower esophageal sphincter hypotension in cats. *Gastroenterology* **71**: 51-56.
- Ho W, Keenan CM, Wu H & Sharkey KA (2003). Enteric glia in a murine model of colitis. *Neurogastroenterol Motil* **15**: 228.
- Holzer P & Holzer-Petsche U (1997). Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* **73**: 173-217.
- Horiguchi K, Semple GS, Sanders KM & Ward SM (2001). Distribution of pacemaker function through the tunica muscularis of the canine gastric antrum. *J Physiol* **537**: 237-250.
- Hoyle Ch & Burnstock G (1989). Neuronal populations in the submucous plexus of the human colon. *J Anat* **166**: 7-22.
- Huber O, Bertrand C, Bunnett NW, Pellegrini CA, Nadel JA, Nakazato P, Debas HT & Geppetti P (1993). Tachykinins mediate contraction of the human lower esophageal sphincter in vitro via activation of NK2 receptors. *Eur J Pharmacol* **239**: 103-109.
- Hucho F & Changeux J-P (1973). Molecular weight and quaternary structure of the cholinergic receptor protein extracted by detergents from *Electrophorus electricus* electric tissue. *FEBS Lett* **38**: 11-15.



- Hucho F & Weise Ch (2001). Ligand-Gated Ion Channels. *Angew Chem Int Ed* **40**: 3100- 3116.
- Huizinga JD & Lammers WJ (2009). Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**: G1-G8.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB & Bernstein A (1995). W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* **373**: 347-349.
- Iino S & Nojyo Y (2006). Muscarinic M(2) acetylcholine receptor distribution in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Neuroscience* **138**: 549-559.
- Imaeda K, Joh T, Yamamoto Y, Itoh M & Suzuki H (1998). Properties of inhibitory junctional transmission in smooth muscle of the guinea pig lower esophageal sphincter. *Jpn J Physiol* **48**: 103-109.
- Izumi N, Matsuyama H, Ko M, Shimizu Y & Takewaki T (2003). Role of intrinsic nitrergic neurones on vagally mediated striated muscle contractions in the hamster oesophagus. *J Physiol* **551**: 287-294.
- Izumi N, Matsuyama H, Yamamoto Y, Atoji Y, Suzuki Y, Unno T & Takewaki T (2002). Morphological and morphometrical characteristics of the esophageal intrinsic nervous system in the golden hamster. *Eur J Morphol* **40**: 137-144.
- Jessen KR, Hills JM & Saffrey MJ (2001). Immunohistochemical demonstration of GABAergic neurons in the enteric nervous system. *J Neurosci* **6**: 1628-1634.
- Jin JG, Murthy KS, Grider JR & Makhlouf G (1993). Activation of distinct cyclic AMP- and cyclic GMP-dependent pathways by relaxant agents in isolated gastric muscle cells. *Am J Physiol* **264**: G470-G477.
- Jobe BA, Horyath KD & Swanstrom LL (1998). Postoperative function following laparoscopic Collis gastroplasty for shortened esophagus. *Arch Surg* **133**: 867-874.
- Jury J, Ahmedzadeh N & Daniel EE (1992). A mediator derived from arginine mediates inhibitory junction potentials and relaxations in lower esophageal sphincter: an independent role for vasoactive intestinal peptide. *Can J Physiol Pharmacol* **70**: 1182-1189.
- Kahrilas PJ, Dodds WJ, Dent J, Logemann JA & Shaker R (1988). Upper esophageal sphincter function during deglutition. *Gastroenterology* **95**: 52-62.
- Katsoulis S, Schmidt WE, Schwarzhoff R, Folsch UR, Jin JG, Grider JR & Makhlouf G (1996). Inhibitory transmission in guinea pig stomach mediated by distinct receptors for pituitary adenylate cyclase-activating peptide. *J Pharmacol Exp Ther* **278**: 199-204.
- Kawashima K, Fujimoto K, Suzuki T & Oohata H (1990). Pharmacological differentiation of presynaptic M1 muscarinic receptors modulating acetylcholine release from postsynaptic muscarinic receptors in guinea-pig ileum. *Gen Pharmacol* **21**: 17-21.
- Keast JR, Furness JB & Costa M (1987). Distribution of peptide-containing neurons and endocrine cells in the rabbit gastrointestinal tract, with particular reference to the mucosa. *Cell Tissue Res* **248**: 565-577.
- Keef KD, Shuttleworth CWR, Xue C, Bayguinov O, Publicover NG & Sanders KM (1994). Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacology* **33**: 1303-1314.
- Kerr DIB & Krantis A (1983). Uptake and stimulus-evoked release of [<sup>3</sup>H]-gamma-aminobutyric acid by myenteric nerves of guinea-pig. *Br J Pharmacol* **78**: 271-276.
- Kerr KP, Stevenson JE & Mitchelson F (1995). Simultaneous comparison of nicotinic receptor antagonists on three nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharm Pharmacol* **47**: 1002-1006.
- Kilbinger H & Wagner P (1975). Inhibition by oxotremorine of acetylcholine resting release from guinea pig-ileum longitudinal muscle strips. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **287**: 47-60.
- Kim HS, Park H, Lim JH, Choi SH, Park C, Lee SI & Conklin JL (2008). Morphometric evaluation of oesophageal wall in patients with nutcracker oesophagus and ineffective oesophageal motility. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 869-876.
- Kirchgessner A & Liu MT (1998). Immunohistochemical localization of nicotinic acetylcholine receptors in the guinea-pig bowel and pancreas. *J Comp Neurol* **390**: 497-514.

- Knudsen MA, Svane D & Tottrup A (1991). Importance of the L-arginine-nitric oxide pathway in NANC nerve function of the opossum esophageal body. *Dig Dis* **9**: 365-370.
- Koh SD, Campbell JD, Carl A & Sanders KM (1995). Nitric oxide activates multiple potassium channels in canine colonic smooth muscle. *J Physiol* **489**: (Part 3), 735-743.
- Kohjitani A, Shirakawa J, Okada S & Obara H (1996). Effects of various peptides on isolated rabbit lower esophageal sphincter. *Peptides* **17**: 927-931.
- Konturek JW, Gillessen A & Domschke W (1995). Diffuse esophageal spasm: a malfunction that involves nitric oxide? *Scand J Gastrointest* **30**: 1041-1045.
- Konturek JW, Thor P, Lukaszuk A, Gabryelewicz, Konturek SJ & Domsche W (1997). Endogenous nitric oxide in the control of esophageal motility in humans. *J Physiol Pharmacol* **48**: 201-209.
- Korn O, Stein HJ, Richter TH & Liebermann-Meffert D (1997). Gastroesophageal sphincter: a model. *Dis Esophagus* **10**: 105-109.
- Kortezova N, Mizhorkova Z, Milusheva E, Varga G, Vizi ES & Papisova M (1996). Non-adrenergic non-cholinergic neuron stimulation in the cat lower esophageal sphincter. *Eur J Pharmacol* **304**: 109-115.
- Kovac JR, Chrones T, Preiksaitis HG & Sims SM (2006). Tachykinin receptor expression and function in human esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 513-520.
- Köves K, Arimura A, Vigh S, Somogyvári-Vigh A & Miller J (1993). Immunohistochemical localization of PACAP in the ovine digestive system. *Peptides* **14**: 449-455.
- Krysiak PS & Preiksaitis HG (2001). Tachykinins contribute to nerve-mediated contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* **120**: 39-48.
- Kunze WAA & Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Ann Rev Physiol* **61**: 117-142.
- Kuo B & Urma D (2006). Oral cavity, pharynx and esophagus: Esophagus-anatomy and development. *GI Motility online* doi: 10.1038/gimo6.
- Kuramoto H, Kawano H, Sakamoto H & Furness JB (1999). Motor innervation by enteric nerve fibers containing both nitric oxide synthase and galanin immunoreactivities in the striated muscle of the rat esophagus. *Cell Tissue Res* **295**: 241-245.
- Ladinsky H, Giraldo E, Monferini E, Schiavi GB, Viganò MA, De Conti L, Micheletti R & Hammer R (1988). Muscarinic receptor heterogeneity in smooth muscle: binding and functional studies with AF-DX 116. *Trends Pharmacol Sci (Suppl)*: 44-48.
- Lang IM & Shaker R (1994). An update on the physiology of the components of the upper esophageal sphincter. *Dysphagia* **9**: 229-232.
- Leander S, Brodin E, Håkanson R, Sundler F & Uddman R (1982). Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity. *Acta Physiol Scand* **115**: 427-435.
- Lecci A, Capriati A, Altamura M & Maggi CA (2006). Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton Neurosci* **126-127**: 232-249.
- Lecci A, Santicioli P & Maggi CA (2002). Pharmacology of transmission to gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 630-641.
- Lee BH, Lynn RB, Lee HS, Miselis RR & Altschuler SM (1992). Calcitonin gene-related peptide in nucleus ambiguus motoneurons in rat: viscerotopic organization. *J Comp Neurol* **320**: 531-543.
- Lefebvre RA, de Beurne FA & Sas S (1991). Effect of apanin on the responses to VIP, ATP and NANC neurone stimulation in the rat and cat gastric fundus. *J Auton Pharmacol* **11**: 73-83.
- LePard KJ, Messori E, & Galligan JJ (1997). Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea-pig distribution and pharmacology. *Gastroenterology* **113**: 1522-1534.
- Liebermann-Meffert D, Allgower M, Schmid P & Blum AL (1979). Muscular equivalent of the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **76**: 31-38.
- Lim I, Gibbons SJ, Lyford GL, Miller SM, Stregé PR, Sarr MG, Chatterjee S, Szurszewski JH, Shah VH & Farrugia G (2005). Carbon monoxide activates human intestinal smooth muscle L-type Ca<sup>2+</sup> channels through a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**: G7-G14.

- Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F & Wells G (1996). Structure and function of neuronal nicotinic receptors. *Prog Brain Res* **109**: 125-137.
- Lippi A, Santicoli P, Criscuoli M & Maggi CA (1998). Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **357**: 245-251.
- Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD & Kirchgessner A (1997). Glutamatergic enteric neurons. *J Neuroscience* **17**: 4764-4784.
- Liu JF, Sun J & Drew PA (2011). Characterization of excitatory and inhibitory motor neurons to the human gastric clasp and sling fibers. *Can J Physiol Pharmacol* **89**: 617-622.
- Long JD & Orlando RC (2002). Anatomy, histology, embryology and developmental abnormalities of the esophagus. In: Feldman M, Fieldman LS, Sleisenger MH eds. *Gastrointestinal and Liver Diseases* Philadelphia: WB Saunders, 551-560.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Shulz S, Chepenik KP & Waldman SA (2000). Guanylyl cyclases and signalling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* **52**: 375-414.
- Lui H, Vanderwinden JM, Ji P & De Laet MH (1997). Nitric oxide synthase distribution in the enteric nervous system of children with cardiac achalasia. *Chin Med J (Engl.)* **110**: 358-361.
- Luzzi S, Zilletti L, FranchiMicheli S, Gori AM & Moroni F (1988). Agonists, antagonists and modulators of excitatory amino acid receptors in the guinea-pig myenteric plexus. *Br J Pharmacol* **95**: 1271-1277.
- MacDermott AB, Role LW & Siegelbaum SA (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Ann Rev Neurosci* **22**: 443-485.
- Maggi CA, Patacchini R, Rovero P & Giachetti A (1993). Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* **13**: 23-93.
- Makhlouf GM & Murthy KS (1997). Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal* **9**: 269-276.
- Mashimo H & Goyal RK (2006). Physiology of esophageal motility. *GI Motility online* doi: **10.1038/gimo3**.
- Matsui M, Motomura D, Fujikawa T, Jiang J, Takahashi S, Manabe T & Taketo MM (2002). Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable. *J Neurosci* **22**: 10627-10632.
- Mayer EA & Gebhart GF (1994). Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* **107**: 271-293.
- McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P & Role LW (1995). Nicotinic enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* **269**: 1692-1696.
- Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S & Malagelada JR (1993). Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* **23**: 724-728.
- Michel K, Sann H, Schaaf & Schemann M (1997). Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct serotonin receptors: projection, neurochemical coding, and functional implications. *J Neurosci* **17**: 8009-17.
- Miller SM, Reed D, Sarr MF, Farrugia G & Szurszewski JH (2001). Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* **13**: 121-131.
- Miniarez RC & Jobe BA (2006). Surgical therapy for gastroesophageal reflux disease. *GI Motility online* doi: **10.1038/gimo56**.
- Mitsui R & Komuro T (2002). Direct and indirect innervation of smooth muscle cells of rat stomach, with special reference to the interstitial cells of Cajal. *Cell Tissue Res* **309**: 219-227.
- Mittal RK, Holloway RH, Penagini R, Blackshaw LA & Dent J (1995). Transient lower esophageal sphincter relaxation. *Gastroenterology* **109**: 601-610.
- Mittal RK, Lange RC & McCallum RW (1987). Identification and mechanism of delayed esophageal acid clearance in subjects with hiatus hernia. *Gastroenterology* **92**: 130-135.

- Mittal RK, Liu J, Puckett JL, Bhalla V, Bhargava V, Tipnis N & Kassab G (2005). Sensory and motor function of the esophagus: Lessons from ultrasound imaging. *Gastroenterology* **128**: 487-497.
- Morikawa S & Komuro T (1998). Distribution of myenteric NO neurons along the guinea-pig esophagus. *J Auton Nerv Syst* **74**: 91-99.
- Mulderry PK, Ghateri MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM, Legon S *et al* (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* **25**: 195-205.
- Mule F & Serio R (2003). NANC inhibitory neurotransmission in mouse isolated stomach: involvement of nitric oxide, ATP and vasoactive intestinal polypeptide. *Br J Pharmacol* **140**: 431-437.
- Murray J, Du C, Ledlow A, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am J Physiol* **261**: G401-G406.
- Murthy KS, Grider JR, Jin JG & Makhlof GM (1996). Interplay of VIP and nitric oxide in the regulation of neuromuscular function in the gut. *Ann NY Acad Sci* **805**: 355-363.
- Murthy KS & Makhlof GM (1994). Vasoactive Intestinal Peptide/Pituitary Adenylate Cyclase-activating Peptide-dependent activation of membrane-bound NO synthase in smooth muscle mediated by Pertussi toxin-sensitive G<sub>11-2</sub>. *J Biol Chem* **269**: 15977-15980.
- Nagahama M, Semba R, Tsuzuki M & Aoki E (2001). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept* **10**: 336-340.
- Neunlist M, Michel K, Reiche D, Dobrev G, Huber K & Schemann M (2001). Glycine activates myenteric neurones in adult guinea-pigs. *J Physiol* **536**: 727-739.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutsdler E & Schmalzing G (1998). P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* **17**: 3016-3028.
- North RA & Surprenant A (2000). Pharmacology of cloned P2X receptors. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **40**: 563-580.
- Ny L, Alm P, Ekström P, Hannibal J, Larsson B & Andersson KE (1994). Nitric oxide synthase-containing, peptide-containing, and acetylcholinesterase-positive nerves in the cat lower oesophagus. *Histochem J* **26**: 721-733.
- Ny L, Alm P, Ekstrom P, Larsson B, Grundemar L & Andersson KE (1996). Localization and activity of haem oxygenase and functional effects of carbon monoxide in the feline lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **118**: 392-399.
- Ny L, Alm P, Larsson B & Andersson KE (1997). Morphological relations between haem oxygenases, NO-synthase and VIP in the canine and feline gastrointestinal tracts. *J Auton Nerv Syst* **65**: 49-56.
- Ny L, Alm P, Larsson B, Ekström P & Andersson KE (1995a). Nitric oxide pathway in cat esophagus: localization of nitric oxide synthase and functional effects. *Am J Physiol* **268**: G59-G70.
- Ny L, Larsson B, Alm P, Ekström P, Fahrenkrug J, Hannibal J & Andersson KE (1995b). Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide in cat and human lower esophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **116**: 2873-2880.
- O'Halloran DJ & Bloom SR (1991). Calcitonin gene related peptide. *BMJ (Clinical Research ed.)* **30**: 739-740.
- Ohno N, Xue L, Yamamoto Y & Suzuki H (1996). Properties of the inhibitory junction potential in smooth muscle of the guinea-pig gastric fundus. *Br J Pharmacol* **117**: 974-978.
- Oliveira RB, Matsuda NM, Antonioli AR & Ballejo G (1992). Evidence for the involvement of nitric oxide in the electrically induced relaxations of human lower esophageal sphincter and distal pylorus. *Braz J Med Biol Res* **25**: 853-855.
- Olsson C & Holmgren S (1994). Distribution of PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)-like and helospectin-like peptides in the teleost gut. *Cell Tissue Res* **277**: 539-547.
- 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, Jiménez M, Clavé P & Gallego D (2011). Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory

- motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **23**: e11-25.
- Ordög T, Redelman D, Horváth VJ, Miller LJ, Horowitz B & Sanders KM (2004). Quantitative analysis by flow cytometry of interstitial cells of Cajal, pacemakers, and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Cytometry A* **62**: 139-149.
- Park W & Vaezi MF (2005). Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am J Gastroenterol* **100**, 1404-1414.
- Parkman HP, Reynolds JC, Elfman KS & Ogorek CP (1989). Calcitonin gene-related peptide: a sensory and motor neurotransmitter in the feline lower esophageal sphincter *Regul Pept* **25**: 131-146.
- Pasricha PJ, Ravich WJ & Kalloo AN (1993). Effects of intrasphincteric botulinum toxin on the lower esophageal sphincter in piglets. *Gastroenterology* **105**: 1045-1049.
- Paterson WG (1998). Role of mast cell-derived mediators in acid-induced shortening of the esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **274**: G385-G388.
- Paterson WG (2006). Review: Part 1. Oral cavity, pharynx and esophagus: Esophageal peristalsis. Review. *GI Motility online doi: 10.1038/gimo13*.
- Paterson WG, Goyal RK & Habib FI (2006). Oral cavity, pharynx and esophagus: Esophageal motility disorders. *GI Motility online doi: 10.1038/gimo20*.
- Paterson WG & Kolyn DM (1994). Esophageal shortening induced by short-term intraluminal acid perfusion in opossum: a cause for hiatus hernia? *Gastroenterology* **70**: 1736-1740.
- Pluja L, Fernández E & Jiménez 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.
- Pompolo S & Furness JB (1990). Ultrastructure and synaptology of neurons immunoreactive for gamma-aminobutyric acid in the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *J Neurocytol* **19**: 539-549.
- Preiksaitis HG & Laurier LG (1998). Pharmacological and molecular characterization of muscarinic receptors in cat esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 853-861.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994a). Cholinergic responses in the cat lower esophageal sphincter show regional variation. *Gastroenterology* **106**: 381-388.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994b). Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* **39**: 770-775.
- Pritchett DB, Sontheimer H, Shivers BD, Ymer S, Kettenmann H, Schfield PR & Seeburg PH (1989). Importance of a novel GABAA receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* **338**: 582-585.
- Rae MG & Muir TC (1996). Neuronal mediators of inhibitory junction potentials and relaxation in the guinea-pig internal anal sphincter. *J Physiol* **493 (Part 2)**: 517-527.
- Ralevic V & Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, **50**: 413-492.
- Ratcliffe EM, deSa DJ, Dixon MF & Stead RH (1998). Choline acetyltransferase (ChAT) immunoreactivity in paraffin sections of normal and diseased intestines. *J Histochem Cytochem* **46**: 1223-1231.
- Rattan S, Gonnella P & Goyal RK (1988). Inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide and calcitonin on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* **94**: 284-293.
- Rattan S & Goyal RK (1974). Neural control of the lower esophageal sphincter: influence of the vagus nerve. *Am J Physiol* **54**: 899-906.
- Rattan S & Goyal (1980). Evidence against purinergic inhibitory nerves in the vagal pathway to the opossum lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **78**: 898-904.
- Rattan S, Grady M & Goyal RK (1982). Vasoactive intestinal peptide causes peristaltic contractions in the esophageal body. *Life Sci* **30**: 1557-1563.
- Rekik M, Delvaux M, Tack I, Frexinos J & Bueno L (1996). VIP-induced relaxation of guinea-pig intestinal smooth muscle cells: sequential involvement of cyclic AMP and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **118**: 447-484.
- Robertson SJ, Ennion SJ, Evans EJ & Edwards FA (2001). Synaptic P2X receptors. *Curr Opin Neurobiol* **11**: 378-386.

- Rodrigo J, Uttenthal LO, Peinado MA, Esteban FK, Fernández AP, Serrano J, Martínez de Velasco J, Santacana M, Bentura ML, Martínez-Murillo R & Pedrosa JA (1998). Distribution of nitric oxide synthase in the esophagus of the cat and monkey. *J Auton Nerv Syst* **70**: 164-179.
- Roman C & Gonella J (1981). Extrinsic control of digestive tract motility. In Physiology of the gastrointestinal tract, R.L. Johnson, ed. (New York: Raven Press), 289-333.
- Rossiter CD, Norman WP, Jain M, Hornby PJ, Benjamin S & Gillis RA (1990). Control of lower esophageal sphincter pressure by two sites in dorsal motor nucleus of the vagus. *Am J Physiol* **259**: G899-G906.
- Rühl A (2005). Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* **17**: 777-790.
- Rühl A, Hoppe S, Frey I, Daniel H & Schemann M (2005). Functional expression of the peptide transporter PEPT2 in the mammalian enteric nervous system. *J Comp Neurol* **490**: 1-11.
- Rühl A, Nasser Y & Sharkey KA (2004). Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* **16** (Suppl. 1), 44-49.
- Ryan JP, Snape WJ Jr & Cohen S (1977). Influence of vagal cooling on esophageal function. *Am J Physiol* **232**: E159-E164.
- Sanders KM & Ward SM (2007). Kit mutants and gastrointestinal physiology. *J Physiol* **578**: 33-42.
- Sandler AD, Maher JW, Weinstock JV, Schmidt CD, Schlegel JF, Jew JY & Williams TH (1991). Tachykinins in the canine gastroesophageal junction. *Am J Surg* **161**: 165-170.
- Sang Q & Young HM (1997). Development of nicotinic receptor clusters and innervation accompanying the change in muscle phenotype in the mouse esophagus. *J Comp Neurol* **386**: 119-136.
- Sang Q & Young HM (1998). The origin and development of the vagal and spinal innervation of the external muscle of the mouse esophagus. *Brain Res* **809**: 253-268.
- Schemann M, Sann H, Schaaf C & Mäder M (1993). Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am J Physiol* **265**: G1005-G1009.
- Schoeman MN, Tippett MDeM; Akkermans LMA, Dent J & Holloway RH (1995). Mechanisms of gastroesophageal reflux in ambulant healthy human subjects. *Gastroenterology* **108**: 83-91.
- Schuurkes JA, Van Bergen PJ & Van Nueten JM (1988). Prejunctional muscarinic (M1)-receptor interactions on guinea-pig ileum: lack of effect of cisapride. *Br J Pharmacol* **94**: 228-234.
- Seelig Jr LL, Doody P, Brainard L, Gidda JS & Goyal RK (1984). Acetylcholinesterase and choline acetyltransferase staining of neurons in the opossum. *Anat Rec* **209**: 125-130.
- Seelig LI & Goyal RK (1978). Morphological evaluation of opossum lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **75**: 51-58.
- Sengupta JN (2006). Esophageal sensory physiology. *GI Motility online* doi: 10.1038/gimo16.
- Serio R, Alessandro M, Zizzo MG, Tamburello MP & Mule F (2003). Neurotransmitters involved in the Fast inhibitory junction potentials in Mouse distal colon. *Eur J Pharmacol* **460**: 183-190.
- Sha L, Farrugia G, Harmsen WS & Szurszewski JH (2007). Membrane potential gradient is carbon monoxide-dependent in mouse and human small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**: G438-G445.
- Shah V, Lyford G, Gores G & Farrugia G (2004). Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **126**: 903-913.
- Sifrim D, Janssens J & Vantrappen G (1992). A wave of inhibition precedes primary peristaltic contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* **103**: 876-882.
- Sigala S, Missale G, Missale C, Villanacci V, Cestari R, Grigolato PG, Lojcono L & Spano PF (1995). Different neurotransmitter systems are involved in the development of esophageal achalasia. *Life Sci* **56**: 1311-1320.
- Singaram Ch, Sengupta A, Sugarbaker DJ & Goyal RK (1991). Peptidergic innervation of the human esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* **101**: 1256-1263.
- Singaram C, Sengupta A, Sweet MA, Sugarbaker DJ & Goyal RK (1994). Nitrinergic and peptidergic innervation of the human oesophagus. *Gastroenterology* **35**: 1690-1696.

- Singh S & Hamdy S (2005). The upper oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **17** (Suppl. 1): 3-12.
- Sivarao DV & Goyal RK (2000). Functional anatomy and physiology of the upper esophageal sphincter. *Am J Med* **108** (suppl 4a): 27S-37S.
- Sivarao DV, Mashimo HL, Thatte HS & Goyal RK (2001). Lower esophageal sphincter is achalasic in nNOS(-/-) and hypotensive in W/W(v) mutant mice. *Gastroenterology* **121**: 34-42.
- Sloan S, Rademaker AW N & Kharilas PJ (1992). Determinants of gastroesophageal junction incompetence: hiatal hernia, lower esophageal sphincter, or both? *Ann Intern Med* **117**: 977-982.
- Smid SD & Blackshaw LA (2000). Neuromuscular function of the human lower oesophageal sphincter in reflux disease and Barrett's oesophagus. *Gut* **46**: 756-761.
- Soejima O, Katsuragi T & Furukawa T (1993). Opposite modulation by muscarinic M1 and M3 receptors of acetylcholine release from guinea pig ileum as measured directly. *Eur J Pharmacol* **249**: 1-6.
- Sohn UD, Harnett KM, De PG, Behar J & Biancani P (1993). Distinct muscarinic receptors, G proteins and phospholipases in esophageal and lower esophageal sphincter circular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **267**: 1205-1214.
- Stein HJ, Liebermann-Meffert D, DeMeester TR & Siewert JR (1995). Three-dimensional pressure image and muscular structure of the human lower esophageal sphincter. *Surgery* **117**: 692-698.
- Strege PR, Bernard CE, Ou Y, Gibbons SJ & Farrugia G (2005). Effect of mibefradil on sodium and calcium currents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**: G249-G253.
- Taniyama K, Miki Y, Kusunoki M, Saito N & Tanaka C (1983). Release of endogenous and labelled GABA from isolated guinea-pig ileum. *Am J Physiol* **245**: G717-G721.
- Thuneberg L (1982). Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* **71**: 1-130.
- Thuneberg L & Peters S (2001). Toward a concept of stretch-coupling in smooth muscle. I. Anatomy of intestinal segmentation and sleeve contractions. *Anat Rec* **262**: 110-124.
- Timmermans JP, Adriaensen D, Cornelissen W & Scheuermann DW (1997). Structural organization and neuropeptide distribution in the mammalian enteric nervous system, with special attention to those components involved in mucosal reflexes. *Comp Biochem Physiol* **118**: 331-340.
- Timmermans JP, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D & Groodt-Lasseel MH (1992). Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol* **30**: 113-122.
- Todorov S, Pozzoli C, Zamfirova R & Poli E (2003). Prejunctional modulation of non-adrenergic non-cholinergic (NANC) inhibitory responses in the isolated guinea-pig gastric fundus. *Neurogastroenterol Motil* **15**: 299-306.
- Tonini M, Frigo G, Lecchini S, D'Angelo L & Crema A (1981). Hyoscine-resistant peristalsis in guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* **71**: 375-81.
- Töröscik A, Oberfrank F, Sershen H, Lajtha A, Nemesky K & Vizi ES (1991). Characterization of somatodendritic neuronal nicotinic receptors located on the myenteric plexus. *Eur J Pharmacol* **202**: 297-302.
- Tøttrup A, Ny L, Alm P, Larsson B, Forman A & Andersson KE (1993). The role of the L-arginine/nitric oxide pathway for relaxation of the human lower oesophageal sphincter. *Acta Physiol Scand* **149**: 451-459.
- Tøttrup A, Svane S & Forman A (1991). Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol* **260**: G385-G389.
- Uc A, Murray JA & Conklin JL (1997). Effects of calcitonin gene-related peptide on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* **113**: 514-520.
- Uc A, Oh ST, Murray JA, Clark E & Conklin JL (1999). Biphasic relaxation of the opossum lower esophageal sphincter: roles of NO, VIP and CGRP. *Am J Physiol* **277**: G548-G554.
- Uchiyama T & Chess-Williams R (2004). Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* **40**: 237-247.
- Uddman R, Alumets J, Edvinsson L, Hakanson R & Sundler F (1978). Peptidergic (VIP) innervation of the esophagus. *Gastroenterology* **75**: 5-8.

- Uddman R, Luts A, Absood A, Arimura A, Ekelund M, Desai H, Hakånson R, Hambreaus G & Sundler F (1991). PACAP, a VIP-like peptide, in neurons of the esophagus. *Regul Pep* **36**: 415-422.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L & Vaudry H (2009). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* **61**: 283-357.
- Vegesna AK, Braverman AS, Miller LS, Tallarida RJ, Tiwana MI, Khayyam U & Ruggieri MR Sr (2010). Comparison of human and porcine gastric clasp and sling fiber contraction by M2 and M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G530-4.
- Vicente Y, Da RC, Yu J, Hernández-Peredo G, Martínez L, Pérez-Mies B & Tovar JA (2001). Architecture and function of the gastroesophageal barrier in the piglet. *Dig Dis Sci* **46**: 1899-1908.
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K & Lindstrom J (1996). Assembly of human neuronal nicotinic receptor  $\alpha 5$  subunits with  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  and  $\beta 4$  subunits. *J Biol Chem* **271**: 17656-65.
- Wang XY, Vannucchi MG, Nieuwmeyer F, Ye J, Faussone-Pellegrini MS & Huizinga JD (2005). Changes in interstitial cells of Cajal at the deep muscular plexus are associated with loss of distention-induced burst-type muscle activity in mice infected by *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol* **167**: 437-453.
- Ward SM, Beckett EA, Wang X, Baker F, Khoyi M & Sanders KM (2000). Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* **20**: 1393-1403.
- Ward SM, Burns AJ, Torihashi S & Sanders KM (1994). Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* **480**: 91-97.
- Ward SM, Morris G, Reese L, Wang XY & Sanders KM (1998). Interstitial cells of Cajal mediate enteric inhibitory neurotransmission in the lower esophageal and pyloric sphincters. *Gastroenterology* **115**: 314-319.
- Watkins CC, Boehning D, Kaplin AI, Rao M, Ferris CD & Snyder SH (2004). Carbon monoxide mediates vasoactive intestinal polypeptide-associated nonadrenergic / noncholinergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2631-2635.
- Wattchow DA & Costa M (1996). Distribution of peptide-containing nerve fibres in achalasia of the oesophagus. *J Gastroenterol Hepatol* **11**: 478-485.
- Wattchow DA, Furness JB & Costa M (1988). Distribution and coexistence of peptides in nerve fibers of the external muscle of the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **95**: 32-41.
- Wattchow DA, Furness JB, Costa M, O'Brien PE & Peacock M (1987). Distributions of neuropeptides in human esophagus. *Gastroenterology* **93**: 1363-1371.
- Weisbrodt NW & Christensen J (1972). Gradients of contractions in the opossum esophagus. *Gastroenterology* **62**: 1159-1166.
- Werkstrom V, Ny L, Persson K & Andersson KE (1997). Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* **120**: 312-318.
- White RJ, Zhang Y, Morris GP & Paterson WG (2001). Esophagitis-related esophageal shortening in opossum is associated with longitudinal muscle hyperresponsiveness. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**: G463-G469.
- Wiley JW, Lu Y & Owyang C (1991). Evidence for a glutamatergic neural pathway in the myenteric plexus. *Am J Physiol* **261**: G693-G700.
- Won KJ, Sanders KM & Ward SM (2005). Interstitial cells of Cajal mediate mechanosensitive responses in the stomach. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **102**: 14913-14918.
- Wonnacott S (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**: 92-98.
- Wood JD (2006). Cellular neurophysiology of enteric neurons. *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Fourth Edition* ed. by Leonard R. Johnson, **chapter 23**: 629-663.
- Xue L, Farrugia G, Miller SM, Ferris CD, Snyder SH & Szurszewski JH (2000a). Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: evidence from genomicdeletion of biosynthetic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1851-1855.



- Xue L, Farrugia G, Sarr MG & Szurszewski JH (1999). ATP is a mediator of the Fast inhibitory neuromuscular transmission mediated by the P2Y(1) receptor in guinea-pig small intestine. *Am J Physiol* **276**: G1373-G1379.
- Xue L, Farrugia G & Szurszewski JH (2000b). Effect of exogenous ATP on canine jejunal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**: G725-G733.
- Xue L, Valdez D, Collman PI & Diamant NE (1996). Effects of nitric oxide synthase blockade on esophageal peristalsis and the lower esophageal sphincter in the cat. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 1249-1257.
- Yamashita Y, Mason RJ & DeMeester TR (2003). Postprandial acid reflux is reduced by delayed gastric emptying. *J Smooth Muscle Res* **39**: 87-93.
- Yamato S, Saha JK & Goyal RK (1992a). Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation. *Life Sci* **50**: 1263-1272.
- Yamato S, Spechler SJ & Goyal RK (1992b). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* **103**: 197-204.
- Yuan S & Brookes SJ (1999). Neuronal control of the gastric sling muscle of the guinea pig. *J Comp Neurol* **412**: 669-680.
- Yuan S, Costa M & Brookes SJ (1998). Neuronal pathways and transmission to the lower esophageal sphincter of the guinea Pig. *Gastroenterology* **115**: 661-671.
- Zakhary R, Poss KD, Jaffrey SR, Ferris CD, Tonegawa S & Snyder SH (1997). Targeted gene deletion of heme oxygenase 2 reveals neural role for carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 14848-14853.
- Zhai J, Gershon MD, Walsh JH, Wong HC & Kirchgessner AL (1999). Inward currents in neurons from newborn guinea-pig intestine: mediation by 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **291**: 374-382.
- Zhang Y, Vogalis F & Goyal RK (1998). Nitric oxide suppresses a Ca(2+)-stimulated Cl- current in smooth muscle cells of opossum esophagus. *Am J Physiol* **274**: G886-G890.
- Zhou DS, Desaki J & Komuro T (1996). Neuro-muscular junctions of longitudinal and circular muscle fibers of the guinea-pig esophagus and their relation to myenteric plexus. *J Auton Nerv Syst* **58**: 63-68.
- Zhou X & Galligan JJ (1999). Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine receptors in myenteric neurons of guinea-pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 803-810.
- Zhou X, Ren J, Brown EB, Schneider D, Caraballo-López Y & Galligan JJ (2002). Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea-pig small intestinal myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 889-897.



## Objetivos

El objetivo general de esta tesis ha consistido en el estudio **in vitro** de distintas zonas del esófago (cuerpo esofágico (EB) y esfínter esofágico inferior (LES)) con tejido procedente de dos especies, el humano y el cerdo. Para ello hemos empleado las técnicas de *baño de órganos* y *microelectrodos*, que nos han permitido: Estudiar los mecanismos de control y los neurotransmisores implicados en las respuestas inducidas mediante la estimulación de las motoneuronas inhibitorias y excitatorias del plexo mientérico en el esófago (LES y EB) humano y animal. Hemos utilizado el modelo porcino porque está considerado como un **modelo animal homólogo** al humano, ya que ambas especies presentan grandes similitudes tanto funcionales como estructurales respecto al tracto gastrointestinal.

**Objetivo 1.** Evaluar el efecto de la estimulación de los receptores tipo canal iónico dependiente de ligando (LGIC, *ligand-gated ion channels*, **nAChRs**, **5-HT<sub>3</sub>**, **P2X**) en el **LES porcino**. Y de forma más específica, estudiar el efecto de la estimulación selectiva de las motoneuronas inhibitorias ó de las motoneuronas excitatorias del plexo mientérico a través de dichos receptores LGIC en el **LES porcino**.

**Objetivo 2.** Explorar los mecanismos mientéricos que controlan la motilidad esofágica en las dos regiones del esófago humano: **cuerpo esofágico (EB)** y las dos zonas del **esfínter esofágico inferior (LES)** –**región clasp vs región sling**-. Evaluar los neurotransmisores inhibitorios implicados en las respuestas del **EB** y de ambas zonas del **LES (clasp y sling)** y los mecanismos de especialización funcional de las diferentes regiones del **esfínter esofágico inferior** y del **cuerpo esofágico humano**.

**Objetivo 3.** Estudiar los patrones de contracción del **cuerpo esofágico (EB) porcino (músculo liso)** en respuesta a la estimulación de las motoneuronas inhibitorias y excitatorias del plexo mientérico. Caracterizar los neurotransmisores y los receptores que median el origen y la modulación de la neurotransmisión responsable de las contracciones del **cuerpo esofágico porcino**.

## Capítulo 1

### Selective Stimulation of Intrinsic Excitatory and Inhibitory Motor Pathways in Porcine Lower Oesophageal Sphincter

Lecea B, Matínez E, Aulí M, Opazo Á & Clavé P (2009). Selective stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 1342-e130.

#### Abstract

The mechanisms of stimulation of inhibitory and excitatory motor neurons (MNs) in the lower oesophageal sphincter (LOS) are not fully understood. The aim of this study was to assess the effect of selective stimulation of inhibitory and excitatory MNs in porcine LOS through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), 5-HT<sub>3</sub>, and P2X receptors. Circular LOS strips from adult pigs were studied in organ baths. We compared the effects of stimulation of MNs by electrical field stimulation (26 V, 0.3-20 Hz); nicotine (1-300  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); 5-HT and 2-Me-5-HT (1  $\text{nmol L}^{-1}$ -30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); and  $\alpha,\beta$ -methylene ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP 1-100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); in standard Krebs solution; a non-adrenergic non-nitroergic non-purinergeric (NANNNP) solution; and a non-adrenergic non-cholinergic (NANC) solution. Electrical stimulation of inhibitory MNs caused an intense LOS relaxation ( $-78.94 \pm 4.50$  % of LOS tone); and of excitatory MNs, a strong contraction ( $17.89 \pm 1.96$  g). Nicotine 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  relaxed LOS ( $-84.67 \pm 3.98$  %) in standard Krebs solution, an effect reduced by Tetrodotoxin (TTX) 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Nicotine induced a weak TTX-sensitive contraction ( $1.64 \pm 0.4$  g) in NANNNP solution. 5-HT 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and 2-Me-5-HT 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  contracted LOS in standard, NANC and NANNNP conditions, maximal responses ( $7.30 \pm 1.52$  g,  $3.50 \pm 0.18$  g respectively) being reduced by TTX.  $\alpha,\beta$ -meATP 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  caused a LOS relaxation ( $-17.45 \pm 6.62$  %) unaffected by TTX in NANC solution, and a contraction ( $6.7 \pm 0.85$  g) antagonized by TTX in NANNNP solution. Our results suggest selective mechanisms for stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine LOS. Inhibitory MNs are strongly stimulated by nAChRs and do not respond to stimulation of 5-HT<sub>3</sub> and P2X receptors. By contrast, excitatory MNs are stimulated through 5-HT<sub>3</sub> and P2X receptors, stimulation through nAChRs being difficult and causing a weak response.

#### Introduction

The mechanisms that control lower oesophageal sphincter (LOS) motility are mainly confined to the oesophageal myenteric plexus (Goyal *et al.*, 2001; Paterson *et al.*, 1992). Vagal efferent fibres synapse with motor neurons (MNs) in the myenteric ganglia to provide input for swallowing-induced LOS relaxation during primary peristalsis and the transient LOS relaxation that causes physiological gastro-oesophageal reflux (Chang *et al.*, 2003; Goyal *et al.*, 2001). Efforts during recent years have been directed at characterizing the mechanisms controlling LOS tone and the neurotransmitters released by MNs and sent to LOS smooth muscle. We found that human and porcine LOS tone is mainly myogenic and is modulated by tonic input from excitatory and inhibitory MNs (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). Relaxation of porcine LOS following stimulation of inhibitory MNs is caused in a similar degree by two parallel pathways: (i) one mediated by nitric oxide through guanylate cyclase signaling mechanisms and (ii) a second pathway mainly mediated by ATP or a related purine acting through P2Y<sub>1</sub> receptors (Farré *et al.*, 2006).

In human studies, we found that nitric oxide synthesis inhibitors reduced LOS relaxation by more than 85%, and P2Y<sub>1</sub> antagonists blocked the non-nitroergic relaxation (González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2008). In both species, the effects of excitatory MNs are mediated by co-release of acetylcholine (ACh) and tachykinins, the subtypes of tachykinin receptors involved being species dependent (Brown & Timmermans, 2004; Kovac *et al.*, 2006). By contrast, there is little data available on the mechanisms and receptors involved in the stimulation of excitatory and inhibitory motor pathways from interneurons and vagal fibres in the LOS. Acetylcholine released by vagal fibres acting upon inhibitory MNs through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) has been considered the main mechanism of transmission in this pathway (Chang *et al.*, 2003). Nevertheless, there is some controversy over the nature of the neural input to the excitatory MNs as its stimulation

through nAChRs is difficult and causes a weak response (Chang *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Rattan & Goyal, 1974), suggesting the participation of non-nicotinic mechanisms in neurotransmission to excitatory MNs in human LOS (González *et al.*, 2004).

Recent studies on other gastrointestinal tissues described how nAChRs, purinergic (P2X) and serotonergic (5-HT<sub>3</sub>) receptors participate in fast synaptic transmission to enteric MNs (Galligan, 2002). These nAChRs, P2X and 5-HT<sub>3</sub> receptors are ligand-gated ion channels (LGICs) and are expressed by MNs (S neurons) in the enteric nervous system (Galligan, 2002). Synaptic connections in the enteric nervous system are likely to be chemically coded so that connections to MNs can use specific neurotransmitter combinations (Galligan & North, 2004).

The aim of this study was to assess the effect of stimulation of ligand-gated ion channels in the porcine LOS, and, specifically, the effect of selective stimulation of intrinsic inhibitory and excitatory MNs through nAChRs, 5-HT<sub>3</sub>, and P2X receptors.

## Materials and Methods

### Preparations

Fifty-eight adult pigs (age, 6 months; weight, 75-80 Kg) were stunned and killed by exsanguination in a slaughterhouse. The experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain. The mucosa was removed and full thickness 3-mm-wide strips parallel to circular muscle fibres were obtained from the clasp side of the LOS (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006). Weight of the strips was similar ( $0.33 \pm 0.01$  g,  $n = 21$ ). Final strips measuring 10 mm in length were placed in 15-mL organ baths containing a standard Krebs solution constantly bubbling with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, and after 30-min incubation, strips were stretched up to 150% of their initial length and stabilized (Farré *et al.*, 2006). Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (Model 03 Force Transducer; Grass Instruments Co., Quincy, MA, USA) and recorded on a computer using the data acquisition software ACQKNOWLEDGE 3.7.2 (Biopac Systems Inc., Goleta, CA, USA). Electrical Field Stimulation (EFS) was applied by means of an electrical stimulator (Model S88; Grass Instruments Co., West Warwick, RI, USA) and a power booster (Stimu-Splitter II; Med-Lab Instruments, Loveland, CO, USA) (Farré *et al.*, 2006). Strips were considered to originate from the LOS when spontaneously develop tone during equilibration

period and relaxed in response to neural stimulation by EFS (Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004).

### Drugs

Tetrodotoxin (TTX), the selective P2X subtype receptor agonist  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate ( $\alpha,\beta$ -meATP), 5-hydroxytryptamine (5-HT), nicotine, hexamethonium chloride, apamin, *N*<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME), phentolamine hydrochloride, (1H-[1,2,4] and Oxadiazole-[ 4,3 -  $\alpha$  ] quinoxalin - 1 - one) (ODQ) were obtained from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). The selective NK<sub>2</sub> receptor antagonist (NK-2ra) Bz-Ala-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH<sub>2</sub> was obtained from Bachem (Weil am Rhein, Germany). Propranolol hydrochloride, 2-Methyl-5-hydroxytryptamine hydrochloride (2-Me-5-HT), ondansetron hydrochloride, substance P, the competitive antagonist for P2Y<sub>1</sub> receptors MRS2179 (2'-Deoxy-*N*<sup>6</sup>-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt) and the antagonist for the P2X<sub>1,2,3</sub> receptors NF279 ( 8 , 8  $\phi$  - [ Carbonylbis ( imino - 4 , 1 - phenylenecarbonylimino - 4 , 1 - phenylenecarbonylimino ) ] bis - 1 , 3 , 5 - naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt) were purchased from Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK), and Atropine from Merck (Darmstadt, Germany). The selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist besylate of nolpitantium (SR140333) was a kind gift from Dr X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier Cédex, France).

### Experimental Design

Our experimental design included: (i) the effect of direct stimulation of both excitatory and inhibitory LOS MNs by EFS; (ii) the selection of experimental conditions to specifically explore the effect of stimulation of excitatory or inhibitory MNs by agonist of LGICs and (iii) the characterization of these responses with neurotoxins and specific antagonists of neurotransmitters released by excitatory or inhibitory MNs.

#### *i) Electrical field stimulation of MNs*

A frequency-related curve of the effect of EFS on LOS strips was plotted to study both relaxation and contraction responses induced by stimulation of MNs. Transmural EFS (pulses of 0.4-ms duration, frequency 0.3-20 Hz) was applied to LOS preparations in 5-s trains at 26 V (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). In this study, we also assessed the effect of hexamethonium ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), ondansetron ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and specific antagonists for NK<sub>1</sub> (SR140333) and NK<sub>2</sub> receptors (NK<sub>2</sub>ra), and TTX ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) on EFS responses.

**ii) Selection of conditions to specifically explore the effect of stimulation of excitatory or inhibitory MNs**

In addition to the standard Krebs solution, two additional solutions were used to explore the specific effect of stimulation of either excitatory or inhibitory MNs. A non-adrenergic non-cholinergic Krebs solution (NANC, containing propranolol hydrochloride  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , phentolamine hydrochloride  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  and atropine  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) was used to block the effects of neurotransmitters released by excitatory MNs to explore the specific effect of stimulation of inhibitory MNs. A non-adrenergic, non-nitroergic and non-purinergetic Krebs solution (NANNNP, propranolol hydrochloride  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , phentolamine hydrochloride  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , L-NAME  $1 \text{mmol L}^{-1}$  and apamin  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) was used to block the effects of inhibitory neurotransmitters to explore the specific effect of stimulation of excitatory MNs.

**iii) Characterization of the responses induced by stimulation of LGICs**

Responses to (i) nicotine  $1\text{-}300 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Farré *et al.*, 2006), (ii) 5-HT  $1 \text{nmol L}^{-1}\text{-}30 \mu\text{mol L}^{-1}$ , and the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist 2-Me-5-HT  $10 \text{nmol L}^{-1}\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Janssen *et al.*, 2002), (iii) the selective P2XR agonist  $\alpha,\beta\text{-meATP}$   $1\text{-}100 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Farré *et al.*, 2006) were assessed in standard, NANC and NANNNP Krebs solutions and compared to responses induced by electrical stimulation of MNs. Strips were exposed to each solution for 30 min before adding agonists, and concentration-related curves were obtained by exposing LOS strips to single concentrations of agonists for 3 min. Strips were washed with 45 mL of fresh solution and left for 30 min before next agonist exposure. Using this protocol, repeated additions of nicotine ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), 5-HT ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), 2-Me-5-HT ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), or  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) did not result in changes in the responses and did not desensitize the receptors (not shown). LOS responses (relaxation or contraction) were characterized by the neurotoxin TTX ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and antagonists for excitatory (atropine  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , and SR140333  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), and inhibitory (ODQ  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  or L-NAME  $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) neurotransmitters (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004).

**Data Analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and *n* depicts number of animals. Relaxation was expressed as a percentage of LOS tone at the end of the equilibration period (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006). The concentration-response curve was

calculated and the EC<sub>50</sub> values by GRAPHPAD PRISM, version 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Contraction was expressed in grams. *t*-test was selected for comparisons, using the paired mode when appropriate, and the effect of pharmacological agents on frequency-response curves was performed using two-way repeated measure analysis of variance. When *t*-test was significant, the Bonferroni test was carried out to determine the frequencies of statistically different responses. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

**Results**

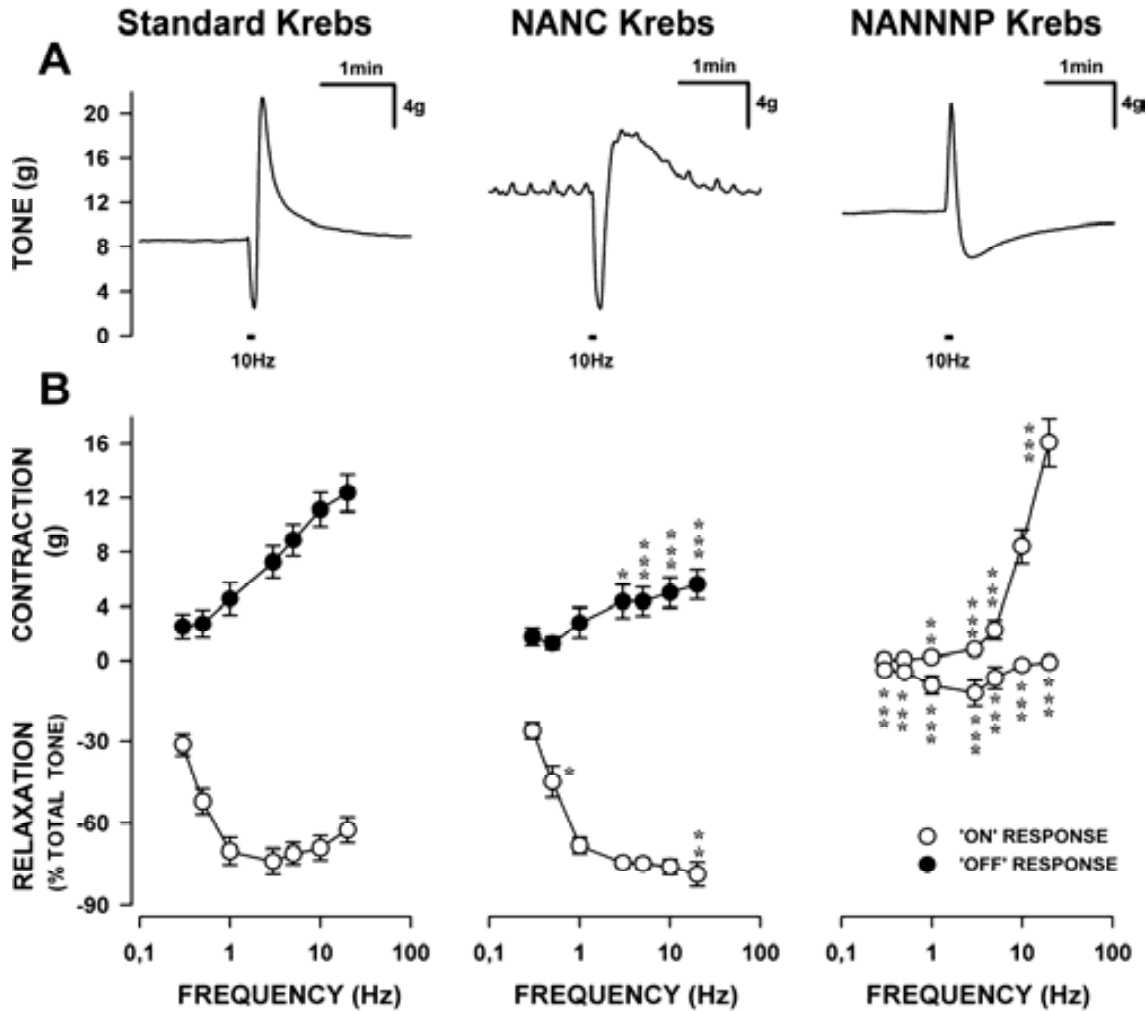
**Responses induced by electrical stimulation of MNs**

LOS strips developed  $9.44 \pm 0.40 \text{g}$  of tone after the equilibration period (*n* = 58). In experiments with standard Krebs solution, LOS strips responded to EFS with a sharp and intense frequency-dependent relaxation during electrical stimulus (*on*-relaxation), followed by a strong phasic contraction at the end of the stimulus (*off*-contraction) (Fig. 1). Hexamethonium did not affect EFS-responses ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , *n* = 3, ns), and ondansetron  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  did not affect *on*-relaxation ( $+1.33 \pm 3.8\%$  at 20 Hz, *n* = 6, ns) and moderately reduced *off*-contraction ( $-25.21 \pm 6.89\%$  at 20 Hz, *n* = 6, *P* < 0.05). TTX ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (*n* = 6, *P* < 0.001) almost abolished *on*-relaxation and *off*-contraction suggesting EFS responses are mainly caused by stimulation of both excitatory and inhibitory MNs. NK<sub>2</sub>ra  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  did not significantly affect *off*-contraction (*n* = 4, not shown). By contrast, the NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  significantly reduced the amplitude at 3-20 Hz ( $-47.75 \pm 9.30\%$  to  $-21.21 \pm 6.36\%$ , *n* = 4, *P* < 0.01) and sequential addition of atropine  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  almost abolished EFS contraction (*n* = 4). SP  $0.1 \text{nmol L}^{-1}\text{-}10 \mu\text{mol L}^{-1}$  induced a concentration-dependent contraction (EC<sub>50</sub> =  $113 \text{nmol L}^{-1}$ , *n* = 5), the maximal contraction being  $7.43 \pm 1.78 \text{g}$ , representing  $60.07 \pm 15.9\%$  of maximal *off*-contraction induced by EFS. NK<sub>2</sub>ra slightly reduced the SP  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -induced contraction by  $-16.20 \pm 3.99\%$  (*n* = 7, *P* < 0.01). By contrast, the NK<sub>1</sub> receptor antagonist SR140333 almost abolished the SP  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -induced contraction by  $-92.37 \pm 0.62\%$  (*n* = 8, *P* < 0.0001).

Electrical stimulation of MNs in NANC Krebs solution induced a frequency-dependent relaxation slightly above that observed in standard Krebs solution (Fig. 1); *off*-contraction was strongly reduced by up to  $-45.61 \pm 12.84\%$ , (*n* = 5, 20 Hz, *P* < 0.001). EFS relaxation was almost abolished in NANNNP solution (Fig. 1). In this experimental

setting, NANNNP solution shifted the *off*-contraction to *on*-contraction of increased amplitude of  $+49.83 \pm 15.54\%$ , at higher frequencies of

electrical stimulation (20 Hz,  $n = 7$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 1, right panel).

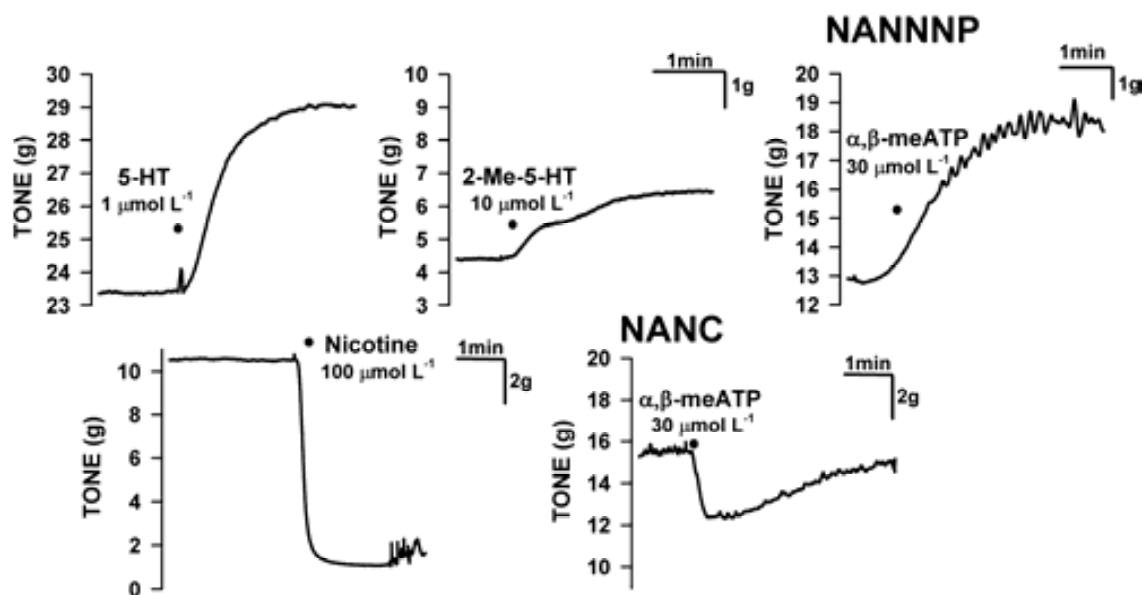


**Figure 1. (A) Representative tracings and (B) frequency-response curves of electrical field stimulation responses (0.3-20 Hz; 4 ms; 26 V) in standard Krebs solution (left panel curve), NANC (non-adrenergic non-cholinergic) Krebs solution,  $n = 5$ , central panel and NANNNP (non-adrenergic non-nitroergic non-purinergeric) Krebs solution,  $n = 7$ , right panel. Electrical stimulation of motor neurons caused a relaxation during electrical stimulus (*on*-relaxation), followed by a strong contraction at the end of the stimulus (*off*-contractions) in standard Krebs. *Off*-contraction was strongly reduced in NANC solution; by contrast, *on*-relaxation was enhanced at higher frequencies of stimulation. *On*-relaxation was almost blocked in NANNNP solution and *off*-contraction was shifted to *on*-contraction of increased amplitude at higher frequencies of electrical stimulation. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs standard Krebs.**

## Effect of stimulation of nAChRs

In standard Krebs solution, nicotine ( $1\text{-}300\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) relaxed LOS strips in a concentration-dependent manner (Figs. 2 and 3).  $EC_{50}$  was  $15.9\ \mu\text{mol L}^{-1}$  and amplitude of maximal relaxation ( $-84.67 \pm 3.98\%$  of LOS tone,  $n = 6$ ) was similar to that obtained by EFS ( $-74.12 \pm 4.7\%$  of tone, 3 Hz, ns, Table 1). Hexamethonium fully blocked nicotine-induced LOS relaxation ( $-98.27 \pm 3.51\%$ ,  $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ), and TTX  $1\ \mu\text{mol L}^{-1}$  reduced it ( $-40.51 \pm 8.79\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ). ODQ  $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $-56.36 \pm 3.44\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.001$ ) also antagonized  $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$  nicotine LOS relaxation. The relaxation induced by stimulation of nAChRs by

nicotine in NANC solution was significantly less than that caused by stimulation of nAChRs in standard conditions (Fig. 3). Relaxation caused by nicotine in NANC solution was also significantly antagonized by TTX ( $-74.21 \pm 5.9\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). Stimulation of nAChRs by nicotine did not cause any significant relaxation in NANNNP conditions (Fig. 3). Nicotine induced a weak concentration-dependent contraction in NANNNP conditions ( $n = 3$ , Fig. 3, Table 1), fully antagonized by atropine ( $-100\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ). Maximal contraction induced by nicotine in NANNNP solution was  $9.17 \pm 2.47\%$  of that caused by stimulation of excitatory EMNs by EFS under the same conditions ( $n = 3$ ,  $P < 0.05$ ).



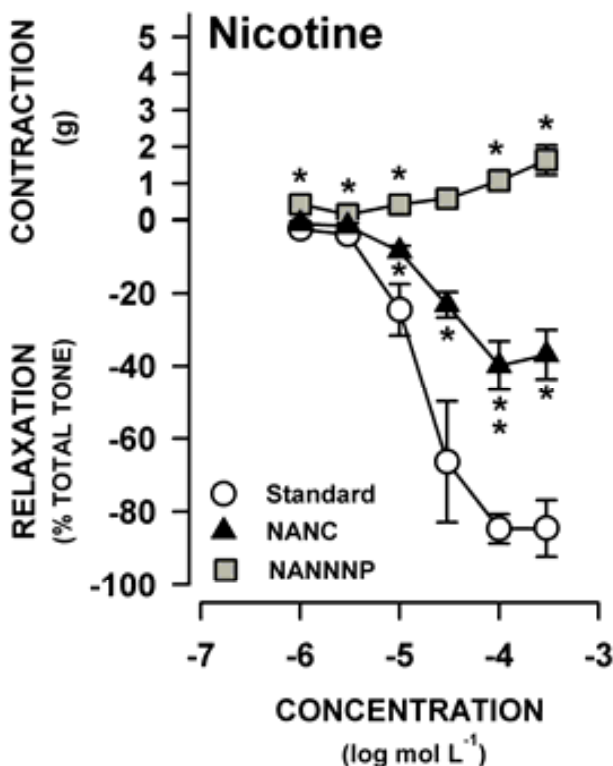
**Figure 2. Representative tracings** showing the morphology of responses induced by the agonists of nicotinic, 5-HT, and P2X receptors in porcine LOS. In standard Krebs solution, 5-HT and 2-Me-5HT induced a contraction, and nicotine, a relaxation. Stimulation of P2X receptors by  $\alpha,\beta$ -meATP caused LOS relaxation in NANC solution and LOS contraction in NANNNP solution.



**Table 1.** EC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub> of agonists causing LOS relaxation and contraction during standard Krebs, NANC and NANNNP conditions.

Agonist	Solution	EC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	E <sub>max</sub>
<b>LOS relaxation</b>			
EFS (3 Hz)	Standard Krebs	-	-74.12 ± 4.7%
Nicotine	Standard Krebs	15.9	-84.7 ± 4.0%, ns
α,β-meATP	Standard Krebs	55.4	-36.21 ± 6.6% **
EFS (20 Hz)	NANC	-	-78.94 ± 4.50%
Nicotine	NANC	22.6	-39.87 ± 6.7 %**
α,β-meATP	NANC	42.8	-17.45 ± 6.6 %**
EFS (3 Hz)	NANNNP	-	-12.05 ± 4.65%
<b>LES contraction</b>			
EFS (20 Hz)	Standard Krebs	-	12.36 ± 1.39 g
5-HT	Standard Krebs	0.6	7.30 ± 1.5 g *
2-Me-5-HT	Standard Krebs	5.90	3.50 ± 0.2 g **
α,β-meATP	Standard Krebs	42.2	1.19 ± 0.5 g *
EFS (20 Hz)	NANC	-	5.62 ± 1.10 g
5-HT	NANC	5.8	3.55 ± 0.5 g, ns
2-Me-5-HT	NANC	11.2	0.73 ± 0.1 g **
EFS (20 Hz)	NANNNP	-	17.89 ± 1.96 g
Nicotine	NANNNP	122	1.64 ± 0.4 g *
5-HT	NANNNP	4.64	6.28 ± 0.8 g **
2-Me-5-HT	NANNNP	18.2	1.41 ± 0.3 g **
α,β-meATP	NANNNP	28.6	6.7 ± 0.85 g **

\* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs EFS in each experimental condition. E<sub>max</sub>, maximal effect; EFS, electrical field stimulation; LOS, lower oesophageal sphincter; NANC, non-adrenergic, non-cholinergic; NANNNP, non-adrenergic, non-nitroergic, non-purinergetic; 5-HT, 5-Hydroxytryptamine; α,β-meATP, α,β-Methylenadenosine 5<sup>2</sup>-triphosphate; 2-Me-5-HT, 2-Methyl-5-Hydroxytryptamine Hydrochloride.

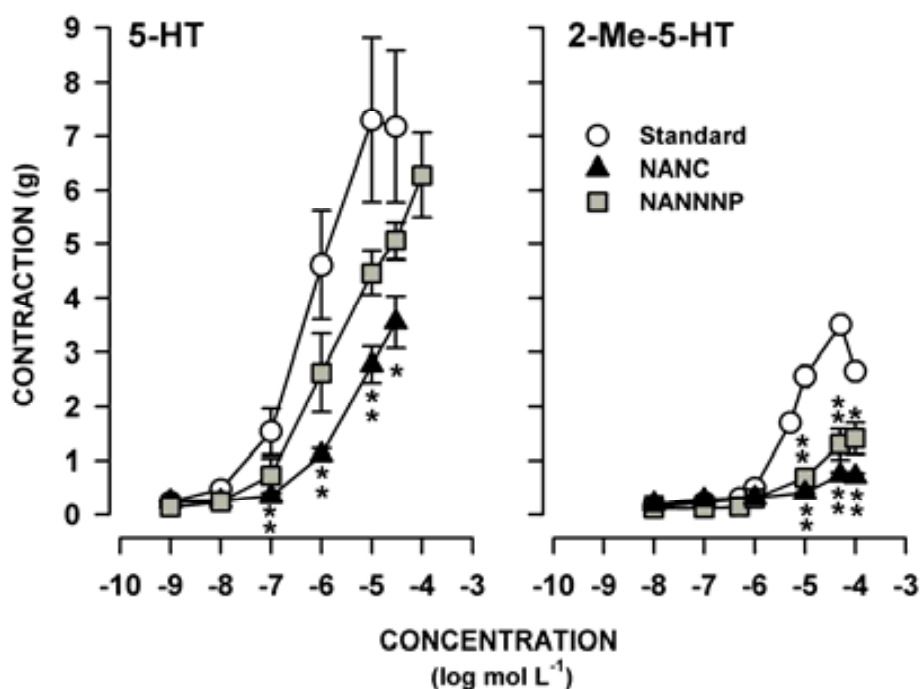


**Figure 3.** Log concentration-response curves (1 μmol L<sup>-1</sup>-300 μmol L<sup>-1</sup>) induced by nicotine in standard Krebs solution (*n* = 8), NANC conditions (*n* = 5), and NANNNP conditions (*n* = 3), \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01 vs standard Krebs. Nicotine induced a strong concentration-dependent relaxation in standard Krebs solution that was reduced in NANC solution. In NANNNP solution, nicotine-relaxation was abolished and nicotine induced a weak contraction.

## Effect of stimulation of 5-HT receptors

In standard Krebs solution, 5-HT ( $1 \text{ nmol L}^{-1}$  -  $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) evoked an intense concentration-dependent contraction with  $\text{EC}_{50}$   $0.6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 6$ ) and maximal contraction  $59.02 \pm 15.96\%$  of that induced by EFS ( $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ), (Figs. 2 and 4). 2-Me-5-HT ( $10 \text{ nmol L}^{-1}$  -  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) also induced a concentration-dependent contraction with  $\text{EC}_{50}$   $5.9 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  and maximal amplitude representing  $47.99 \pm 10.3\%$  of maximal contraction response induced by 5-HT ( $3.50 \pm 0.18 \text{ g}$  vs  $7.17 \pm 1.40 \text{ g}$  respectively,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ) (Figs. 2 and 4 and Table 1). Ondansetron  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  antagonized the contraction induced by  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  2-Me-5-HT by  $-52.7 \pm 7.2\%$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ) and at  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  antagonized the contraction induced by  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  5-HT by  $-28.8 \pm 4.7\%$  ( $n = 8$ ,  $P < 0.01$ ). Also in standard Krebs solution, both TTX  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  and atropine  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  antagonized the contraction induced by 5-HT  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $-49.67 \pm 6.62\%$ ,  $n = 5$   $P < 0.01$  and  $-53.11 \pm 13.28\%$ ,  $n = 5$   $P < 0.05$ ) and

2-Me-5-HT  $10 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $-81.54 \pm 2.53\%$   $n = 4$   $P < 0.0001$ ,  $-48.78 \pm 10.28\%$   $n = 4$   $P < 0.05$ ), respectively. SR140333  $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  significantly antagonized the contraction induced by 5-HT ( $-44.0 \pm 2.1\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ) and 2-Me-5-HT ( $-32.60 \pm 5.70\%$ ,  $n = 6$   $P < 0.01$ ) in standard Krebs solution. Maximal contractions to 5-HT and 2-Me-5-HT were significantly reduced ( $-62.02 \pm 9.13\%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$ , and  $-78.92 \pm 1.68\%$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$  respectively) in NANC conditions and no relaxation was observed (Fig. 4). The maximal contractions to 5-HT and 2-Me-5-HT were also significantly reduced in NANNNP condition ( $-38.87 \pm 13.88\%$ ,  $n = 4$ , ns, and  $-62.84 \pm 8.46\%$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$  respectively). TTX significantly antagonized the contraction induced by 5-HT and 2-Me-5-HT in NANC conditions ( $-29.84 \pm 8.76\%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ;  $-28.96 \pm 7.67\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$ ) and NANNNP ( $-32.63 \pm 8.20\%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ;  $-69.96 \pm 6.86\%$ ,  $n = 6$ ,  $P < 0.001$  respectively).

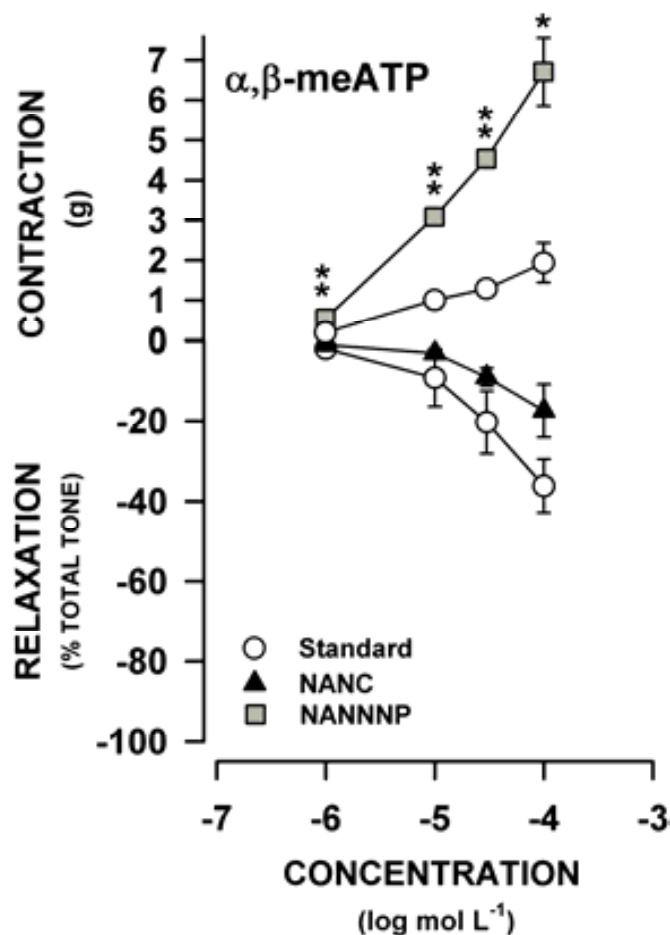


**Figure 4.** Log concentration-response curves ( $1 \text{ nmol L}^{-1}$  -  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induced by 5-HT (left) and 2-Me-5-HT (right) in standard Krebs solution ( $n = 4-9$ ), NANC solution ( $n = 4-5$ ), and NANNNP solution ( $n = 4-7$ ). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs standard Krebs. In standard Krebs solution, 5-HT and 2-Me-5-HT induced a concentration-dependent contraction that was reduced in NANC solution and no relaxation was observed. Contraction in response to 5-HT and 2-Me-5-HT was also reduced in NANNNP solution.

## Effect of stimulation of P2X receptors

The P2X agonist  $\alpha,\beta$ -meATP ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) evoked two types of LOS responses in standard Krebs solution. In 60% of strips,  $\alpha,\beta$ -meATP ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induced a moderate concentration-dependent contraction ( $EC_{50} 42.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n = 6$ ) ( $15.61 \pm 4.39\%$  of that induced by EFS,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ). In 40% of strips,  $\alpha,\beta$ -meATP ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induced a concentration-dependent relaxation ( $EC_{50} 55.4 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $n = 5$ )  $48.85 \pm 9.50\%$  of that induced by EFS,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ , (Figs. 2 and 5). NF279  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  antagonized the relaxation induced by  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\alpha,\beta$ -meATP by  $-20.4 \pm 5.7\%$  ( $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ); further addition of  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  MRS2179 fully abolished the relaxation induced by  $\alpha,\beta$ -meATP ( $n = 5$ ,  $P < 0.001$ ). The contraction response of  $\alpha,\beta$ -meATP  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  was enhanced by NF279  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $76.73 \pm 25.7\%$   $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) and

further addition of MRS2179  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  significantly enhanced the contraction response ( $212.71 \pm 63.03\%$   $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ). By contrast,  $\alpha,\beta$ -meATP always evoked a LOS relaxation in NANC conditions (Fig. 5). LOS relaxation induced by  $\alpha,\beta$ -meATP  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  in NANC conditions was  $22.11 \pm 8.48\%$  of that induced by EFS ( $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ). Neither TTX  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $-2.13 \pm 16.96\%$ ,  $n = 5$ , ns) nor L-NAME  $1 \text{mmol L}^{-1}$  ( $40.30 \pm 20.05\%$ ,  $n = 3$ , ns) antagonized relaxation induced by  $\alpha,\beta$ -meATP  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  in NANC solution. Maximal contraction to  $\alpha,\beta$ -meATP was significantly enhanced ( $246.28 \pm 99.36\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) in NANNNP conditions and no relaxation was observed. This contraction was  $37.44 \pm 6.29\%$  of that induced by EFS ( $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ) in the same experimental conditions (Table 1). TTX antagonized the contraction induced by  $\alpha,\beta$ -meATP  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $-36.03 \pm 6.86\%$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.01$ ) in NANNNP conditions.



**Figure 5.** Log concentration-response curves ( $1 \text{nmol L}^{-1}$ -  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induced by the selective P2X receptor agonist,  $\alpha,\beta$ -meATP, in standard Krebs solution ( $n = 6$ ), NANC conditions ( $n = 5$ ), and NANNNP conditions ( $n = 7$ ) \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs standard Krebs. In standard solution,  $\alpha,\beta$ -meATP induced a concentration-dependent contraction in 60% of strips and concentration-dependent relaxation in 40% of strips. In NANC solution,  $\alpha,\beta$ -meATP always evoked a LOS relaxation and in NANNNP solution,  $\alpha,\beta$ -meATP induced a strong contraction and no relaxation was observed.

## Discussion

Our results suggest selective mechanisms for stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory MNs through LGICs in porcine LOS with potential therapeutic implications. Inhibitory MNs are specifically and intensively stimulated by nAChRs, causing LOS relaxation. By contrast, excitatory MNs are strongly stimulated by serotonergic receptors, causing LOS contraction. The stimulation of excitatory MNs through nAChRs is weak and we failed to stimulate inhibitory MNs through serotonergic receptors. The effect of P2X receptors in porcine LOS is complex, involving both a direct relaxant and contractile muscular effect and a weak stimulation of excitatory motor pathways.

Both excitatory and inhibitory MNs have been efficiently stimulated by EFS in our experiments with standard Krebs solution (Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). The neurotoxin TTX that interrupts transmission of action potentials along the axon fully blocked, and the ganglionic blocker hexamethonium unaffected EFS-responses so their main origin was in the stimulation of the soma of MNs (Costa *et al.*, 1996). Our preparation is transmural and contains all the components of MP including myenteric ganglia, and excitatory and inhibitory MNs (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). We used a NANC solution to provide an experimental setting that allowed full stimulation of inhibitory MNs during blockade of excitatory neurotransmitters. Although we clearly found that NK<sub>1</sub> receptors partially mediate EFS contraction, we did not use NK<sub>1</sub> antagonists in this solution due to the difficulties caused by their exclusive ethanol dissolution. We also used a NANNP solution to fully block the effect of inhibitory neurotransmitters allowing us to specifically assess the mechanism of stimulation of excitatory MNs (Farré *et al.*, 2006).

Recent studies have found up to three subsets of MNs in the myenteric plexus that could be distinguished by the receptors mediating fast excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs). In one subset (representing only 25%-36% of MNs), fEPSPs were mediated solely by nAChRs. In the other subsets, fEPSPs were mediated by a mixed contribution from nAChRs and P2X and 5-HT<sub>3</sub> receptors (Galligan *et al.*, 2000). The functional significance of these receptors in the synaptic transmission to excitatory and inhibitory MNs in the LOS is unclear.

In our study, nicotine strongly stimulated inhibitory motor pathways and relaxed LOS strips to a similar extent that direct electrical stimulation of inhibitory MNs. Nicotine-LOS relaxation was partially inhibited - but not blocked - by TTX suggesting the

presence of nAChRs in somatodendritic regions and nerve terminals of inhibitory MNs (Farré *et al.*, 2006; Galligan, 2002).

In this study, NANC solution decreased nicotine-induced LOS relaxation. In addition, atropine antagonized nicotine-induced relaxation in our previous study on the human LOS (González *et al.*, 2004). Previous studies also found that atropine can block several subtypes of neuronal nAChRs at concentrations as low as 0.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (frequently used in experiments to antagonize muscarinic receptors) (Barajas-López *et al.*, 2001; Zwart & Vijverberg, 1997), suggesting that the effect of atropine on nicotine-LOS relaxation was caused by direct pharmacological antagonism.

By contrast, the effect of nicotine on the excitatory pathway was very weak as maximal LOS contraction induced by nicotine in NANNP conditions amounted to less than 10% of that achieved by electrical stimulation of excitatory MNs (González *et al.*, 2004). Classical *in vivo* studies by Rattan and Goyal on the opossum suggested that the vagi do not mediate any influence upon excitatory MNs in the LOS and the vagal influence on the sphincter is entirely inhibitory (Goyal & Rattan, 1975; Rattan & Goyal, 1974). These authors also found that nicotine only stimulated inhibitory MNs and not the excitatory (Rattan & Goyal, 1975). Recent studies on the same animal also found that vagal stimulation did not evoke excitatory responses even following complete blockade of inhibitory LOS pathways, suggesting that excitatory MNs in the LOS lack direct nicotinic vagal inputs (Yuan *et al.*, 1998), agreeing with our studies.

Serotonin released from enterochromaffin cells in the mucosa can initiate enteric reflexes by activating 5-HT<sub>3</sub> receptors on interneurons and MNs in the myenteric plexus (Zhou & Galligan, 1999). In the small intestine, 5-HT<sub>3</sub> receptors are also localized in the nerve cell body of enteric S neurons, where they mediate fast depolarization (Surprenant & Crist, 1988; Zhou & Galligan, 1999). We assess the effect of 5-HT, and the selective 5-HT<sub>3</sub> agonist 2-Me-5-HT in our LOS preparation. We found that in our three experimental conditions both agonists induced a partial neurogenic LOS contraction; by contrast, we failed to induce any relaxation suggesting inhibitory MNs do not respond to 5-HT<sub>3</sub> agonists in contrast to previous studies also in the LOS (Blackshaw *et al.*, 1995). Previous work on the opossum reported that vagal stimulation-induced LOS relaxation could be attenuated by 5-HT antagonists (Rattan & Goyal, 1978); however, this was not the case in another study on the same animal arguing against a major physiological role for 5-HT receptors on the inhibitory motor pathways to the opossum LOS

(Paterson *et al.*, 1992). Our results agree with those from a similar study on the guinea pig gastric fundus that found 5-HT<sub>3</sub> agonists specifically activated cholinergic excitatory neurons and did not mediate inhibitory responses (Michel *et al.*, 1997). In our study, contractions induced by stimulation of 5-HT receptors amounted to 59% of those obtained by electrical stimulation of MNs. In addition, contractions induced by either 5-HT or 2-Me-5-HT were partly antagonized by TTX and atropine, and the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron, partly inhibited EFS contractions but did not affect EFS-relaxation, clearly showing the presence of 5-HT<sub>3</sub> receptors in the neural excitatory motor pathways to the LOS (Galligan, 2002; Michel *et al.*, 1997). The greater amplitude of 5-HT-induced contraction compared with that induced by 2-Me-5-HT might be caused by stimulation of other subtypes of 5-HT receptors on excitatory MNs (5-HT<sub>4</sub>) and/or on smooth muscle cells (5-HT<sub>2B</sub>) (Wouters *et al.*, 2007). The peak response caused by 2-Me-5-HT was only 20% of that caused by 5-HT in studies in myenteric neurons of guinea pig intestine, this difference being attributed to a partial agonism or even to an antagonism of 2-Me-5-HT on 5-HT<sub>3</sub> receptors in enteric neurons (Zhou & Galligan, 1999).

Exogenous ATP caused a fast depolarization of enteric S neurons that was similar to that caused by stimulation of nAChRs (Barajas-López *et al.*, 1994; Barajas-López *et al.*, 1996; Galligan & Bertrand, 1994). Initial studies characterizing P2X-mediated fEPSPs were carried out in myenteric plexus preparations obtained from the ileum. Subsequent studies were performed to determine if P2X-mediated fEPSPs were a general mechanism to fast synaptic excitation in the gut (LePard *et al.*, 1997). Recordings from the duodenum to the distal colon revealed that there was a P2X-mediated component to fEPSPs recorded from myenteric neurones in each of these tissues but that the P2X-mediated component was most prominent distally (LePard & Galligan, 1999). In our study, in NANC conditions,  $\alpha,\beta$ -meATP always induced a relaxation response that was unaffected by TTX suggesting the presence of inhibitory P2X receptors on LOS smooth muscle cells and agreeing with our previous study on porcine LOS which showed that NF279 partly antagonized non-nitroergic LOS relaxation following stimulation of inhibitory MNs (Farré *et al.*, 2006). ATP-induced relaxation of rat pylorus has also been attributed to P2X purinoceptors located on smooth muscle cells (Ishiguchi *et al.*, 2000). In this study, NF279 partly antagonized the  $\alpha,\beta$ -meATP-relaxation and further addition of MRS2179 fully abolished this response suggesting that  $\alpha,\beta$ -meATP can stimulate inhibitory P2X and P2Y receptors in smooth muscle cells of

porcine LOS as recently described in smooth muscle cells of the human colon (King & Townsend-Nicholson, 2008). In an earlier study on the porcine LOS we found a strong inhibitory pathway mediated by muscular P2Y<sub>1</sub> receptors and a minor contribution of inhibitory P2X receptors (Farré *et al.*, 2006). This might explain the stronger effect of MRS2179 compared with NF279 on  $\alpha,\beta$ -meATP relaxation. By contrast, in NANNNP conditions,  $\alpha,\beta$ -meATP induced a neural contraction. The exact subtype and location of neuronal P2X receptor stimulated by  $\alpha,\beta$ -meATP has not been settled. Studies have found that  $\alpha,\beta$ -meATP is an agonist at P2X receptors containing P2X<sub>1</sub> and P2X<sub>3</sub> subunits but it does not activate P2X<sub>2</sub> receptors expressed by S neurons (Galligan & North, 2004). In addition - and also consistent with our results -  $\alpha,\beta$ -meATP elicited a neurogenic contractile response via release of ACh from excitatory MNs in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum (Sawyer *et al.*, 2000). In our study, maximal contraction to  $\alpha,\beta$ -meATP was significantly enhanced in NANNNP conditions because the effect of  $\alpha,\beta$ -meATP on muscular inhibitory P2X receptors was blocked by apamin and we could only observe the effects of P2X receptors on excitatory motor pathways. In addition, NF279 and MRS2179 enhanced this contractile response, suggesting the net effect of  $\alpha,\beta$ -meATP is a balance of inhibitory and excitatory responses. We believe blockade of the inhibitory P2X receptors by NF279 and P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 enhanced the contraction induced by  $\alpha,\beta$ -meATP through stimulation of P2X receptors located on excitatory motor pathways to the LOS not affected by these antagonists.

In summary, we found specific mechanisms of control and stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways to porcine LOS by different classes of LGICs with different cellular localization, and different pharmacological properties with potential therapeutic implications in the treatment of human LOS diseases. We hypothesized that selective stimulation of excitatory motor pathways by 5-HT<sub>3</sub> receptors could be used in the treatment of hypotonic LOS associated with gastroesophageal reflux disease. By contrast, selective stimulation of inhibitory motor pathways by nAChRs agonists could be used in the treatment of hypertonic LOS in early stages of achalasia with preserved inhibitory innervation (De Giorgio *et al.*, 2004). Further *in vitro* studies on human oesophageal tissue and clinical studies on patients are needed to explore the potential therapeutic effect of this approach.

### REFERENCES

- Barajas-López C, Espinosa-Luna R & Gerzanich V (1994). ATP closes a potassium and opens a cationic conductance through different receptors in neurons of guinea pig submucous plexus. *J Pharmacol Exp Ther* **268**: 1397-402.
- Barajas-López C, Huizinga JD, Collins SM, Gerzanich V, Espinosa-Luna R & Peres AL (1996). P2x-purinoceptors of myenteric neurones from the guinea-pig ileum and their unusual pharmacological properties. *Br J Pharmacol* **119**: 1541-8.
- Barajas-López C, Karanjia R & Espinosa-Luna R (2001). 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* **414**: 113-23.
- Blackshaw LA, Nisyrios V & Dent J (1995). Responses to ferret lower esophageal sphincter to 5-hydroxytryptamine: pathways and receptor subtypes. *Am J Physiol* **268**: G1004-11.
- Brown DR & Timmermans JP (2004). Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16** (Suppl. 1): 50-4.
- Costa M, Brookes SJ, Steele PA, Gibbins I, Burcher E & Kandiah CJ (1996). Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* **75**: 949-67.
- Chang HY, Mashimo H & Goyal RK (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G357-66.
- De Giorgio R, Guerrini S, Barbara G, Stanghellini V, De PF, Corinaldesi R, Moses PL, Sharkey KA & Mawe GM (2004). Inflammatory neuropathies of the enteric nervous system. *Gastroenterology* **126**: 1872-83.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Estrada O, Sunol X & Clavé P (2007). Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**: 1427-36.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Martínez E & Clavé P (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-48.
- Galligan JJ (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**: 611-23.
- Galligan JJ & Bertrand PP (1994). ATP mediates fast synaptic potentials in enteric neurons. *J Neurosci* **14**: 7563-71.
- Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA & Zhou X (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**: 97-103.
- Galligan JJ & North RA (2004). Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16** (Suppl. 1): 64-70.
- González AA, Farré R & Clavé 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.
- Goyal RK, Padmanabhan R & Sang Q (2001). Neural circuits in swallowing and abdominal vagal afferent-mediated lower esophageal sphincter relaxation. *Am J Med* **111** (Suppl. 8A): 95S-105S.
- Goyal RK & Rattan S (1975). Nature of the vagal inhibitory innervation to the lower esophageal sphincter. *J Clin Invest* **55**: 1119-26.
- Ishiguchi T, Takahashi T, Itoh H & Owyang C (2000). Nitrgergic and purinergic regulation of the rat pylorus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G740-7.
- Janssen P, Prins NH, Meulemans AL & Lefebvre RA (2002). Pharmacological characterization of the 5-HT receptors mediating contraction and relaxation of canine isolated proximal stomach smooth muscle. *Br J Pharmacol* **136**: 321-9.
- King BF & Townsend-Nicholson A (2008). Involvement of P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>11</sub> purinoceptors in parasympathetic inhibition of colonic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **24**: 1055-63.
- Kovac JR, Chrones T, Preiksaitis HG & Sims SM (2006). Tachykinin receptor expression and function in human esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 513-20.
- Lecea B, Aulí M, Martínez E, Opazo A, Farré R, Sunol X & Clavé P (2008). Regional functional specialization and inhibitory purinergic



- neurotransmission in human lower esophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 20-1.
- LePard KJ & Galligan JJ (1999). Analysis of fast synaptic pathways in myenteric plexus of guinea pig ileum. *Am J Physiol* **276**: G529-38.
- LePard KJ, Messori E & Galligan JJ (1997). Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea pig: distribution and pharmacology. *Gastroenterology* **113**: 1522-34.
- Michel K, Sann H, Schaaf C & Schemann M (1997). Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct serotonin receptors: projection, neurochemical coding, and functional implications. *J Neurosci* **17**: 8009-17.
- Paterson WG, Anderson MA & Anand N (1992). Pharmacological characterization of lower esophageal sphincter relaxation induced by swallowing, vagal efferent nerve stimulation, and esophageal distention. *Can J Physiol Pharmacol* **70**: 1011-5.
- Rattan S & Goyal RK (1974). Neural control of the lower esophageal sphincter: influence of the vagus nerves. *J Clin Invest* **54**: 899-906.
- Rattan S & Goyal RK (1975). Effect of nicotine on the lower esophageal sphincter. Studies on the mechanism of action. *Gastroenterology* **69**: 154-9.
- Rattan S & Goyal RK (1978). Evidence of 5-HT participation in vagal inhibitory pathway to opossum LES. *Am J Physiol* **234**: E273-6.
- Sawyer GW, Lambrecht G & Ehlert FJ (2000). Functional role of muscarinic M(2) receptors in alpha,beta-methylene ATP induced, neurogenic contractions in guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* **129**: 1458-64.
- Surprenant A & Crist J (1988). Electrophysiological characterization of functionally distinct 5-hydroxytryptamine receptors on guinea-pig submucous plexus. *Neuroscience* **24**: 283-95.
- Wouters MM, Farrugia G & Schemann M (2007). 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. *Neurogastroenterol Motil* **19** (Suppl. 2): 5-12.
- Yuan S, Costa M & Brookes SJ (1998). Neuronal pathways and transmission to the lower esophageal sphincter of the guinea Pig. *Gastroenterology* **115**: 661-71.
- Zhou X & Galligan JJ (1999). Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine(3) receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 803-10.
- Zwart R & Vijverberg HP (1997). Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and non competitive effects. *Mol Pharmacol* **52**: 886-95.





## APPENDIX I: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Porcine Lower Oesophageal Sphincter (LOS)

### Summary

This section shows complementary figures that were originated from the experiments of chapter 1 and were not published. In this *in vitro* mechanical study of porcine lower oesophageal sphincter (LOS) strips we compared the effect of two neurotoxins on EFS-induced responses, assessing the neural origin of them with the TTX and the release of neurotransmitters from nerve varicosities with  $\omega$ -conotoxin (GVIA). The experiments assessing the effect of 5-HT<sub>3</sub> receptor (ondansetron) and tachykinergic (SR140333-NK<sub>1</sub>ra, GR94800-NK<sub>2</sub>ra) antagonists on both *on*-relaxation and *off*-contraction responses are included. We assessed the purinergic component of the responses induced by mechanical and electrophysiological experimental techniques in the porcine clasp LOS, and we found that following a nitrenergic blockade this purinergic component was evident in the mechanical responses, but it was not present in the electrophysiological porcine responses. We also assessed the involvement of LGICs on LOS responses: (i) nAChRs, we determined the pharmacological interaction of atropine with nicotine-induced relaxation responses in NANC Krebs solution by increasing concentrations of this muscarinic antagonist. We also studied the effect of a  $\beta$ 4-nAChR agonist (cytisine) on LOS strips in standard, NANC and NANNNP Krebs solution. Only in standard conditions cytisine induced a moderate LOS relaxation; (ii) 5-HT<sub>3</sub>R, we assessed a desensitization study of 5-HT and 2-Me-5-HT agonists-induced responses and we found that repetitive addition of these agonists did not affect the *amplitude* of responses. We studied the effect of NK<sub>1</sub>ra (SR140333) and 5-HT<sub>3</sub>R (ondansetron) antagonists on 5-HT and 2-Me-5-HT contraction responses. We also assessed the effect of the components of NANNNP Krebs solution on 5-HT and 2-Me-5-HT contractions and we found that apamin had no effect on them whereas phentolamine reduced them significantly; (iii) P2XR, we carried out a desensitization study of  $\alpha,\beta$ -meATP agonist-induced responses and we found that the *amplitude* of the relaxation responses was not affected. We also assessed the effect of purinergic P2XR (NF279) and P2Y<sub>1</sub>R (MRS2179) antagonists on  $\alpha,\beta$ -meATP relaxations. Taken together, our studies suggest that different classes of LGICs are involved in inhibitory and excitatory motor pathways to porcine LOS. Functional 5-HT<sub>3</sub>Rs are in the excitatory pathway and nAChRs are in the inhibitory one.

## **INDEX:**

### **PHYSIOLOGICAL STUDIES:**

#### **ORIGIN OF EFS-INDUCED RESPONSES**

**-Figure 1.1** Neural origin of EFS-responses. Effect of EFS on the porcine clasp LOS strips: A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses by the neurotoxin TTX.

**-Figure 1.2** Nerve varicosities neurotransmitter release. EFS-induced responses: A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses by the neurotoxin  $\omega$ -conotoxin GVIA.

**-Figure 2.** Assessment of the involvement of the 5-HT<sub>3</sub> receptor in EFS-responses. A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses with ondansetron.

**-Figure 3.1** Tachykinergic component. A) Representative tracing, and B) Effect of NK<sub>1</sub>ra receptor antagonist (SR140333). Characterization of EFS-induced responses.

**-Figure 3.2** Tachykinergic component. A) Representative tracing, and B) Effect of NK<sub>2</sub>ra receptor antagonist (GR94800). Characterization of EFS-induced responses.

**-Figure 4.** Purinergic component. A) Representative tracing, and B) Effect of MRS2179 on mechanical non-nitroergic EFS-induced responses.

#### **PORCINE ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDIES**

**-Figure 5.** Microelectrode tracings of porcine clasp LOS. Effect of MRS2179 and L-NAME in two different protocols.

#### **CHARACTERIZATION OF LGICs STIMULATION RESPONSES**

**-Figure 6.** Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). A) Representative tracing, and B) Quantitative effect of atropine on nicotine-induced LOS relaxation responses.

**-Figure 7.** Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). A) Representative tracing, and B) Log concentration-response curves induced by the  $\beta$ 4-nAChR agonist cytisine in standard, NANC and NANNNP conditions.

**-Figure 8.** Desensitization study of 5-HT receptors. A) Representative tracing, and B) Quantitative effects of repeated 5-HT additions on LOS strips.

**-Figure 9.** 5-HT<sub>3</sub> receptors. Desensitization study of 5-HT<sub>3</sub> receptors. A) Representative tracing, and B) Quantitative effects of repeated 2-Me-5-HT additions on LOS strips.

**-Figure 10.1** 5-HT<sub>3</sub> receptors. Characterization of 5-HT and 2-Me-5-HT-induced responses. Quantitative effects of A) NK<sub>1</sub>R antagonist, SR140333, and B) 5-HT<sub>3</sub>R antagonist, ondansetron.

**-Figure 10.2** 5-HT<sub>3</sub> receptors. Characterization of 2-Me-5-HT-induced responses. Quantitative effects of simultaneous blockade of atropine and NK<sub>1</sub>R antagonist, SR140333.

**-Figure 11.** 5-HT<sub>3</sub> receptors. Characterization of 5-HT and 2-Me-5-HT-induced responses. Quantitative effects of apamin and phentolamine, components of NANNNP Krebs solution.

**-Figure 12.** P2X receptors. Desensitization study of P2X receptors. A) Representative tracing, and B) Quantitative effects of repeated  $\alpha,\beta$ -meATP additions on LOS strips.

**-Figure 13.** P2X receptors. Characterization of  $\alpha,\beta$ -meATP-induced responses. Quantitative effects of NF279 and MRS2179.

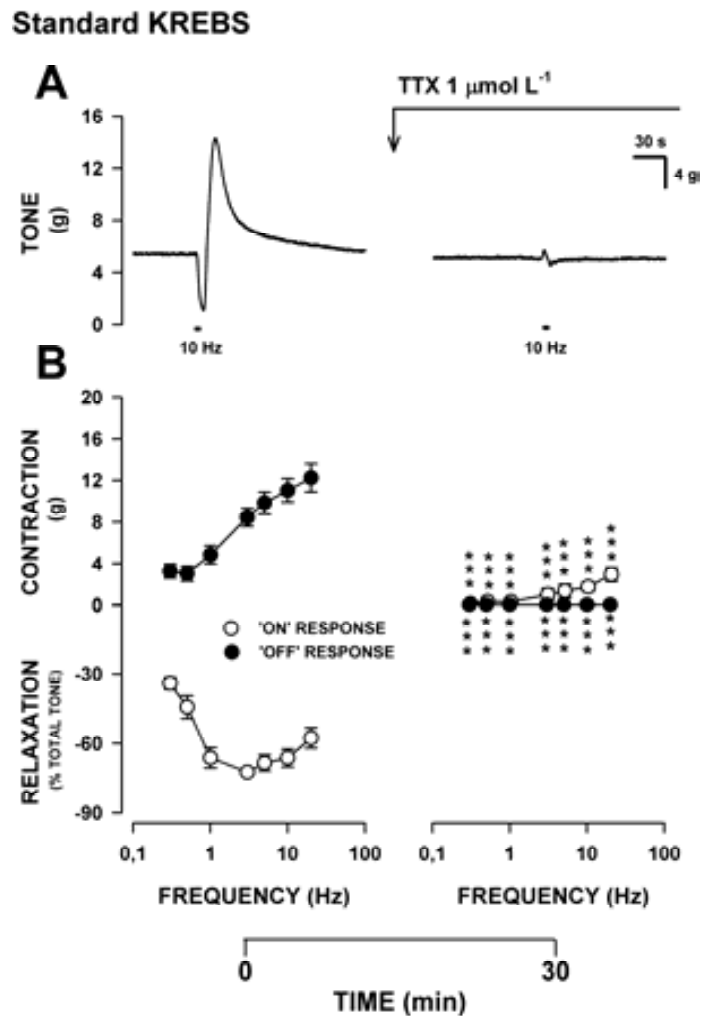
**-Figure 14.** Glutamate, glycine and GABA receptors. A) Representative tracing, and B) Log concentration-response curves induced by glutamate, glycine and GABA in standard Krebs solution.

**PHYSIOLOGICAL STUDIES:**

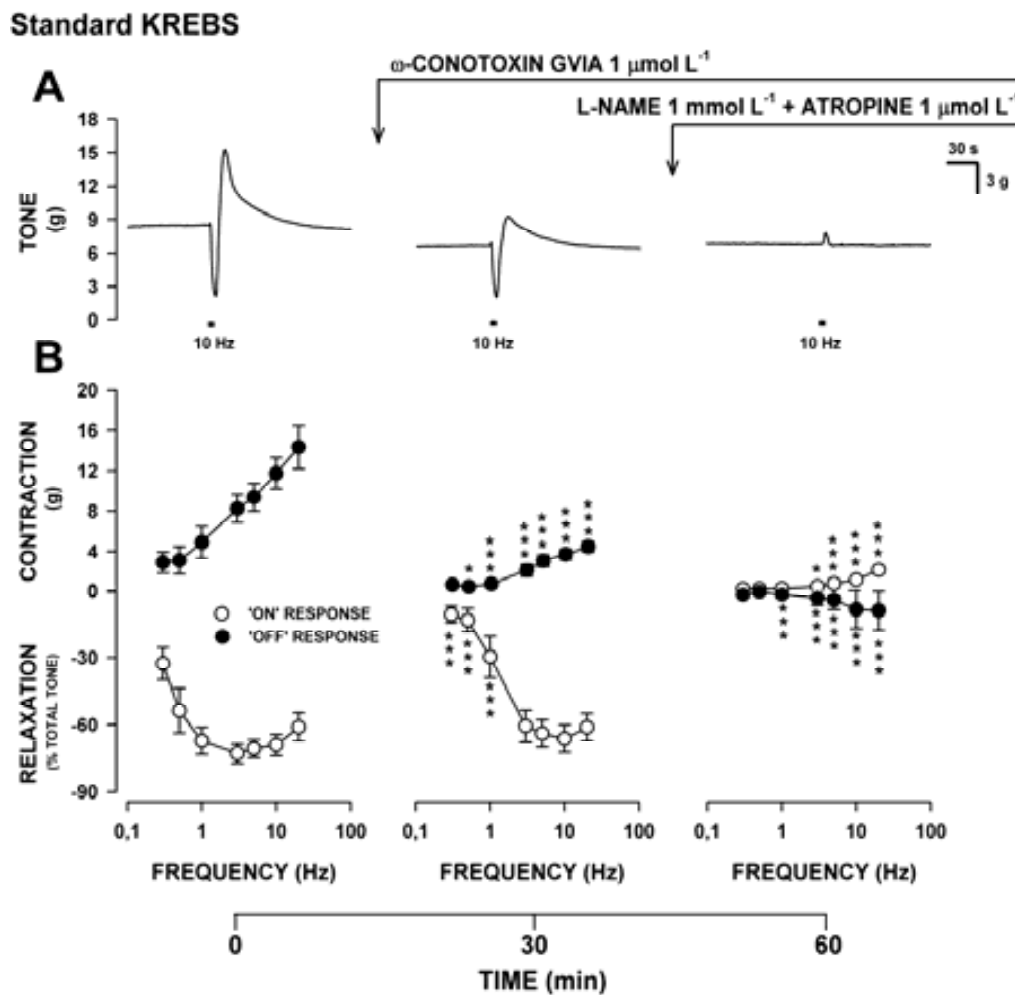
**Electrical field stimulation of enteric motorneurons (MNs) in the porcine lower oesophageal sphincter**

Origin of EFS-induced responses

Effect of neurotoxins

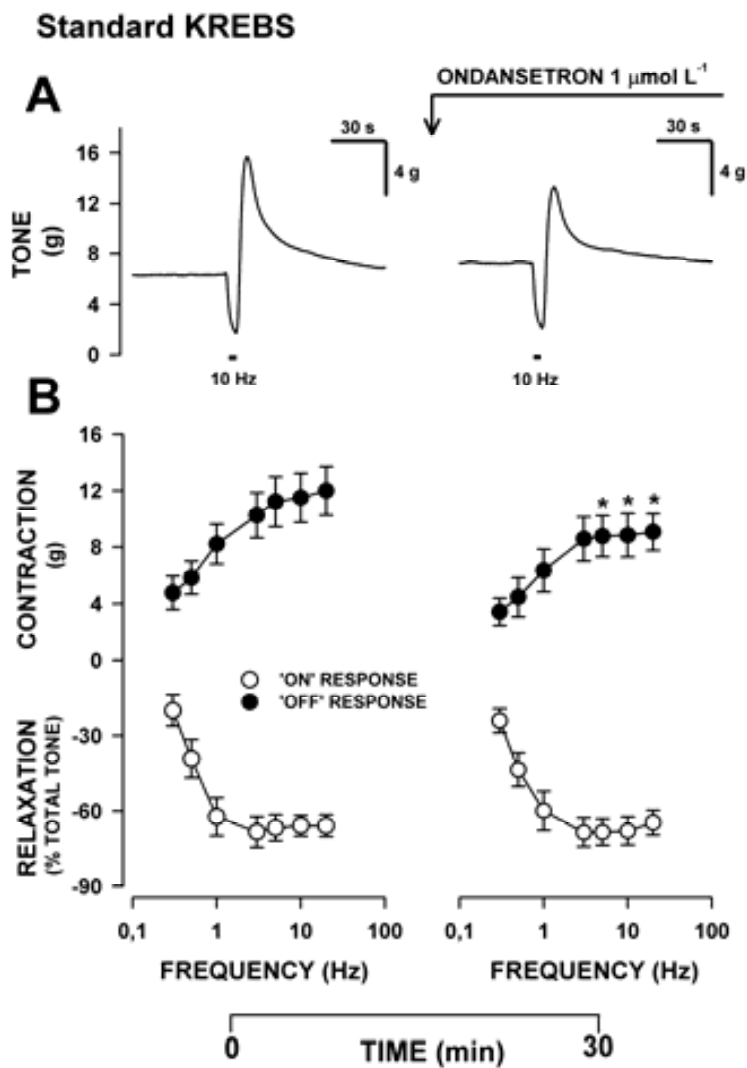


**Figure 1.1 Effect of the neurotoxin tetrodotoxin on electrically-induced responses.** Tetrodotoxin (TTX,  $n = 6$ ) on EFS-induced responses on the porcine clasp LOS strips. (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of blockade of action potentials transmission along the axon by TTX on EFS-induced responses in standard Krebs solution ( $n = 6$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).



**Figure 1.2** Effect of the neurotoxin  $\omega$ -conotoxin GVIA on electrically-induced responses. (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of the inhibition of neurotransmitters release from nerve varicosities by  $\omega$ -conotoxin (GVIA), antagonist of N-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, on EFS-induced responses in standard Krebs solution on the clasp LOS strips ( $n = 5$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

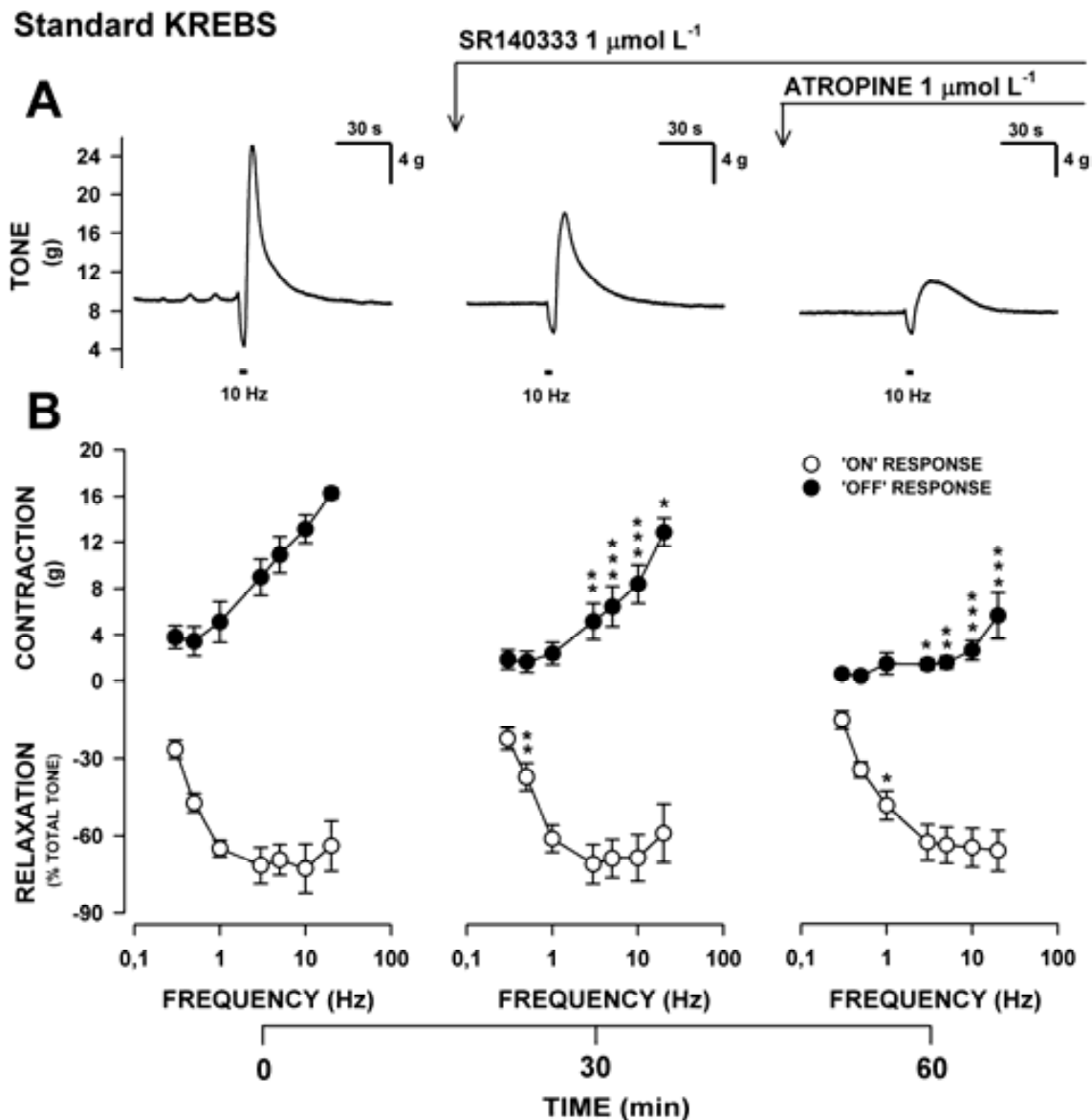
5-HT<sub>3</sub> receptor



**Figure 2. 5-HT<sub>3</sub> receptors.** (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects on frequency-related (0.3-20 Hz) clasp LOS responses. Blockade of serotonergic 5-HT<sub>3</sub> receptors by ondansetron did not affect the *on*-relaxation but moderately reduced *off*-contraction responses. ( $n = 6$ , \*  $P < 0.05$  vs previous response).

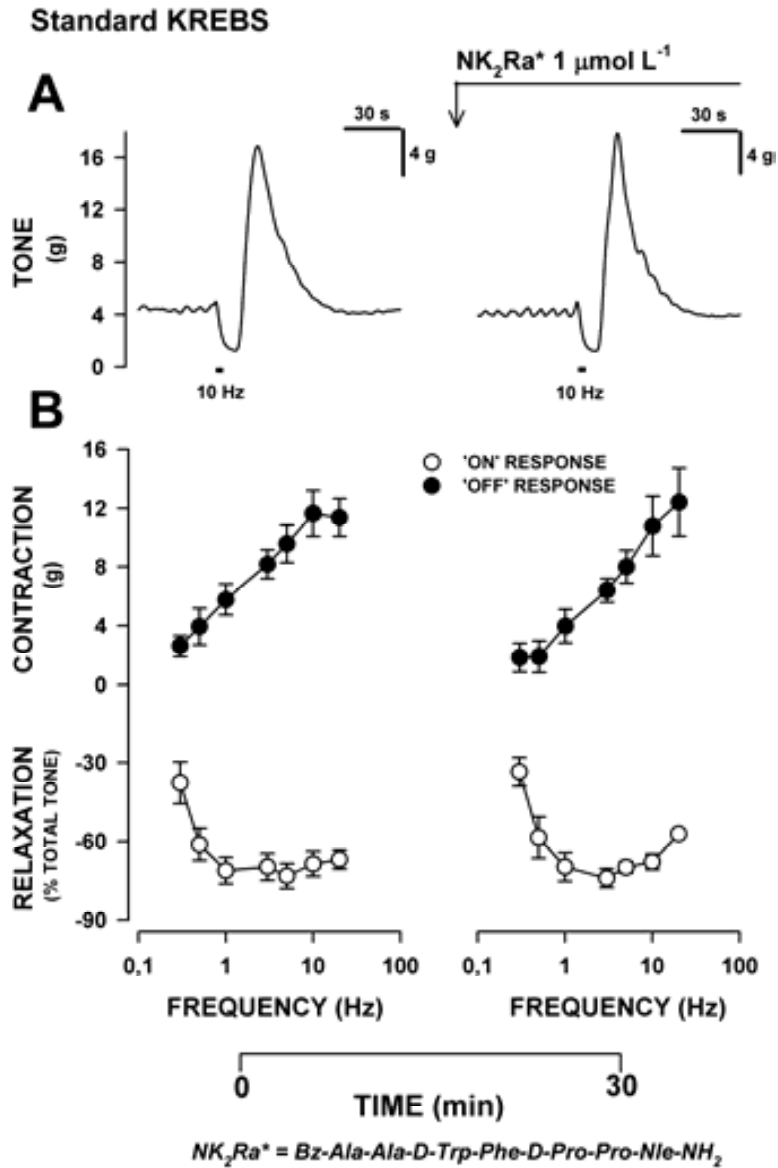
Tachykinergic component

NK<sub>1</sub> receptor



**Figure 3.1. Tachykinergic component (NK<sub>1</sub> receptor).** (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects on frequency-related (0.3-20 Hz) clasp LOS responses. Blockade of tachykinergic NK<sub>1</sub> receptors by SR140333 did not affect *on*-relaxation but significantly reduced the amplitude of *off*-contractions. Subsequent addition of atropine blocking muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) did not affect *on*-relaxation but significantly reduced *off*-contraction ( $n = 4$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

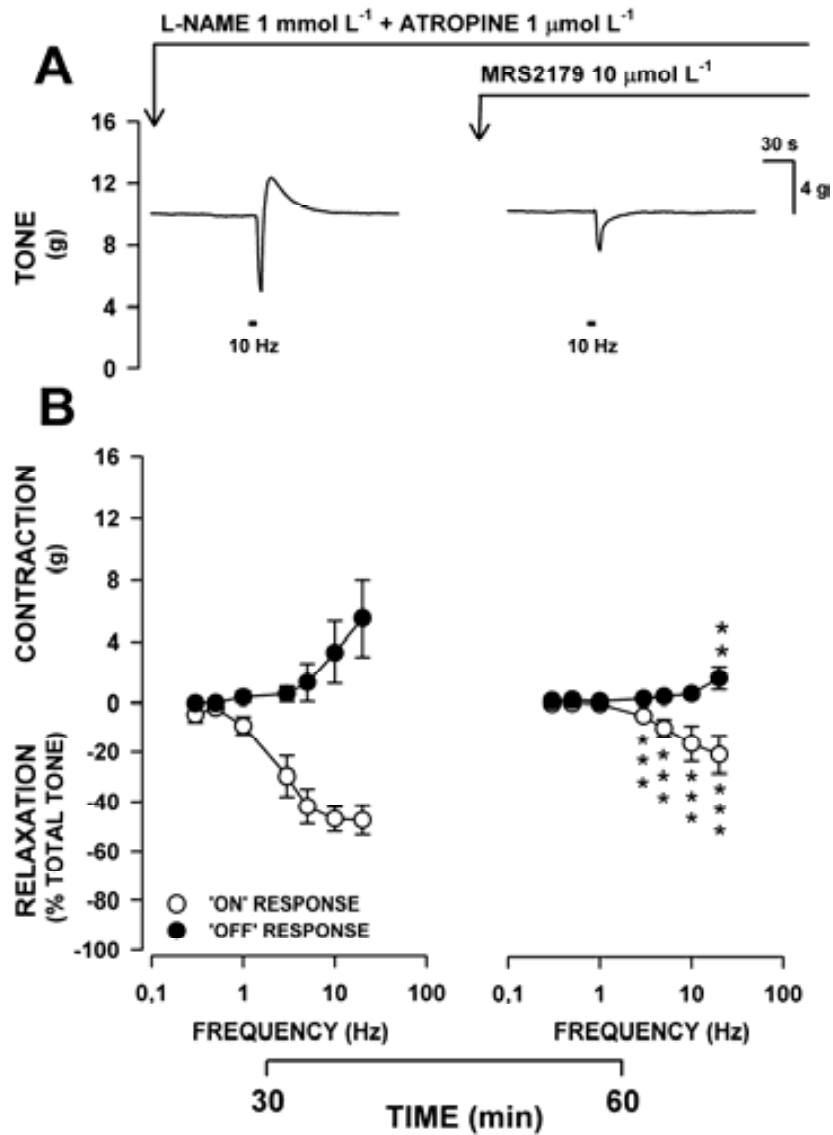
NK<sub>2</sub> receptor



**Figure 3.2. Tachykinergic component (NK<sub>2</sub> receptor).** (A) Representative tracings and (B) Quantitative effects on frequency-related (0.3-20 Hz) clasp LOS responses. Blockade of tachykinergic NK<sub>2</sub> receptors by Bz-Ala-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH<sub>2</sub>\* did not affect either the *on*-relaxation or the *off*-contraction responses. (*n* = 5, ns).

## Porcine lower oesophageal sphincter (LOS)

### Purinergic component (mechanical studies)

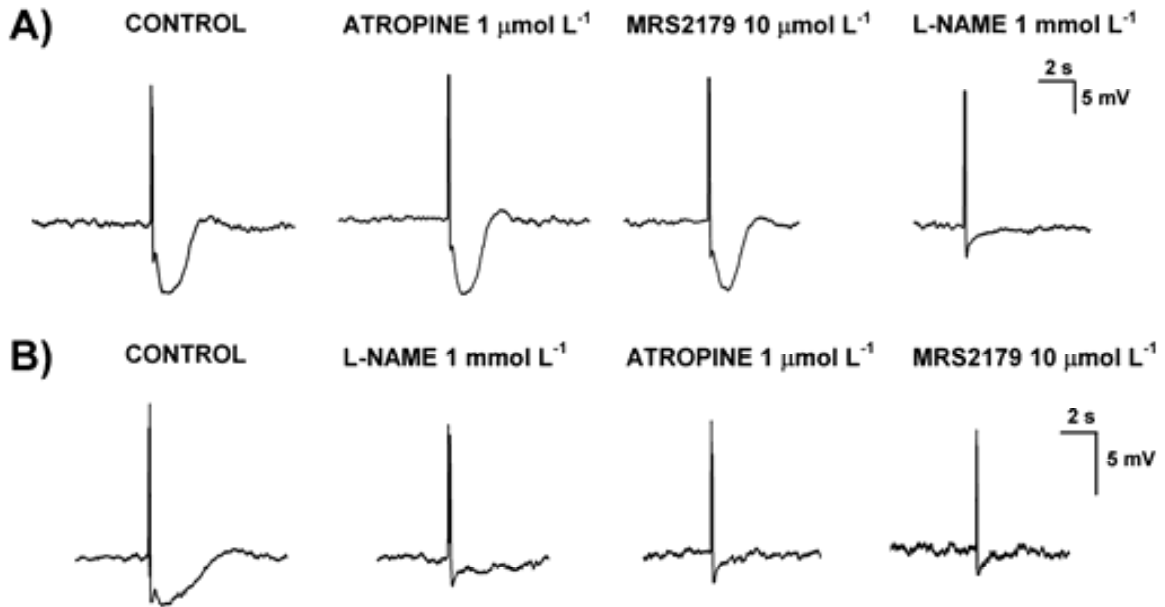


**Figure 4. Porcine clasp lower oesophageal sphincter.** The non-nitric relaxation was antagonized by the specific P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2179 in our previous study. (Adapted from Farré *et al.*, 2006. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-1248).



## Purinergetic component (electrophysiological studies)

## CLASP LOS

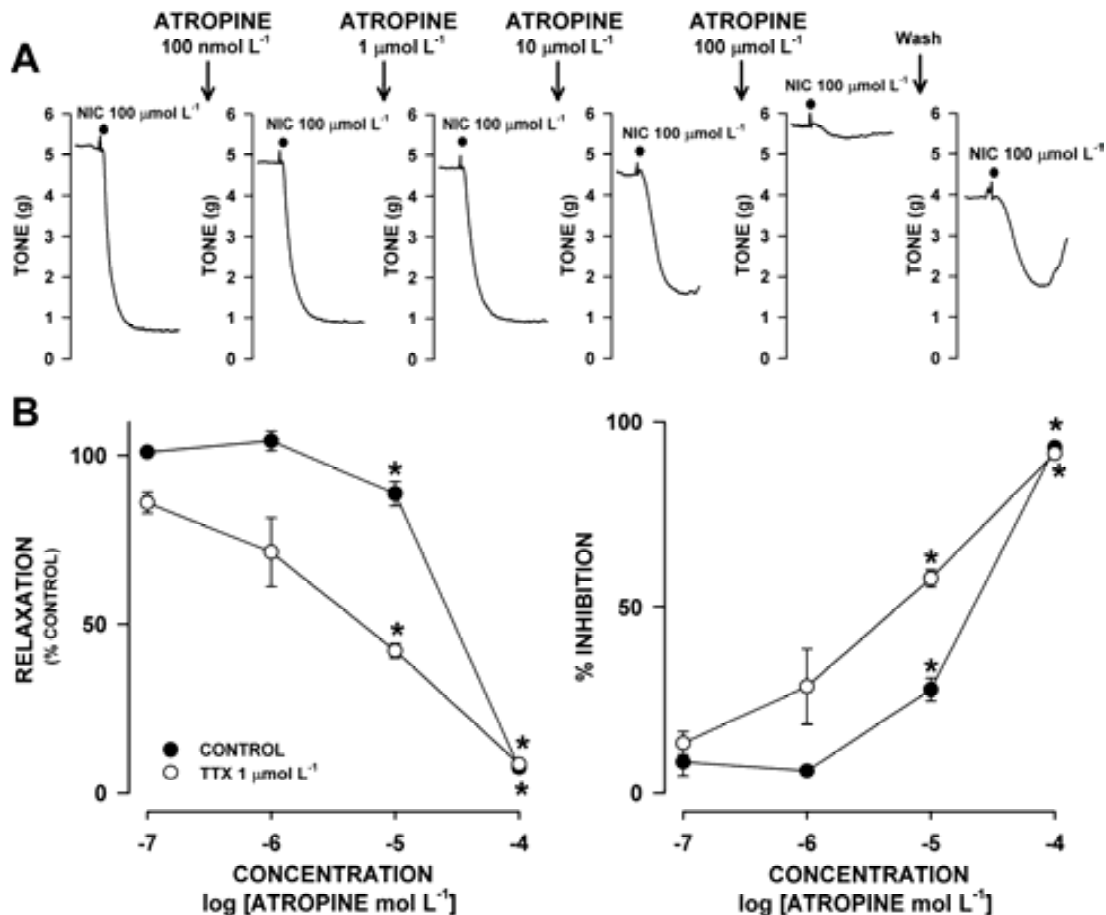


**Figure 5. Microelectrode tracings of porcine clasp lower oesophageal sphincter.** Tracings of intracellular microelectrode recordings in the porcine clasp LOS corresponding to two different experimental protocols. MRS2179 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  did not affect either the *amplitude* or the *duration* of the IJP while L-NAME 1  $\text{mmol L}^{-1}$  completely abolished it, independently of the order in which they were incubated.

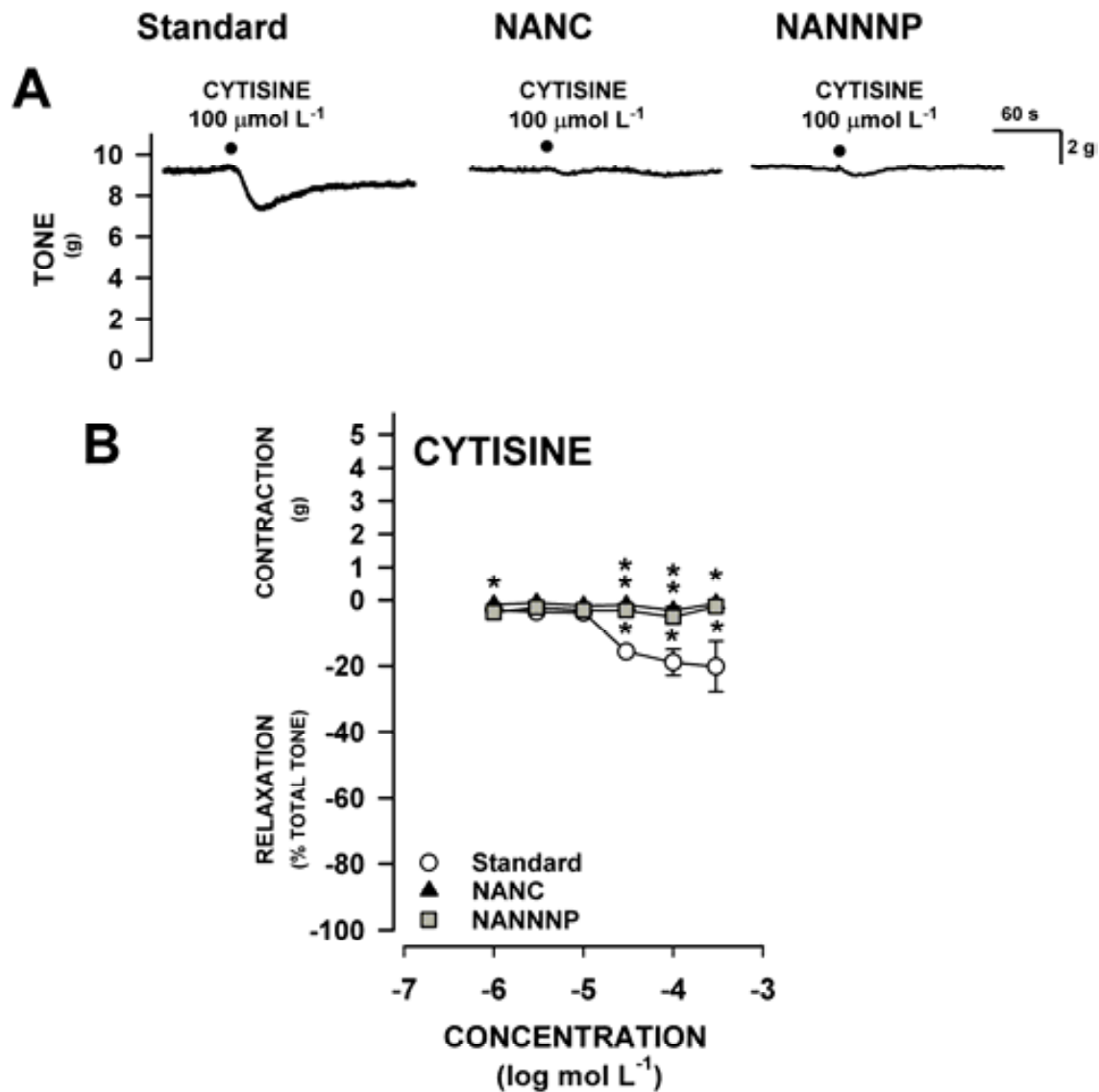
## Characterization of the responses induced by stimulation of ligand-gated ion channels

### (i) Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs)

Effect of atropine on nicotine-induced LOS relaxation response

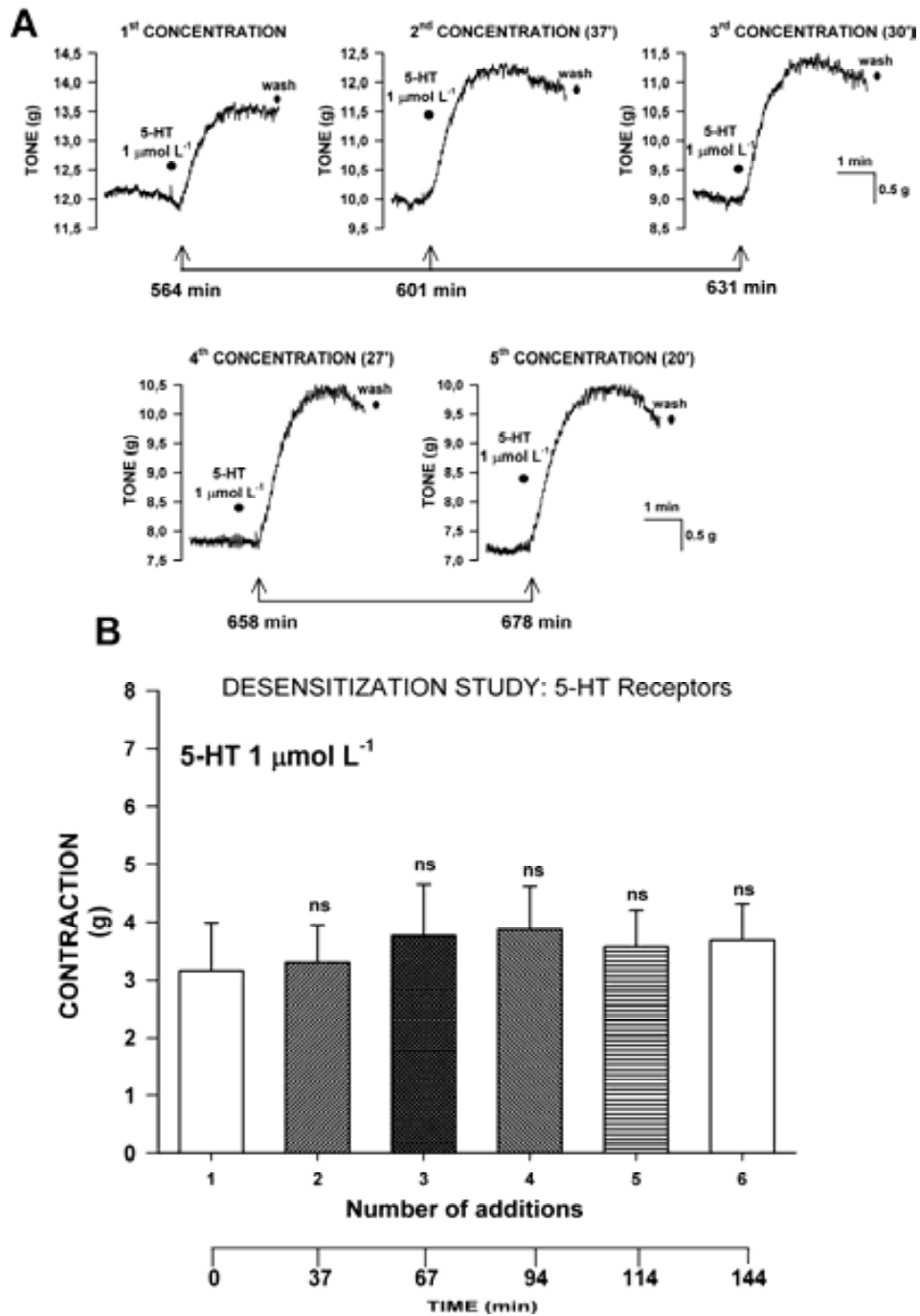


**Figure 6. Characterization of the effect of atropine on nicotine (NIC)-induced relaxation in porcine lower oesophageal sphincter.** (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of increased concentrations of atropine on nicotine-induced relaxation showing the inhibitory effect of the muscarinic receptor antagonist. Atropine inhibited NIC-induced LOS relaxation (control) in a concentration-dependent manner. 100 μmol L<sup>-1</sup> atropine abolished NIC-relaxation ( $n = 4$ ,  $* P < 0.05$  vs first NIC concentration on control conditions (black plot)). In the presence of TTX 1 μmol L<sup>-1</sup>, where terminals of inhibitory enteric MNs can be stimulated, atropine also blocked NIC-induced relaxation in a concentration-dependent manner suggesting a direct pharmacological antagonism ( $n = 4$ ,  $* P < 0.05$  vs first NIC concentration on TTX conditions (white plot)).



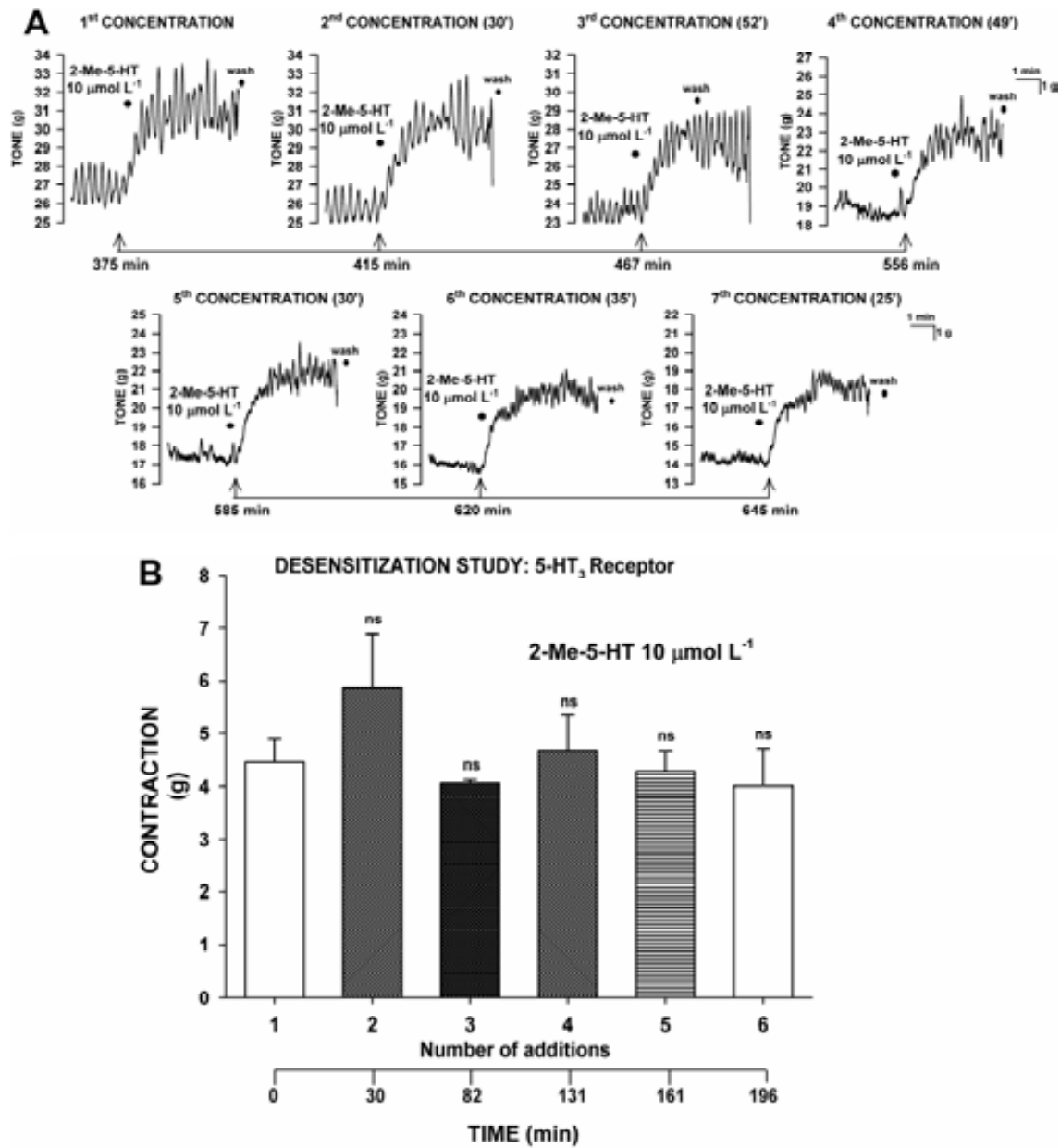
**Figure 7. Effect of the  $\beta_4$ -nAChR agonist, cytisine, on clasp lower oesophageal sphincter strips.** (A) Representative tracings of main responses, and (B) Log concentration-response curves ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  -  $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) induced by cytisine, the  $\beta_4$ -nAChR agonist, in standard Krebs solution ( $n = 6$ ), NANC conditions ( $n = 5$ ) and NANNNP conditions ( $n = 3$ ). Cytisine caused a concentration-dependent relaxation of LOS strips in standard Krebs solution ( $EC_{50} = 15.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) and amplitude of maximal LOS relaxation ( $-20.2 \pm 7.6$  % of Total Tone) was significantly lower than that induced by nicotine. In NANC conditions, cytisine did not cause any significant response. Moreover, cytisine did not cause any significant contraction in NANNNP conditions (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs standard Krebs).

(ii) 5-HT receptors



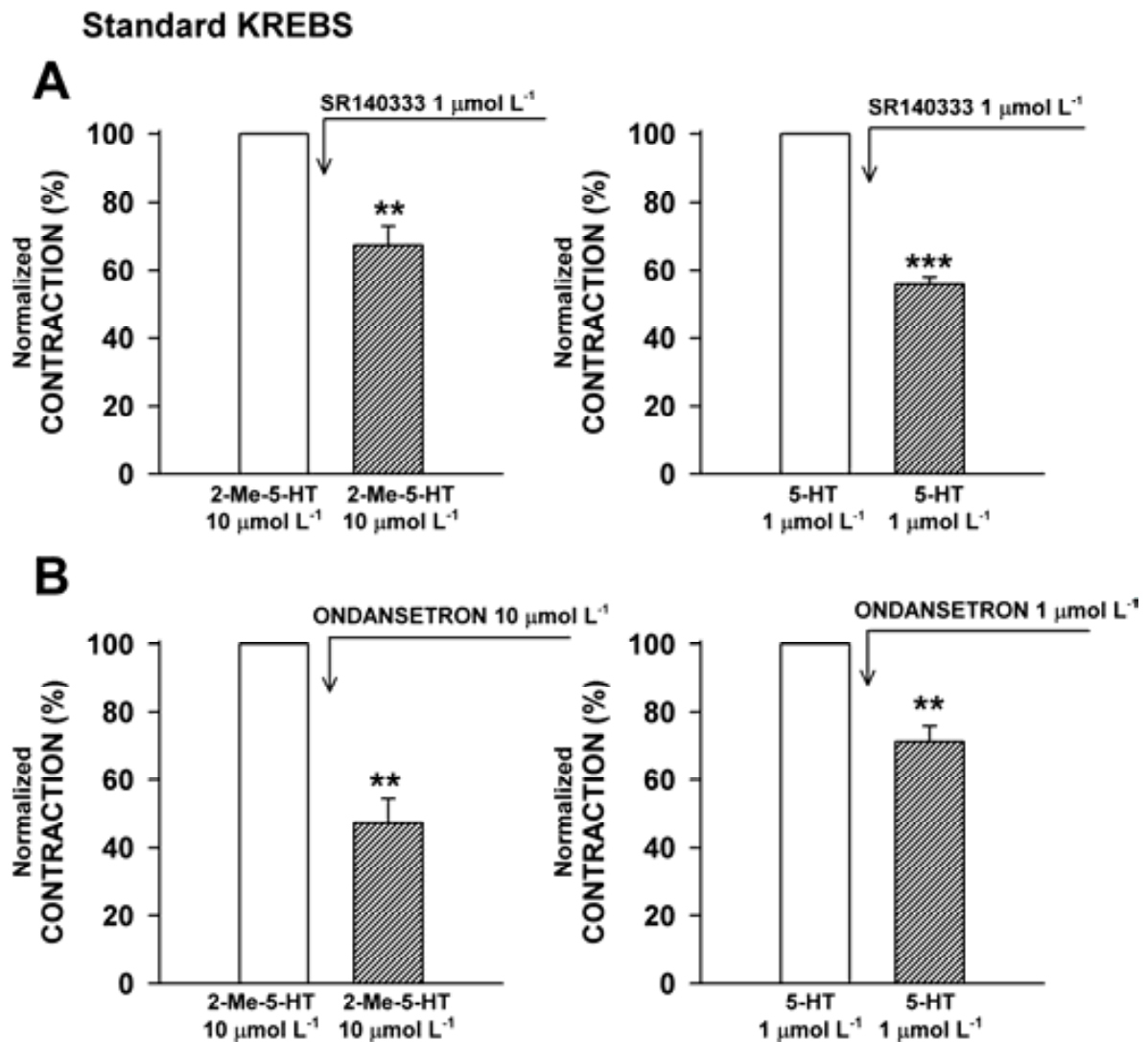
**Figure 8. Desensitization study on 5-HT receptor.** Repeated additions of the non-selective 5-HT receptor agonist, 5-HT ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), did not result in changes in the *amplitude* of the LOS contractions. (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of repeated  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  5-HT additions on LES strips ( $n = 4$ , ns).

## 5-HT<sub>3</sub> receptors



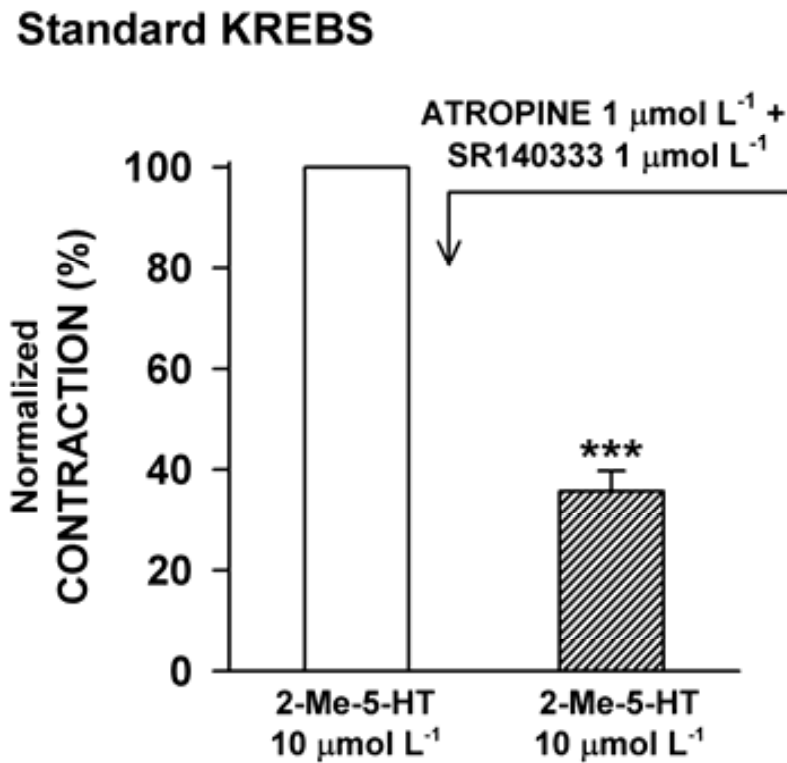
**Figure 9. Desensitization study on 5-HT<sub>3</sub> receptor.** Repeated additions of the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist, 2-Me-5-HT (10 μmol L<sup>-1</sup>), did not result in changes in the amplitude of the LOS contractions. (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of repeated 10 μmol L<sup>-1</sup> 2-Me-5-HT additions on LOS strips (*n* = 3, ns).

Characterization of 5-HT and 2-Me-5-HT normalized responses



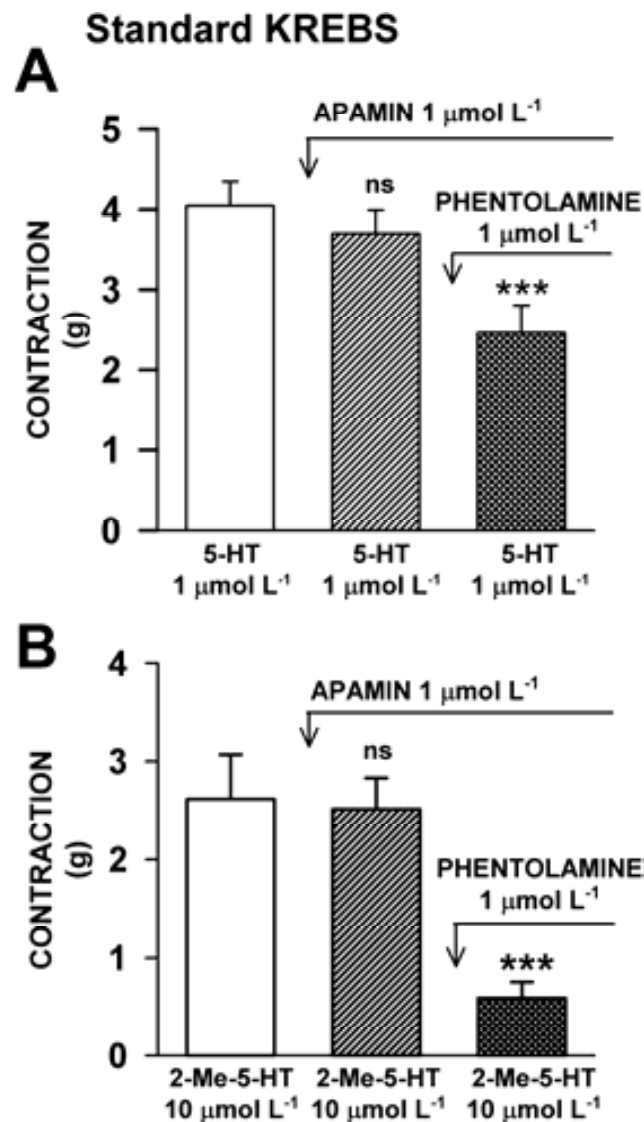
**Figure 10.1 Characterization of 2-Me-5-HT and 5-HT agonists-induced responses.** Quantitative effects of NK<sub>1</sub> receptor antagonist, SR140333 1 µmol L<sup>-1</sup>, and 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron 1-10 µmol on 2-Me-5-HT 10 µmol L<sup>-1</sup> and 5-HT 1 µmol L<sup>-1</sup> normalized contraction responses on LOS strips in standard Krebs solution. (A) Blockade of NK<sub>1</sub> receptor by SR140333 1 µmol L<sup>-1</sup> significantly reduced 2-Me-5-HT 10 µmol L<sup>-1</sup> (*n* = 6) and 5-HT 1 µmol L<sup>-1</sup> (*n* = 5)-induced responses; (B) Blockade of 5-HT<sub>3</sub> receptor by ondansetron 1-10 µmol L<sup>-1</sup> significantly antagonized 2-Me-5-HT 10 µmol L<sup>-1</sup> (*n* = 5) and 5-HT 1 µmol L<sup>-1</sup> (*n* = 8)-induced responses (\*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001 vs control response).

## Simultaneous effect of atropine and SR140333 on 2-Me-5-HT responses



**Figure 10.2 Characterization of 2-Me-5-HT agonist-induced response.** Quantitative effects of NK<sub>1</sub> receptor antagonist, SR140333 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and atropine 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  on 2-Me-5-HT 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  normalized contraction responses on LOS strips in standard Krebs solution. Simultaneous blockade of NK<sub>1</sub> receptor by SR140333 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and mAChR by atropine 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  significantly reduced 2-Me-5-HT 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ -induced responses and no relaxation was observed. ( $n = 7$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control response).

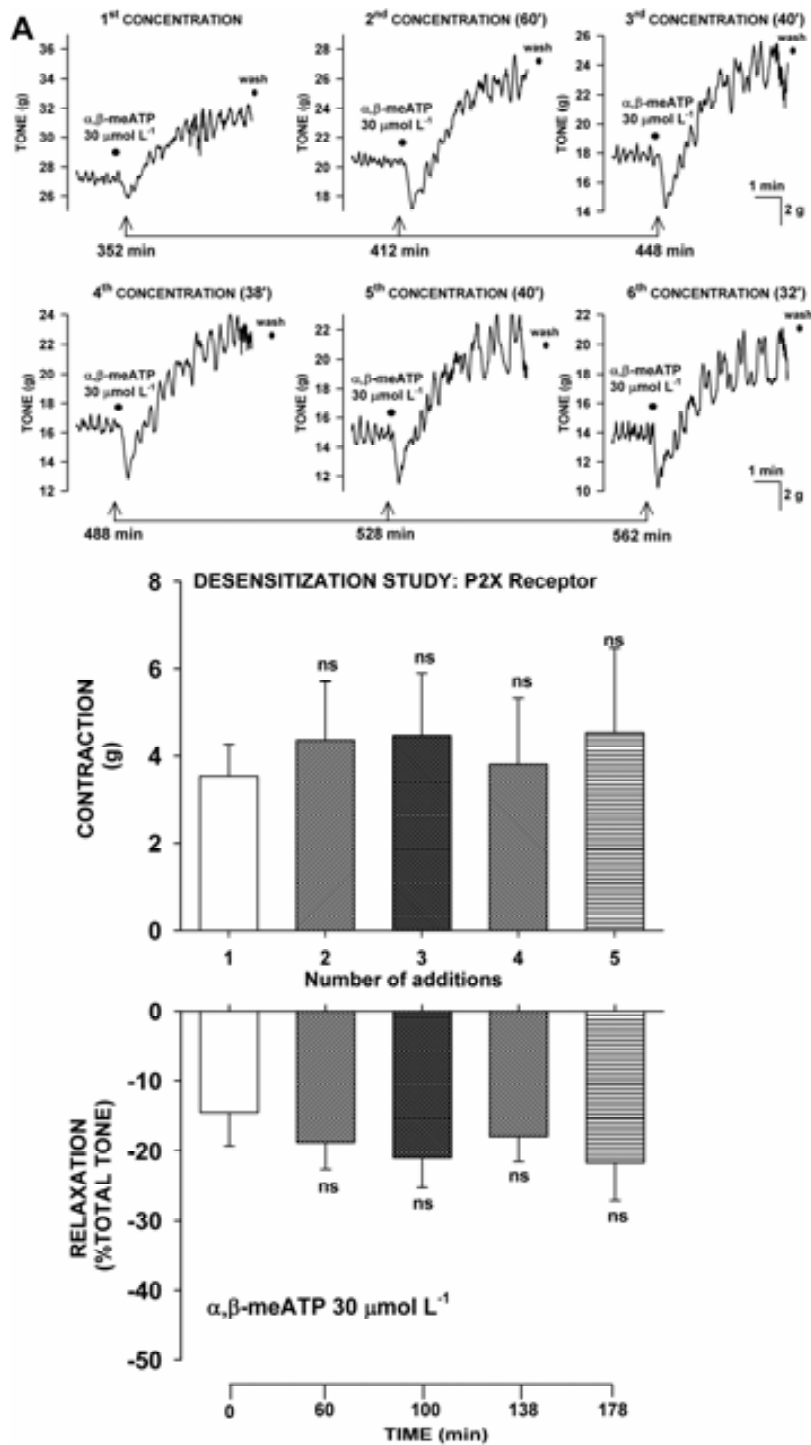
Effect of apamin and phentolamine on 5-HT and 2-Me-5-HT responses



**Figure 11. Effect of apamin and phentolamine on 5-HT (A) and 2-Me-5-HT (B)-induced responses.** Quantitative effects of non-purinergeric (apamin 1 μmol L<sup>-1</sup>) and non-adrenergic (phentolamine 1 μmol L<sup>-1</sup>) antagonists on (A) 5-HT 1 μmol L<sup>-1</sup> (*n* = 7), and (B) 2-Me-5-HT 10 μmol L<sup>-1</sup> (*n* = 4) contraction responses on LOS strips. Blockade of small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by apamin did not affect either 2-Me-5-HT or 5-HT contraction responses. Subsequent addition of phentolamine blocking α-adrenergic receptor strongly reduced 2-Me-5-HT-induced contractions and moderately inhibited 5-HT-induced contractions (\*\*\*) *P* < 0.001 vs previous response).

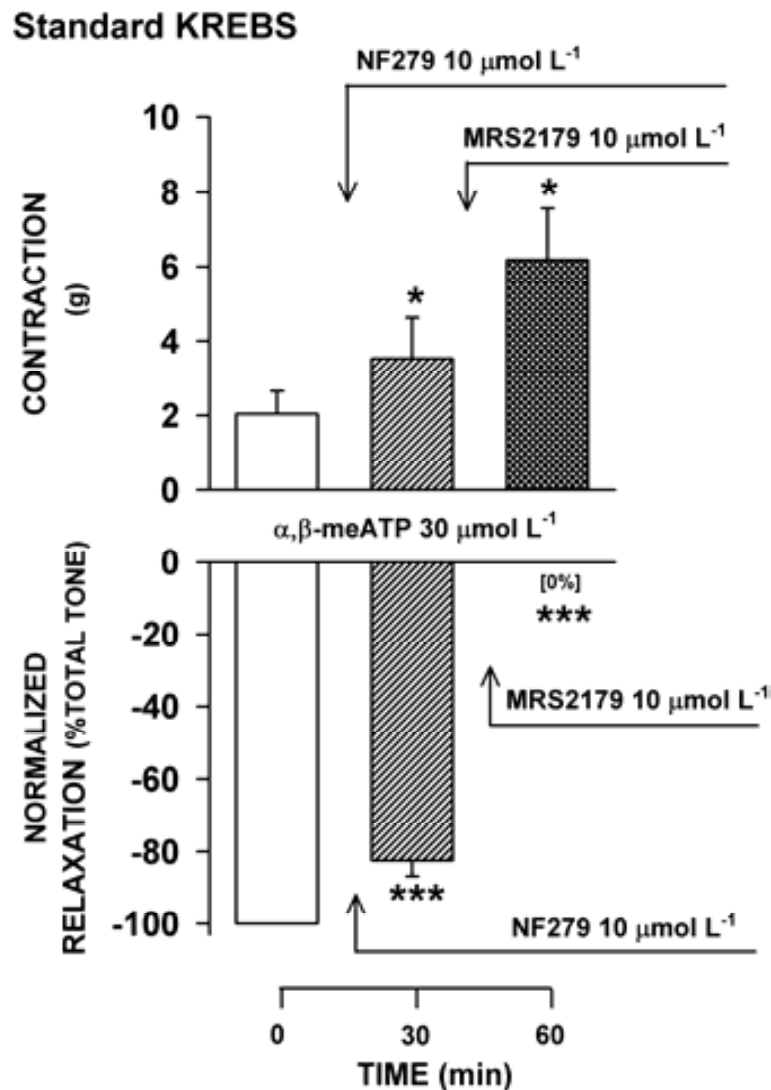


(iii) P2X receptors



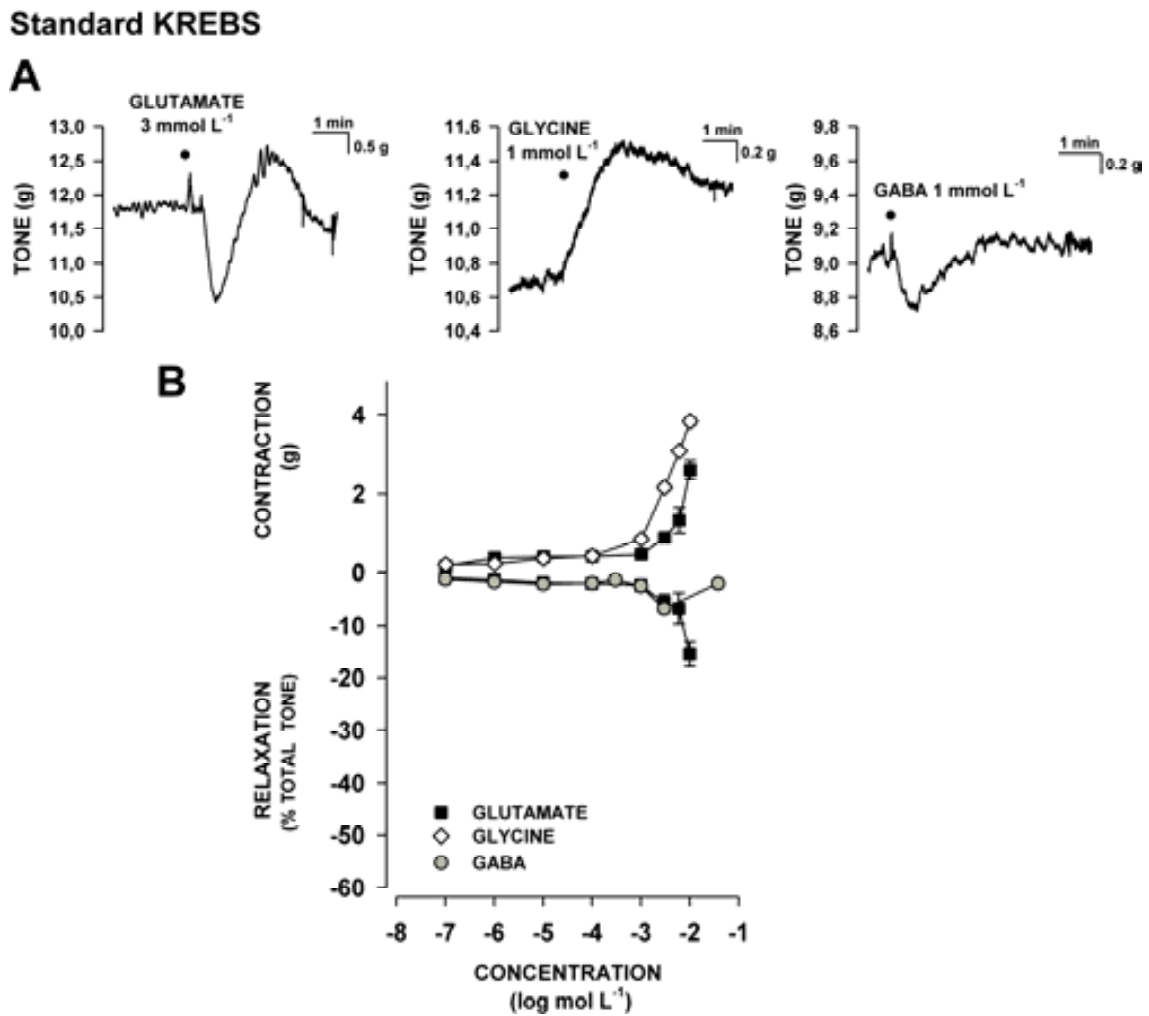
**Figure 12. Desensitization study on P2X receptor.** Repeated additions of the selective P2X receptor agonist,  $\alpha,\beta$ -meATP ( $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), did not result in changes in the amplitude of LOS relaxations. (A) Representative tracings, and (B) Quantitative effects of repeated  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\alpha,\beta$ -meATP additions ( $n = 5$ , ns) on LOS strips.

Characterization of  $\alpha,\beta$ -meATP responses



**Figure 13. Characterization of  $\alpha,\beta$ -meATP-induced responses.** Sequential quantitative effects of P2X receptor antagonist, NF279 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , and P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist, MRS2179 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  on  $\alpha,\beta$ -meATP 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  normalized responses on LOS strips in standard Krebs solution. Blockade of P2X receptor by NF279 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  significantly reduced the relaxation induced by 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\alpha,\beta$ -meATP ( $n = 5$ ). Sequential blockade of P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 fully abolished the  $\alpha,\beta$ -meATP-induced relaxation ( $n = 5$ ). The contraction response was enhanced by both NF279 and MRS2179 antagonists (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

(iii) Glycine, glutamate and GABA receptors



**Figure 14. Glutamate, glycine, and GABA receptors.** (A) Representative tracings, and (B) Log concentration-response curves ( $0.1 \mu\text{mol L}^{-1}$ -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) of glutamate ( $n = 6$ ), glycine ( $n = 7$ ) and GABA ( $n = 4$ ) receptor agonists on LOS strips in standard Krebs solution. Glutamate evoked a very weak relaxation, high concentrations of glycine induced a moderate concentration-dependent contraction and GABA did not induce any response on LOS strips.



## Capítulo 2

### Regional Functional Specialization and Inhibitory Nitroergic and Nonnitroergic Coneurotransmission in the Human Esophagus

Lecea B, Gallego D, Farré R, Opazo Á, Auli M, Jiménez M & Clavé P (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitroergic and nonnitroergic coneurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G782-94.

#### Abstract

The aim of this study was to explore the myenteric mechanisms of control of human esophageal motility and the effect of nitroergic and nonnitroergic neurotransmitters. Human circular esophageal strips were studied in organ baths and with microelectrodes. Responses following electrical field stimulation (EFS) of enteric motoneurons (EMNs) or through nicotinic acetylcholine receptors were compared in the esophageal body (EB) and in clasp and sling regions in the lower esophageal sphincter (LES). In clasp LES strips: 1) sodium nitroprusside (1 nM to 100  $\mu$ M), adenosine-5'-[ $\beta$ -thio]diphosphate trilithium salt (1-100  $\mu$ M), and vasoactive intestinal peptide (1 nM to 1  $\mu$ M) caused a relaxation; 2) 1 mM *N*<sup>o</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) shifted the EFS *on*-relaxation to an *off*-relaxation, partly antagonized by 10  $\mu$ M 2'-deoxy-*N*<sup>6</sup>-methyladenosine 3',5'-biphosphate tetrasodium salt (MRS2179) or 10 U/mL  $\alpha$ -chymotrypsin; and 3) nicotine-relaxation (100  $\mu$ M) was mainly antagonized by L-NNA, and only partly by MRS2179 or  $\alpha$ -chymotrypsin. In sling LES fibers, EFS and nicotine relaxation was abolished by L-NNA. In the EB, L-NNA blocked the *latency* period, and MRS2179 reduced *off*-contraction. The *amplitude* of cholinergic contraction decreased from the EB to both LES sides. EFS induced a monophasic inhibitory junction potential in clasp, sling and EB fibers abolished by L-NNA. Our study shows a regional specialization to stimulation of EMNs in the human esophagus, with stronger inhibitory responses in clasp LES fibers and stronger cholinergic excitatory responses in the EB. Inhibitory responses are mainly triggered by nitroergic EMNs mediating the inhibitory junction potentials in the LES and EB, EFS-*on*-relaxation in clasp and sling LES sides, and *latency* in the EB. We also found a minor role for purines (through P2Y<sub>1</sub> receptors) and vasoactive intestinal peptide-mediating part of nonnitroergic clasp LES relaxation.

#### Introduction

The main physiological function of the lower esophageal sphincter (LES) is to generate a zone of high pressure that prevents the reflux of acid gastric content into the esophagus. LES relaxations occur briefly after swallowing, and transient LES relaxations cause physiological gastroesophageal reflux and allow belching. Enteric motoneurons (EMNs) are the final step in the inhibitory vagal pathway to the LES, mediating swallow-induced and transient LES relaxation (Chang *et al.*, 2003). Nitric oxide (NO) released from these inhibitory EMNs is the major contributor to LES relaxation in humans (González *et al.*, 2004) and opossums (Murray *et al.*, 1991; Tøttrup *et al.*, 1991). However, vasoactive intestinal peptide (VIP) and ATP are putative inhibitory neurotransmitters in animal studies (Imaeda & Cunnane, 2003; Ny *et al.*, 1994; Ny *et al.*, 1995a; Ny *et al.*, 1995b; Ny *et al.*, 1997; Uc *et al.*, 1997; Werkstrom *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998), and the relative contribution of each of these neurotransmitters remains unclear in humans. Our laboratory has recently found that the relaxation of porcine LES is caused by two main neural pathways of similar magnitude: 1) NO through guanylate cyclase signaling pathways; and 2) an apamin-sensitive pathway mediated by ATP or a related purine acting through P2Y<sub>1</sub> receptors (Farré *et al.*, 2006). In contrast, we found that, in humans, NO is the main neurotransmitter released after stimulation of inhibitory EMNs and causes 85% of LES relaxation, an apamin-sensitive neurotransmitter having only a minor role (González *et al.*, 2004). The role of purines and VIP in human LES relaxation has not been established.

In vivo manometric studies performed on humans and animals have shown significant radial asymmetry in the distribution of LES pressures, the highest pressures being recorded in the left lateral direction of the LES (Preiksaitis *et al.*, 1994a; Richardson & Welch, 1981; Schulze *et al.*, 1977; Vicente *et al.*, 2001). Moreover, both in humans (Richardson & Welch, 1981) and animals (Preiksaitis *et al.*, 1994a), atropine decreases LES pressure more on the left than the right side. The

macroscopic arrangement of LES inner muscle circular smooth fibers in humans and pigs is very similar, with semicircular transverse muscle clasps on the lesser curve side ("clasp fibers") and long oblique gastric "sling" fibers in the greater curvature on the left side of LES (Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Vicente *et al.*, 2001). Porcine LES shows a strong transversal functional asymmetry, as neural stimulation induces stronger nitrenergic responses and weaker cholinergic responses in clasp fibers and, in contrast, weaker nitrenergic responses and stronger cholinergic responses in the sling region (Farré *et al.*, 2007). A very recent study on mice also found regional differences in the inhibitory junction potential (IJP) between clasp and sling LES sides (Zhang *et al.*, 2008).

In the human and porcine esophageal body (EB), the circular fibers are arranged in rings, and both inhibitory and excitatory EMNs play an important role in the peripheral mechanism of EB peristalsis. Animal studies found cholinergic nerve stimulation enhanced the *amplitude* and *duration* of esophageal peristalsis, with the influence of cholinergic EMNs being most prominent proximally along the smooth muscle portion of the esophagus (Crist *et al.*, 1984). Human studies showed that activation of inhibitory EMNs preceded that of cholinergic EMNs during EB peristalsis (Sifrim *et al.*, 1992). However, the neuromyogenic mechanisms of the regional functional specialization in the LES and the EB have not been fully characterized in humans.

The aims of the present study are to explore, *in vitro*, the myenteric mechanisms of control of human LES and EB motility and the effect of nitrenergic and nonnitrenergic inhibitory neurotransmitters in the human esophagus (LES and EB).

## **METHODS**

### **Preparations**

We studied specimens of the gastric fundus, the gastroesophageal junction, and the EB from 9 organ donors, and more restricted specimens from the LES and EB from 15 patients with esophageal cancer. The overall sample included 24 esophageal specimens (4 women/20 men; mean age,  $53.7 \pm 3.5$  yr). The study protocol was approved by the Institutional Review Board of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain. The gastroesophageal junction was opened along the anterior side, the mucosa was carefully removed, and the clasp and sling fiber bundles of LES were readily identified as a thickened band of semicircular oriented smooth muscle adjacent to the greater and lesser curvature

of the stomach, respectively (Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Vicente *et al.*, 2001). Full thickness preparations, including the circular and longitudinal muscle layers, as well as the myenteric plexus, were obtained from each LES side (clasp/sling strips) by cutting 3-mm-wide strips parallel to circular muscle fibers (Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). Up to four consecutive strips were obtained from both the clasp and sling region of the LES of each specimen from organ donors and from the EB, 5 cm above the transitional line (Farré *et al.*, 2007; González *et al.*, 2004). The weight of the strips was similar in the three regions studied: 1) clasp,  $0.29 \pm 0.01$  g ( $n = 18$ ); 2) sling,  $0.31 \pm 0.02$  g ( $n = 13$ ); and 3) EB,  $0.31 \pm 0.02$  g ( $n = 28$ ).

### **Solutions and drugs**

The Krebs solution used in these experiments was the same as in our laboratory's previous studies (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). Sodium nitroprusside (SNP), nicotine, nifedipine, tetrodotoxin (TTX), the selective P2X subtype receptor agonist  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate ( $\alpha,\beta$ -meATP), the P2Y<sub>1</sub> receptor agonist adenosine-5'-[ $\beta$ -thio]diphosphate trilithium salt (ADP $\beta$ S), N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine (L-NNA),  $\alpha$ -chymotrypsin, and VIP were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). The competitive antagonist for P2Y<sub>1</sub> receptors 2'-deoxy-N<sup>6</sup>-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt (MRS2179) was purchased from Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK), and atropine from Merck (Darmstadt, Germany). All drugs were dissolved in distilled water, except nifedipine, which was dissolved in ethanol (0.0104% vol), and L-NNA, which was dissolved in Krebs solution by sonication.

### **Techniques**

**a) Organ bath studies.** Final strips measuring 10 mm in length were placed in 15-mL organ baths containing Krebs' solution constantly bubbled with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>. 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), computed using the data acquisition software Acqknowledge 3.7.2 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). After an equilibration period of 60 min, strips were stretched up to 150% of their initial length and positioned between two parallel platinum wire electrodes 10 mm apart (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004). Thereafter, strips taken from the LES progressively increased their tone during the following 1-2 h, and those from the EB did not. Total tone achieved by LES strips was defined as the tone developed by the strips after the

equilibration period. Electrical field stimulation (EFS) was applied by means of an electrical stimulator (Model S88, Grass Instruments Co., West Warwick, RI, USA) and a power booster (Stimu-Splitter II, Med-Lab Instruments, Loveland, CO, USA) (González *et al.*, 2004). These electrical stimuli were simultaneously recorded with tracings of mechanical responses through a synchronized transistor-transistor logic signal between the electrical stimulator Grass S88 and the computerized Biopac System to assess whether the mechanical responses occurred during (“on”-responses) or after (“off”-responses) the electrical stimulus. Only the strips that developed spontaneous tone during the equilibration period and relaxed during EFS were considered as pertaining to the LES.

### **b) *Electrophysiological studies.***

Transmural circular LES and EB muscle strips were placed in a Sylgard-coated chamber continuously perfused with Krebs solution at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Strips were pinned on a cross-sectioned slab, allowing microelectrode recordings of circular muscle (Gallego *et al.*, 2006). Smooth muscle cells from the circular layer were impaled with glass microelectrodes (40-60 M $\Omega$ ) filled with 3 M KCl. Membrane potential was measured using standard electrometer Duo773 (WPI Inc., Sarasota, FL, USA). Tracings were displayed on an oscilloscope 4026 (Racal-Dana Ltd., Windsor, Berkshire, England) and simultaneously digitalized (100 Hz) using PowerLab 4/30 system and Chart 5 software for Windows (all from ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). EFS 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 mechanical activity during electrophysiological experiments and obtain stable impalements.

## **Experimental design**

### **(a) *Organ bath studies:***

**a.1) CHARACTERIZATION OF MECHANICAL RESPONSES FOLLOWING STIMULATION OF EMNs IN THE LES AND EB.** The neural responses in clasp and sling regions of LES were compared with those from EB in experiments with stimulation of EMNs by EFS or through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). Transmural EFS (pulses of 0.4-ms duration, frequency 0.3-20 Hz) were applied to LES and EB preparations in 5-s trains at 26 V (Farré *et al.*, 2006). Experiments were conducted during electrical stimulation of both excitatory and inhibitory EMN by EFS, with sequential addition of antagonists to assess the nature and effects of the neurotransmitters released. First, the nitrenergic and

cholinergic components of EFS responses were sequentially blocked by 1 mM L-NNA and 1  $\mu\text{M}$  atropine. In the LES, the effect of 10  $\mu\text{M}$  MRS2179 and 10 U/mL  $\alpha$ -chymotrypsin on L-NNA-resistant EFS relaxation was assessed. In the EB, the effect of nitrenergic, cholinergic, VIP, and P2Y<sub>1</sub> antagonists was also assessed on EFS responses. The effect of single doses of 100  $\mu\text{M}$  nicotine on LES strips was also assessed (Farré *et al.*, 2006). After washing the strips with 45 mL of fresh buffer, there was a 30-min period before the following exposure. Repetitive additions of nicotine did not result in desensitization of nAChRs (Farré *et al.*, 2006). The neurotransmitters released by stimulation of EMN through nAChRs were characterized by sequential addition of L-NNA and atropine, and the effect of MRS2179 or  $\alpha$ -chymotrypsin on L-NNA-resistant nicotine relaxation was also assessed. Drugs were added to the baths 30 min before the stimulation of inhibitory EMN with nicotine.

### **a.2) EFFECT OF AGONISTS FOR PUTATIVE EXCITATORY AND INHIBITORY NEUROTRANSMITTERS IN THE LES.**

The dose-related effects on LES tone of the NO donor SNP (1 nM to 100  $\mu\text{M}$ ), the P2Y<sub>1</sub> agonist ADP $\beta\text{S}$  (1-100  $\mu\text{M}$ ), the P2X agonist  $\alpha,\beta$ -meATP (1-100  $\mu\text{M}$ ), and VIP (1 nM to 1  $\mu\text{M}$ ) were assessed in the presence of the neurotoxin TTX (1  $\mu\text{M}$ ). Concentration-related curves of the effects of agonists were obtained by exposing LES strips to single doses of agonists for up to 3 min (reported concentrations are final bath concentrations). After washing the strips with 45 mL of fresh buffer, there was a 30-min period before the next exposure.

**(b) *Electrophysiological studies:*** Two different protocols with different EFS parameters were performed during electrophysiological studies. The first protocol consisted of an electrical stimulus with the following characteristics: total duration, 100 ms; frequency, 20 Hz; pulse duration, 0.3 ms; and increasing amplitude voltage, 5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 and 50 V. The *amplitude* and the *duration* of EFS-induced IJP were measured under control conditions and after addition of each drug. Second, longer pulses of 5 s at supramaximal voltage of 50 V and pulse duration of 0.3 ms were performed at 1 Hz (5 pulses) and 5 Hz (25 pulses). These longer pulses elicited a longer monophasic hyperpolarization (Gallego *et al.*, 2008). The EFS-induced hyperpolarizations (IJPs) were evaluated before and after the sequential addition of atropine (1  $\mu\text{M}$ ), MRS2179 (10  $\mu\text{M}$ ),  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) and L-NNA (1 mM). The effect of these drugs on the resting membrane potential (RMP) was also measured.

### Data Analysis

Studies were designed to 1) study and compare pairs of clasp and sling strips from the same specimen; 2) compare LES and EB responses; and 3) explore the nitrenergic and nonnitrenergic inhibitory coneurotransmission in human LES and EB. The effect of EFS or pharmacological agents was determined in terms of changes in total tone. Relaxation was expressed in grams and/or in the percent change in total LES tone. Contraction was expressed in grams. The frequency of spontaneous IJP (sIJP) was measured by the standard deviation (SD-sIJP; expressed in mV) (Gil *et al.*, 2010). The number of experiments was represented by *n*. Data are expressed as means  $\pm$  SE. Student's *t*-test was selected for comparisons, using the paired mode when appropriate. To further characterize EFS responses, the effect of pharmacological agents on frequency-response curves was performed using two-way repeated measures ANOVA. When the *t*-test was significant, the Bonferroni test was carried out to determine the frequencies of statistically different responses. A *P* value  $< 0.05$  was considered statistically significant. The differences between the *amplitude* and *duration* of the IJPs before and after drug infusion were compared by two-way analysis of variance (drug and voltage), followed by Bonferroni post hoc test, using GraphPad prism 4 (version 4.01, La Jolla, CA, USA). A *P* value  $< 0.05$  was considered statistically significant.



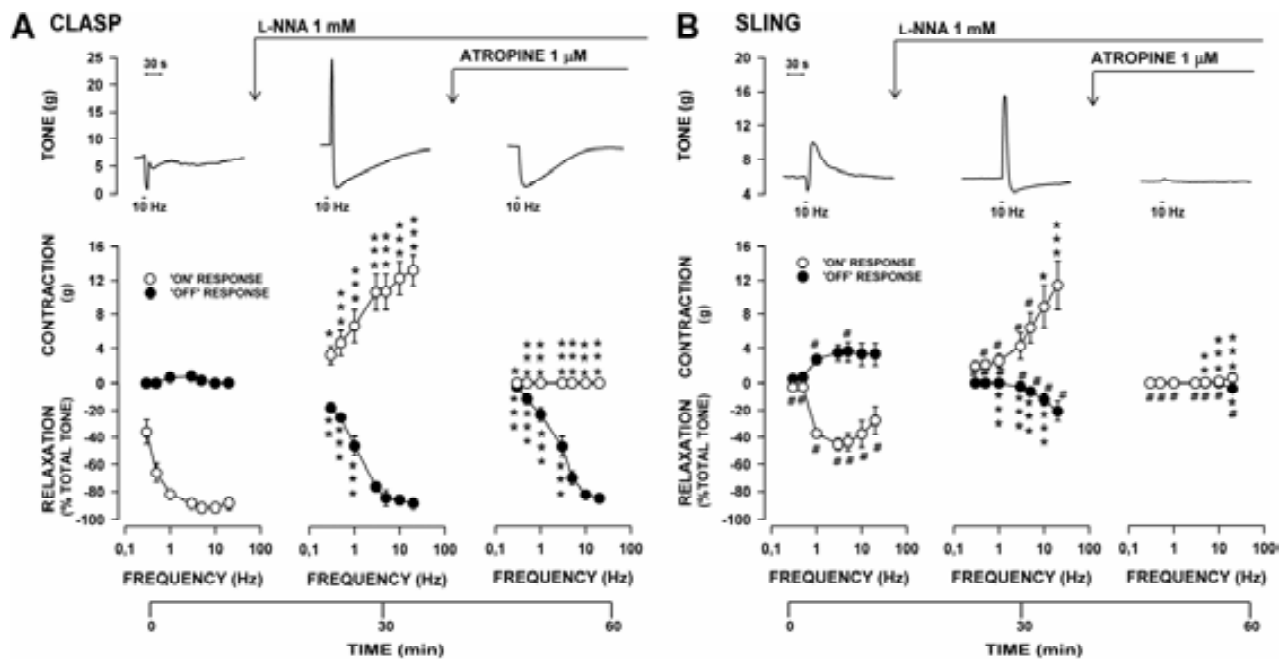
## Results

### Organ Bath Studies in the LES

(a) **Basal tone:** Total tone after the equilibration period in clasp strips ( $10.05 \pm 0.7$  g,  $n = 20$ ) was higher than tone in sling fibers ( $4.48 \pm 0.52$  g,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). L-NNA (1 mM) increased total tone by  $35.5 \pm 6.1\%$  in the clasp and only by  $18.1 \pm 1.9\%$  in the sling region ( $P < 0.05$ ). Atropine (1  $\mu$ M) did not significantly reduce LES tone in either clasp or sling fibers (not shown).

(b) **EFS-responses:** LES strips from both clasp and sling regions responded to EFS with a sharp relaxation during electrical stimulus (“on”-relaxation), followed by a phasic contraction at the end of the stimulus (“off”-contraction) (Fig. 1). The

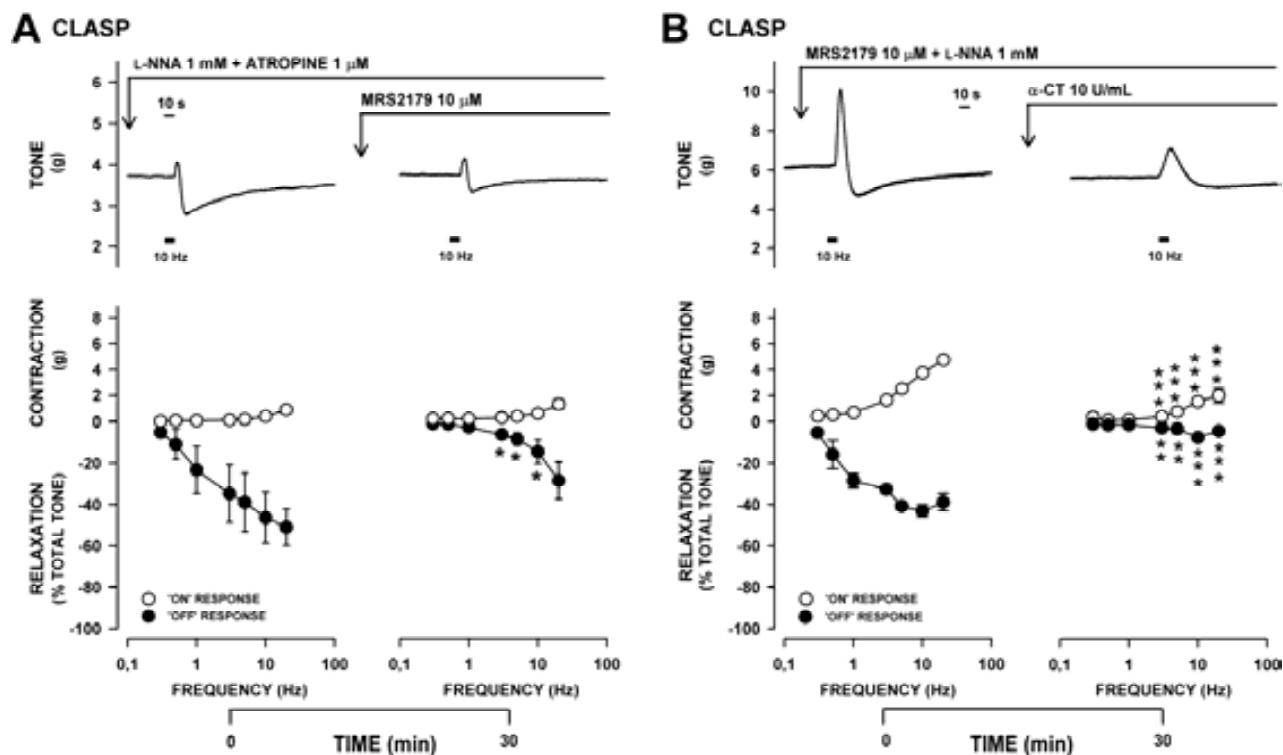
amplitude of both responses was frequency dependent (Fig. 1). Amplitude of “on”-relaxation was greater in clasp strips than in sling fibers ( $-91.55 \pm 3.4\%$  of total tone in clasp vs  $-43.32 \pm 6.3\%$ ; in sling at 5 Hz,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). In contrast, the amplitude of “off”-contraction was greater in sling strips than in clasp fibers ( $3.63 \pm 1.1$  g sling vs  $0.35 \pm 0.3$  g in clasp,  $P < 0.05$  at 5 Hz,  $n = 4$ ). In clasp strips (Fig. 1), L-NNA (1 mM) fully abolished EFS “on”-relaxation at all frequencies tested ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ) and switched EFS responses to an “on”-contraction of enhanced amplitude and an “off”-relaxation of similar amplitude to “on”-relaxation in control experiments (Fig. 1). Subsequent addition of atropine fully abolished EFS “on”-contraction at all frequencies tested ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ), and a prominent “off”-relaxation remained (Fig. 1).



**Fig. 1. Quantitative aspects of responses induced by electrical stimulation of enteric motorneurons (EMNs) in clasp (A) and sling (B) regions of human lower esophageal sphincter (LES).** Amplitude of electrical field stimulation (EFS) “on”-relaxation was higher in clasp strips, and amplitude of EFS “off”-contraction was higher in sling strips. In both regions, N<sup>0</sup>-nitro-L-arginine (L-NNA) changed the response to a cholinergic “on”-contraction. Values are means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; #  $P < 0.05$  vs clasp.

This persistent “off”-relaxation following L-NNA and atropine was significantly antagonized, but not completely abolished, by the P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2179 at 3-10 Hz ( $-60.16 \pm 4.2\%$  at 5 Hz,  $n = 5$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 2A). In independent experiments (Fig. 2B), we also found the peptidase  $\alpha$ -chymotrypsin 10 U/mL, which cleaves VIP at the level of tyrosine residues, strongly antagonized EFS-relaxation at 3-20 Hz following L-NNA and MRS2179. In sling muscle, 1 mM L-NNA switched the “off”-response from a contraction to a relaxation

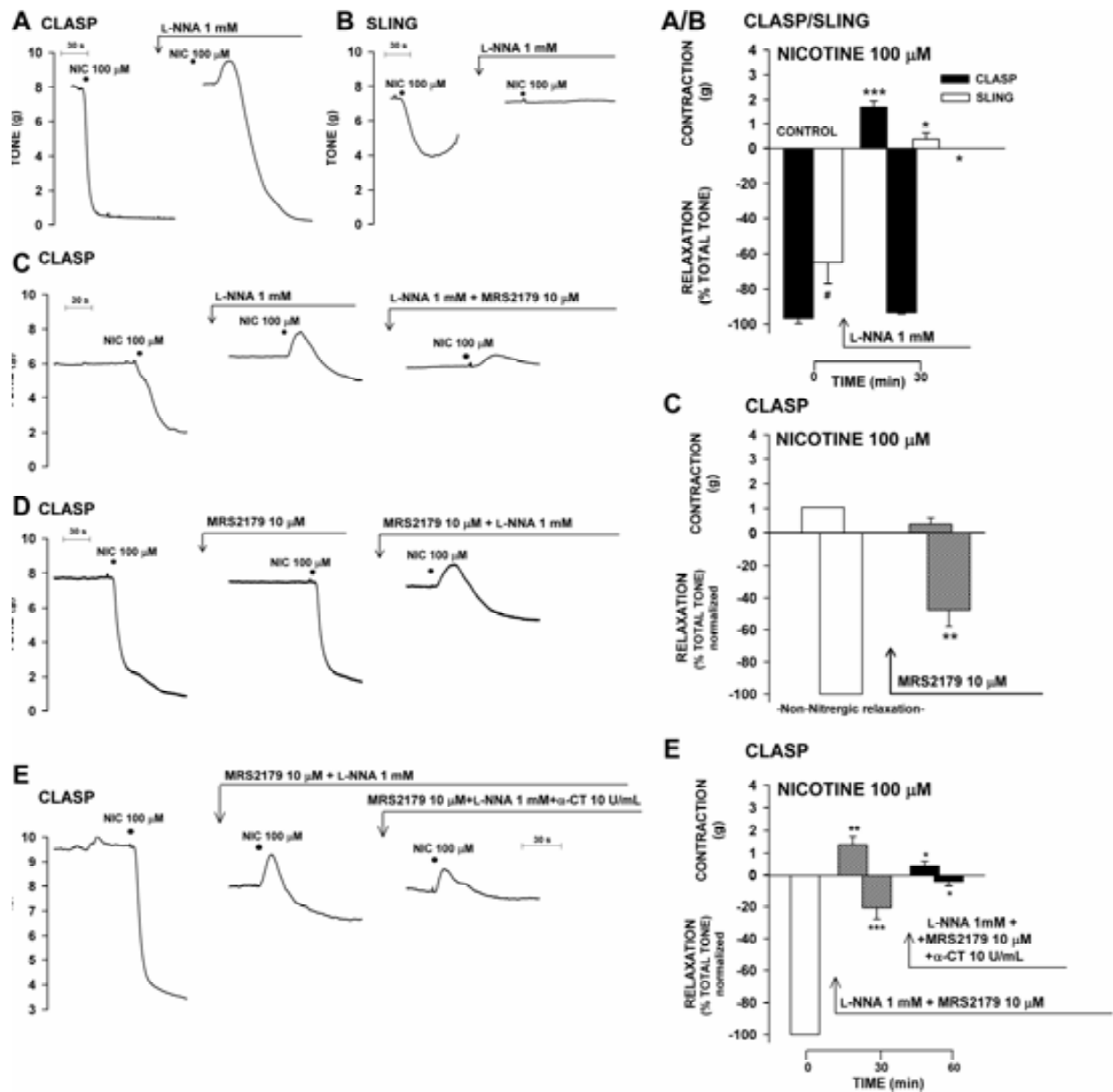
of lesser *amplitude* than the “on”-relaxation observed in the control experiments, and the “on”-relaxation to an “on”-contraction of greater *amplitude* than in control experiments. In contrast, *amplitude* of “off”-relaxation was strongly reduced by L-NNA compared with sling strips in control experiments ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 1). In sling strips, subsequent addition of atropine fully abolished EFS contraction and no relaxation remained (Fig. 1).



**Fig. 2.** Effect of MRS2179 (A) and  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CT; B) on nonnitroergic EFS-induced LES relaxation in clasp strips. A: Sequential addition of 10  $\mu$ M MRS2179 further decreased the nonnitroergic electrical relaxation at 3-10 Hz following blockade of nitric oxide synthesis by 1 mM L-NNA ( $n = 5$ , \*  $P < 0.05$ ). B:  $\alpha$ -CT strongly antagonized EFS relaxation at 3-20 Hz following L-NNA and MRS2179 ( $n = 3$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ). Values are means  $\pm$  SE.

(c) **Nicotine-responses:** Nicotine (100  $\mu$ M) induced a sharp relaxation in both clasp and sling muscles (Fig. 3, A and B). The amplitude of nicotine-induced relaxation was higher in clasp strips than sling fibers ( $-96.73 \pm 2.9\%$  vs  $-65.02 \pm 1.2\%$  of total tone,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). In clasp strips, following L-NNA, nicotine induced a biphasic response with a weak contraction followed by a strong relaxation (Fig. 3C). This nonnitroergic relaxation induced by stimulation of inhibitory EMNs through nAChRs in clasp fibers was significantly antagonized by MRS2179 ( $-58.48\% \pm$

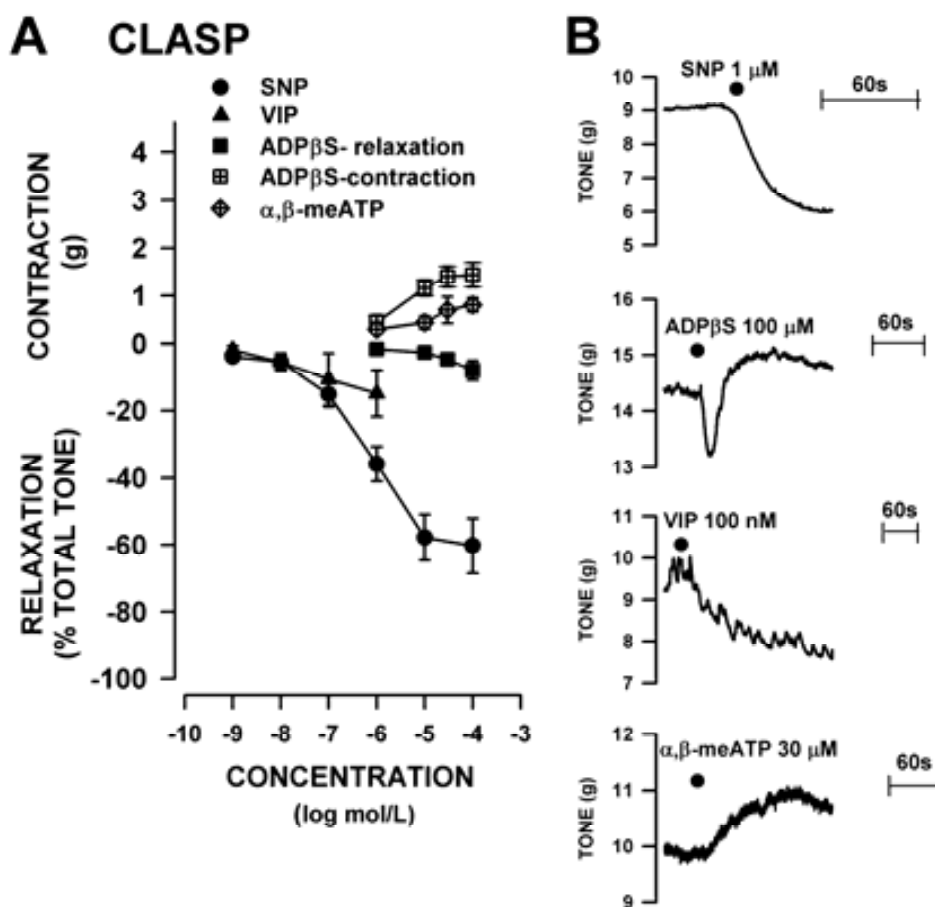
$12.2\%$ ,  $n = 5$ ,  $P < 0.01$ ). In an independent group of experiments also on clasp strips, MRS2179 failed to antagonize the nicotine relaxation. However, sequential addition of L-NNA after MRS2179 caused a strong inhibition of nicotine relaxation ( $n = 4$ ,  $-80.25 \pm 7.1\%$ ) exceeding that caused by L-NNA alone ( $P < 0.05$ , Fig. 3D). Also in clasp strips,  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) antagonized the nonnitroergic relaxation induced by nicotine by  $-52.1 \pm 1.9\%$ ,  $n = 3$ , and the relaxation induced by nicotine following L-NNA and MRS2179 by  $-72.9 \pm 13.5\%$ ,  $n = 3$  (Fig. 3E).



**Fig. 3. Responses to stimulation of EMNs through nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in human clasp and sling LES regions.** Nicotine (NIC) induced a strong relaxation in both clasp ( $n = 4$ ; A) and sling ( $n = 4$ ; B) LES sides. #  $P < 0.05$ , sling control vs clasp control. A: Following L-NNA, NIC still induced an intense relaxation in clasp region ( $n = 4$ ). Nonsignificant and \*\*\*  $P < 0.001$  vs control contraction. B: In contrast, L-NNA fully abolished NIC relaxation in sling strips ( $n = 4$ ). \*  $P < 0.05$  #  $P < 0.05$  vs clasp control relaxation or control contraction. C: In clasp strips, 10  $\mu$ M MRS2179 antagonized NIC relaxation following L-NNA. \*\*  $P < 0.01$  vs nonnitergic relaxation. D: The antagonism of NIC relaxation by MRS2179 and L-NNA exceeded that of L-NNA alone ( $n = 5$ ). E: 10 U/mL  $\alpha$ -CT antagonized the relaxation induced by NIC following L-NNA and MRS2179 ( $n = 3$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control relaxation, \*\*  $P < 0.01$  vs control contraction, \*  $P < 0.05$  vs L-NNA + MRS2179 relaxation or contraction. Values are means  $\pm$  SE.

**(d) Effect of putative inhibitory neurotransmitters in the LES:** We explored the direct effect of the proposed inhibitory neurotransmitters in clasp LES strips pretreated with the neurotoxin TTX, and we found that the NO donor, SNP (1 nM to 100  $\mu$ M,  $n = 4$ ), and VIP (1 nM to 1  $\mu$ M,  $n = 3$ ) induced a strong monophasic relaxation, the P2Y<sub>1</sub> receptor agonist, ADP $\beta$ S (1-100  $\mu$ M,  $n = 4$ ), induced a weak, fast and transient relaxation, followed by a contraction, and the purinergic P2X agonist,  $\alpha,\beta$ -meATP (1- 100  $\mu$ M,  $n$

= 3), induced a sustained contraction (Fig. 4). Strips from each region of the LES show similar concentration-dependent profiles induced by the agonist SNP, the main putative inhibitory neurotransmitter in human LES. The EC<sub>50</sub> and the maximal effect of the relaxation of total tone induced by SNP in clasp fibers ( $0.41 \mu\text{M}$ ,  $-85.4 \pm 4.3\%$ ,  $n = 3$ ) were of similar magnitude to those induced by SNP in sling fibers [ $0.59 \mu\text{M}$ ,  $-87.9 \pm 8.5\%$ ,  $n = 3$ ,  $P$ , not statistically significant (NS)].

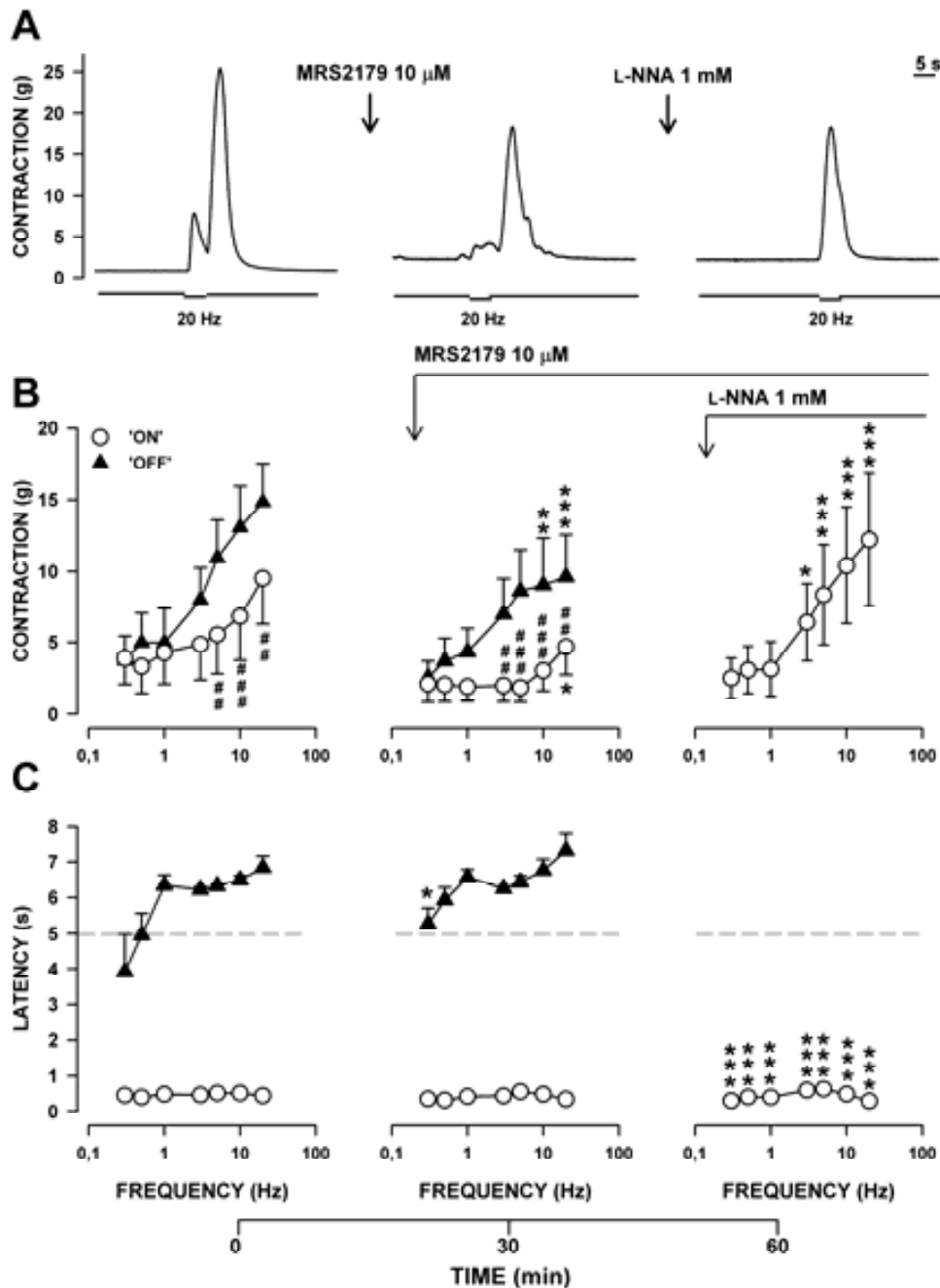


**Fig. 4. Effect of agonists of proposed inhibitory neurotransmitters on human clasp LES strips pretreated with the neurotoxin tetrodotoxin. A:** Concentration-related curves. Values are means  $\pm$  SE. **B:** Representative traces of responses. SNP, sodium nitroprusside; VIP, vasoactive intestinal peptide; ADP $\beta$ S, adenosine-5'-[ $\beta$ -thio]diphosphate trilithium salt;  $\alpha,\beta$ -meATP,  $\alpha,\beta$ -methyleneadenosine 5'-triphosphate.

## Organ Bath Studies in the EB

Strips from the EB did not develop active tone and presented much less total tone than LES strips at the end of the equilibration period ( $2.7 \pm 0.2$  g,  $n = 16$ ,  $P < 0.05$  vs clasp and sling fibers). EB strips responded to electrical stimulation of EMNs with a brief “on”-contraction at the beginning of the

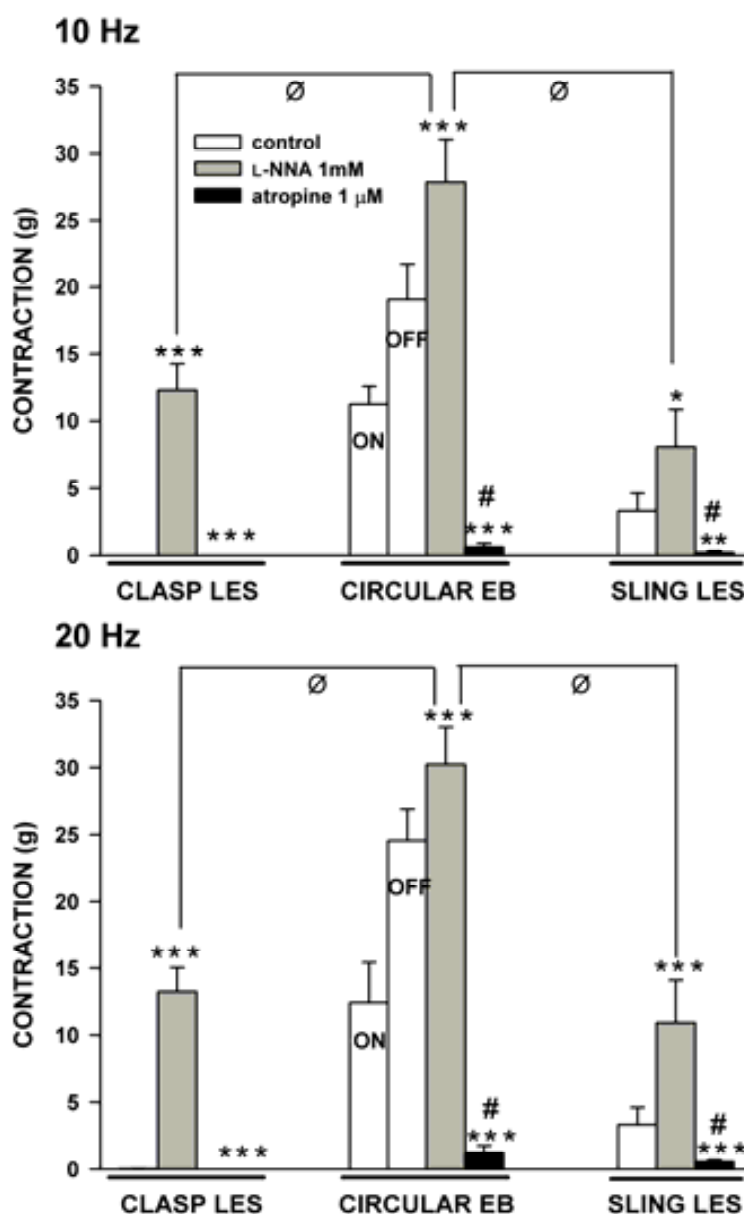
electrical stimulus and a more prominent “off”-contraction at the end of it (Fig. 5). The *amplitude* of both contractions was frequency dependent, and “off”-contractions were greater than “on”-contractions ( $n = 6$ ,  $P < 0.001$ , Fig. 5).



**Fig. 5. Representative tracings (A) and frequency-related responses on amplitude (B) and latency (C) of esophageal body (EB) contractions.** Strips from the EB responded to electrical stimulation of EMNs with an “on”-contraction at the beginning of the stimulus and an “off”-contraction following the end of the stimulus. Blockade of P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 decreased *amplitude* of both “on”- and “off”-contractions without affecting *latency*. In contrast, L-NNA fully abolished *latency* of “off”-contractions, inducing the appearance of “on”-contractions of enhanced *amplitude* ( $n = 6$ ). Values are means  $\pm$  SE., (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs each control; ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  “off”-contraction vs “on”-contraction).

The *latency* period of “off”-contractions was measured as the time from initiation of the electrical stimulus to the onset of the contraction, and this *latency* increased with the frequency of electrical stimulation (Fig. 5). Blockade of P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 (10 μM) decreased *amplitude* of both “on”- (20 Hz,  $-55.42 \pm 8.1\%$ ,  $P < 0.05$ ) and “off”-contractions (20 Hz,  $-39.37 \pm 10.1\%$ ,  $P < 0.001$ ), without affecting *latency* at all frequencies except 0.3 Hz,  $P < 0.05$  (Fig. 5). In addition, α-chymotrypsin similarly reduced the *amplitude* of the “on”- (20 Hz,  $-50.5 \pm 10.0\%$ ,  $P < 0.05$ ), and “off”-contractions (20 Hz,  $-35.7 \pm 6.4\%$ ,  $P < 0.001$ ) without affecting *latency* at all frequencies (not shown). In contrast, L-NNA (1 mM) completely abolished the *latency* of “off”-contractions, inducing the appearance of “on”-

contractions of enhanced *amplitude* during the electrical stimulus (Fig. 5). We compared the *amplitude* of the esophageal contractions induced by electrical stimulation at 10 and 20 Hz in the EB with those induced by the same electrical stimuli in clasp and sling fibers in the LES (Fig. 6). *Amplitude* of electrical induced “off”-contractions, as well as *amplitude* of electrical “on”-contractions following L-NNA (1 mM) was higher in the EB than in both clasp and sling sides of the LES (Fig. 6). As “on”-contraction following L-NNA is almost completely blocked by atropine in the EB and clasp and sling fibers in the LES, these results suggest that the effect of cholinergic neurons was stronger in the EB than in either LES side.

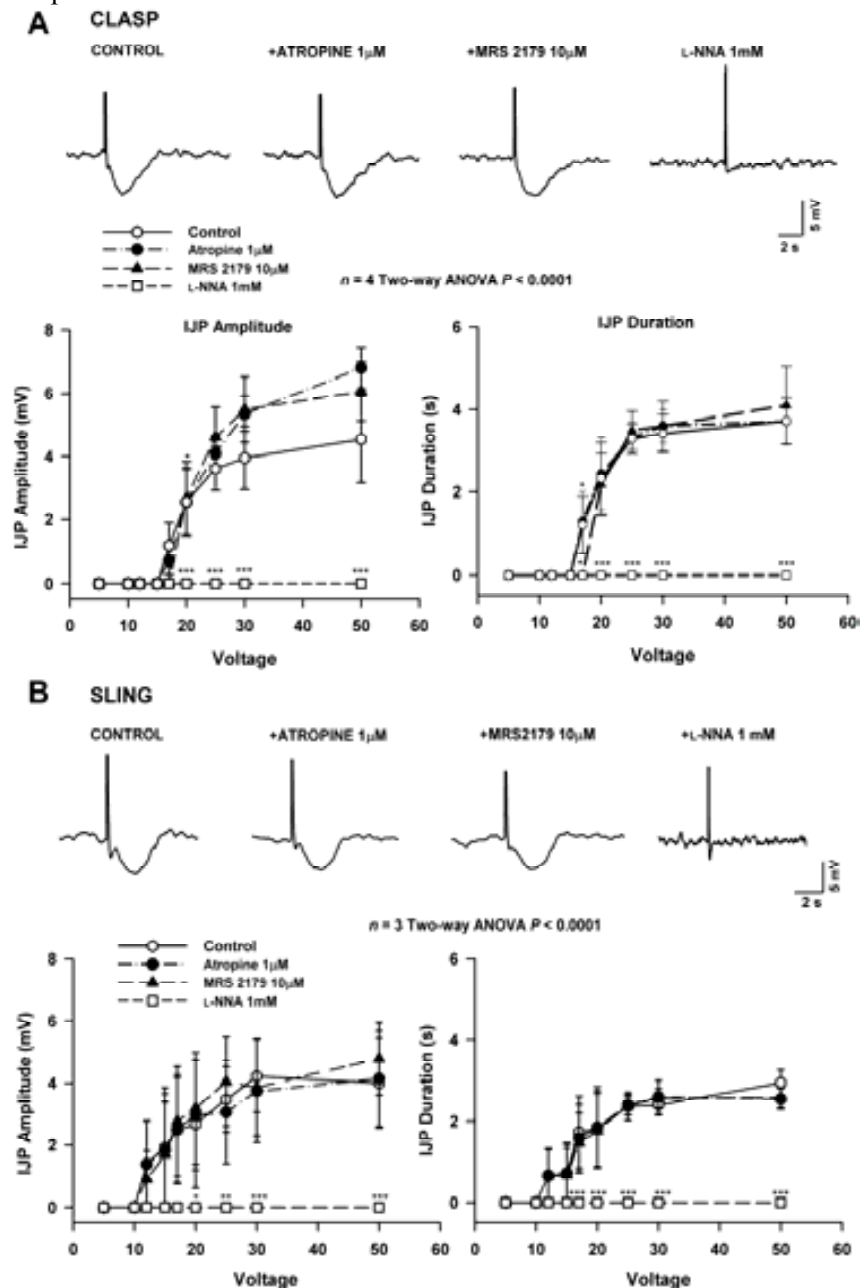


**Fig. 6. Vertical differences of cholinergic innervation between the EB and both LES sides.** The *amplitude* of the cholinergic “on”-contraction following L-NNA is higher in the EB than in either LES side. Values are means  $\pm$  SE.  $\phi$   $P < 0.05$ ; #  $P < 0.05$  vs “on”-control contraction; \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs each control.

## Electrophysiological Studies in the LES and EB

The nature of inhibitory neurotransmitters in clasp LES and EB fibers was also explored in electrophysiological studies. Resting membrane potential (RMP) in clasp ( $-43.9 \pm 0.4$  mV,  $n = 4$ ) and sling ( $-42.66 \pm 1.91$  mV,  $n = 3$ ) regions of the LES was similar, and both were significantly less negative than the RMP in the EB ( $-52.5 \pm 1.7$  mV,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$  vs clasp and sling). The RMP in the clasp LES and EB presented continuous small

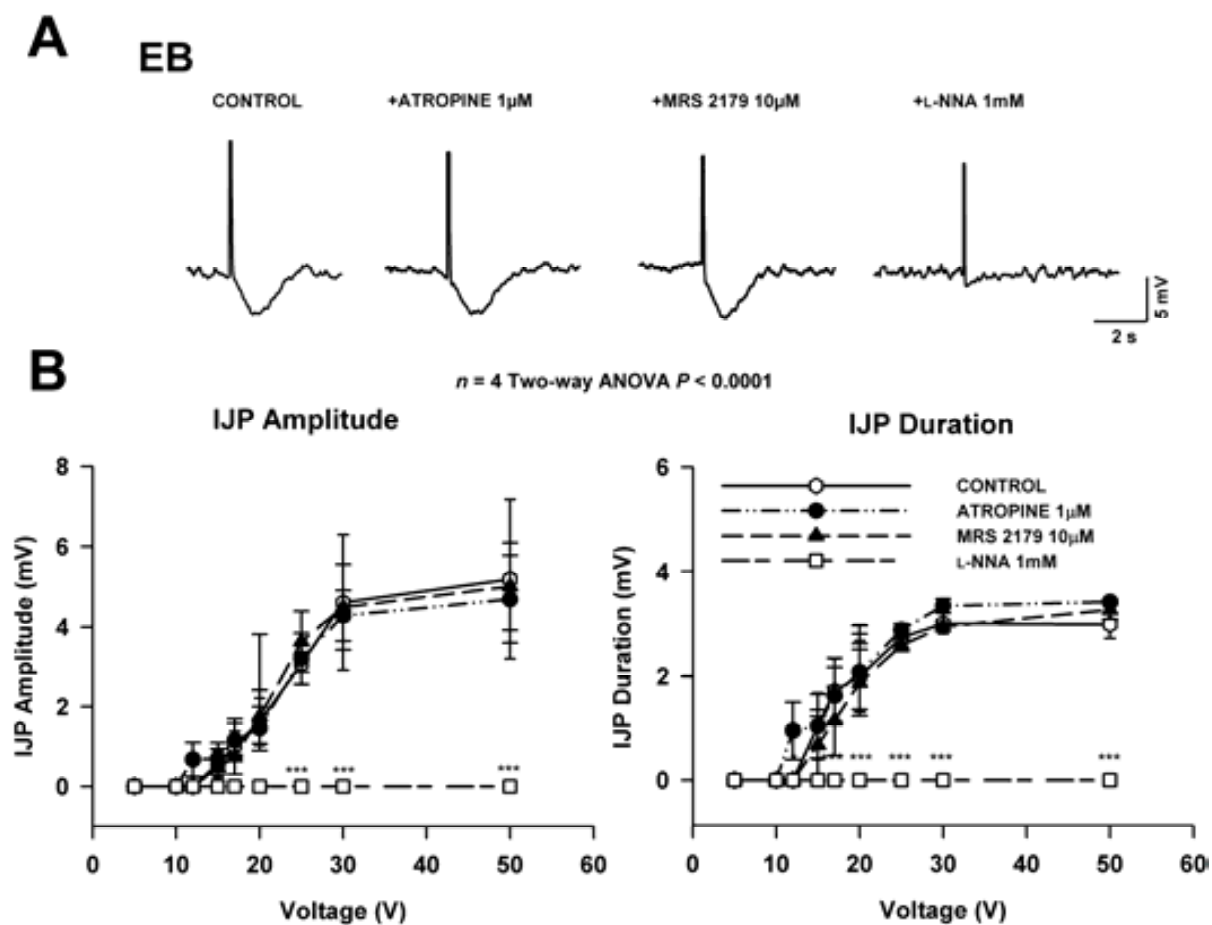
oscillations (unitary potentials, Figs. 7 and 8) and low SD-sIJP values of  $0.079 \pm 0.047$  mV ( $n = 4$ ) in the clasp,  $0.16 \pm 0.026$  mV ( $n = 3$ ) in the sling, and  $0.13 \pm 0.05$  mV ( $n = 5$ ) in the EB (NS), suggesting that there are very few spontaneous sIJPs in the human esophagus under these experimental conditions. Neither atropine, MRS2179 nor L-NNA affected RMP or SD-sIJPs in the clasp and sling LES and EB (not shown). Stimulation of inhibitory EMNs by single EFS pulses caused a monophasic IJP in the clasp and sling regions of the LES and EB (Figs. 7 and 8).



**Fig. 7. Intracellular microelectrode recordings.** EFS-induced inhibitory junction potential (IJP) elicited at 50 V and voltage-dependent curves showing the sequential effect of 1  $\mu$ M atropine, 10  $\mu$ M MRS2179, and 1 mM L-NNA on the amplitude and duration of the EFS-induced IJP in clasp (A) and sling (B) LES strips. Values are means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  \*\*\*  $P < 0.001$ .

The *amplitude* and the *duration* of the IJP was voltage dependent, reaching similar maximal transient hyperpolarizations [ $n = 4$  each, NS; 50 V, clasp strips, *amplitude*:  $-5.3 \pm 0.43$  mV and *duration*:  $3.16 \pm 0.08$  s; sling strips, *amplitude*:  $-3.99 \pm 1.44$  mV and *duration*:  $2.95 \pm 0.31$  s (Fig. 7), and EB, *amplitude*:  $-5.2 \pm 2.0$  mV and *duration*:  $3.0 \pm 0.26$  s, (Fig. 8)]. In both clasp and sling regions of the LES and in the EB, the *amplitude* and *duration*

of the IJP was unaffected by atropine or the P2Y<sub>1</sub> antagonist, MRS2179, and, in contrast, both *amplitude* and *duration* were fully abolished by 1 mM L-NNA, showing that NO mediates the transient hyperpolarization in the human LES and EB (Figs. 7 and 8). The *amplitude* and *duration* of the IJP was also unaffected by  $\alpha$ -chymotrypsin (not shown).

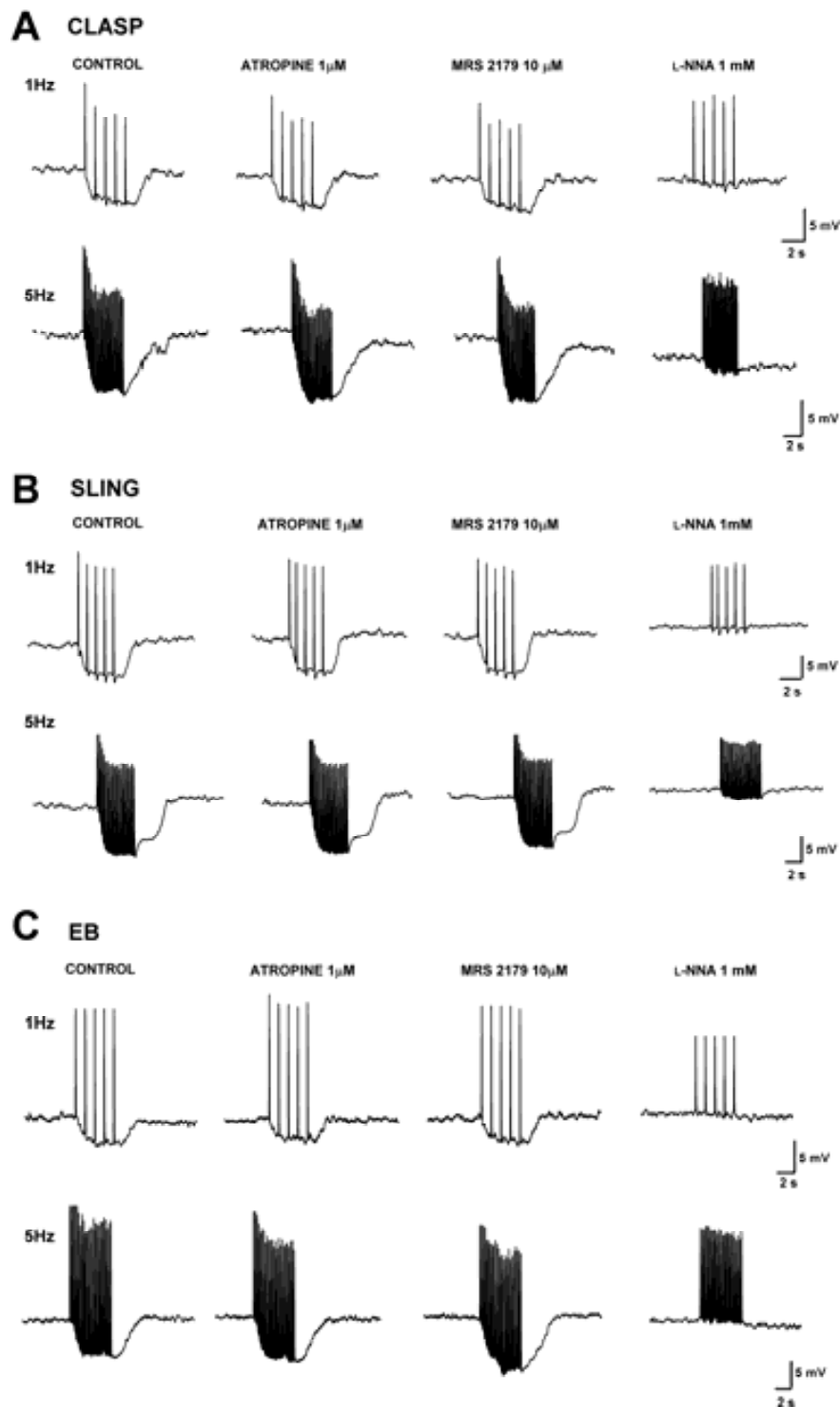


**Fig. 8. Intracellular microelectrode recordings** showing the sequential effect of 1  $\mu$ M atropine, 10  $\mu$ M MRS2179 and 1 mM L-NNA on the EFS-induced IJP elicited at the maximum voltage of stimulation (50 V) in the EB. *B*: Plot graphs showing the *amplitude* and *duration* of the IJP at 5-50 V of stimulation. Values are means  $\pm$  SE. \*  $P < 0.05$  \*\*\*  $P < 0.001$ .



In an independent set of experiments, electrical pulses of 1 and 5 Hz also originated a sustained monophasic IJP in the LES and EB. The electrophysiological response was unaffected by

MRS2179 and almost completely blocked by L-NNA in both clasp and sling LES regions and EB fibers (Fig. 9).



**Fig. 9. Intracellular microelectrode recordings** in clasp (A) and sling (B) LES strips and EB (C) showing the EFS-induced IJPs obtained during 5-s stimulation at 5 Hz (25 pulses) and 1 Hz (5 pulses). Atropine (1  $\mu$ M) and MRS2179 (10  $\mu$ M) did not affect either *amplitude* or *duration* of these IJP, whereas L-NNA (1 mM) fully abolished the IJP in clasp, sling and EB regions.

### Discussion

In this study, we found that human LES relaxation induced by stimulation of inhibitory motoneurons of the myenteric plexus is mainly mediated by neural NO with a minor contribution of a purine acting through P2Y<sub>1</sub> receptors and VIP. In contrast, the IJP in the LES and EB, and *latency* of EB contractions, are fully mediated by NO, and we could not find a purinergic or VIP-ergic component in the IJP. We also found the human esophagus presents a significant intrinsic regional specialization in response to neural stimulation of the myenteric plexus that consists of a transversal asymmetry in the LES with stronger inhibitory responses in the clasp fibers of the lesser curvature and a vertical asymmetry from the EB to the LES, with stronger effect of excitatory cholinergic responses in the EB.

We also found important functional differences between clasp and sling fibers of human LES. Total tone developed by clasp strips was higher than tone developed by sling fibers, in accordance with previous human studies (Preiksaitis *et al.*, 1994b). EFS caused strong stimulation of inhibitory EMNs in the clasp region, as relaxation was greater than in the sling region (Korn *et al.*, 2000). In contrast, EFS in the sling region induced a less efficient relaxing response and a more intense contraction. In the clasp region, nicotine caused strong stimulation of nitrergic EMNs and induced a relaxation similar to that obtained by maximal EFS. In the sling region, stimulation of inhibitory EMNs through nAChRs caused a higher relaxation than that obtained by maximal EFS; however, the *amplitude* of this relaxation was lower than that obtained in clasp strips. In contrast, the direct effect of inhibitory NTs is similar between both LES sides, suggesting this functional asymmetry can be attributed to specialization at the myenteric plexus level. These results in the human LES agree with our laboratory's previous studies on pigs (Farré *et al.*, 2007) and previous studies in cats (L'Heureux *et al.*, 2006), which found that stimulation of EMNs induces stronger inhibitory responses in clasp fibers and stronger excitatory responses in sling fibers. Supporting our results on both humans and pigs, studies on the guinea pig LES also show a marked functional neural asymmetry, as vagal stimulation causes activation of excitatory and inhibitory EMNs on the sling LES side (Yuan & Brookes, 1999) and only inhibitory responses in the clasp (Yuan *et al.*, 1998). In addition, all of these functional studies and our present results on humans agree with morphological studies mapping the regional distribution of EMNs in guinea pig LES that found that, in the clasp region, 33% of the neurons stain positively for cholineacetyl-transferase, whereas 70% stain positively for NO synthase (Brookes *et*

*al.*, 1996). In contrast, sling fibers are mainly innervated (> 80%) by cholinergic neurons, with only 15% staining positively for NO synthase (Brookes *et al.*, 1996; Yuan & Brookes, 1999). Taken together with our previous functional studies, all of these findings strongly suggest that, in the human LES, the inhibitory neurons predominate in the clasp, whereas the excitatory ones predominate in the sling fibers.

LES responses to EFS and nicotine in this study are similar to those our laboratory found in earlier studies on the human LES (González *et al.*, 2004). Then we found NO was the main mediator for LES relaxation in the human LES and that other minor apamin-sensitive inhibitory coneurotransmitters were released (González *et al.*, 2004). In the present study, both the EFS "on"-relaxation observed in organ bath studies and the IJP observed in electrophysiological studies were fully abolished by NO synthesis inhibitors, further confirming a major role for NO in LES hyperpolarization and subsequent relaxation of human LES following stimulation of inhibitory EMNs. We also conducted additional experiments showing that adding L-NNA first completely abolished the IJP, without unmasking a late-onset IJP. However, a relevant nonnitroergic "off"-relaxation was still observed in clasp strips following stimulation of inhibitory EMNs by EFS or through nAChRs during full blockade of NO synthesis by L-NNA (1 mM), clearly suggesting again the participation of other inhibitory neurotransmitters in human LES relaxation. In our studies on porcine LES, we found two components in the nonnitroergic and apamin-sensitive relaxation: 1) a main component inhibited by MRS2179 showing the effect of a purine acting on P2Y<sub>1</sub> receptors; and 2) a minor component slightly but consistently inhibited by the P2X receptor antagonist NF279. We have now found, in the human LES, that the P2Y<sub>1</sub> agonist ADPβS caused a relaxation of LES, whereas the P2X agonist caused a contraction. In addition, we found the nonnitroergic "off"-relaxation following stimulation of EMNs by EFS or through nAChRs was significantly inhibited by the P2Y<sub>1</sub> antagonist MRS2179. In our study, VIP also caused a strong relaxation of human LES, and the residual nonnitroergic and nonpurinergic relaxation following stimulation of inhibitory motoneurons by EFS or through nAChRs was antagonized by the peptidase α-chymotrypsin, also suggesting a minor role for VIP in human LES relaxation (Chang *et al.*, 2003).

In the present study, electrical stimulation of EMNs produced a low-amplitude monophasic IJP in both clasp and sling strips, fully abolished by L-NNA and similar to that observed in the EB. The IJP in human LES and EB has different properties than the

IJP we recorded in response to identical electrical stimulus from other areas of the human gastrointestinal tract. In the colon (Gallego *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2006) and small intestine (unpublished observations), the IJP has a fast component of ~20-40 mV, which is sensitive to P2Y<sub>1</sub> antagonist, followed by a slow component of ~10-20 mV, which is mainly nitrergic. The fast component presents a rundown, whereas the slow component can be sustained (Gallego *et al.*, 2008). In the clasp region of the mouse (Imaeda & Cunnane, 2003; Zhang *et al.*, 2008), IJP also has a fast component partly antagonized by apamin, followed by a slow sustained nitrergic component. In the present study, we could not record a biphasic IJP, and the response in strips obtained from both the EB and the clasp and sling regions in the LES showed only a slow component with a small *amplitude* (5-6 mV), which was L-NNA sensitive and could be sustained under repetitive stimulation. A similar IJP of small *amplitude* has also been described in the opossum, which presents anatomic similarities to the human LES (Zhang *et al.*, 2010). In our study, electrophysiological data match with mechanical data, because the “on”-relaxations observed in both clasp and sling fibers were inhibited by L-NNA, and *latency* observed after EFS in the EB was also blocked by L-NNA. Unfortunately, we could not find a purinergic or VIP-ergic component in the IJP responsible for nonnitrergic relaxation in clasp fibers. This can be attributed to the different electrical stimuli we used in organ bath or microelectrode experiments to stimulate EMNs or to a putative nonelectromechanical coupling in the L-NNA-resistant inhibitory pathway. It is important to notice that the RMP of clasp (-44 mV) and sling muscle (-42 mV) was more positive than that of the EB (-53 mV). This difference might be responsible for the myogenic tone present in sphincters, which is absent in the EB. Taken together, our results suggest that “on”-relaxation and the IJP in the human LES is caused by NO release from inhibitory EMNs, and there is a minor nonnitrergic “off”-relaxation mainly mediated by the release of both a purine, also from inhibitory EMNs acting at muscular P2Y<sub>1</sub> receptors, and VIP.

There is some controversy in the literature regarding the definition of the LES from both an anatomic and physiological perspective, and it seems that researchers in this field have developed two different viewpoints. One group of researchers considers the LES to be the clasp and sling muscle fiber complex (Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004; Korn *et al.*, 2000; L’Heureux *et al.*, 2006; Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Preiksaitis *et al.*, 1994b; Stein *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1995). Another group of researchers consider the LES to

be the circular smooth muscle near the distal end of the esophagus (LEC, lower esophageal circular) (Miller *et al.*, 2009; Vegesna *et al.*, 2010). There are those at one extreme of the controversy who do not believe that the clasp-sling muscle fiber complex pertains to the LES (Vegesna *et al.*, 2010), and at the other extreme who do not believe the lower esophageal circular (LEC) even exists. We believe part of the discrepancy is due to differences between humans and the animal species used in some of the previous studies, and another important part of this controversy is due to different methodological approaches (in vivo vs in vitro). Although our study has not been specifically designed to solve this controversy, we have not found circular fibers at the end of the human esophagus behaving, in vitro, as a sphincter. Further studies on humans combining morphological (electronic microscopy, immunohistochemistry) and functional methods (in vivo and in vitro physiology) will clarify this point in the next few years.

Circular esophageal muscle fibers from the EB respond with a minor contraction during the electrical stimulus, “on”-contraction, and a prominent “off”-contraction shortly after the end of the stimulus. The time between the beginning of the stimulus and the initiation of the “on”- and “off”-contraction is termed *latency* (Aulí *et al.*, 2008). Animal studies described that NO released from inhibitory myenteric neurons controlled both the *amplitude* and the *latency* timing of the “off”-response in the distal smooth muscle esophagus (Crist *et al.*, 1984) and mediated nerve-induced hyperpolarization of circular esophageal and LES smooth muscle (Christinck *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1991). These in vitro animal studies also found that inhibition of NOS with L-NNA or by blocking the NO-intracellular pathway with the guanylate cyclase inhibitor ODQ attenuated or even abolished the “off”-response and shortened the *latency* period, inducing the appearance of a cholinergic “on”-contraction of greater *amplitude* than the previous “on”- and “off”-contractions (Crist *et al.*, 1984; Murray *et al.*, 1991). In our human study, in vitro “on”- and “off”- EB contractions are similar to these previous in vitro animal studies and to the two types of esophageal peristaltic contractions found during in vivo vagal stimulation in the opossum esophagus (Murray *et al.*, 1991). The contraction during vagal stimulation was primarily cholinergic and was called the “A wave.” The other contraction occurred after stimulus and was called the “B wave.” NOS inhibitors strongly increased the velocity of the cholinergic A wave by decreasing the time of its arrival in the distal esophagus (Yamato *et al.*, 1992), a very similar result to what we found on *latency* in the human EB. Animal studies also found that the *amplitude* of esophageal peristalsis is

controlled by a peripherally located gradient of cholinergic innervation, most prominent proximally, and which decreases distally along the smooth muscle portion of the esophagus (Crist *et al.*, 1984).

Our results also suggest a complex interplay between the excitatory cholinergic and the inhibitory nitrenergic systems in the control of esophageal peristalsis in the human esophagus. Our electrophysiological results in the human esophagus show that the IJP in the EB is fully nitrenergic, as well as *latency* of “off”-contractions, suggesting that nitrenergic EMNs control the velocity of peristalsis. We also found that the RMP of the human EB muscle is more “negative” compared with that of clasp LES fibers, agreeing with the differences observed in the tone of both regions (Yuan *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008). Blockade of NO synthesis in the EB strips shifted “off”-contraction to an enhanced cholinergic “on”-contraction, suggesting an inhibitory effect of nitrenergic EMNs on *amplitude* of EB contractions, as well as a predominant role of cholinergic neurons in the *amplitude* of EB peristalsis. We found decreasing effects of the intrinsic cholinergic innervation from the EB to both sides of human LES, supporting the concept that *amplitude* of esophageal contractions is determined by a balance of these intrinsic circuits. Finally, the P2Y<sub>1</sub> receptor antagonist MRS2179 did not affect *latency*, but reduced *amplitude* of “off”-contractions, suggesting a modulation of cholinergic neurons by excitatory P2Y<sub>1</sub> receptors (Aulí *et al.*, 2008).

Alterations in these intrinsic mechanisms controlling LES and EB physiology contribute to the pathophysiology of gastroesophageal reflux disease and achalasia. Recent studies found that the smooth muscle pressure component of the LES caused by the clasp and sling muscle fibers is defective in patients with gastroesophageal reflux disease (Miller *et al.*, 2009). Cytokines and free radicals might mediate esophagitis-associated impairment of cholinergic EMNs, decreasing LES tone and *amplitude* of esophageal peristalsis (Stein *et al.*, 1991). Otherwise, the imbalance between a preserved excitatory and an impaired intrinsic inhibitory innervation (Park & Vaezi, 2005) might explain why patients with achalasia show a hypertensive and nonrelaxing LES, greatly increased tone in the LES, and non-progressive simultaneous contractions in the EB (Mearin *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1995).

## REFERENCES

- Aulí M, Martínez E, Gallego D, Opazo A, Espín F, Martí-Gallostra M, Jiménez M & Clavé P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**: 1043-1055.
- Brookes SJ, Chen BN, Hodgson WM & Costa M (1996). Characterization of excitatory and inhibitory motor neurons to the guinea pig lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **111**: 108-117.
- Chang HY, Mashimo H & Goyal RK (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G357-G366.
- Christinck F, Jury J, Cayabyab F & Daniel EE (1991). Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* **69**: 1448-1458.
- Crist J, Gidda JS & Goyal RK (1984). Intramural mechanism of esophageal peristalsis: roles of cholinergic and noncholinergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 3595-3599.
- Du C, Murray J, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of NANC hyperpolarization of opossum esophageal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **261**: G1012-G1016.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Martínez E & Clavé P (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-1248.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Estrada O, Sunol X & Clavé P (2007). Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**: 1427-1436.
- Gallego D, Hernández P, Clavé P & Jiménez M (2006). P2Y<sub>1</sub> receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G584-G594.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Aulí M, Clavé P & Jiménez M (2008). Purinergic and nitrenergic junction

- potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**: G522-G533.
- Gil V, Gallego D, Grasa L, Martín MT & Jiménez M (2010). Purinergic and nitrenergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G158-G169.
- González AA, Farré R & Clavé 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-G306.
- Imaeda K, Joh T, Yamamoto Y, Itoh M & Suzuki H (1998). Properties of inhibitory junctional transmission in smooth muscle of the guinea pig lower esophageal sphincter. *Jpn J Physiol* **48**: 457-465.
- Imaeda K & Cunnane TC (2003). Electrophysiological properties of inhibitory junction potential in murine lower oesophageal sphincter. *J Smooth Muscle Res* **39**: 119-133.
- Korn O, Csendes A, Burdiles P, Braghetto I & Stein HJ (2000). Anatomic dilatation of the cardia and competence of the lower esophageal sphincter: a clinical and experimental study. *J Gastrointest Surg* **4**: 398-406.
- L'Heureux MC, Muinuddin A, Gaisano HY & Diamant NE (2006). Feline lower esophageal sphincter sling and circular muscles have different functional inhibitory neuronal responses. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**: G23-G29.
- Liebermann-Meffert D, Allgower M, Schmid P & Blum AL (1979). Muscular equivalent of the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **76**: 31-38.
- Mearin F, Mourelle M, Guarner F, Salas A, Riveros-Moreno V, Moncada S & Malagelada JR (1993). Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. *Eur J Clin Invest* **23**: 724-728.
- Miller L, Dai Q, Vegesna A, Korimilli A, Ulerich R, Schiffner B & Brasseur J (2009). A missing sphincteric component of the gastro-oesophageal junction in patients with GORD. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 813-e52.
- Murray J, Du C, Ledlow A, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **261**: G401-G406.
- Ny L, Alm P, Ekstrom P, Hannibal J, Larsson B & Andersson KE (1994). Nitric oxide synthase-containing, peptide-containing, and acetylcholinesterase-positive nerves in the cat lower oesophagus. *Histochem J* **26**: 721-733.
- Ny L, Alm P, Larsson B, Ekstrom P & Andersson KE (1995a). Nitric oxide pathway in cat esophagus: localization of nitric oxide synthase and functional effects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **268**: G59-G70.
- Ny L, Larsson B, Alm P, Ekstrom P, Fahrenkrug J, Hannibal J & Andersson KE (1995b). Distribution and effects of pituitary adenylate cyclase activating peptide in cat and human lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **116**: 2873-2880.
- Ny L, Waldeck K, Carlemalm E & Andersson KE (1997). Alpha-latrotoxin-induced transmitter release in feline oesophageal smooth muscle: focus on nitric oxide and vasoactive intestinal peptide. *Br J Pharmacol* **120**: 31-38.
- Park W & Vaezi MF (2005). Etiology and pathogenesis of achalasia: the current understanding. *Am J Gastroenterol* **100**: 1404-1414.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994a). Cholinergic responses in the cat lower esophageal sphincter show regional variation. *Gastroenterology* **106**: 381-388.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994b). Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* **39**: 770-775.
- Richardson BJ & Welch RW (1981). Differential effect of atropine on rightward and leftward lower esophageal sphincter pressure. *Gastroenterology* **81**: 85-89.
- Schulze K, Dodds WJ, Christensen J & Wood JD (1977). Esophageal manometry in the opossum. *Am J Physiol Endocrinol Metab Gastrointest Physiol* **233**: E152-E159.
- Sifrim D, Janssens J & Vantrappen G (1992). A wave of inhibition precedes primary peristaltic contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* **103**: 876-882.
- Stein HJ, DeMeester TR, Naspetti R, Jamieson J & Perry RE (1991). Three-dimensional imaging of the

lower esophageal sphincter in gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* **214**: 374-383.

Stein HJ, Crookes PF & DeMeester TR (1995). Three-dimensional manometric imaging of the lower esophageal sphincter. *Surg Annu* **27**: 199-214.

Tøttrup A, Svane D & Forman A (1991). Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower esophageal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **260**: G385-G389.

Uc A, Murray JA & Conklin JL (1997). Effects of calcitonin gene-related peptide on opossum esophageal smooth muscle. *Gastroenterology* **113**: 514-520.

Vegesna AK, Braverman AS, Miller LS, Tallarida RJ, Tiwana MI, Khayyam U & Ruggieri Sr MR (2010). Comparison of human and porcine gastric clasp and sling fiber contraction by M2 and M3 muscarinic receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G530-G534.

Vicente Y, da Rocha C, Yu J, Hernández-Peredo G, Martínez L, Pérez-Mies B & Tovar JA (2001). Architecture and function of the gastroesophageal barrier in the piglet. *Dig Dis Sci* **46**: 1899-1908.

Werkstrom V, Ny L, Persson K & Andersson KE (1997). Carbon monoxide-induced relaxation and distribution of haem oxygenase isoenzymes in the pig urethra and lower oesophagogastric junction. *Br J Pharmacol* **120**: 312-318.

Yamato S, Spechler SJ & Goyal RK (1992). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* **103**: 197-204.

Yuan S, Costa M & Brookes SJ (1998). Neuronal pathways and transmission to the lower esophageal sphincter of the guinea pig. *Gastroenterology* **115**: 661-671.

Yuan S & Brookes SJ (1999). Neuronal control of the gastric sling muscle of the guinea pig. *J Comp Neurol* **412**: 669-680.

Zhang Y, Mashimo H & Paterson WG (2008). Regional differences in nitrergic innervation of the smooth muscle of murine lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **153**: 517-527.

Zhang Y, Miller DV & Paterson WG (2010). TREK-1 channels do not mediate nitrergic neurotransmission in circular smooth muscle from the lower oesophageal sphincter. *Br J Pharmacol* **159**: 362-373.



## **APPENDIX II: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Human Esophagus (Esophageal Body, EB; Lower Esophageal Sphincter, LES)**

### **Summary**

This section shows complementary figures that were originated from the experiments of chapter 2 and were not published. We have described the anatomical origin of the strips included in these experiments in the human esophagus [esophageal body (EB), and clasp and sling regions of the lower esophageal sphincter (LES)].

We also carried out mechanical and electrophysiological studies in the human EB and in the clasp and sling regions of the LES. We assessed the morphology of the mechanical tone developed in the human EB and in the clasp and sling regions of the LES, and we found that active tone was developed in clasp and sling zones but it was not in the EB.

### **Purinergic and peptidergic components of mechanical and electrophysiological responses:**

The electrophysiological experiments assessing the purinergic component of the human clasp LES responses are included. We found that the Inhibitory Junction Potential (IJP) was completely nitrergic and there was no unmasked nonnitrergic IJP in the human clasp LES.

We assessed the effect of purinergic (MRS2365 and ADP $\beta$ S) and peptidergic (VIP) agonists on the membrane potential and on the total tone of the human clasp LES. Electrophysiological experiments assessing the effect of the peptidergic ( $\alpha$ -chymotrypsin) antagonist on *amplitude* and *duration* of IJP in the human EB and clasp LES were also included.

We characterized the mechanical responses induced by the peptidergic agonist (VIP) on the total tone of the human clasp LES with TTX and  $\alpha$ -chymotrypsin. We assessed the peptidergic component of the nicotine-induced relaxation of the human clasp LES by the antagonist  $\alpha$ -chymotrypsin following a nitrergic blockade, and we found that  $\alpha$ -chymotrypsin reduced this nonnitrergic relaxation.

### **Mechanical effects of agonists and antagonists on human esophagus:**

We assessed the EFS-induced responses obtained in the human EB and in the clasp and sling regions of the LES. Mechanical experiments assessing the effect of agonists (SNP donor of NO, CCh, ACh analogue) and antagonists (L-NNA, nitrergic blockade; atropine, cholinergic blockade) on the total tone of the human EB and of the clasp and sling regions of the LES were included.

### **Morphological studies of the human clasp LES and EB:**

Histological studies show the circular and longitudinal smooth muscle layers of the clasp LES and EB. Immunohistochemical S100 staining identified a neural ganglion at the myenteric plexus between both smooth muscle layers of the clasp LES. We observed some interstitial cells of Cajal in the circular smooth muscle of the clasp LES and in the myenteric ganglion.

### **Electrophysiological effects of agonists and antagonists on human esophagus:**

Electrophysiological experiments assessing the comparison of the resting membrane potential (RMP) of the human EB and clasp and sling LES were included. We also assessed the effect of antagonists (L-NNA, nitrergic blockade; atropine, cholinergic blockade; MRS2179, purinergic blocked;  $\alpha$ -chymotrypsin, peptidergic blockade) on the RMP of the human EB and of the clasp and sling regions of the LES.



**INDEX:**

**1) MORPHOLOGICAL STUDIES:**

ANATOMY

**-Figure 1.** Preparation. Anatomical origin of the human esophageal strips included in the in vitro study.

**2) HUMAN MECHANICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDIES**

**-Figure 2.** Morphology of the total tone developed by the strips from different regions of the human esophagus (equilibration period) at mechanical recordings.

**-Figure 3.** Representative tracings and quantitative aspects of intracellular microelectrode responses in clasp region of human LES. Effect of sequential addition of L-NNA, atropine and MRS2179.

**-Figure 4.** Representative tracings and quantitative aspects in A) Intracellular microelectrode, and B) mechanical responses in clasp region of human LES. Effect of MRS2365, ADP $\beta$ S and VIP.

**-Figure 5.** Representative tracings and quantitative aspects of intracellular microelectrode responses in human A) esophageal body (EB), and B) clasp region of LES. Effect of  $\alpha$ -chymotrypsin on the EFS-induced IJP.

**-Figure 6.** Mechanical studies. A) Quantitative aspects, and B) Representative tracings of VIP-induced responses in clasp human LES. Effect of TTX and  $\alpha$ -chymotrypsin on mechanical responses.

**-Figure 7.** Mechanical studies. Quantitative aspects of nicotine-induced responses in clasp human LES. Effect of  $\alpha$ -chymotrypsin on mechanical non-nitric responses.

**-Figure 8.** Mechanical studies. A) EFS-induced mechanical responses, and B) Mechanical effect of agonists SNP and CCh in human clasp, sling LES and EB strips.

**-Figure 9.** Mechanical studies. C) Mechanical effect of antagonists atropine and L-NNA in human clasp, sling LES and EB strips.

**-Figure 10.** Morphological studies. Haematoxylin & Eosin, S100 and c-Kit stainings of sections of human clasp LES and EB.

**-Figure 11.** Electrophysiological studies. Quantitative aspects of microelectrode resting membrane potential (RMP) in human EB, and clasp and sling LES strips.

**-Figure 12.** Electrophysiological studies. Representative tracings and quantitative aspects of different blockers on the RMP in human EB, and clasp and sling LES strips.

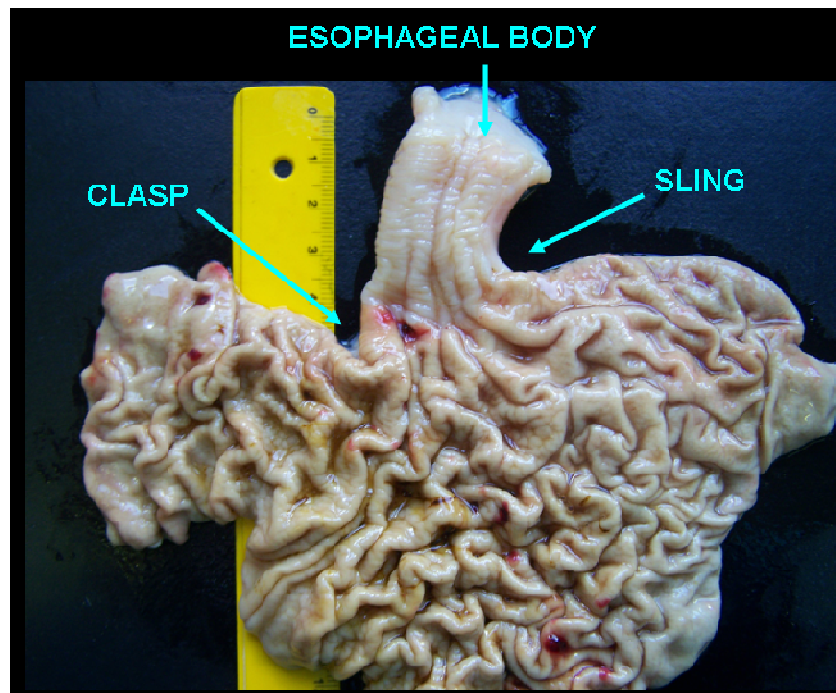
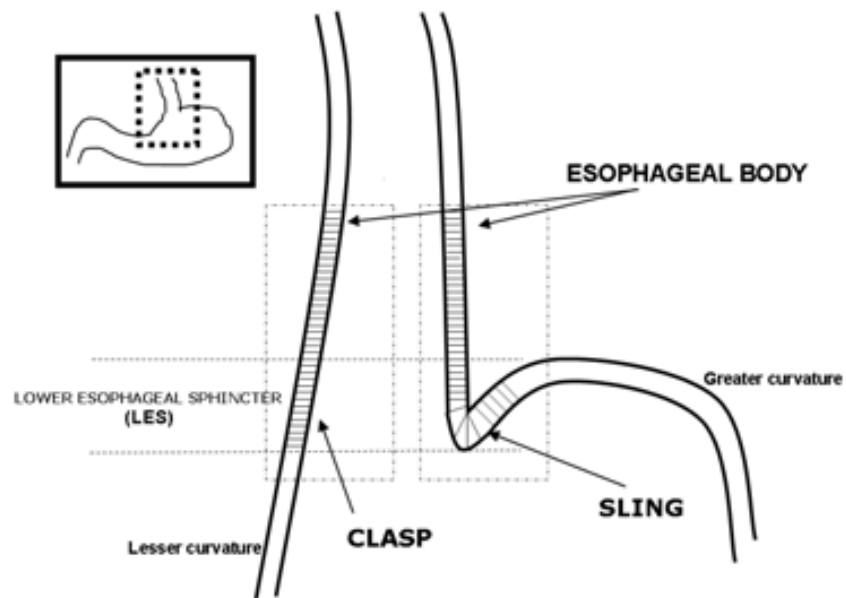
**-Table 1.** Effect of direct agonists for the main inhibitory and excitatory neurotransmitters (NO donor SNP and ACh-analogue CCh) in each region of the human esophagus.

**-Table 2.** Effect of different antagonists on the RMP, spontaneous IJPs and total tone of human LES and EB strips.

## 1) MORPHOLOGICAL STUDIES:

### Anatomy

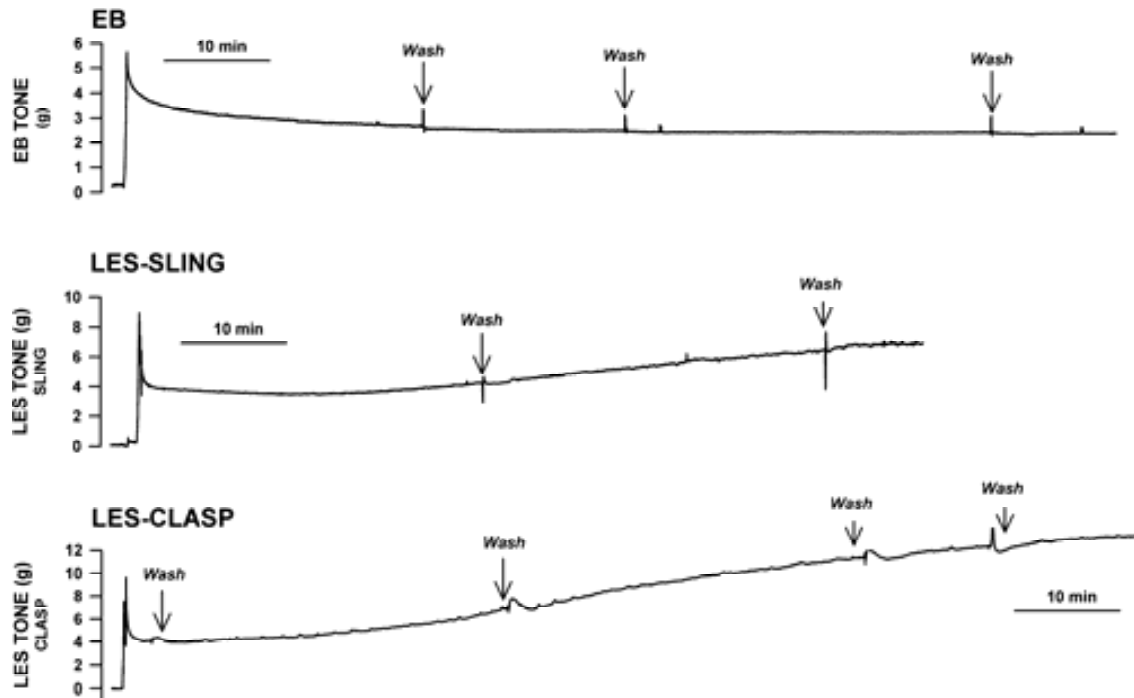
### Preparation



**Figure 1. Preparation.** Anatomical origin of the human esophageal strips included in the present study.

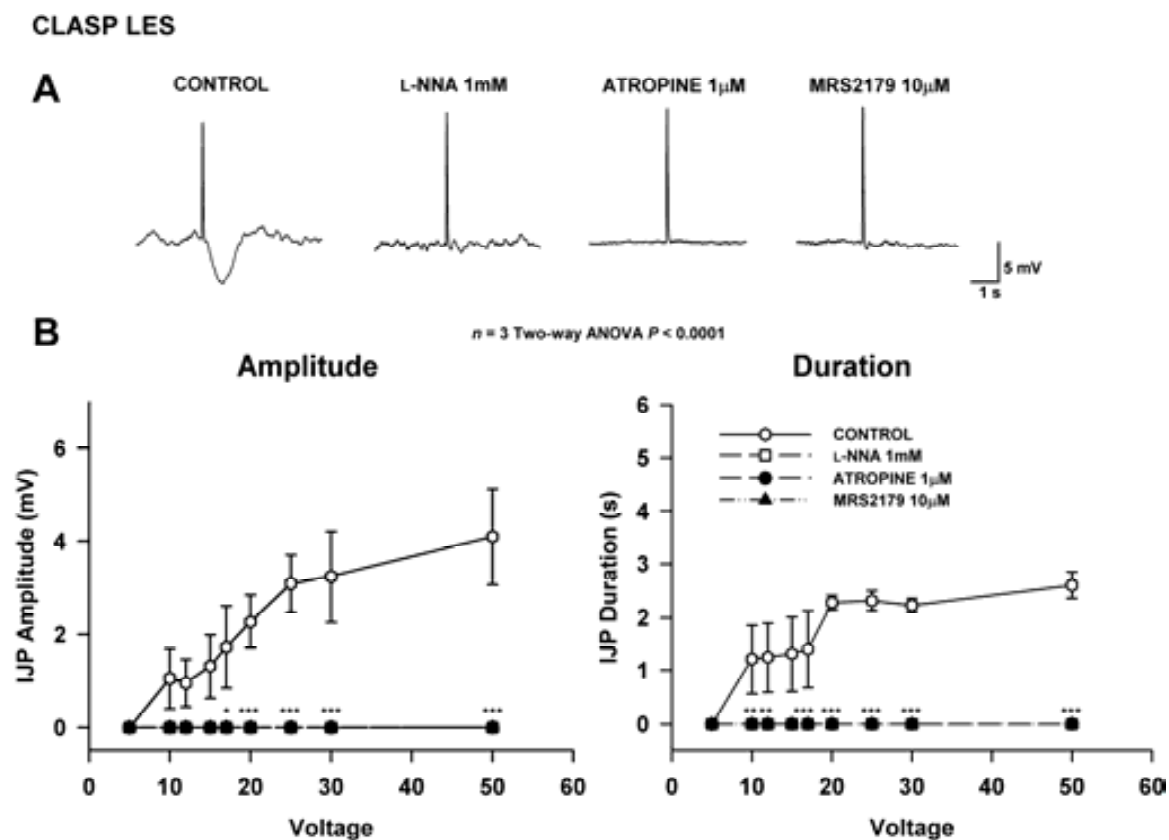
## 2) HUMAN MECHANICAL AND ELECTROPHYSIOLOGICAL STUDIES

### Morphology of the total tone developed



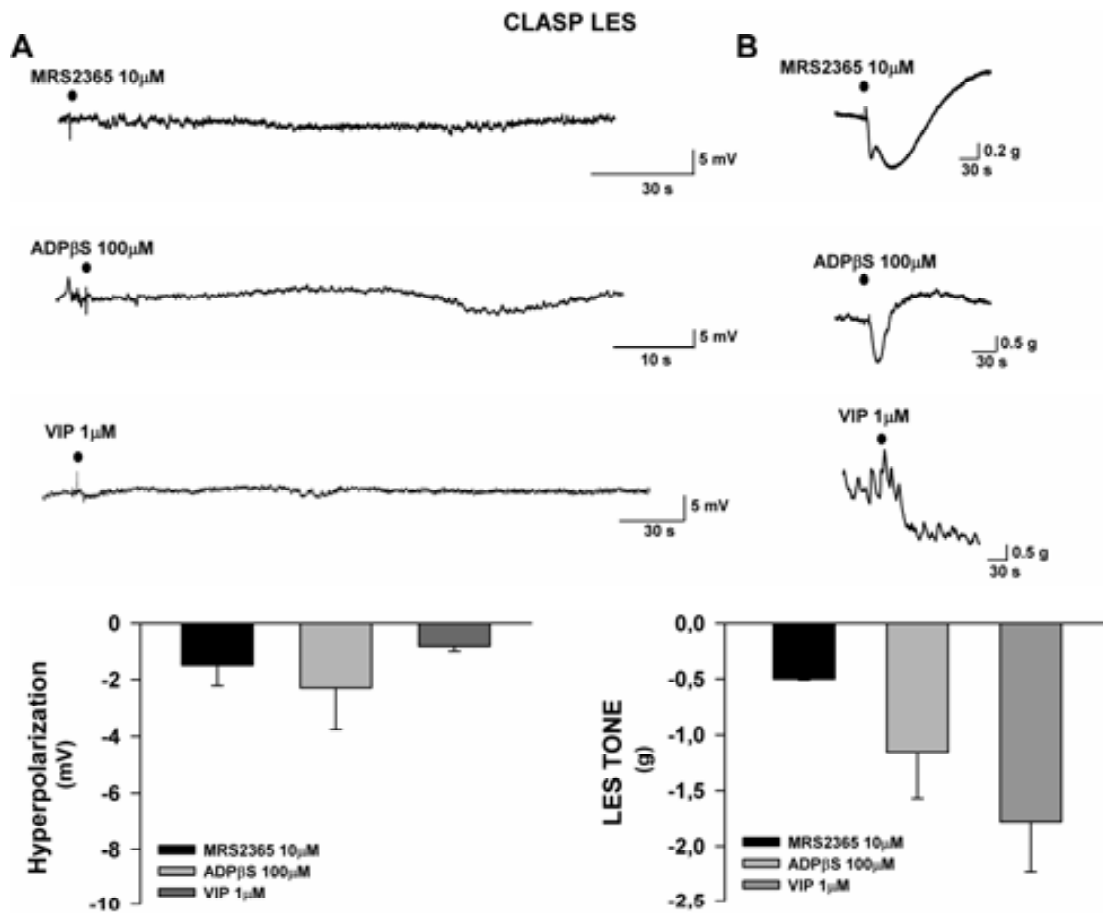
**Figure 2. Morphology of the total tone developed.** Representative tracings showing the total tone developed during the equilibration period by the strips from different regions of the human esophagus. Following similar procedures (60 min incubation, and stretch to 150% of their initial length) strips from clasp and sling regions of the LES developed active tone, whereas those from EB did not.

Electrophysiological studies



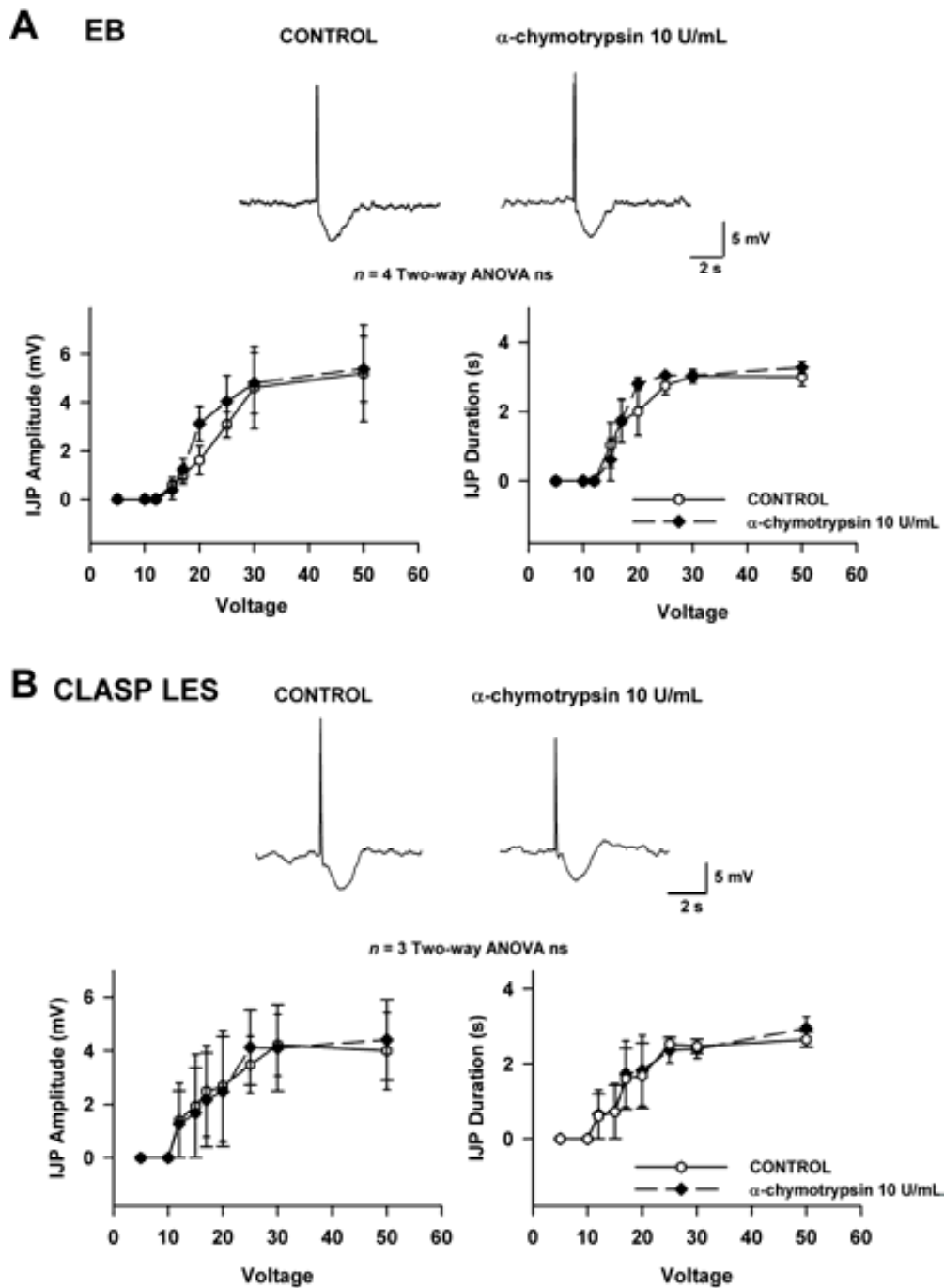
**Figure 3. Electrophysiological studies.** A) Intracellular microelectrode recordings showing the sequential effect of L-NNA 1 mM, atropine 1  $\mu$ M and MRS2179 10  $\mu$ M on the EFS-induced IJP, elicited at the maximum voltage of stimulation (50 V) in clasp LES strips (top), and B) plot graphs showing the *amplitude* and *duration* at different voltages of stimulation (5-50 V) (bottom). The IJP was nitrenergic in the human LES (completely blocked by L-NNA) and there was no unmasked non-nitrenergic IJPs following the addition of L-NNA. ( $n = 3$ , \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ).

## Electrophysiological studies: purinergic and peptidergic agonists



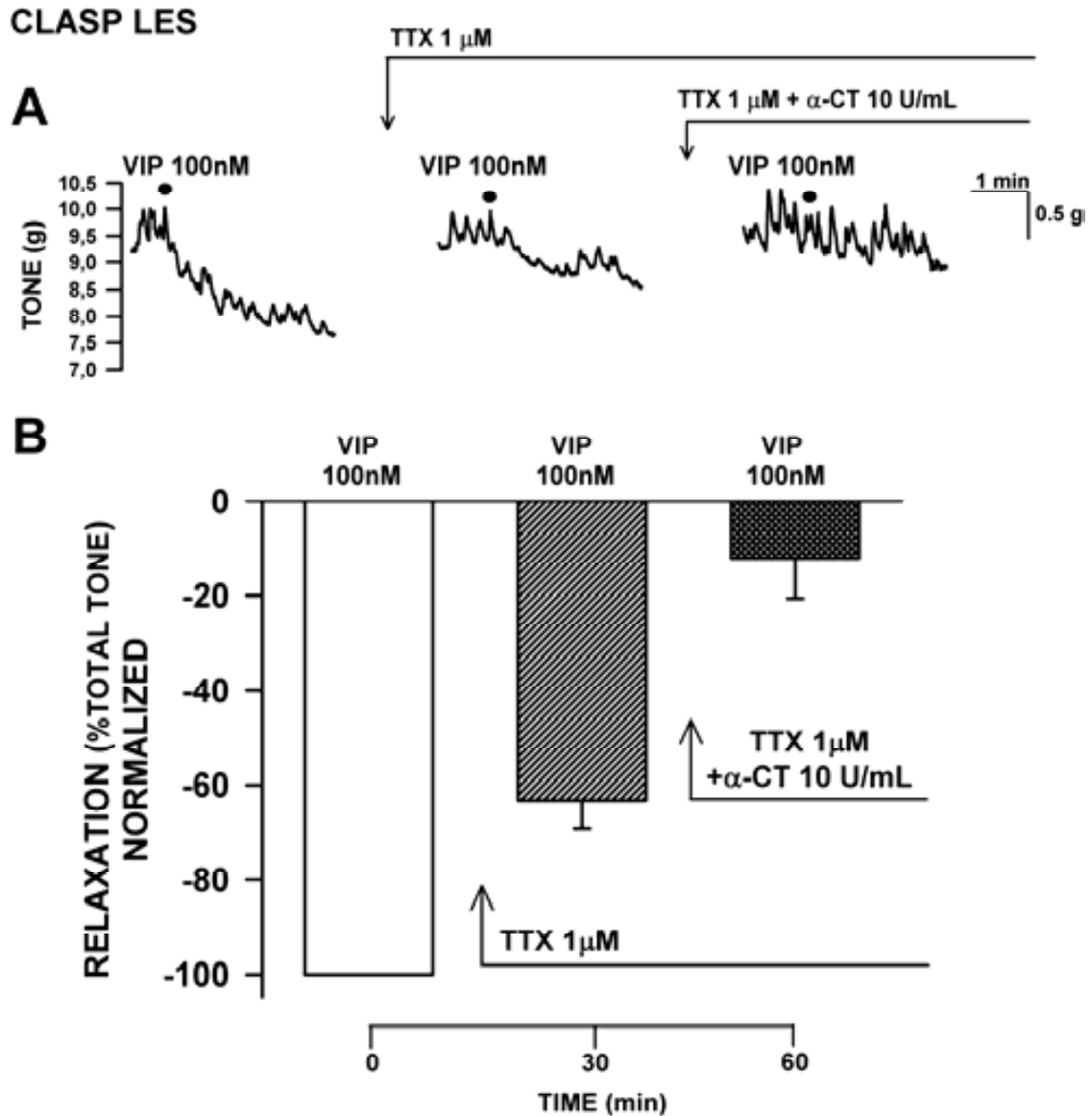
**Figure 4. Effect of purinergic and peptidergic agonists.** A) Intracellular microelectrode recordings showing the effect of MRS2365 (10  $\mu$ M), ADP $\beta$ S (100  $\mu$ M) and VIP (1  $\mu$ M) (top) and histogram expressing this effect as mean  $\pm$  SEM; B) Representative tracings of the clasp LES relaxation induced by MRS2365, ADP $\beta$ S and VIP (top) and quantitative effects (bottom).

Electrophysiological studies: peptidergic antagonist



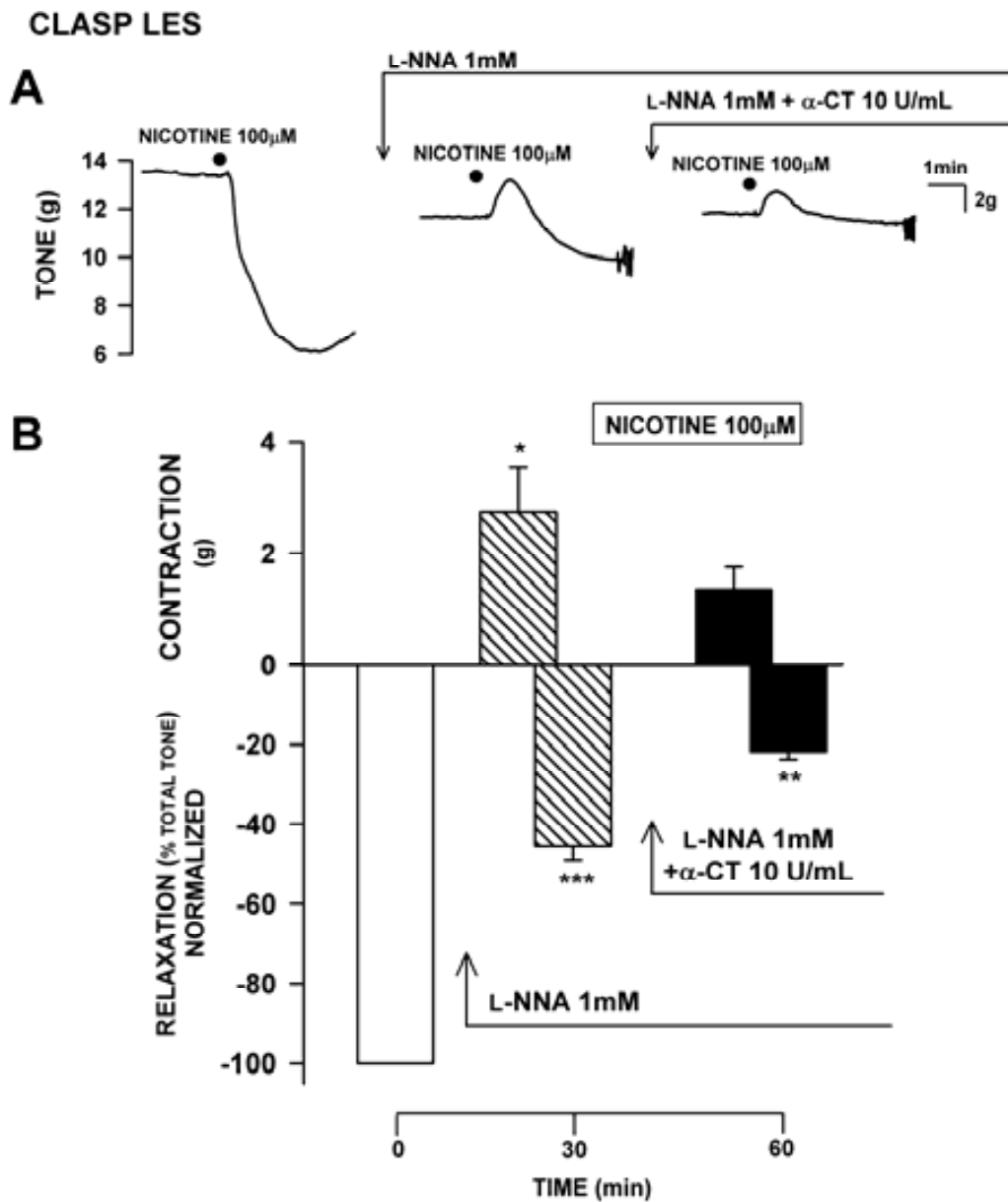
**Figure 5. Effect of a peptidergic antagonist on electrophysiological responses.** A) Intracellular microelectrode recordings showing the effect of  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) on the EFS-induced IJP elicited at the maximum voltage of stimulation (50 V) in EB strips (top), and plot graphs showing the *amplitude* and *duration* at different voltages of stimulation (5-50 V) (bottom). B) Intracellular microelectrode recordings showing the effect of  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) on the EFS-induced IJP elicited at the maximum voltage of stimulation (50 V) in clasp LES strips (top), and plot graphs showing the *amplitude* and *duration* at different voltages of stimulation (5-50 V) (bottom).

## Mechanical studies: peptidergic agonist and antagonist



**Figure 6. Characterization of VIP (100 nM) responses in clasp LES strips.** A) Representative tracings, and B) Quantitative effects of VIP-induced responses. TTX 1  $\mu$ M only partly ( $-36.8 \pm 9.8\%$ ,  $P < 0.05$ ) antagonized VIP responses, showing a strong, direct, muscular relaxant effect. Sequential addition of the peptidase  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U/mL) almost abolished VIP relaxation by  $-90.7 \pm 7.3\%$ .

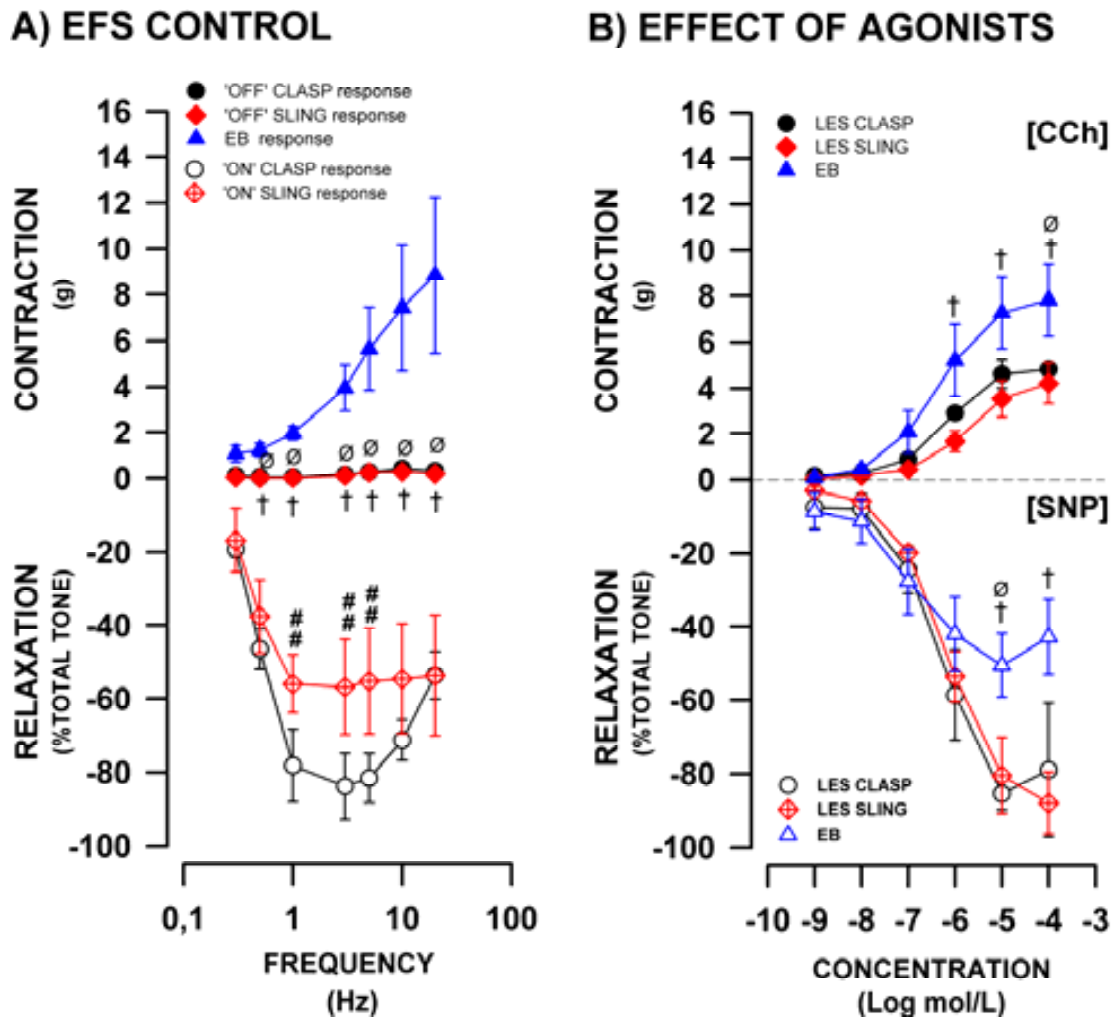
Mechanical studies: nicotine-induced responses



**Figure 7. Characterization of nicotine-induced responses in clasp LES strips.** A) Representative tracing, and B) Quantitative effects on nicotine-induced responses. Effect of  $\alpha$ -chymotrypsin 10 U/mL following nitrenergic blockade by L-NNA 1 mM.  $\alpha$ -chymotrypsin reduced the non-nitrenergic relaxation by  $-52.1 \pm 1.9\%$ . ( $n = 3$  in each experiment, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs the previous experimental condition).



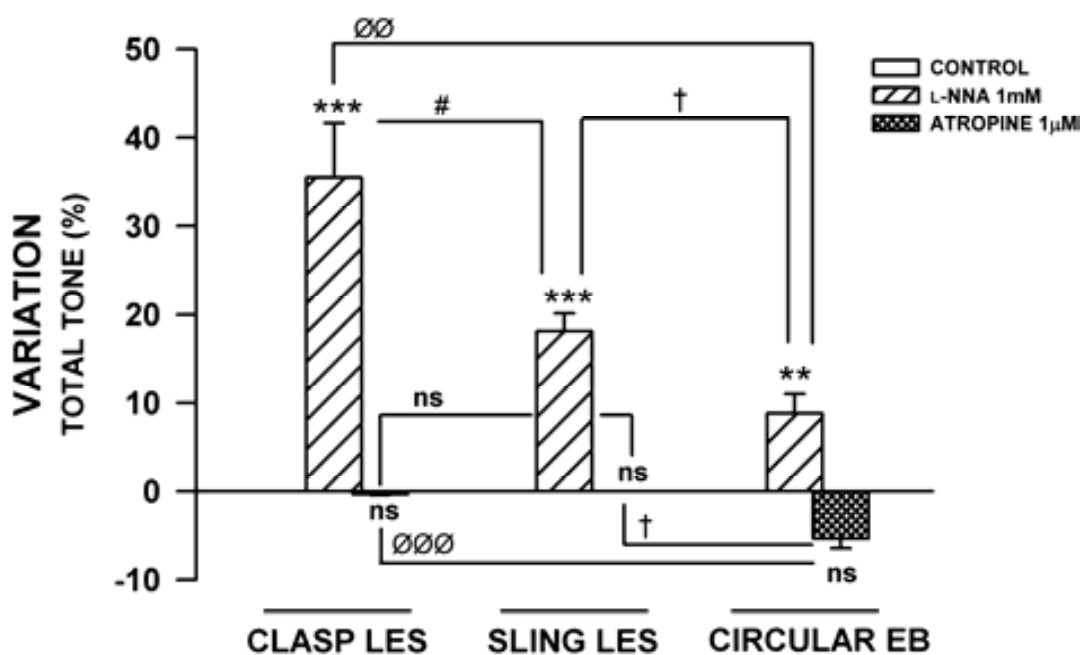
## Mechanical studies: EFS and agonists-induced responses in the human esophagus



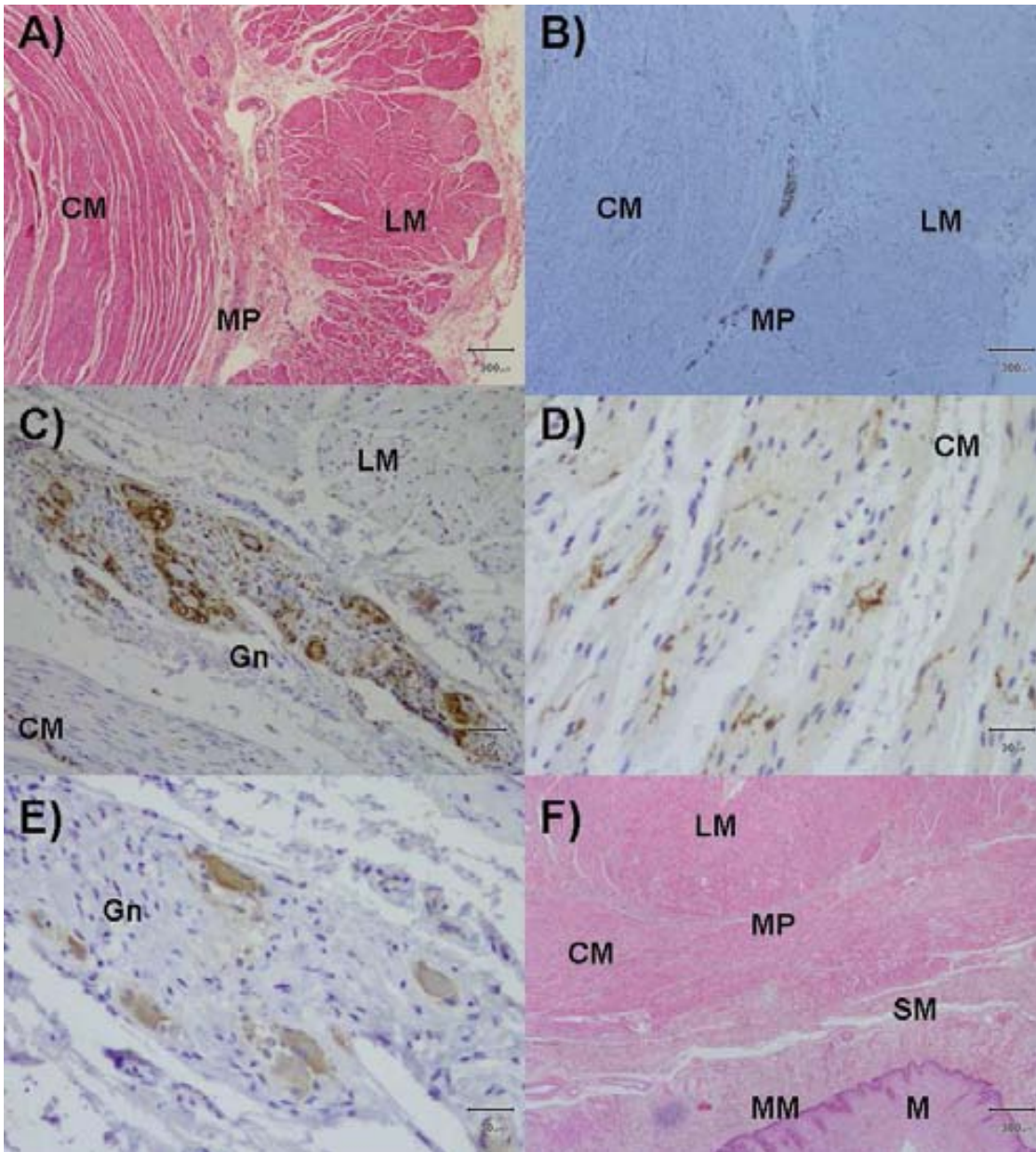
**Figure 8. EFS-induced responses on human esophagus.** A) Electrical field stimulation-induced responses at different frequencies in both clasp and sling regions of the lower esophageal sphincter (LES) and the esophageal body (EB). "On"-relaxation and "off"-contraction values for  $n = 3$ . (# #  $P < 0.01$  clasp vs sling fibers;  $\emptyset P < 0.05$  EB vs clasp LES; †  $P < 0.05$  EB vs sling LES). **Agonists-induced responses on human esophagus.** B) Concentration-response curves for carbachol (CCh, middle graph) and sodium nitroprusside (SNP, right graph) in the clasp and sling muscles of human LES and EB. ( $n = 3$ ,  $\emptyset P < 0.05$  EB vs clasp LES; †  $P < 0.05$  EB vs sling LES).

Mechanical studies: effect of antagonists in the human esophagus

C) EFFECT OF ANTAGONISTS



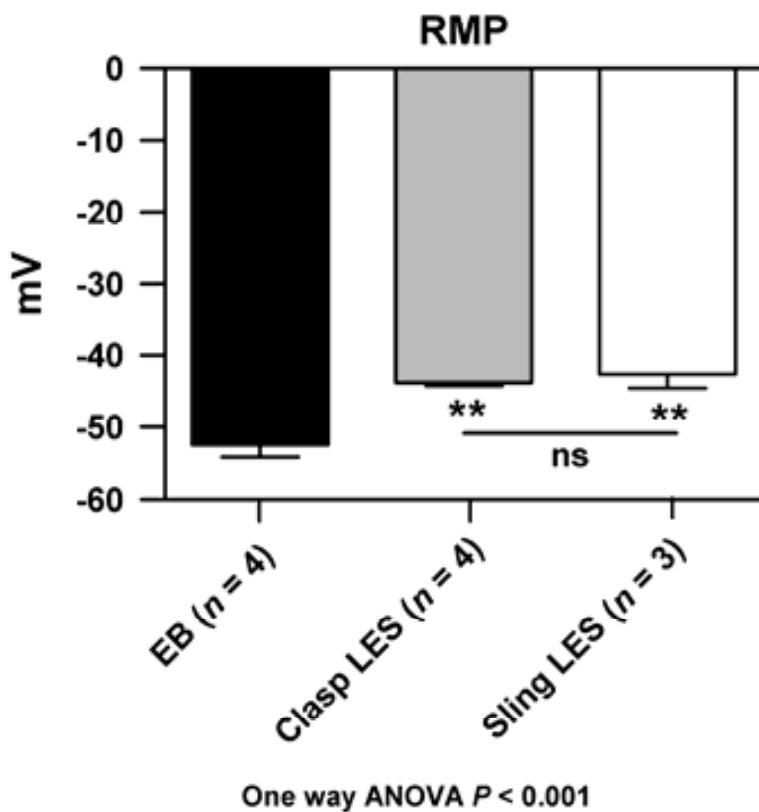
**Figure 9. Effect of antagonists in the human esophagus.** Effect of L-NNA and atropine on total tone in the clasp and sling regions of human LES. L-NNA blocking nitric oxide synthesis significantly increased total LES tone in both sling and clasp LES regions as well as in EB. (\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs each control value). The increase of total tone in clasp LES side is significantly higher than the one observed in sling LES. The increase of total tone in EB is significantly lower than the one observed in both sling and clasp LES. Atropine reduced EB total tone but not significantly, neither total clasp or sling LES tone. (#  $P < 0.05$  clasp LES vs sling LES;  $\emptyset\emptyset P < 0.01$ ,  $\emptyset\emptyset\emptyset P < 0.001$  clasp LES vs EB. †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$  sling LES vs EB).

**MORPHOLOGICAL STUDIES:**

**Figure 10. Stainings of different parts of the human esophagus.** A) Haematoxylin & eosin stain of a transversal section at the transmurular clasp LES including both circular and longitudinal smooth muscle layers. B) Neural S100 staining of the circular transmurular clasp LES. C) Neural ganglion at the myenteric plexus with S100 staining. D) Intramuscular interstitial cells of Cajal at the clasp LES circular muscle layer. E) Neural ganglion in the myenteric plexus with c-KIT staining. F) Hematoxylin & eosin stain of a transversal section at the transmurular EB including both circular and longitudinal smooth muscle layers. CM indicates circular muscle; EB, esophageal body; Ng, neural ganglia; LM, longitudinal muscle; LES, lower esophageal sphincter; MM, muscularis mucosa; MP, myenteric plexus; N, nerve fibers and SM, submucosa.

Electrophysiological studies: Resting Membrane Potential comparison

	EB (n = 4)	Clasp LES (n = 4)	Sling LES (n = 3)
Mean	-52.49	-43.85	-42.66
Std. Deviation	3.372	0.8480	3.317
Std. Error	1.686	0.4240	1.915



**Figure 11. Resting membrane potential in the human esophagus.** Representative histograms showing the comparison of the RMP between the EB and the LES (clasp/sling) fibers.

Electrophysiological studies: Resting Membrane Potential comparison

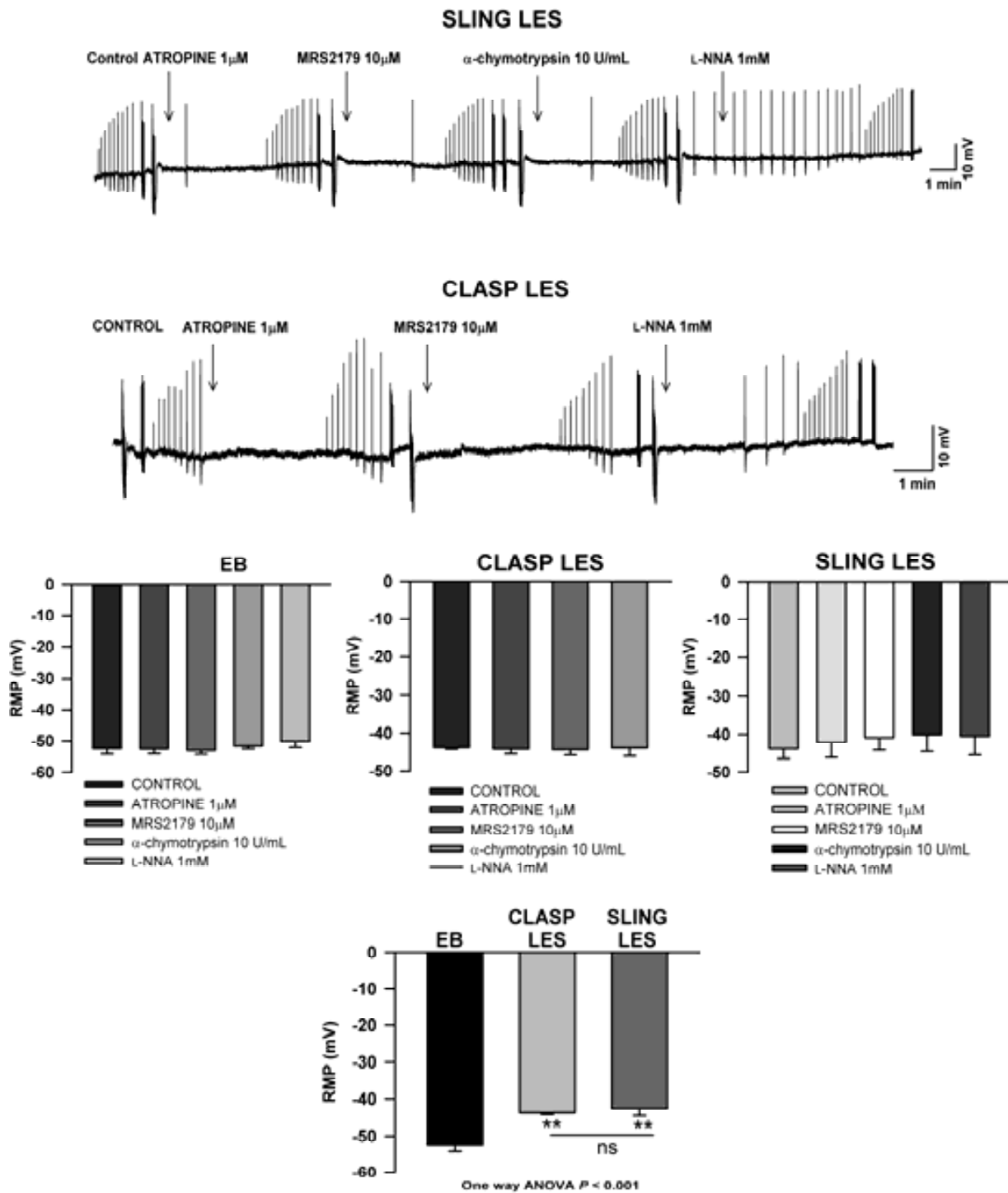


Figure 12. Effect of antagonists on RMP in human esophagus. Representative tracings and histograms showing the lack of effect of the different blockers on the resting membrane potential (RMP) in clasp, sling LES and EB strips.

**Table 1. Effect of agonists in the human esophagus.** Effect of direct agonists of the main inhibitory (SNP) and excitatory (CCh) neurotransmitters in each region of the human esophagus.

AGONIST	ZONE	EC <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub>
<b>LES and EB relaxation</b>			
<i>EFS (3 Hz)</i>	CLASP-LES	-	-86.9 ± 5.3%, ## vs sling
SNP	CLASP-LES	0.41 μM NS vs sling; NS vs EB	-85.4 ± 4.3%, NS vs sling; Ø vs EB
<i>EFS (3 Hz)</i>	SLING-LES	-	-52.3 ± 4.5% ; ## vs. Clasp
SNP	SLING-LES	0.59 μM NS vs clasp; NS vs EB	-87.9 ± 8.5% NS vs clasp; † vs EB
<i>EFS (3 Hz)</i>	EB	-	-
SNP	EB	0.13 μM NS vs clasp; NS vs sling	-50.5 ± 10.2% † vs sling; Ø vs clasp
AGONIST	ZONE	EC <sub>50</sub> (μM)	E <sub>max</sub>
<b>LES and EB contraction</b>			
<i>EFS (20 Hz)</i>	CLASP-LES	-	0.42 ± 0.3 g NS vs sling; Ø vs EB
CCh	CLASP-LES	0.63 μM # vs sling; NS vs EB	4.8 ± 0.1 g NS vs sling; Ø vs EB
<i>EFS (20 Hz)</i>	SLING-LES	-	0.28 ± 0.2 g NS vs clasp; †† vs EB
CCh	SLING-LES	2.1 μM # vs clasp ; † vs EB	4.2 ± 0.9 g NS vs clasp; † vs EB
<i>EFS (20 Hz)</i>	EB	-	8.8 ± 3.4 g Ø vs clasp ; †† vs sling
CCh	EB	0.68 μM NS vs clasp; † vs sling	7.8 ± 1.6 g Ø vs clasp; † vs sling

# *P* < 0.05 clasp vs sling, ## *P* < 0.01 clasp vs sling; Ø *P* < 0.05 clasp vs EB ; † *P* < 0.05 sling vs EB, †† *P* < 0.01 sling vs EB ; NS, not statistically significant.

**Table 2. Effect of agonists in the human esophagus.** Effect of different antagonists on resting membrane potential, spontaneous IJPs and total tone of LES and EB strips.

	ZONE	CONTROL	L-NNA	ATROPINE
<b>RMP</b>	CLASP LES	-43.85 ± 0.42 mV (n = 4)	-43.95 ± 2.1 mV	-44.25 ± 1.26 mV
<b>SD-IJPs</b>	CLASP LES	0.079 ± 0.047 mV (n = 4)	0.056 ± 0.02 mV	0.072 ± 0.044 mV
<b>TOTAL TONE</b>	CLASP LES	8.7 ± 1.0 g (n = 13)	+35.5 ± 6.1% # vs sling; ØØ vs EB	-0.3 ± 0.2% # vs sling; † vs EB
<b>RMP</b>	SLING LES	-42.66 ± 1.91 mV (n = 3)	-40.51 ± 4.95 mV	-42.18 ± 3.9 mV
<b>SD-IJPs</b>	SLING LES	0.16 ± 0.026 mV (n = 3)	0.13 ± 0.046 mV	0.15 ± 0.044 mV
<b>TOTAL TONE</b>	SLING LES	3.9 ± 0.6 g (n = 5)	+18.1 ± 1.9% # vs clasp; † vs EB	- # vs clasp
<b>RMP</b>	EB	-52.49 ± 1.68 mV (n = 4)	-52.56 ± 1.51 mV	-50.12 ± 1.9 mV
<b>SD-IJPs</b>	EB	0.13 ± 0.05 mV (n = 4)	0.15 ± 0.026 mV	0.13 ± 0.039 mV
<b>TOTAL TONE</b>	EB	2.8 ± 0.4 g (n = 5)	+8.8 ± 2.2% ØØ vs clasp; † vs sling	-5.3 ± 1.1% † vs sling

#  $P < 0.05$  clasp vs sling, ##  $P < 0.01$  clasp vs sling; ØØ  $P < 0.01$  clasp vs EB ; †  $P < 0.05$  sling vs EB, ††  $P < 0.01$  sling vs EB.





## Capítulo 3

# Origin and Modulation of Circular Smooth Muscle Layer Contractions in the Porcine Esophagus

Lecea B, Gallego D, Farré R & Clavé P (2012). Origin and modulation of circular smooth muscle layer contractions in the porcine esophagus. *Neurogastroenterol Motil* **24**: 779-e355.

### Abstract

The origin and modulation mechanisms controlling *timing* and *amplitude* of esophageal body peristalsis are not fully understood. We aimed to characterize the neurotransmitters involved in the origin and modulation of circular smooth muscle esophageal body (EB) contractions. Responses of porcine EB strips to electrical stimulation of motor neurons (MNs) were assessed in organ baths and with microelectrodes. The effect of antagonists of inhibitory (L-NAME 1 mmol L<sup>-1</sup>, MRS2179 10 μmol L<sup>-1</sup>) and excitatory neurotransmitters (atropine 1 μmol L<sup>-1</sup>; SR140333 1 μmol L<sup>-1</sup>-NK<sub>1ra</sub> -, GR94800 1 μmol L<sup>-1</sup>-NK<sub>2ra</sub> -) and of ganglionic neurotransmitters (hexamethonium 100 μmol L<sup>-1</sup>, ondansetron 1 μmol L<sup>-1</sup>, NF279 10 μmol L<sup>-1</sup>) were characterized. Electrical field stimulation (EFS) induced a frequency-dependent *off*-contraction (16.8 ± 0.8 g) following a *latency* period. *Latency* was significantly reduced by L-NAME (-66.1 ± 4.1%) and MRS2179 (-25.9 ± 5.6%), and strongly increased by atropine (+36.8 ± 5.8%). *Amplitude* was reduced by L-NAME (-69.9 ± 10.4%), MRS2179 (-34.1 ± 6.0%), atropine (-42.3 ± 4.7%), hexamethonium (-18.9 ± 3.3%), NF279 (-20.7 ± 3.5%), ondansetron (-16.3 ± 3.2%), GR94800 (-28.0 ± 4.8 %) SR140333 (-20.9 ± 7.1%), and α-chymotrypsin (-31.3 ± 7.0%). The EFS induced a monophasic nitrenergic inhibitory junction potential. Our results suggest that *timing* (*latency*) and *amplitude* of esophageal contractions are determined by a balance of complex interactions between excitatory and inhibitory MNs. *Latency* depends on the activation of inhibitory MNs releasing NO and a minor purinergic contribution through P2Y<sub>1</sub> receptors, and excitatory MNs releasing ACh. *Amplitude* depends on a major contribution of excitatory MNs releasing ACh and tachykinins, and also on inhibitory MNs releasing NO, ATP or related purines and peptidergic neurotransmitters acting as strong modulators of the excitatory neuroeffector transmission.

### Introduction

Bolus transport in the esophagus is caused by peristalsis; sequential downward contraction of circular muscle fibers originating in the esophageal body (EB). The EB peristalsis depends on central and peripheral mechanisms and consists of sequences of inhibition followed by excitatory responses. Classical studies have found its *timing* and *amplitude* is mainly controlled by enteric motor neurons (MNs) located in the myenteric plexus (MP) (Christensen & Lund, 1969; Dodds *et al.*, 1978; Mukhopadhyay & Weisbrodt, 1975; Weisbrodt & Christensen, 1972). In the human and porcine EB, the circular fibers are arranged in rings and are innervated by both inhibitory and excitatory MNs from the MP (Lecea *et al.*, 2011). Primary esophageal motor disorders are mainly caused by alterations in these intrinsic neural mechanisms that control EB motor function (Paterson *et al.*, 2006).

The relevance of these peripheral neuromuscular control mechanisms in the generation of EB peristalsis has been recognized for years, although not fully understood. Previous animal (Christensen & Lund, 1969; Crist *et al.*, 1984a; Crist *et al.*, 1984b) and human (Krysiak & Preiksaitis, 2001; Lecea *et al.*, 2011) studies showed that direct activation of neurons by electrical field stimulation (EFS) in circular EB smooth muscle strips produced a minor *on*-contraction during the electrical stimulus and a more prominent *off*-contraction shortly after the end of the stimulus.

The time between the beginning of the stimulus and the initiation of the contractions is termed *latency* and determines the speed of propagation of these esophageal contractions along the esophagus (Aulí *et al.*, 2008; Krysiak & Preiksaitis, 2001; Lecea *et al.*, 2011). In vitro studies (Crist *et al.*, 1984b) showed that inhibitory MNs were responsible for the period of *latency* and NO (nitric oxide) was proposed as the main neurotransmitter in the esophagus of several species, including humans (Christinck *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1991; González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 1991). The *amplitude* of these

EB contractions is mainly mediated by cholinergic nerves and tachykinergic influences have also been described in the human esophagus (Krysiak & Preiksaitis, 2001). In contrast, the effects of other putative neurotransmitters released by both inhibitory and excitatory MNs on the *amplitude* of contractions and on *latency* have not been determined (Christinck *et al.*, 1991; Du *et al.*, 1991; Lecea *et al.*, 2011). In earlier studies, we used porcine esophagus as a homologous animal model for the study of human esophageal motility disorders and found that inhibitory responses in the porcine lower esophageal sphincter (LES) following stimulation of intrinsic inhibitory MNs was mediated by two main neuromuscular pathways: (i) NO through guanylate cyclase signaling, and (ii) non-nitrgic neurotransmission mainly mediated by ATP or a related purine acting on P2Y<sub>1</sub> receptors and a minor contribution of P2X receptors and peptidergic inhibitory neurotransmitters, particularly PACAP (Farré *et al.*, 2006). These two intrinsic neural pathways, in combination with myogenic factors (Helm *et al.*, 1991), generate the aborally progressive peristaltic wave (Anand & Paterson, 1994). Overall, the nerves and transmitters mediating the contraction and relaxation of circular fibers and mechanisms of modulation of peristalsis have not yet been established and might help to improve our understanding of the pathophysiology of primary and secondary motor disorders of the esophagus, and to design new prokinetic agents.

The aim of this study was to characterize *in vitro* the motor patterns, the neuromuscular neurotransmitters and the role of receptors mediating ganglionic neurotransmission in the origin and modulation of *timing* and *amplitude* of porcine circular EB contractions using an experimental design involving electrical stimulation of excitatory and inhibitory MNs.

## Materials and Methods

### Preparations

Specimens including the gastroesophageal junction and the esophagus were obtained from 47 adult pigs (age, 6 months; weight, 75-80 Kg) according our previous studies (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; Lecea *et al.*, 2009). The experimental protocols were approved by the Ethical Review Board of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain. Four to six transverse strips of EB muscle, 3-mm wide, were prepared from each pig, 3-5 cm above LES, and in additional experiments, we also studied smooth muscle strips from 5 to 6 cm above LES (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; Lecea *et al.*,

2009). We observed that the overall esophageal length was 20-24 cm with 5-7 cm of distal smooth muscle.

**(i) Organ bath studies:** Final strips measuring 10 mm in length were placed in 15-mL organ baths containing a standard Krebs solution constantly bubbling with 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub> and, after 30-min incubation, strips were stretched up to 150% of their initial length and stabilized (Farré *et al.*, 2006). Weight of the EB strips was  $0.34 \pm 0.01$  g,  $n = 43$ . Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (model 03 Force Transducer, Grass Instruments Co., Quincy, MA, USA), and recorded on a computer using the data acquisition software AcqKnowledge 3.7.2 (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). Electrical field stimulation was applied by means of an electrical stimulator (Model S88, Grass Instruments Co., West Warwick, RI, USA) and a power booster (Stimu-Splitter II, Med-Lab Instruments, Loveland, CO, USA) (Farré *et al.*, 2006).

**(ii) Electrophysiological studies:** Circular EB muscle strips were placed in a Sylgard-coated chamber continuously perfused with Krebs solution at  $37 \pm 1$  °C (Gallego *et al.*, 2006). Smooth muscle cells from the circular layer were impaled with glass microelectrodes (40-60 M $\Omega$ ) filled with 3 mol L<sup>-1</sup> KCl. Membrane potential was measured using standard electrometer Duo773 (WPI Inc., Sarasota, FL, USA). Tracings were displayed on an oscilloscope 4026 (Racal-Dana Ltd., Windsor, Berkshire, England) and simultaneously digitalized (100 Hz) using PowerLab 4/30 system and Chart 5 software for Windows (all from ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). The EFS was applied using two silver chloride plates placed perpendicular to the longitudinal axis of the preparation and 1.5 cm apart. Nifedipine (1  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>) was used to abolish the mechanical activity during electrophysiological experiments and obtain stable impalements.

### Solutions and Drugs

N, N, N, N', N', N' – Hexamethyl – 1, 6 - hexanediaminium dichloride (hexamethonium dichloride), *N* $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME),  $\alpha$ -chymotrypsin, apamin, phentolamine hydrochloride, atropine sulfate salt monohydrate, carbamoylcholine chloride (carbachol, CCh) were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Tetrodotoxin (TTX), the selective NK<sub>2</sub> receptor antagonist (NK-2ra) N-(Bz)-Ala-Ala-D-Trp-Phe-D-Pro-Pro-Nle-NH<sub>2</sub> (GR94800), propranolol hydrochloride, the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ondansetron hydrochloride (GR 38032), the competitive antagonist for P2Y<sub>1</sub> receptors MRS2179 (2'-Deoxy-

*N*<sup>6</sup>-methyladenosine 3',5'-bisphosphate tetrasodium salt), and the antagonist for the P2X<sub>1,2,3</sub> receptors NF279 (8,8'-[Carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt) were purchased from Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK).

The selective NK<sub>1</sub> receptor antagonist, besylate of nelpitantium (SR140333) was a kind gift from Dr X. Emonds-Alt (Sanofi Recherche, Montpellier Cédex, France). The 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist 4-amino-N-[1-(cyclohex-3-en-1-ylmethyl)piperidin-4-yl]-2-ethoxy-5-nitrobenzamide (cinitapride l-tartrate) was a kind gift from Dr. Ángel Navarro (Laboratorios Recordati España, Madrid, Spain). All drugs were dissolved in distilled water except for SR140333, which was dissolved with < 0.0001% (v/v) ethanol (Lecea *et al.*, 2009). In preliminary experiments, we found that EFS-induced responses did not decrease significantly over time or by the effect of vehicles used in the present study, as distilled water and ethanol (data not shown).

## Experimental Design

**Organ bath studies:** Our experimental design included: (i) the effect of direct stimulation of both excitatory and inhibitory MNs by EFS on EB contractions; (ii) the characterization of these responses with neurotoxins and specific antagonists of neurotransmitters released by excitatory or inhibitory MNs; and (iii) the modulation of these motor responses in the EB through antagonists of ganglionic receptors and (iv) the characterization of the effect of the prokinetic agent, cinitapride. Antagonists were added to the bath 30 min before the stimulation of inhibitory and/or excitatory MNs by EFS, with the exception of  $\alpha$ -chymotrypsin and cinitapride which were added 10 min before. Reported concentrations are final bath concentrations.

### 1. Neural origin of electrical field stimulation-induced responses

A frequency-dependent curve of the effect of EFS on EB strips was plotted to study both *latency* and *amplitude* of contraction responses induced by stimulation of MNs, using the same electrical conditions as in our previous studies on the human (González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011) and porcine esophagus (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; Lecea *et al.*, 2009). The neural origin of EFS-induced responses was assessed by the neurotoxin tetrodotoxin (TTX 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

### 2. Neurotransmitters involved in the origin of esophageal responses following stimulation of inhibitory and excitatory enteric motor neurons by electrical field stimulation

Three different protocols were conducted during direct and simultaneous stimulation of inhibitory and excitatory MNs by EFS and sequential addition of antagonists to assess the nature and effects of the released neurotransmitters on *latency* and *amplitude* of contractions, as in our previous studies (Lecea *et al.*, 2011; Opazo *et al.*, 2011). We assessed the effect of L-NAME (1 mmol L<sup>-1</sup>), atropine (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), MRS2179 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U mL<sup>-1</sup>), SR140333 (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), and GR94800 (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) on EFS-induced responses.

### 3. Modulation of responses to electrical field stimulation of enteric motor neurons by antagonist of ganglionic neurotransmitters

We also assessed the effect of hexamethonium (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), ondansetron (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), and NF279 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) on *amplitude/frequency* of EFS-induced responses (Lecea *et al.*, 2009).

### 4. Effect of the prokinetic agent cinitapride

We explored the effect of cinitapride (0.1-100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) on *latency* and *amplitude* of maximal EB contractions at 20 Hz in standard Krebs solution and, also, in NANNNP Krebs solution (Lecea *et al.*, 2009). The effect of cinitapride on smooth muscle cells was assessed on EB strips precontracted with carbachol (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  or 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) in the presence of TTX 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Electrophysiological studies:** Two protocols with different EFS parameters were carried out: **Protocol A:** total duration of train, 100 ms; frequency, 20 Hz; pulse duration, 0.3 ms, 8-40 V. **Protocol B:** longer pulses of 5 s (supramaximal voltage 32 V, 0.3 ms) were performed at 1 Hz (5 pulses: P1 to P5) and 5 Hz (25 pulses) (Gallego *et al.*, 2008). In each protocol, the *amplitude* and *duration* of inhibitory junction potential (IJPs) were evaluated before and after the

sequential addition of atropine (1  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ), MRS2179 (10  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ ),  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U  $\text{mL}^{-1}$ ), and L-NAME (1  $\text{mmol mL}^{-1}$ ). The effect of these drugs on the resting membrane potential (RMP) was also measured.

### Data Analysis and Statistics

Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, and  $n$  depicts number of animals. *Latency* of EFS contractions was defined as the period of time (expressed in s) from the beginning of EFS to the onset of contraction. Maximal *amplitude* of EFS contractions (expressed in g) was also measured (Aulí *et al.*, 2008; González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011).

The effect of specific antagonists for excitatory and inhibitory neurotransmitters on *latency* and *amplitude* of EB contractions was analysed using two-way ANOVA (González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011). Contraction was expressed in grams. *t*-test was selected for comparisons, using the paired mode when appropriate. When *t*-test was significant, the Bonferroni test was carried out to determine the frequencies of statistically different responses.

The differences between *amplitude* and *duration* of the IJPs before and after drug infusion were compared by two-way ANOVA (drug and voltage) followed by Bonferroni post-hoc test, the differences in the RMP and the pulses of 1 Hz and 5 Hz were assessed by one-way ANOVA and followed by Bonferroni post-hoc test using GraphPad prism 4 (Version 4.01, La Jolla, CA, USA). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### (a) Organ bath studies in the distal esophageal body

#### **1. Neural origin of electrical field stimulation-induced responses**

Esophageal body strips did not develop active tone after the 2-h equilibration period ( $n = 85$ ). In experiments with standard Krebs solution, EB strips responded to EFS (transmural, pulses of 0.4 ms duration, frequency 0.3-20 Hz, 5 s trains, 26 V (Farré *et al.*, 2007; Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011; Lecea *et al.*, 2009) with an *on*-contraction ( $1.6 \pm 0.1$  g) at the beginning of the stimulus and an *off*-contraction ( $16.9 \pm 0.9$  g) following the end of the stimulus (*latency period*), both frequency-dependent (Fig. 1, left panel curve).

The neurotoxin TTX (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ( $n = 11$ ,  $P < 0.001$ ) almost completely abolished the *off*-contraction, further confirming that EFS responses are mainly caused by stimulation of both excitatory and inhibitory MNs. In contrast, *on*-contractions observed in control conditions were unaffected by TTX (not shown).

#### **2. Neurotransmitters involved in the origin of esophageal responses following stimulation of inhibitory and excitatory enteric motor neurons by electrical field stimulation**

##### **Protocol 1. Effect of NO.**

Blockade of NO synthesis by L-NAME (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) strongly reduced *latency* ( $-66.1 \pm 4.1\%$ ,  $n = 16$ ,  $P < 0.001$ ) at 20 Hz, switching *off*-contraction to an *on*-contraction during EFS with significant inhibition of *amplitude* ( $-61.2 \pm 7.2\%$  at 3 Hz,  $n = 16$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1). Sequential addition of MRS2179 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly reduced *latency* at lower frequencies, switching *off*-contraction to an *on*-contraction, with additional reduction in *amplitude* (Fig. 1). Subsequent cholinergic blockade by atropine (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly increased *latency* at all frequencies tested ( $n = 16$ ,  $P < 0.001$ ), switching *on*-contraction to an *off*-contraction after EFS, and greatly reduced *amplitude* ( $n = 16$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 1).

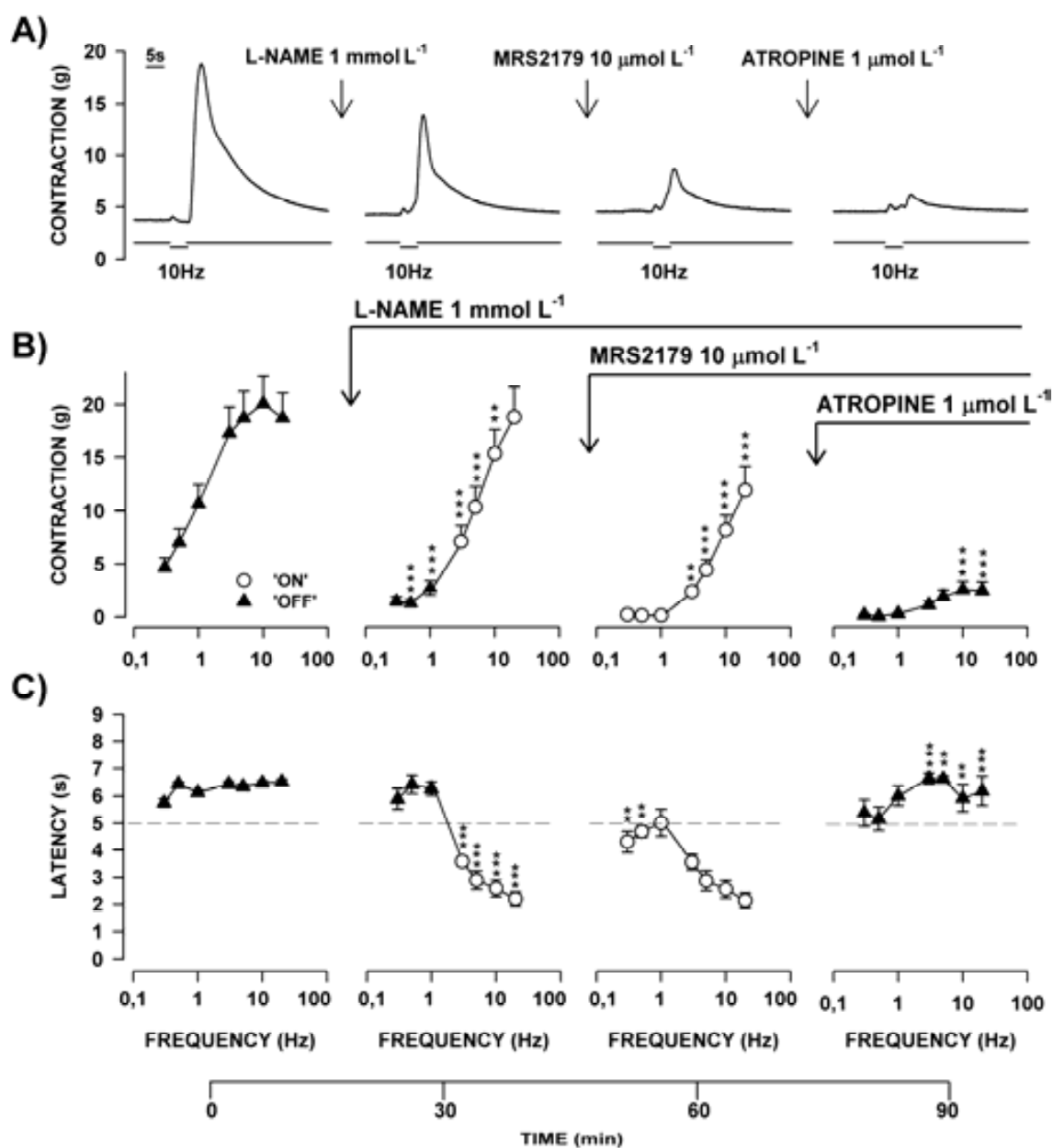
##### **Protocol 2. Effect of purines and $\alpha$ -chymotrypsin.**

In this second set of experiments, blockade of P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) did not affect *latency* at any frequency tested, but significantly reduced *amplitude* of contractions at higher frequencies (Fig. 2).

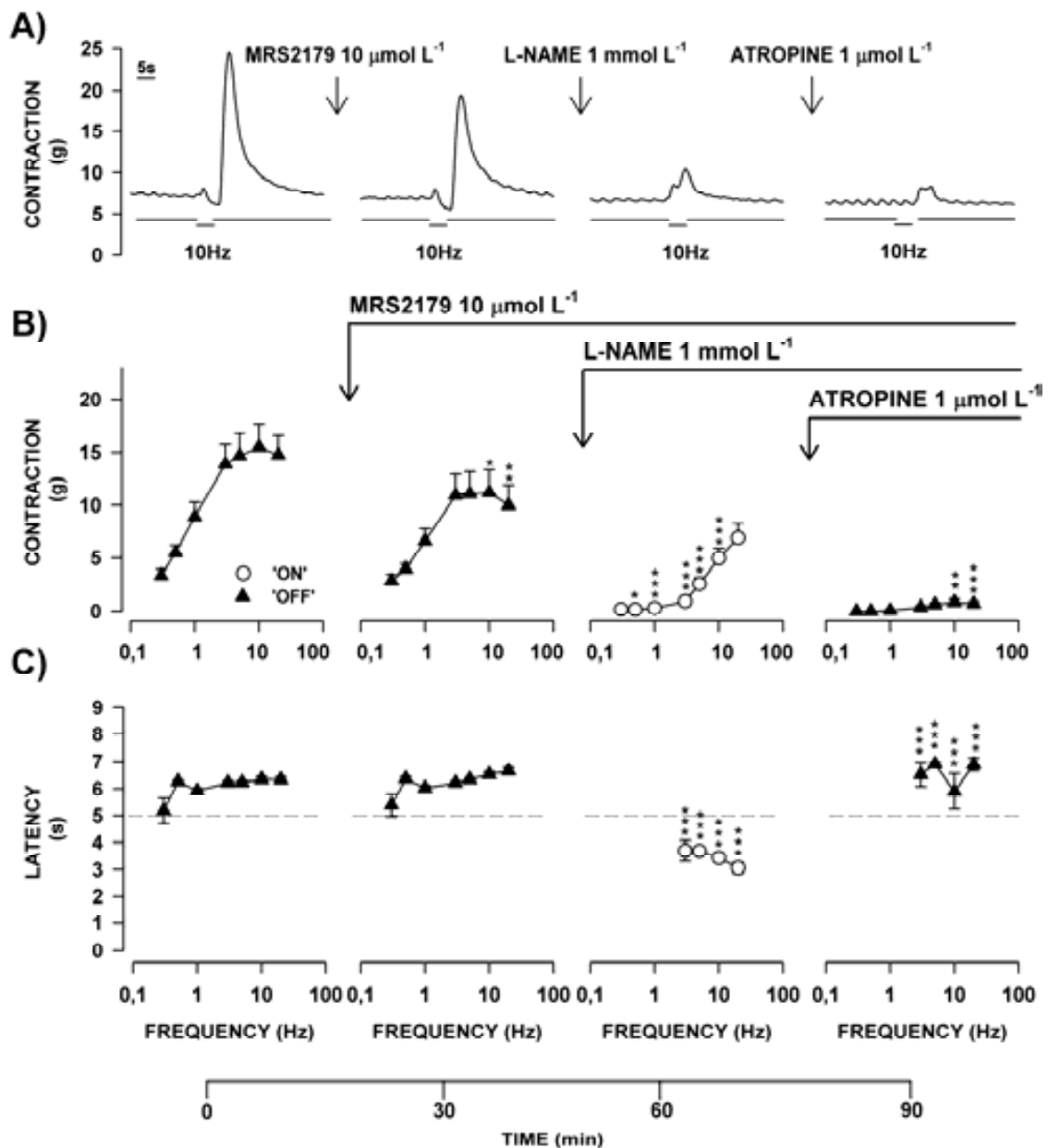
Sequential addition of L-NAME (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) strongly reduced both *latency* and *amplitude* ( $n = 12$ ,  $P < 0.001$ ), switching *off*-contraction to an *on*-contraction during EFS ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

Subsequent addition of atropine (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly increased *latency* ( $n = 12$ ,  $P < 0.001$ ), switching *on*-contraction to an *off*-contraction after EFS with strong inhibition of *amplitude* ( $n = 12$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

In an independent set of studies,  $\alpha$ -chymotrypsin (10 U  $\text{mL}^{-1}$ ) did not affect *latency*, but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies ( $-31.3 \pm 7.0\%$ , 10 Hz,  $n = 4$ ,  $P < 0.01$ ). Sequential addition of L-NAME did not block *latency* (not shown) suggesting a minor role for VIP on inhibitory neurotransmission.



**Figure 1. Protocol 1: Sequential nitrenergic, purinergic, and cholinergic blockade.** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on *amplitude* (B) and *latency* (C) of EB contractions. Blockade of nitric oxide synthesis by L-NAME (1 mmol L<sup>-1</sup>) decreased *latency* and reduced *amplitude*. MRS2179 (10 μmol L<sup>-1</sup>) decreased *latency* at lower frequencies and reduced *amplitude* of *on*-contraction. Atropine (1 μmol L<sup>-1</sup>) enhanced *latency* and almost blocked *amplitude*. ( $n = 16$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

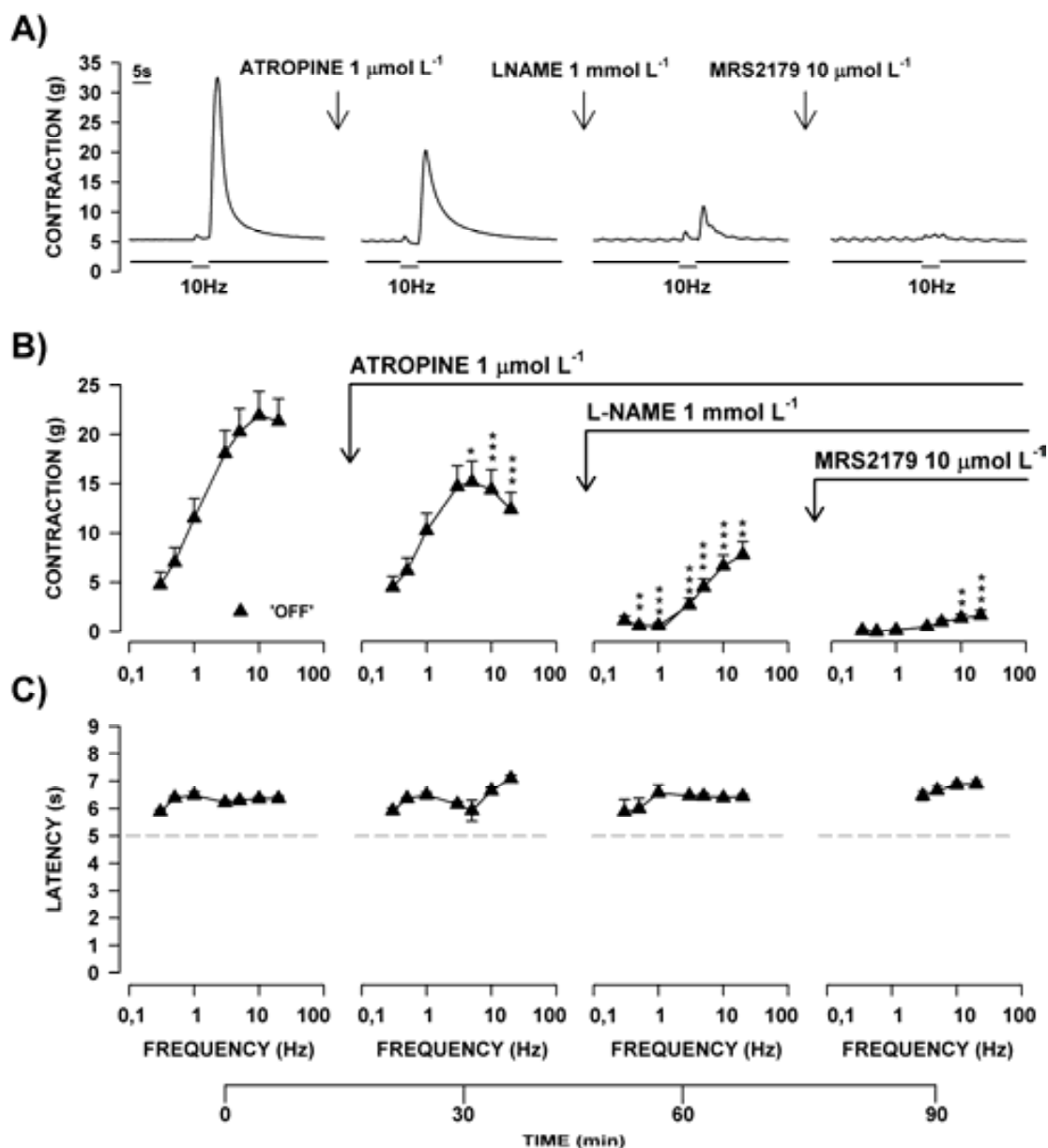


**Figure 2. Protocol 2: Sequential purinergic, nitrgic, and cholinergic blockade.** Blockade of purinergic P2Y<sub>1</sub> receptors by MRS2179 (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) did not affect *latency*, but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies of stimulation. L-NAME (1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) decreased *latency* and *amplitude*. Atropine (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly enhanced *latency* and almost blocked *amplitude* of these *off*-contractions. ( $n = 12$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

**Protocol 3. Cholinergic effects.**

When atropine ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) was used at the beginning of the experiment, it did not affect *latency*, but significantly reduced *amplitude* of contractions at frequencies above 5 Hz ( $n = 15, P < 0.01$ ) (Fig. 3). Sequential addition of L-NAME ( $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) significantly reduced *amplitude* of

contractions at all frequencies tested ( $n = 15, P < 0.001$ ) and subsequent addition of MRS2179 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) significantly reduced *amplitude* of contractions at frequencies above 5 Hz ( $P < 0.001$ ) (Fig. 3). All EFS-induced responses remained *off-contraction* type throughout this protocol (Fig. 3).



**Figure 3. Protocol 3: Sequential cholinergic, nitroergic, and purinergic blockade.** Atropine ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) did not affect *latency*, but reduced *amplitude* of *off-contractions* and prevented the effect of L-NAME ( $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) and MRS2179 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) on *latency*. ( $n = 15, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001$  vs previous response).

#### **Protocol 4. Effect of tachykinergic neurotransmitters.**

The sequential addition of the NK<sub>1</sub> [SR140333 (1 μmol L<sup>-1</sup>)] and NK<sub>2</sub> [GR94800 (1 μmol L<sup>-1</sup>)] (Lecea *et al.*, 2009) receptor antagonists did not affect *latency*, but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies [(-20.9 ± 7.1%, 20 Hz, *n* = 6, *P* < 0.05) and (-28.0 ± 4.8%, 20 Hz, *n* = 6, *P* < 0.01), respectively]. In these sequential experiments, further cholinergic blockade by atropine (1 μmol L<sup>-1</sup>) also significantly increased *latency* (+15.4 ± 1.07%, 20 Hz, *n* = 6, *P* < 0.001) and reduced *amplitude* of *off*-contractions (-61.6 ± 2.1%, 20 Hz, *n* = 6, *P* < 0.001).

#### **3. Modulation of responses induced by electrical field stimulation of motor neurons by antagonists of ganglionic neurotransmitters**

In separate experiments, we found that the nicotinic antagonist, hexamethonium (100 μmol L<sup>-1</sup>); the antagonist for the P2X<sub>1,2,3</sub> receptors, NF279 (10 μmol L<sup>-1</sup>), and the selective 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, ondansetron (1 μmol L<sup>-1</sup>), did not affect *latency*, but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies (10 Hz: -18.9 ± 3.3%, *n* = 7; -20.7 ± 3.5%, *n* = 9; and 20 Hz: -16.3 ± 3.2%, *n* = 8, *P* < 0.01; respectively).

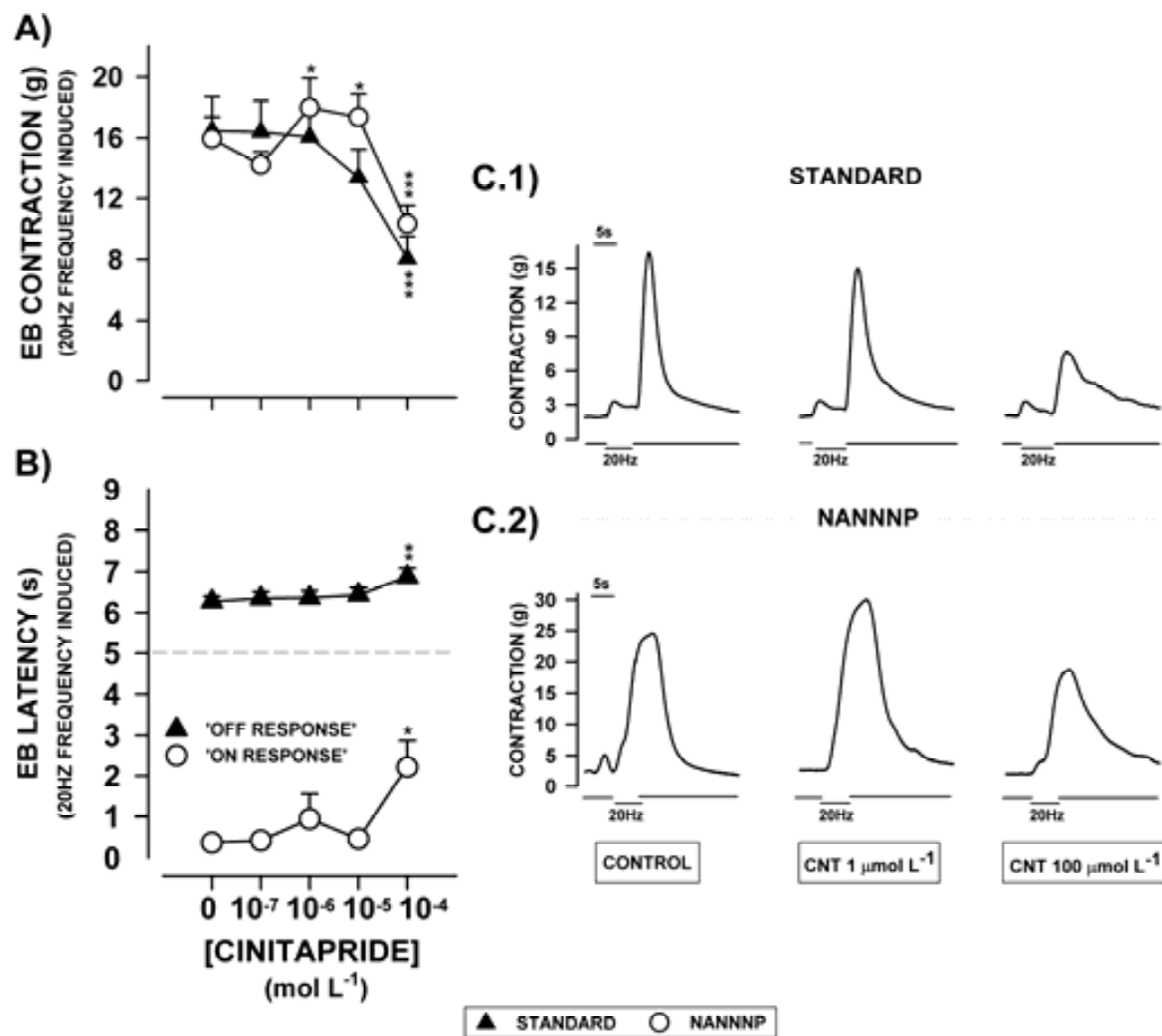
#### **4. Effect of the 5-HT<sub>4</sub> agonist cinitapride**

In standard conditions (Standard Krebs solution), cinitapride (0.1-100 μmol L<sup>-1</sup>) significantly increased *latency* and decreased *amplitude* of EB contraction response to 20 Hz in a concentration-dependent manner (Fig. 4A-C.1). Similarly, we found cinitapride increased *latency* of EB contraction (Fig. 4B) in strips studied in NANNNP Krebs solution to assess cinitapride's effect on excitatory MNs, and had a dual effect on *amplitude* of EB as *amplitude* of contraction increased at a concentration range of 1–10 μmol L<sup>-1</sup> (*n* = 4, *P* < 0.05) and decreased at 100 μmol L<sup>-1</sup> (*n* = 4, *P* < 0.001 *vs* control response; (Fig. 4A and C.2)).

These results suggest that cinitapride acts on 5-HT<sub>4</sub> receptors located in excitatory and inhibitory esophageal MNs in the EB.

Finally, to assess whether cinitapride has any direct effect on smooth muscle contractility in the EB, the compound was also tested against a submaximally effective carbachol-induced contraction in the presence of TTX 1 μmol L<sup>-1</sup>. We found that, in the presence of cinitapride 100 μmol L<sup>-1</sup>, the contractions to carbachol 10 μmol L<sup>-1</sup> were significantly reduced by -41.2 ± 3.8% (*n* = 4, *P* < 0.05 *vs* control response), suggesting a direct inhibitory effect of stimulation of 5-HT<sub>4</sub> receptors by cinitapride on esophageal smooth muscle cells.



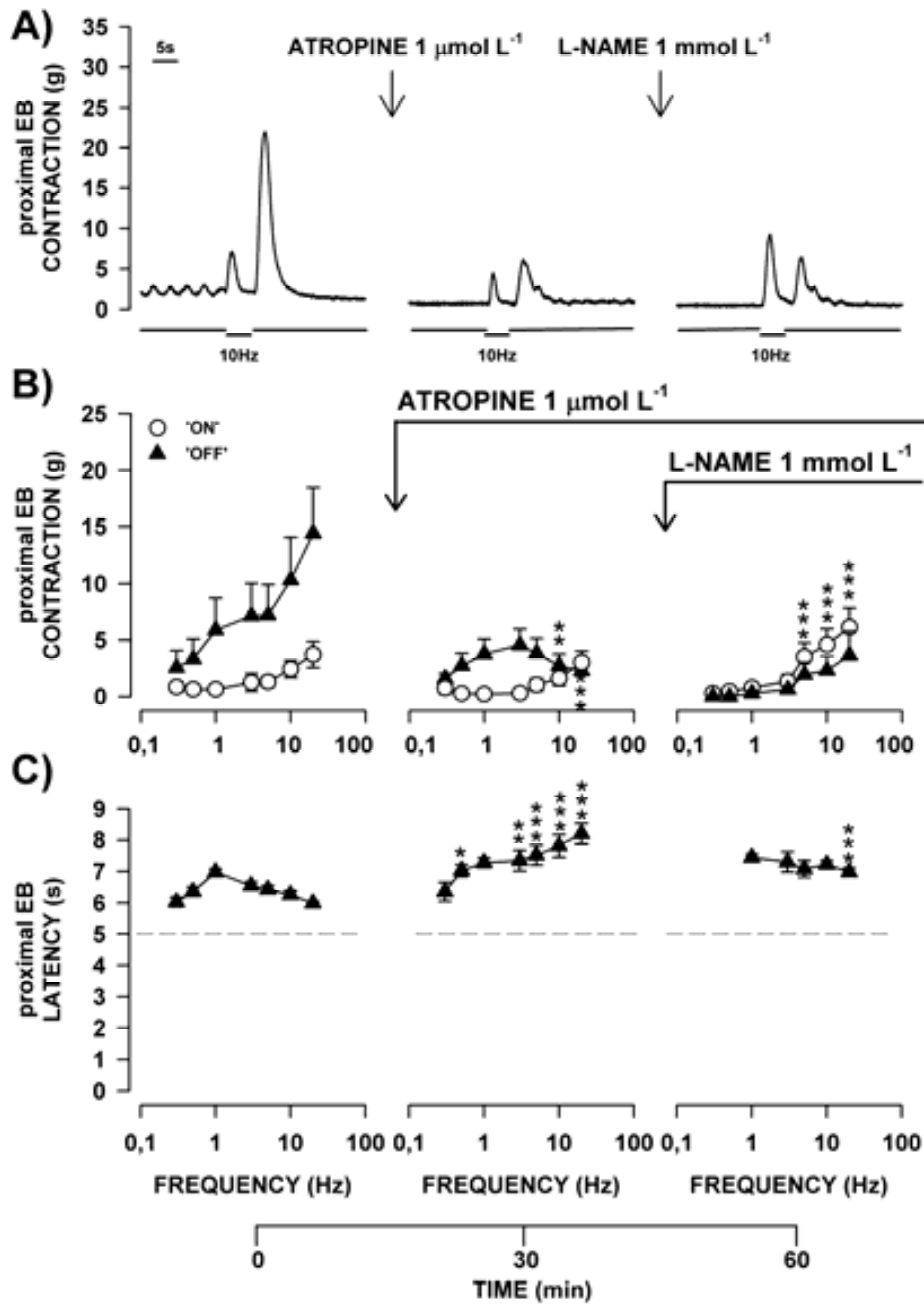


**Figure 4.** Effect of cinitapride on electrical field stimulation contractions (20 Hz). Esophageal body strips in a Standard Krebs solution ( $n = 8$ ) and esophageal body strips in a NANNNP Krebs solution ( $n = 4$ ). (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control response).

**(b) Organ bath studies in the proximal smooth-muscle esophageal body**

Esophageal body strips obtained from the upper part of the smooth muscle esophageal body responded to EFS in control conditions with an *on*-contraction ( $3.7 \pm 1.1$  g) followed by an *off*-contraction ( $14.4 \pm 4.1$  g); (Fig. 5, left panel curve). Atropine ( $1 \mu\text{mol}$

$\text{L}^{-1}$ ) significantly reduced *amplitude* of *off*-contraction ( $n = 4, P < 0.001$ ), increased its *latency* ( $n = 4, P < 0.001$ ), and did not affect *amplitude* of *on*-contraction (Fig. 5). Subsequent addition of L-NAME ( $1 \text{mmol L}^{-1}$ ) significantly increased *amplitude* of *on*-contraction ( $n = 4, P < 0.001$ ) and reduced *latency* of *off*-contraction ( $n = 4, P < 0.001$ ) (Fig. 5).

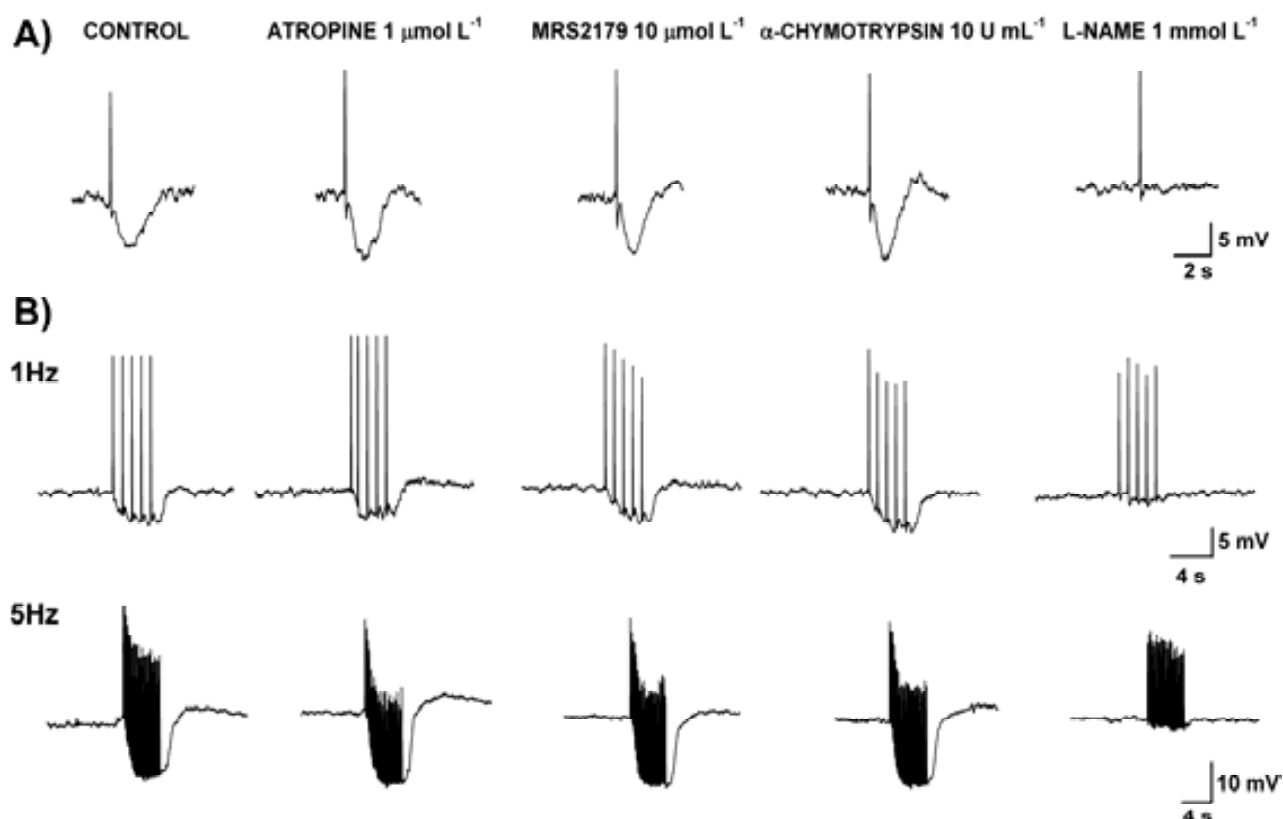


**Figure 5. Proximal smooth muscle esophageal body.** Representative tracings (A) and quantitative effects on (B) *amplitude* and (C) *latency* of frequency-related (0.3-20 Hz) contractions in the proximal smooth EB. Atropine significantly enhanced *latency* and reduced *amplitude* of *off*-contraction. ( $n = 4, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001$  vs previous responses).

**(c) Electrophysiological studies in the esophageal body**

The RMP of the EB strips was  $-41.26 \pm 2.03$  mV ( $n = 4$ ), and was unaffected by atropine, MRS2179,  $\alpha$ -chymotrypsin or L-NAME (data not shown). **Protocol A:** Single EFS pulses caused an IJP with a monophasic profile and a voltage-dependent amplitude (Fig. 6A). The maximal amplitude and duration of IJP was  $5.48 \pm 0.9$  and  $3 \pm 0.24$  s, respectively. The amplitude and duration of the IJP were unaffected by atropine, by the P2Y<sub>1</sub> antagonist

MRS2179 and by  $\alpha$ -chymotrypsin. In contrast, both amplitude and duration were fully abolished by  $1$  mmol L<sup>-1</sup> L-NAME ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ). **Protocol B:** pulses at 1 and 5 Hz also originated a sustained monophasic IJP (amplitude:  $6.88 \pm 1.14$  mV, 1 Hz pulse;  $13.79 \pm 1.9$  mV 5 Hz pulse) unaffected by atropine, MRS2179 or  $\alpha$ -chymotrypsin and fully blocked by L-NAME, (notice that at 5 Hz a residual slight response of about 1-2 mV still remains) ( $n = 4$ ,  $P < 0.001$ ) (Fig. 6B). Both protocols showed NO mediated this hyperpolarization.



**Figure 6. Electrophysiological studies on porcine esophageal body.** Intracellular microelectrode recordings showing (A) the sequential effect of atropine  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , MRS2179  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $\alpha$ -chymotrypsin  $10 \text{ U mL}^{-1}$  and L-NAME  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  on the EFS-induced IJP elicited at  $40 \text{ V}$  in distal EB strips, and (B) the EFS-induced IJPs obtained during 5-s at 5 Hz (25 pulses) and 1 Hz (5 pulses). ( $n = 4$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).

### Discussion

The aim of this study was to characterize the neuronal mechanisms and neurotransmitters involved in origin and modulation of porcine EB peristalsis. Our results suggest a major role for excitatory MNs releasing ACh and tachykinins, which control *amplitude* of contractions, and a major role for inhibitory MNs releasing NO and a purine acting on P2Y<sub>1</sub> receptors, which control *latency* time of porcine esophageal contractions. However, we also found a complex interplay between these excitatory and inhibitory MNs controlling each of these two critical motor events which produce EB peristalsis. *Amplitude* of EB contraction also depended on prominent effects of inhibitory MNs with NO, purines, and peptidergic neurotransmitters acting as strong modulators of the excitatory neuroeffector transmission. *Latency* and timing of this contraction also depended on activation of excitatory MNs releasing ACh. The contribution of cholinergic MNs on the timing of these EB contractions is very relevant, as we found cholinergic blockade prevented the effect of specific antagonists of inhibitory neurotransmitters on *off*-contraction *latency*. In addition, in our preparations, the antagonists of nAChRs, P2X, and 5-HT<sub>3</sub> receptors expressed by MNs did not exert significant influences on *latency* and only minor reductions in contraction *amplitude*. We explored the effects of the 5HT<sub>4</sub> receptor agonist, cinitapride, and found that the net effects of this compound on EB peristalsis were a balance of excitatory effects on both excitatory and inhibitory MNs and direct inhibition of smooth muscle cells contractility. Finally, we found that the IJP in the EB was fully nitrenergic.

Classical in vivo (Anand & Paterson, 1994; Dodds *et al.*, 1978; Sugarbaker *et al.*, 1984; Yamato *et al.*, 1992) and in vitro (Christensen *et al.*, 1979; Crist *et al.*, 1984a; Crist *et al.*, 1984b; Tøttrup *et al.*, 1990; Weisbrodt & Christensen, 1972) studies proposed that the normal peristaltic wave was a result of the interaction of mixed innervation along the esophagus. Excitatory MNs might activate EB contraction by neuroeffector excitatory neurotransmitters release directly depolarizing the EB smooth muscle. Studies found *amplitude* of EB *off*-contractions was significantly reduced by atropine, suggesting that ACh released from excitatory MNs was involved in this response (Crist *et al.*, 1984b; Paterson *et al.*, 2006; Preiksaitis & Laurier, 1998; Preiksaitis *et al.*, 1994; Tøttrup *et al.*, 1990). In our study, we also found a strong atropine-insensitive component in the nerve-evoked responses with the largest contribution in *off*-contraction accounting for approximately 60% to

70% of the response. Previous human (Krysiak & Preiksaitis, 2001; Tøttrup *et al.*, 1990) and animal (Crist *et al.*, 1984a; Preiksaitis & Laurier, 1998) studies also identified this atropine-insensitive component, and tachykinins through NK<sub>2</sub> receptors were found to mediate this response (Krysiak & Preiksaitis, 2001). We also found a modest contribution of NK<sub>2</sub> receptors in the porcine esophageal contraction. On the other hand, inhibitory neurons might cause contraction through a “rebound” depolarization following an initial hyperpolarization (Paterson, 2006). Previous in vitro animal studies also found that NOS inhibition with L-NNA, or ODQ, attenuated or even abolished the *off*-response (Crist *et al.*, 1984b; Murray *et al.*, 1991). The inhibitory effect of  $\alpha$ -chymotrypsin on *amplitude* can also be attributed to a similar mechanism of hyperpolarization inhibition. Both nitrenergic and purinergic neurotransmitter antagonists significantly reduced *amplitude* of electrically-induced *off*-contractions, either in combination or independently of the addition order (Aulí *et al.*, 2008). The purinergic inhibition may suggest a modulation of cholinergic neurons by excitatory P2Y<sub>1</sub> receptors in accordance with results of our recent study on the human esophagus (Lecea *et al.*, 2011). Moreover, a recent work on feline smooth muscle also found a role for ATP through P2Y receptors mediating EFS-induced contractions (Cho *et al.*, 2010).

A gradient of increasing inhibitory neural influence causing *off*-contractions *latency* progressing aborally along the esophagus results in peristaltic propagation of contractions along the esophagus (Crist *et al.*, 1984b; Lecea *et al.*, 2011). We found two interesting things: (i) both nitrenergic and purinergic blockade were necessary to fully block *latency* and switch *off*-contraction to *on*-contraction; and (ii) the effect of these inhibitory neurotransmitters on *latency* depended on the functional cholinergic MNs integrity, as atropine prevented the effect of antagonists of these neurotransmitters. These results suggest that *latency* was mainly caused by stimulation of inhibitory enteric MNs releasing NO and a minor contribution of a second non-nitrenergic neurotransmitter, probably ATP, acting at P2Y<sub>1</sub> receptors (Farré *et al.*, 2006). Interestingly, when purinergic blockade was first carried out, MRS2179 did not affect *latency*, which was only blocked after sequential addition of L-NAME, switching the response to *on*-contractions, showing that both inhibitory antagonists were needed. Cholinergic blockade increased *latency* of all responses and prevented the effects of L-NAME and MRS2179. This suggests that L-NAME and MRS2179 inhibitory effect on *latency* was dependent on cholinergic transmission integrity. This paradox was already observed in previous

experiments that found postjunctional mechanical and electrophysiological effects of neurally-released NO were not apparent in guinea-pig taenia coli, when atropine was present (Knudsen & Tøttrup, 1992; Ward *et al.*, 1996). It still remains unclear how atropine prevents all these NO-dependent responses. Some theories proposed muscarinic regulation of NO release or muscarinic regulation of another excitatory neurotransmitter (tachykinins), which, when blocked, masked the NO postjunctional effects (Ward *et al.*, 1996). These studies argued that NO may have a neuromodulatory role controlling other neurotransmitters release in addition to a primary inhibitory neuroeffector neurotransmitter (Ward *et al.*, 1996).

Our results also agree with earlier *in vitro* studies in opossum (Christensen *et al.*, 1979; Cohen & Green, 1974), which described the cholinergic agents influence on non-cholinergically mediated esophageal contractions. Those studies reported that cholinergic agonists reduced *latency* in the distal esophagus and suggested that peristaltic velocity could be modulated *in vivo* by changes in the acetylcholine levels acting on smooth muscle. In strips from the upper part of smooth muscle EB, we observed that atropine increased *latency*. In a classical *in vitro* study on opossum, Crist *et al.*, found that atropine increased *off-contraction latency* in both proximal and distal EB regions (Crist *et al.*, 1984b). *In vivo* studies with vagal stimulation also in the opossum showed that atropine increased *off-contraction latencies* in the proximal esophagus and had little or no effect in the most distal portions, agreeing with our results (Dodds *et al.*, 1978). Dodds *et al.*, studied the effect of atropine on primary peristalsis in human esophagus, and found that atropine increased *latency* of contractions at all esophageal sites, but particularly in the proximal smooth muscle part (Dodds *et al.*, 1981). We also found this mechanism in the porcine EB and agree with the potential value of this cholinergic-dependent mechanism as a pharmacological target to modulate the velocity of EB peristalsis.

In the intracellular recordings, we found that neither MRS2179 nor  $\alpha$ -chymotrypsin affected *amplitude* and *duration* of IJP. In contrast, L-NAME fully blocked this response showing that esophageal IJP is fully nitrenergic under these particular stimulation conditions of inhibitory MNs. We also found an identical discrepancy between the inhibitory mechanical (nitrenergic and purinergic) and electrophysiological (only nitrenergic) responses in the human esophagus (Lecea *et al.*, 2011), and we have attributed it to differences in the electrical stimulus of each technique. nAChRs, P2X and 5-HT<sub>3</sub> receptors are LGIC expressed by MNs. These receptors respond to synaptically released

neurotransmitters, circulating hormones, and locally released substances and have been proposed as useful targets for drugs to treat gastrointestinal function disorders (Galligan, 2002). We previously found selective mechanisms for excitatory and inhibitory motor pathways stimulation through nAChRs, P2X, and 5HT<sub>3</sub> receptors in the porcine LES with potential therapeutic implications (Lecea *et al.*, 2009). The functional significance of these receptors in the synaptic transmission to excitatory and inhibitory MNs in the EB remains unclear; we found a more modest and uniform effect of nicotinic, P2X, and 5-HT<sub>3</sub> antagonists on EB physiology with a slight decrease in *amplitude* and without effects on *latency* response. Our results suggest the presence of nAChRs, 5-HT<sub>3</sub>, and P2X receptors in the neural excitatory motor pathway to the EB (Galligan, 2002; Lecea *et al.*, 2009).

An ideal prokinetic agent in the EB should mainly increase *amplitude* and contractility of EB peristalsis. We explored the effects of cinitapride on EB motility in our experimental model. Cinitapride is a prokinetic agent widely used in clinical practice for the treatment of motility disorders associated with delayed gastrointestinal transit (Gallego Santos *et al.*, 1991) and gastro-esophageal reflux disease (Surós *et al.*, 1992). Cinitapride's main pharmacological mechanism of action is as an agonist of 5-HT<sub>4</sub> receptors and, to a lesser extent, as an agonist of 5-HT<sub>1</sub> and as an antagonist of 5-HT<sub>2</sub> receptors (Fernández & Roberts, 1991). In our study, we used a NANNNP Krebs solution to investigate the effect of cinitapride on excitatory MNs and three different actions of the 5-HT<sub>4</sub> agonist were obtained: (i) at lower concentrations, cinitapride enhanced of EFS-*on* contractions *amplitude*; (ii) at concentrations greater than 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , it reduced *amplitude* of cholinergic EFS-induced responses; and (iii) it enhanced *latency* of these contractions. The *amplitude* and *latency* enhancement can be attributed to a stimulant effect of the 5-HT<sub>4</sub> agonist on both excitatory and inhibitory MNs (Cellek *et al.*, 2006). We also observed that the EB *off-contractions* were reduced by higher concentrations of cinitapride, an effect that can be attributed to functional antagonism of the EFS-induced contraction due to activation of the inhibitory smooth muscle 5-HT<sub>4</sub> receptors, as it affected the tone elevated by carbachol (Cellek *et al.*, 2006; Leclere *et al.*, 2005). Thus, in our preparations, cinitapride minimally affected *amplitude* and *latency* of EB contractions. These net effects of cinitapride on EB peristalsis are dependent on concentration and are a balance of excitatory effects on both excitatory and inhibitory MNs and direct contractility inhibition of smooth muscle cells. Taken together, our results suggest minor effects on EB peristalsis by agonist and

antagonists of receptors expressed by neurons in the esophageal MP and, in contrast, strong effects by pharmacological modulation of neuromuscular neurotransmission. Future studies should explore the effect of compounds acting at the neuromuscular transmission level and target them for drugs aiming to improve EB peristalsis.

### REFERENCES

- Anand N & Paterson WG (1994). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am J Physiol* **266**: G123-31.
- Aulí M, Martínez E, Gallego D, Opazo A, Espín F, Martí-Gallostra M, Jiménez M & Clavé P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**: 1043-55.
- Cellek S, John AK, Thangiah R, Dass NB, Bassil AK, Jarvie EM, Lalude O, Vivekanandan S & Sanger GJ (2006). 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists enhance both cholinergic and nitrergic activities in human isolated colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 853-61.
- Christensen J, Arthur C & Conklin JL (1979). Some determinants of latency of off-response to electrical field stimulation in circular layer of smooth muscle of opossum esophagus. *Gastroenterology* **77**: 677-81.
- Christensen J & Lund GF (1969). Esophageal responses to distension and electrical stimulation. *J Clin Invest* **48**: 408-19.
- Christinck F, Jury J, Cayabyab F & Daniel EE (1991). Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic, noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* **69**: 1448-58.
- Cohen S & Green F (1974). Force-velocity characteristics of esophageal muscle: effect of acetylcholine and norepinephrine. *Am J Physiol* **226**: 1250-6.
- Crist J, Gidda JS & Goyal RK (1984a). Characteristics of "on" and "off" contractions in esophageal circular muscle in vitro. *Am J Physiol* **246**: G137-44.
- Crist J, Gidda JS & Goyal RK (1984b). Intramural mechanism of esophageal peristalsis: roles of cholinergic and noncholinergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 3595-9.
- Cho YR, Jang HS, Kim W, Park SY & Sohn UD (2010). P2X and P2Y receptors mediate contraction induced by Electrical Field Stimulation in feline esophageal smooth muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**: 311-6.
- Dodds WJ, Christensen J, Dent J, Wood JD & Arndorfer RC (1978). Esophageal contractions induced by vagal stimulation in the opossum. *Am J Physiol* **235**: E392-401.
- Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ & Arndorfer RC (1981). Effect of atropine on esophageal motor functions in humans. *Am J Physiol* **240**: G290-6.
- Du C, Murray J, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of NANC hyperpolarization of opossum esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* **261**: G1012-6.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Estrada O, Suñol X & Clavé P (2007). Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**: 1427-36.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Martínez E & Clavé P (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-48.
- Fernández AG & Roberts DJ (1991). Cinitapride hydrogen tartrate. *Drugs* **16**: 885-92.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Aulí M, Clavé P & Jiménez M (2008). Purinergic and nitrergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **259**: G522-33.
- Gallego D, Hernández P, Clavé P & Jiménez M (2006). P2Y<sub>1</sub> receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**: G584-94.
- Gallego Santos J, Fombuena Filpo J & Martínez López J (1991). Efficacy and tolerance of cinitapride on the disturbances of gastrointestinal transit. *Rev Med Univ Navarra* **36**: 12-8.
- Galligan JJ (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**, 611-23.

- González AA, Farré R & Clavé 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.
- Helm JF, Bro SL, Dodds WJ, Sarna SK, Hoffman RG & Arndorfer RC (1991). Myogenic oscillatory mechanism for opossum esophageal smooth muscle contractions. *Am J Physiol* **261**: G377-83.
- Knudsen MA & Tøttrup A (1992). A possible role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* **107**: 837-41.
- Krysiak PS & Preiksaitis HG (2001). Tachykinins contribute to nerve-mediated contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* **120**: 39-48.
- Lecea B, Gallego D, Farré R, Opazo A, Aulí M, Jiménez M & Clavé P (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitregeric and nonnitregeric coneurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**: G782-94.
- Lecea B, Martínez E, Aulí M, Opazo A & Clavé P (2009). Selective stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 1342-e130.
- Leclere PG, Prins NH, Schuurkes AJ & Lefebvre RA (2005). 5-HT<sub>4</sub> receptors located on cholinergic nerves in human colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* **17**: 366-75.
- Mukhopadhyay AK & Weisbrodt NW (1975). Neural organization of esophageal peristalsis: role of vagus nerve. *Gastroenterology* **68**: 444-7.
- Murray J, Du C, Ledlow A, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am J Physiol* **261**: G401-6.
- Opazo A, Lecea B, Gil V, Jiménez M, Clavé P & Gallego D (2011). Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **23**: e11-25.
- Paterson WG (2006). Esophageal peristalsis. *GI Motility online* doi: **10.1038/gimo13**.
- Paterson WG, Goyal RK & Habib FI (2006). Esophageal motility disorders. *GI Motility online* doi: **10.1038/gimo20**.
- Preiksaitis HG & Laurier LG (1998). Pharmacological and molecular characterization of muscarinic receptors in cat esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 853-61.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994). Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* **39**: 770-5.
- Sugarbaker DJ, Rattan S & Goyal RK (1984). Mechanical and electrical activity of esophageal smooth muscle during peristalsis. *Am J Physiol* **246**: G145-50.
- Surós A, Adell F, De Novoa V, Castellarnau J, Diosdado D, Carrasquer J & Merelló J (1992). Cinitapride in the treatment of gastroesophageal reflux. Comparative study with metoclopramide and placebo. *Rev Med Univ Navarra* **37**: 18-23.
- Tøttrup A, Forman A, Funch-Jensen P, Raundahl U & Andersson KE (1990). Effects of transmural field stimulation in isolated muscle strips from human esophagus. *Am J Physiol* **258**: G344-51.
- Ward SM, Dalziel HH, Khoyi MA, Westfall AS, Sanders KM & Westfall DP (1996). Hyperpolarization and inhibition of contraction mediated by nitric oxide released from enteric inhibitory neurones in guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* **118**: 49-56.
- Weisbrodt NW & Christensen J (1972). Gradients of contractions in the opossum esophagus. *Gastroenterology* **62**: 1159-66.
- Yamato S, Spechler SJ & Goyal RK (1992). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* **103**: 197-204.





## APPENDIX III: Complementary Studies on Anatomy and Physiology of Porcine Esophageal Body.

### Summary

This section shows complementary figures that were originated from the experiments of chapter 3 and were not published. The anatomical origin of the strips included in these experiments in the porcine esophageal body is described. In the physiological experiments we carried out both organ bath and electrophysiological studies.

#### a) Organ bath studies:

We assessed the neural origin of both *latency* and *amplitude* of the EFS-induced contraction responses in experiments with the neurotoxin TTX. The experiments assessing the effect of peptidergic ( $\alpha$ -chymotrypsin), tachykinergic (SR140333-NK<sub>1</sub>Ra, GR94800-NK<sub>2</sub>Ra) and adrenergic (propranolol, phentolamine) antagonists on *latency* and *amplitude* of responses were included. We also assessed the modulation of EFS-induced contractions with antagonists of ligand-gated ion channels as hexamethonium, NF279, and ondansetron on EFS-induced responses (nAChR, P2XR, and 5-HT<sub>3</sub> receptors antagonists, respectively). *Latency* was not affected and the three antagonists reduced *amplitude* of esophageal contractions. We studied the effect of cinitapride (0.1-100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) on EB contractions in two experimental conditions: (i) in standard Krebs solution, with simultaneous electrical stimulation of both inhibitory and excitatory MNs; and (ii) in NANNNP Krebs solution, with selective stimulation of excitatory MNs. What we found was that in:

(a) on EB strips without mucosa in standard Krebs solution, *latency* was increased at higher frequencies and *amplitude* was decreased in a concentration-dependent manner,

(b) on EB strips with mucosa in standard Krebs solution, cinitapride increased *latency* and decreased *amplitude*.

(c) on EB strips without mucosa in NANNNP Krebs solution, cinitapride increased *amplitude* of these *on*-contractions at 1-10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . We also assessed the direct effect of cinitapride on clasp LES where cinitapride had a dual effect as this compound induced LES contractions inhibited by atropine and a relaxation response reduced by L-NAME.

Finally, we also found cinitapride has a direct effect on EB smooth muscle contractility. The contraction response obtained by CCh on strips pretreated with TTX were reduced by cinitapride. Taken together, our studies suggest the net effects of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist, cinitapride on EB peristalsis are a balance of excitatory effects on both excitatory and inhibitory MNs of the esophageal myenteric plexus and direct inhibition of contractility of smooth muscle cells.

#### b) Electrophysiological studies:

The experiments assessing the effect of muscarinic (atropine), purinergic (MRS2179), peptidergic ( $\alpha$ -chymotrypsin), and nitrenergic (L-NAME) antagonists on *amplitude* and *duration* of IJP responses were included. The IJP was nitrenergic in the porcine EB (completely blocked by L-NAME).

## INDEX:

### 1) MORPHOLOGICAL STUDIES:

#### ANATOMY

-**Figure 1.1.** Anatomical origin of porcine esophageal strips included in the in vitro study.

-**Figure 1.2.** Arrangement of clasp/sling strips at lower esophageal sphincter (LES) and esophageal body.

-**Figure 2.** Anatomy of the porcine esophagus according to our observations.

### 2) PHYSIOLOGICAL STUDIES:

#### 2.1. Organ bath studies

#### ORIGIN OF EFS-INDUCED RESPONSES

-**Figure 3.** Representative tracing showing the morphology of the mechanical response induced by electrical field stimulation (EFS) on the porcine EB strips.

-**Figure 4.** Neural origin of EFS-responses. Effect of EFS on the EB strips: A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses by TTX.

-**Figure 5.** Assessment of the peptidergic component of EFS-responses: A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses with  $\alpha$ -chymotrypsin and L-NAME.

-**Figure 6.** Tachykinergic component: A) Representative tracing, and B) Effect of NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors antagonists: characterization of EFS-induced responses.

-**Figure 7.** Adrenergic influence on EFS responses: A) Representative tracing, and B) Characterization of EFS-induced responses with propranolol and phentolamine.

#### MODULATION OF EFS-INDUCED RESPONSES

##### Effect of antagonists of ligand-gated ion channels

-**Figure 8** Role of nAChRs, P2X, and 5-HT<sub>3</sub> receptors. Characterization of EFS-induced responses by A) hexamethonium, B) NF279, and C) ondansetron. Representative tracings showing the effect of EFS on the EB strips.

-**Figure 9.** Role of 5-HT<sub>3</sub>Rs. Representative tracing showing the effect of EFS on the EB strips. Characterization of EFS-induced responses by ondansetron.

-**Figure 10.** Role of time, and vehicles (distilled H<sub>2</sub>O, EtOH): Characterization of EFS-induced responses by time, distilled H<sub>2</sub>O and EtOH. Representative tracings showing the effect of EFS on the EB strips.

##### Characterization of the effect of cinitapride

-**Figure 11.** Representative tracing showing the effect of EFS on the EB strips without mucosa. Modulation of EFS-induced responses by cinitapride.

**-Figure 12.** Representative tracing showing the effect of EFS on the EB strips with mucosa. Modulation of EFS-induced responses by cinitapride.

**-Figure 13.** Representative tracing comparing the effect of EFS on the EB strips with/without mucosa. Modulation of EFS-induced responses by cinitapride.

**-Figure 14.** Representative tracing showing the effect of EFS on the EB. Modulation of EFS-induced responses by cinitapride in a NANNNP krebs solution.

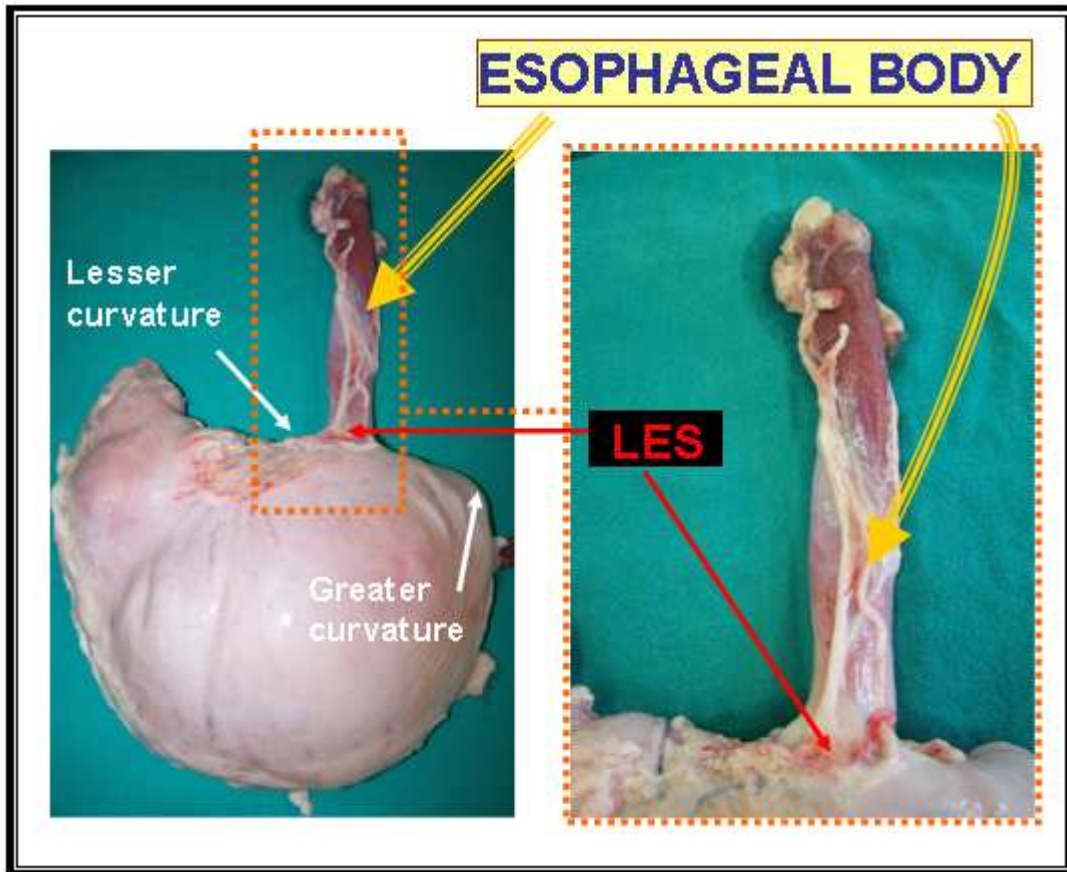
**-Figure 15.** A) Log concentration-response curve induced by cinitapride on porcine clasp LES strips. B) Characterization of  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride-induced relaxation response by L-NAME. C) Characterization of  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride-induced contraction response by atropine.

**-Figure 16.** Characterization of  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  carbachol-induced contraction response,  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  TTX-pretreated, by  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride on porcine EB.

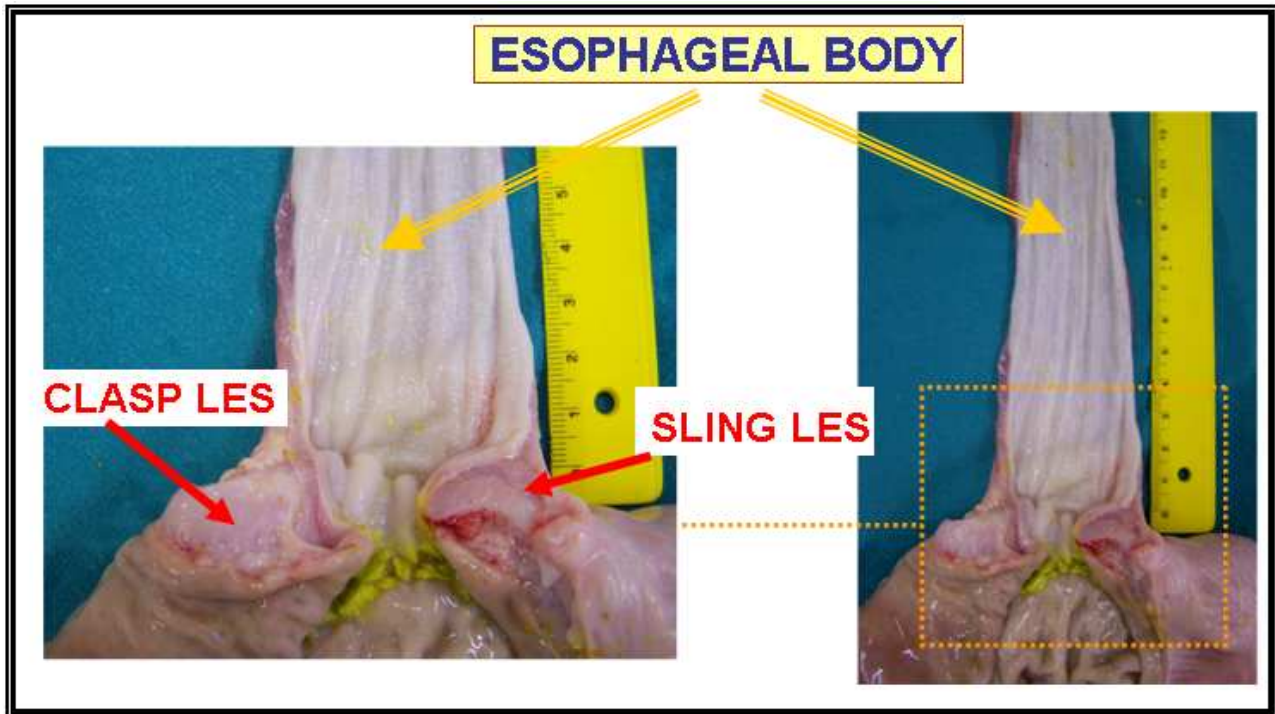
## **2.2. Electrophysiological studies**

**-Figure 17.** Electrophysiological studies on porcine esophageal body: sequential effect of atropine, MRS2179,  $\alpha$ -chymotrypsin and L-NAME on IJP.

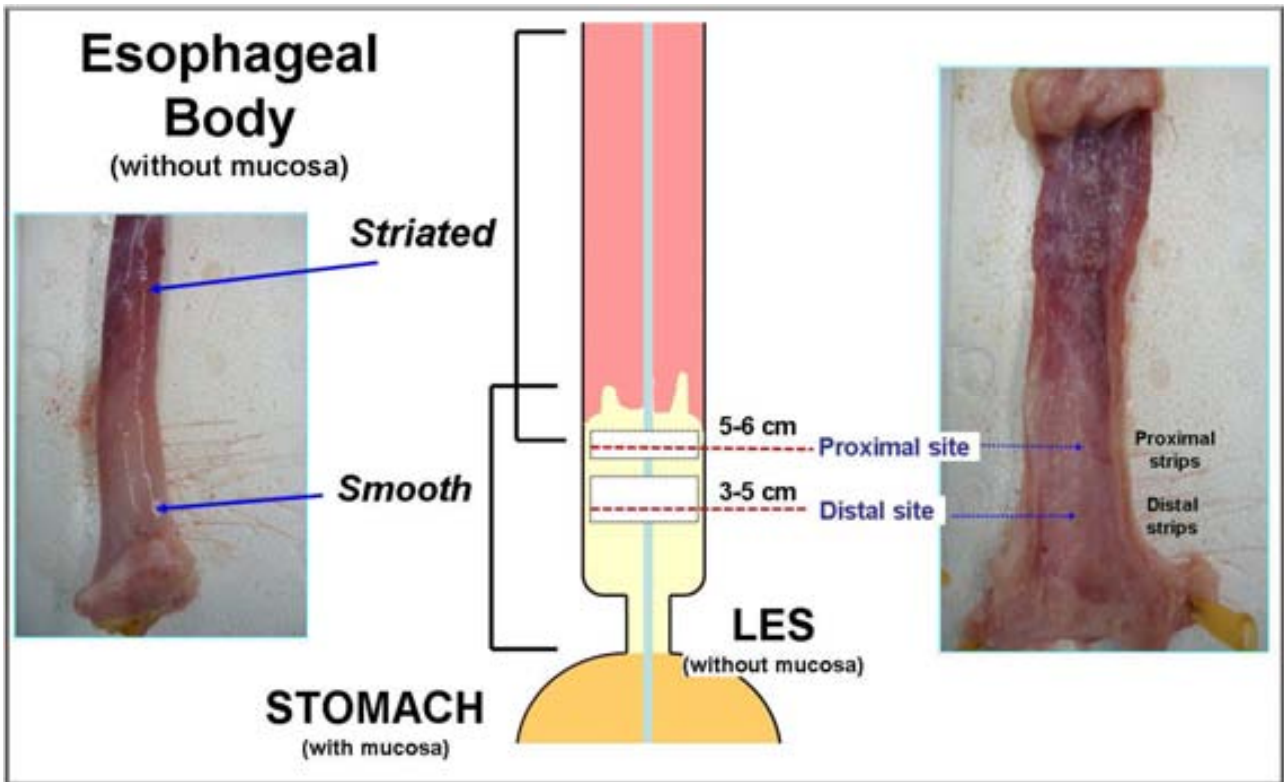
1) MORPHOLOGICAL STUDIES: Anatomy



**Figure 1.1.** Photograph of the porcine specimen containing the stomach and esophagus. Anatomical origin of the porcine esophageal strips included in the present study. Circular muscle for in vitro studies was obtained from each area indicated. The circular EB strips were obtained from 5-7 cm above the LES.



**Figure 1.2. Preparation:** Photograph of the anatomical origin of the porcine EB and LES strips included in the present study. Note the arrangement of short transverse clasp muscle fibres on the lesser curve side, and long oblique gastric sling fibres in the angle of His of the greater curvature, on the left side at the gastroesophageal junction of the porcine stomach. The stomach was opened on the middle of both curvatures; the inside esophageal lumen and stomach wall is shown and the mucosa was not stripped off. The muscular clasp and sling layers are exposed.

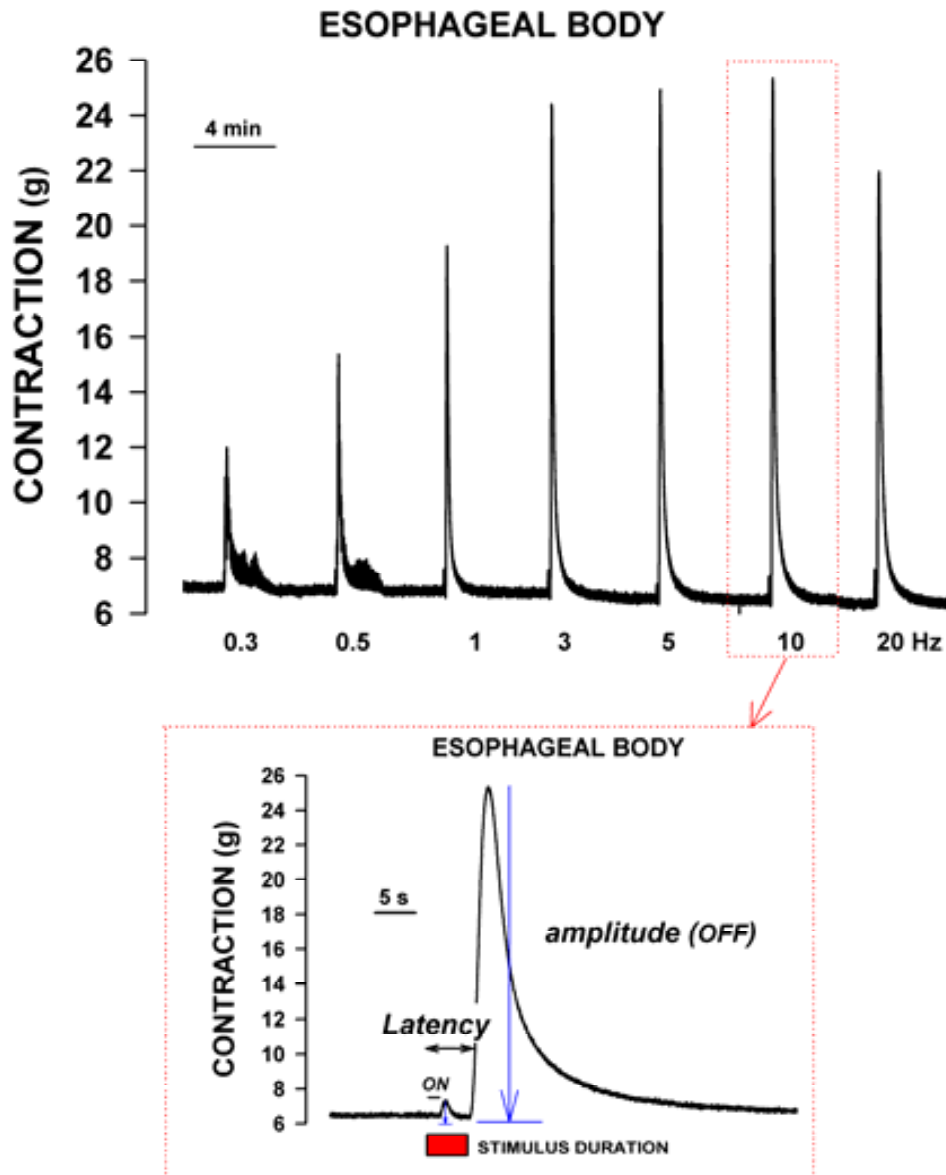


**Figure 2. Anatomy of the porcine esophagus according to our observations of more than 100 specimens.** The proximal and mid parts of the esophagus are composed of striated muscle and the lower/distal part of the esophagus is composed of smooth muscle. The esophageal length was 20-24 cm and the smooth muscle portion of the esophagus had a length of 5-7 cm. We obtained strips from two regions of the EB containing smooth muscle: (i) the proximal site, 5-6 cm above the LES; (ii) the distal site, 3-5 cm above the LES.

## 2) PHYSIOLOGICAL STUDIES:

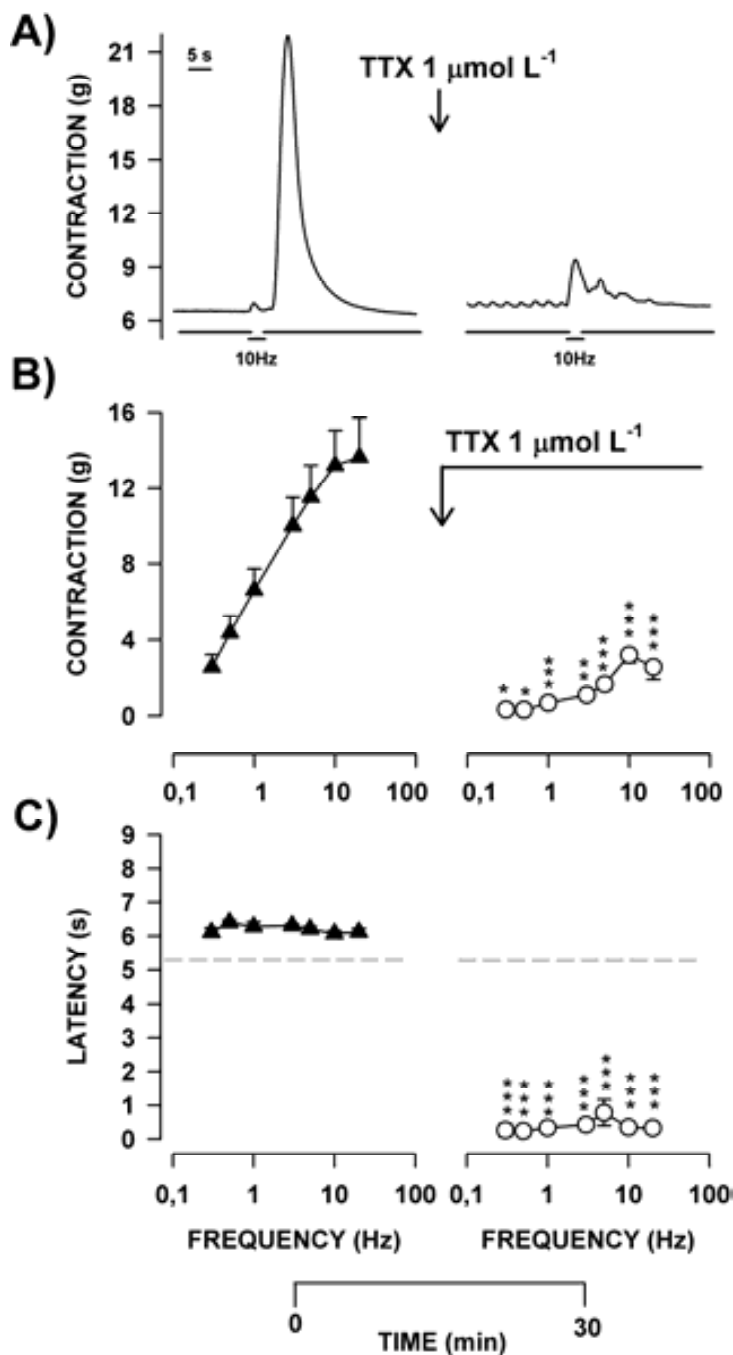
### 2.1. Organ bath studies

#### Origin of EFS-induced-responses in the porcine esophageal body



**Figure 3. Representative tracing showing the morphology of the mechanical response induced by electrical field stimulation in the porcine esophageal body:** Porcine EB strips responded to electrical stimulation of enteric MNs with an *on*-contraction at the beginning of the stimulus and an *off*-contraction following the end of the stimulus. *Latency* of EFS contractions was defined as the period of time (expressed in s) from the beginning of EFS to the onset of EB contraction.

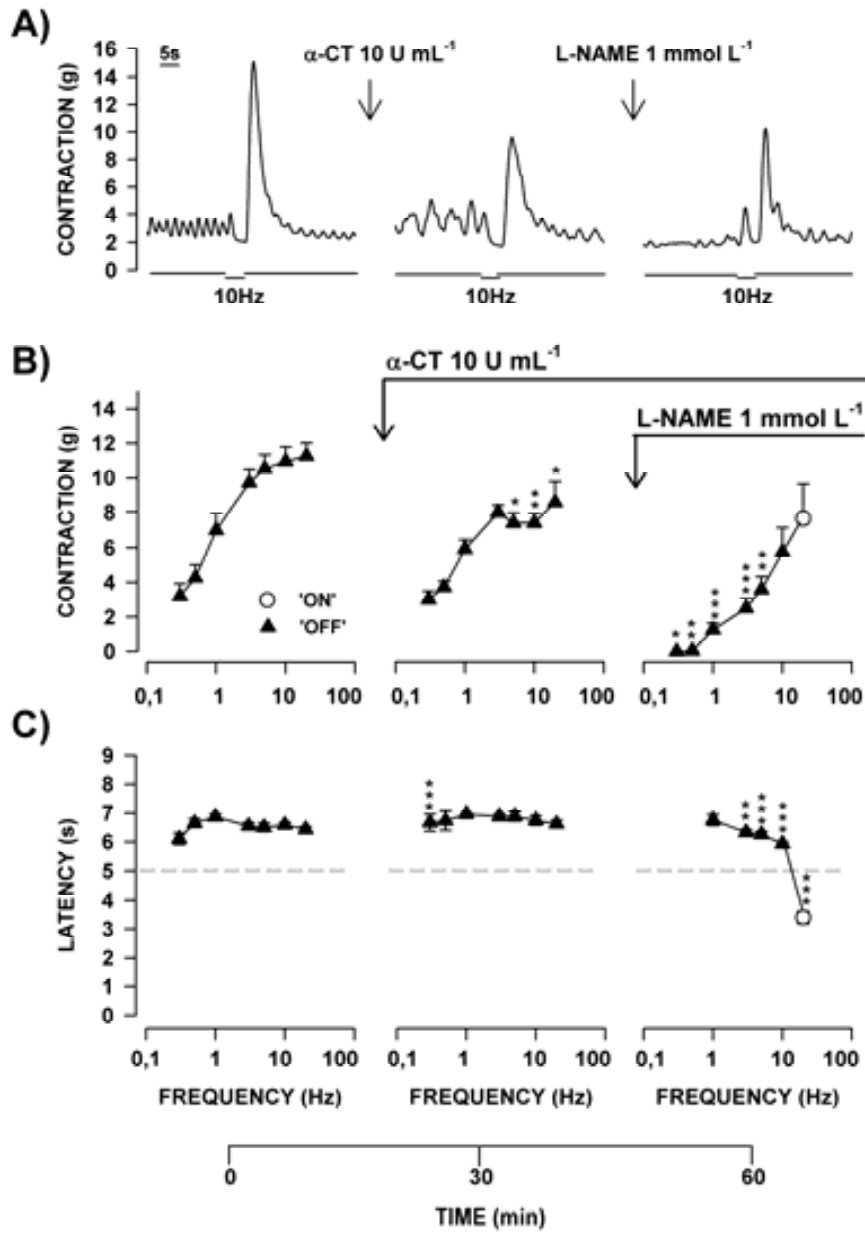
Neural origin of EFS-responses



**Figure 4. Neural origin of electrically-induced responses in the porcine esophageal body:** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on (B) *amplitude* and (C) *latency* of EB contractions. The neurotoxin tetrodotoxin (TTX 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), which interrupts transmission of action potentials along the axon, abolished the *off*-contractions at all frequencies of stimulation. ( $n = 11$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control response).

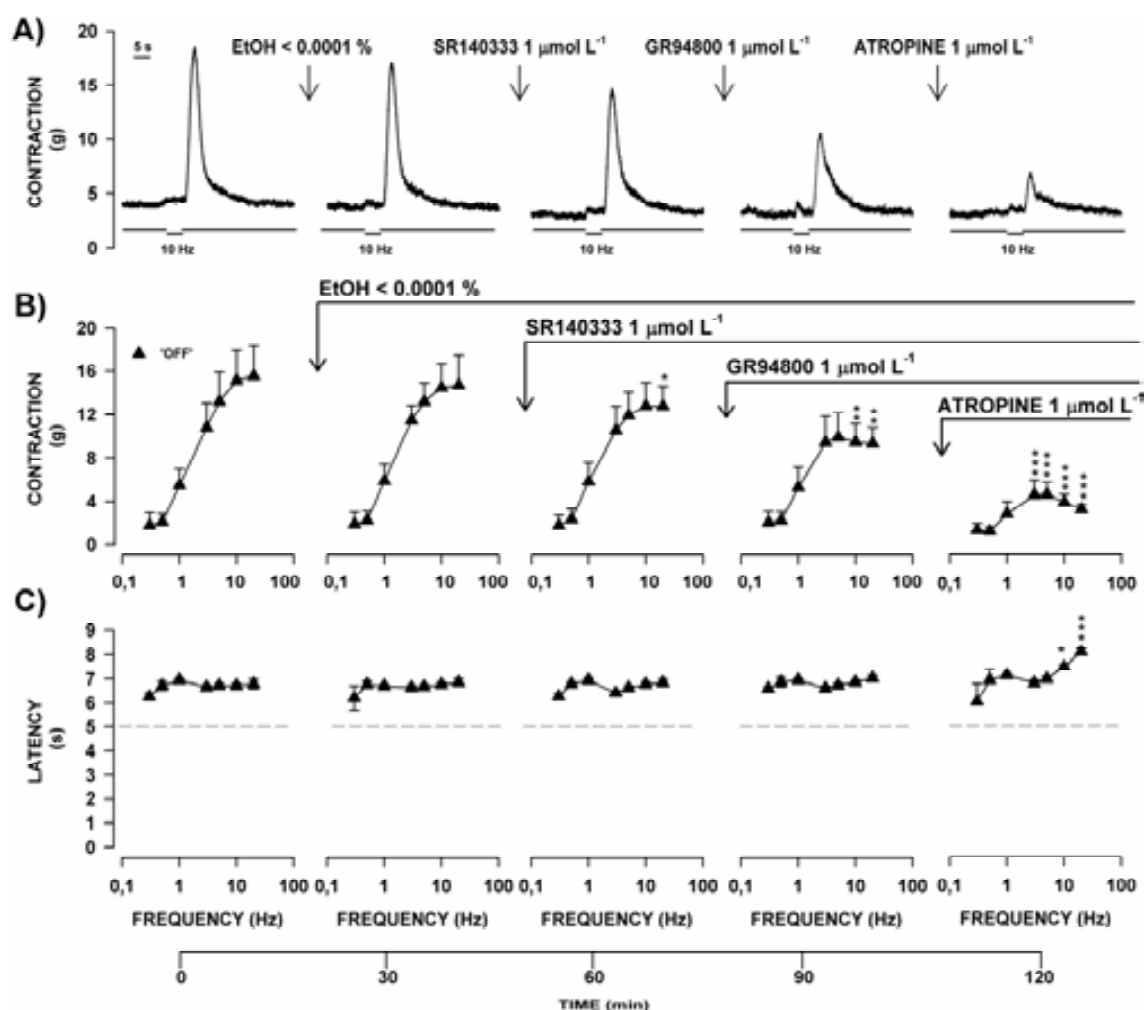


Peptidergic component



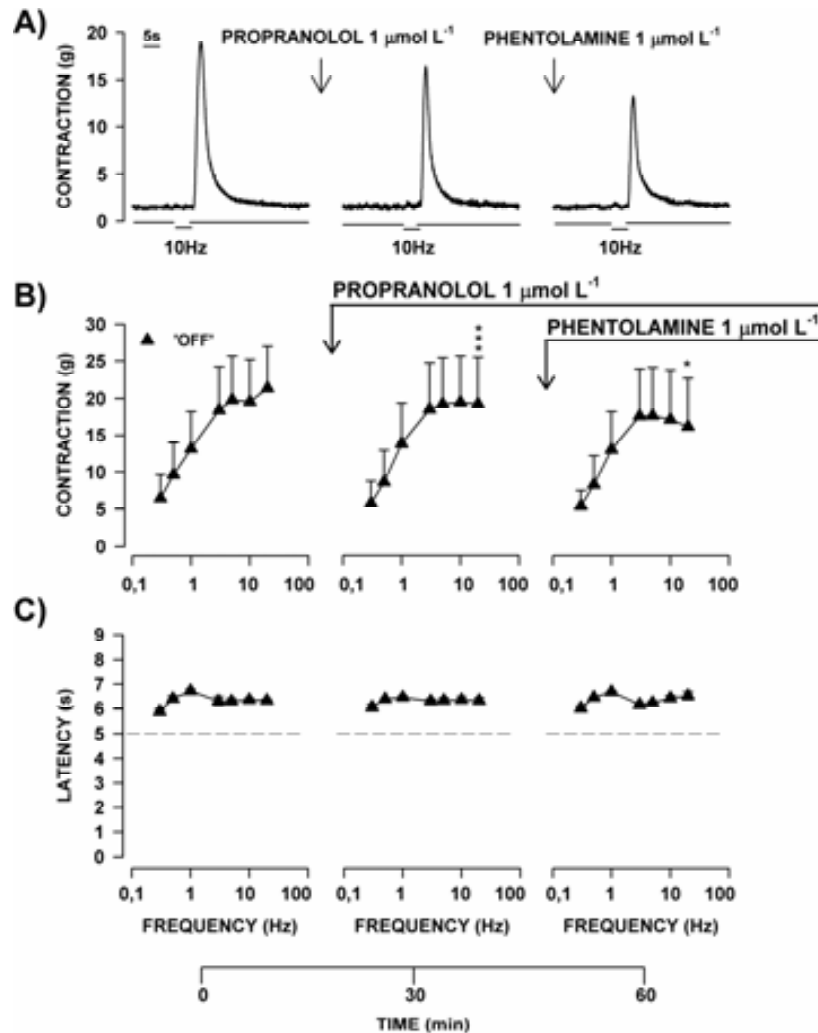
**Figure 5. Peptidergic component in the EFS-induced responses of porcine esophageal body:** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on (B) *amplitude* and (C) *latency* of EB contractions. The peptidase  $\alpha$ -chymotrypsin ( $\alpha$ -CT, 10 U mol<sup>-1</sup>) significantly enhanced *latency* only at 0.3 Hz of frequency and reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies of stimulation. Subsequent addition of L-NAME significantly decreased *latency* at all frequencies and shifted *off*-contraction to an *on*-contraction during EFS at 20 Hz of frequency and with a significant reduction of *amplitude* of *off*-contraction. ( $n = 4$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

Tachykinergic component



**Figure 6. Tachykinergic component in the EFS-induced responses of porcine esophageal body:** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on (B) *amplitude* and (C) *latency* of EB contractions. The vehicle EtOH did not significantly reduced EFS-induced responses. Blockade of tachykinergic NK<sub>1</sub> receptors by SR140333 did not affect *latency* but reduced *amplitude* of *off-contractions*. Subsequent addition of GR94800 blocking tachykinergic NK<sub>2</sub> receptors did not affect *latency* but significantly reduced *amplitude* of *off-contractions*. Atropine significantly enhanced *latency* at higher frequencies and reduced *amplitude* of *off-contractions* at all frequencies. ( $n = 6$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

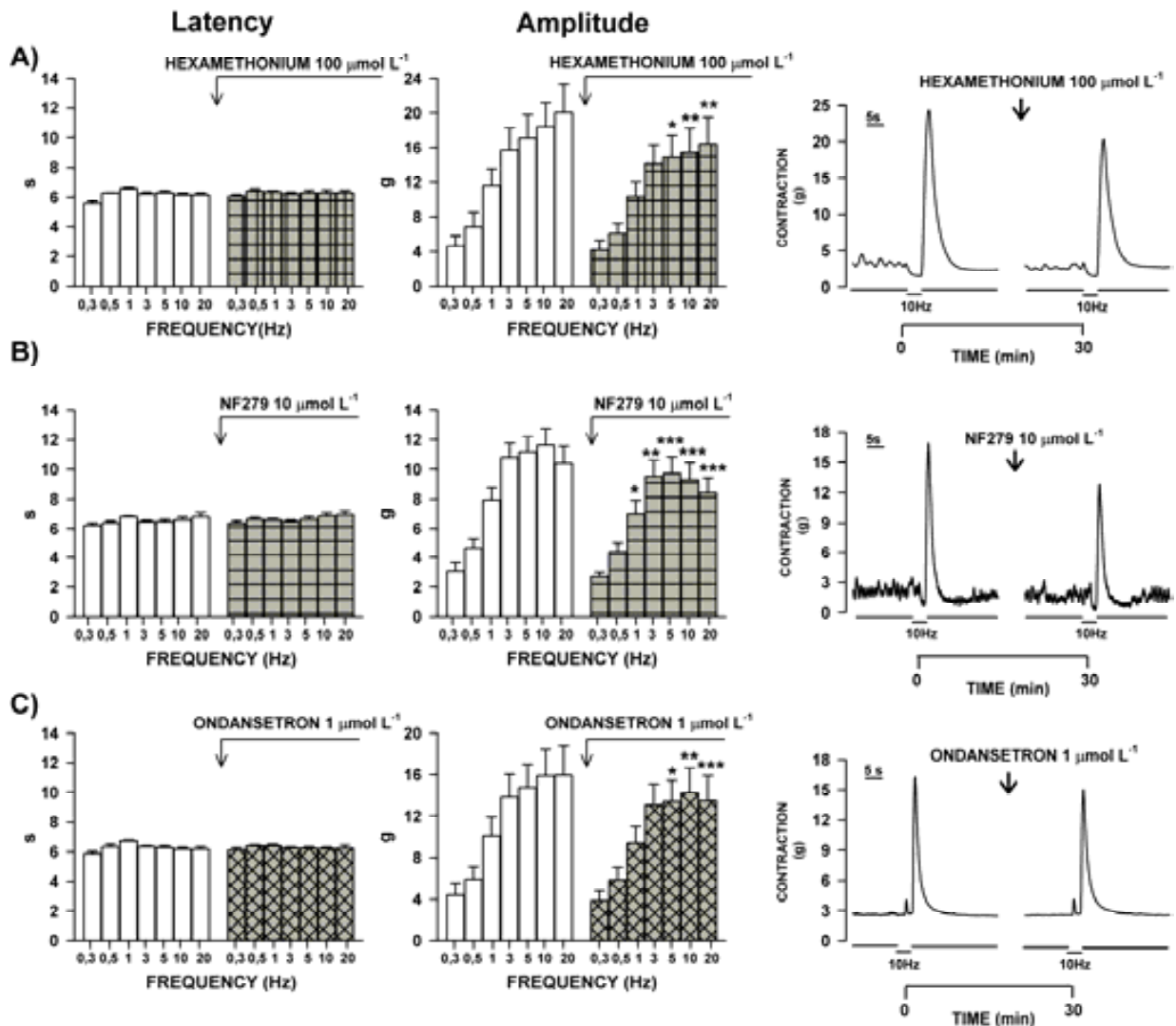
Adrenergic influence



**Figure 7. Adrenergic influence in the EFS-induced responses of porcine esophageal body:** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on (B) *amplitude* and (C) *latency* of EB contractions. Blockade of  $\beta$ -adrenergic receptors by propranolol did not affect *latency* but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at 20 Hz of frequency of stimulation. Subsequent addition of phentolamine blocking  $\alpha$ -adrenergic receptors did not affect *latency* but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies of stimulation. ( $n = 3$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs previous response).

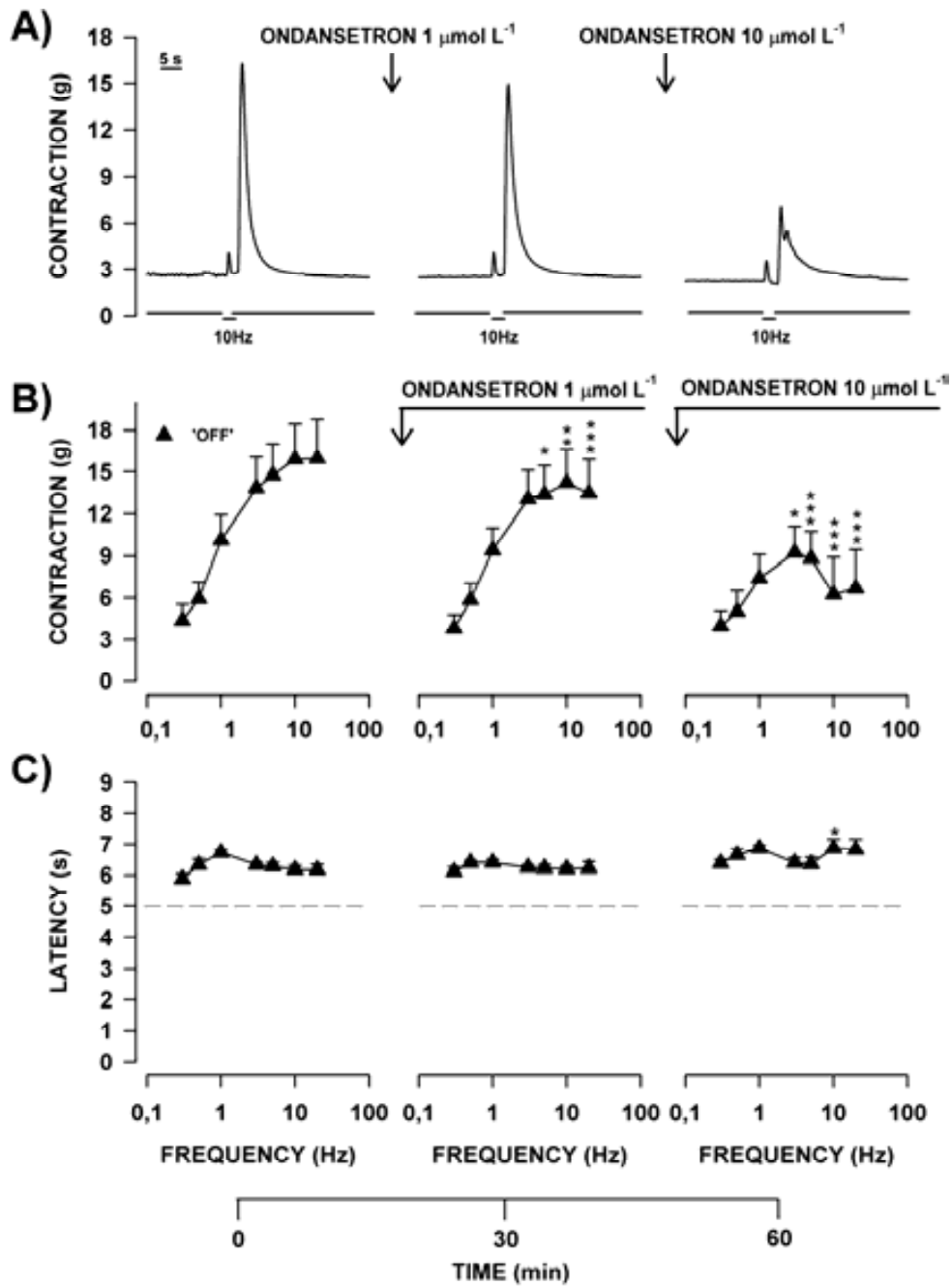
## 2) PHYSIOLOGICAL STUDIES: Modulation of EFS-induced responses

### i) Effect of antagonists of ligand-gated ion channels



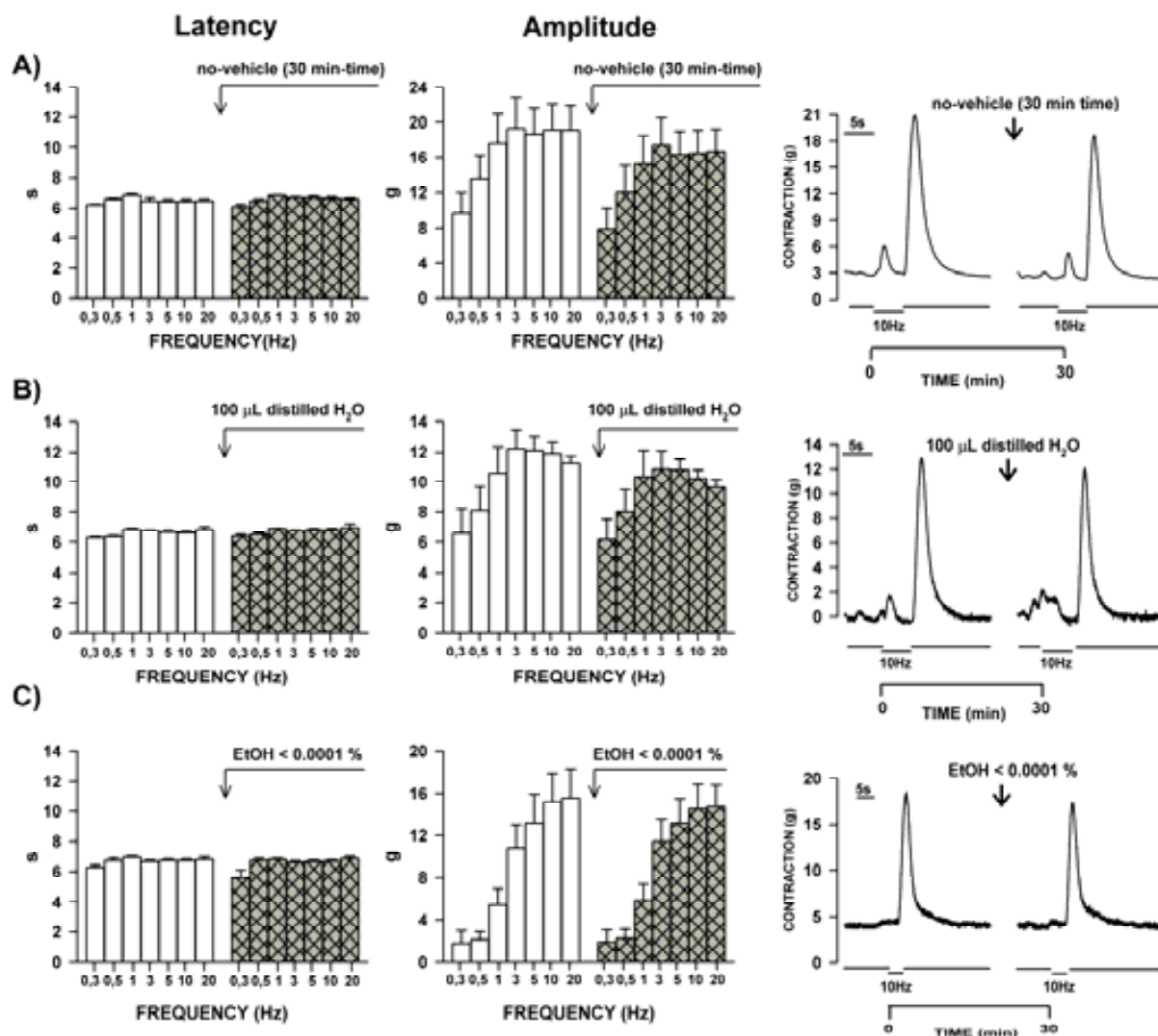
**Figure 8. Effects of antagonists of ligand-gated ion channels on EFS-induced responses of porcine esophageal body.** Quantitative effects and representative tracings on frequency-dependent electrical field stimulation-induced responses of: A) hexamethonium ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ( $n = 7$ ), B) the antagonist of  $\text{P2X}_{1,2,3}$  NF279 ( $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ( $n = 9$ ), and C) the selective  $5\text{-HT}_3$  receptor antagonist ondansetron ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) ( $n = 8$ ). (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs each control).

Serotonergic 5-HT<sub>3</sub>R antagonists



**Figure 9. Role of 5-HT<sub>3</sub> receptors on porcine esophageal body.** Representative tracings (A) and quantitative effects (B, C) on frequency-related (0.3-20 Hz) responses on (B) *amplitude* and (C) *latency* of EB contractions. Blockade of 5-HT<sub>3</sub> receptors by 1 μmol L<sup>-1</sup> ondansetron did not affect *latency* but significantly reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies of stimulation. Sequential addition of 10 μmol L<sup>-1</sup> ondansetron significantly enhanced *latency* and reduced *amplitude* of *off*-contractions at higher frequencies of stimulation. (*n* = 8, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001 vs previous response).

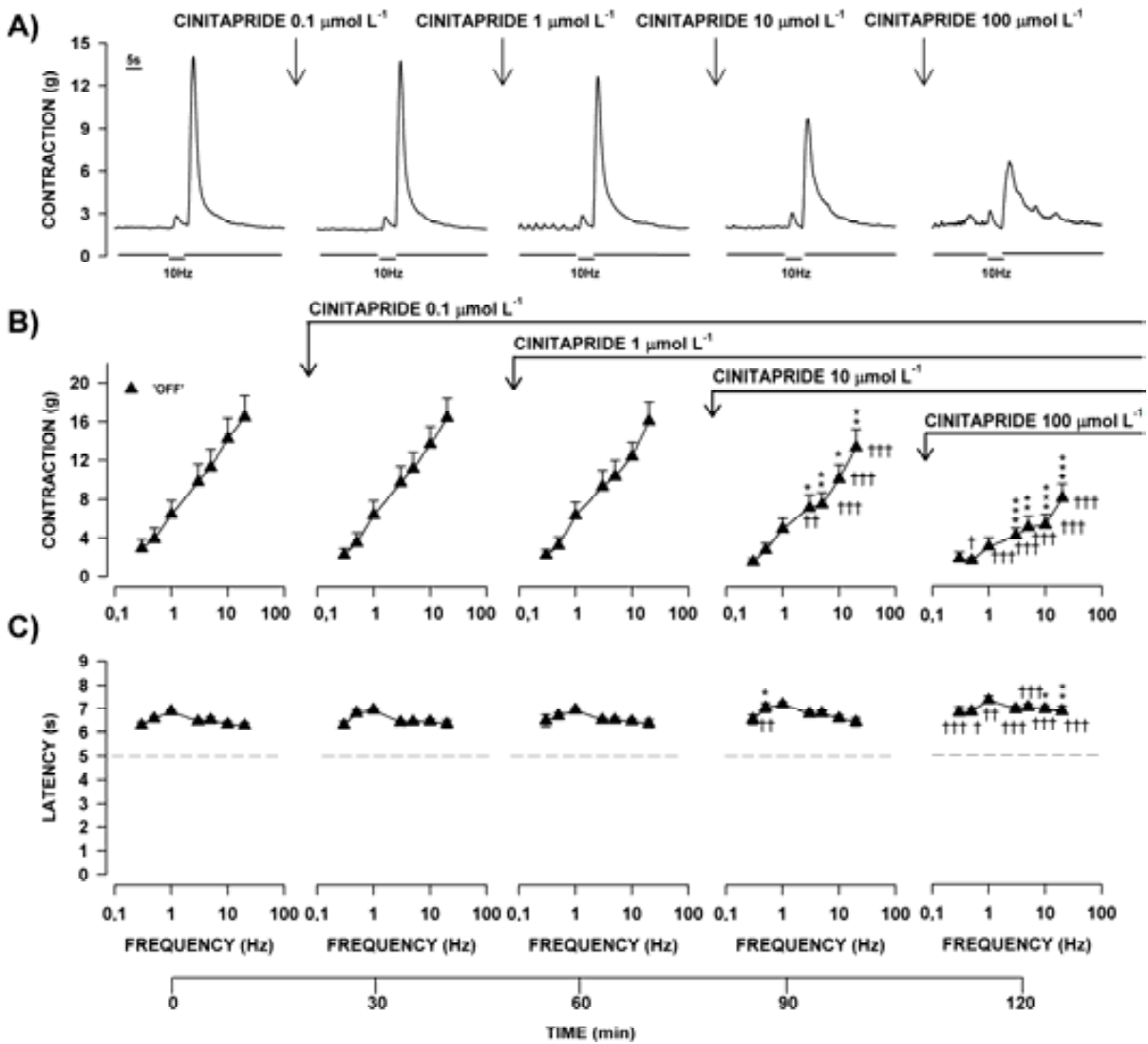
**Role of time of incubation and the vehicles on electrically-induced responses in porcine esophageal body**



**Figure 10. Effect of (A) time of incubation, and the vehicles (B) distilled H<sub>2</sub>O, and (C) EtOH on electrical field stimulation-induced responses in porcine esophageal body.** Quantitative effects (left and middle panels) and representative tracings (right panel) showing a slight, non significant effect of vehicles on EFS-induced responses (*latency* and *amplitude* of contraction). Maximal effect on *amplitude* was caused by 30 min incubation with 100 µL distilled water ( $-13.8 \pm 4.5\%$ , 10 Hz,  $n = 4$ , NS), and maximal effect on *latency* was caused by 30 min incubation without any addition of vehicle ( $+2.7 \pm 0.3\%$ , 10 Hz,  $n = 4$ , NS). Incubation with EtOH affected neither *amplitude* ( $-2.2 \pm 4.2\%$ , 10 Hz,  $n = 4$ , NS), nor *latency* ( $-0.4 \pm 0.7\%$ , 10 Hz,  $n = 4$ , NS) of EFS-induced responses.

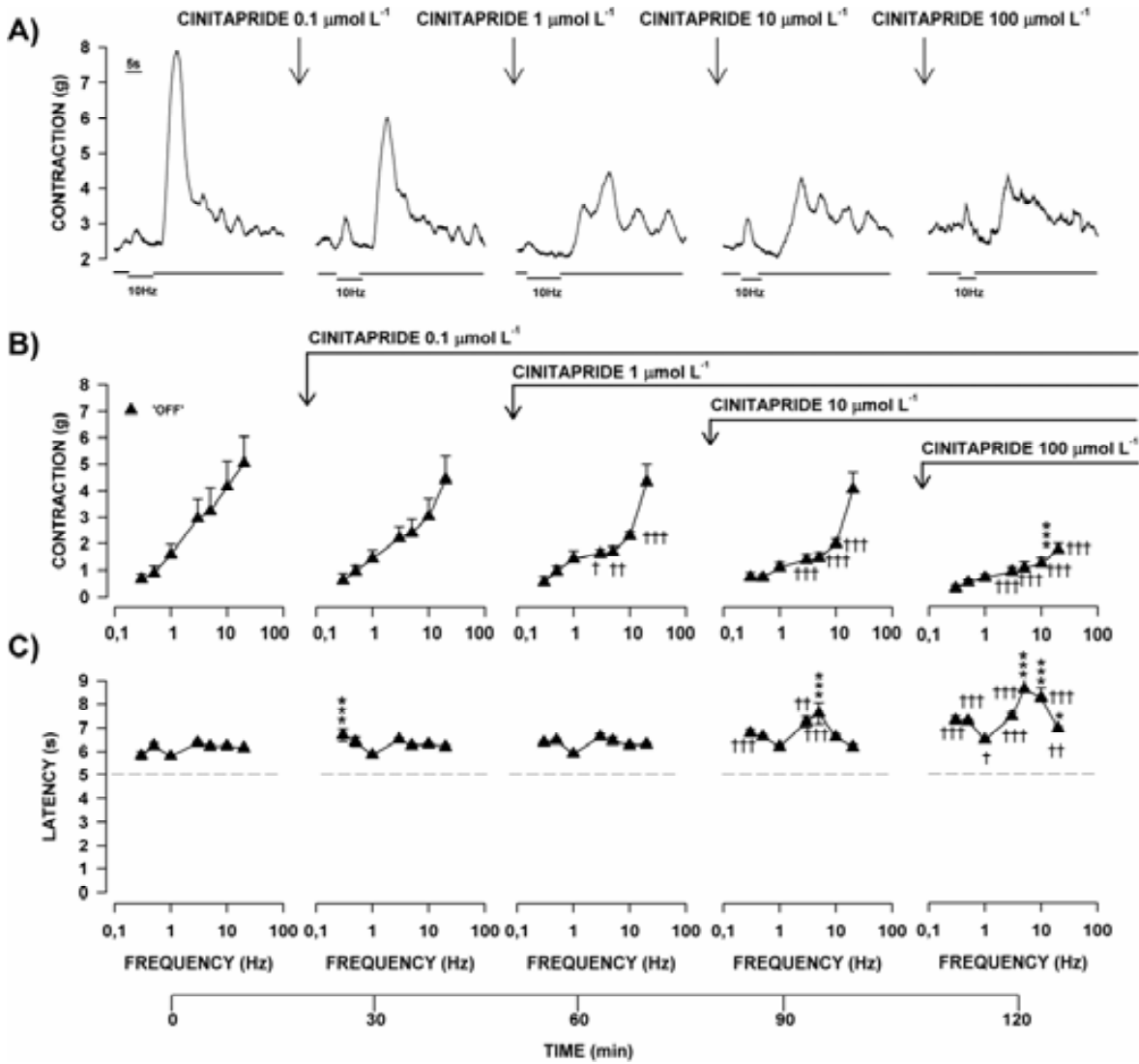
ii) Characterization of the modulation effect of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist

Strips without mucosa in standard Krebs solution



**Figure 11. Effect of cinitapride on strips without mucosa of porcine esophageal body in standard Krebs solution.** Effect of increasing concentrations of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist cinitapride on EB strips: cinitapride from 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  concentrations significantly reduced *amplitude* and increased *latency* of *off*-contractions. ( $n = 8$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs previous response; †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$ , †††  $P < 0.001$  vs control response).

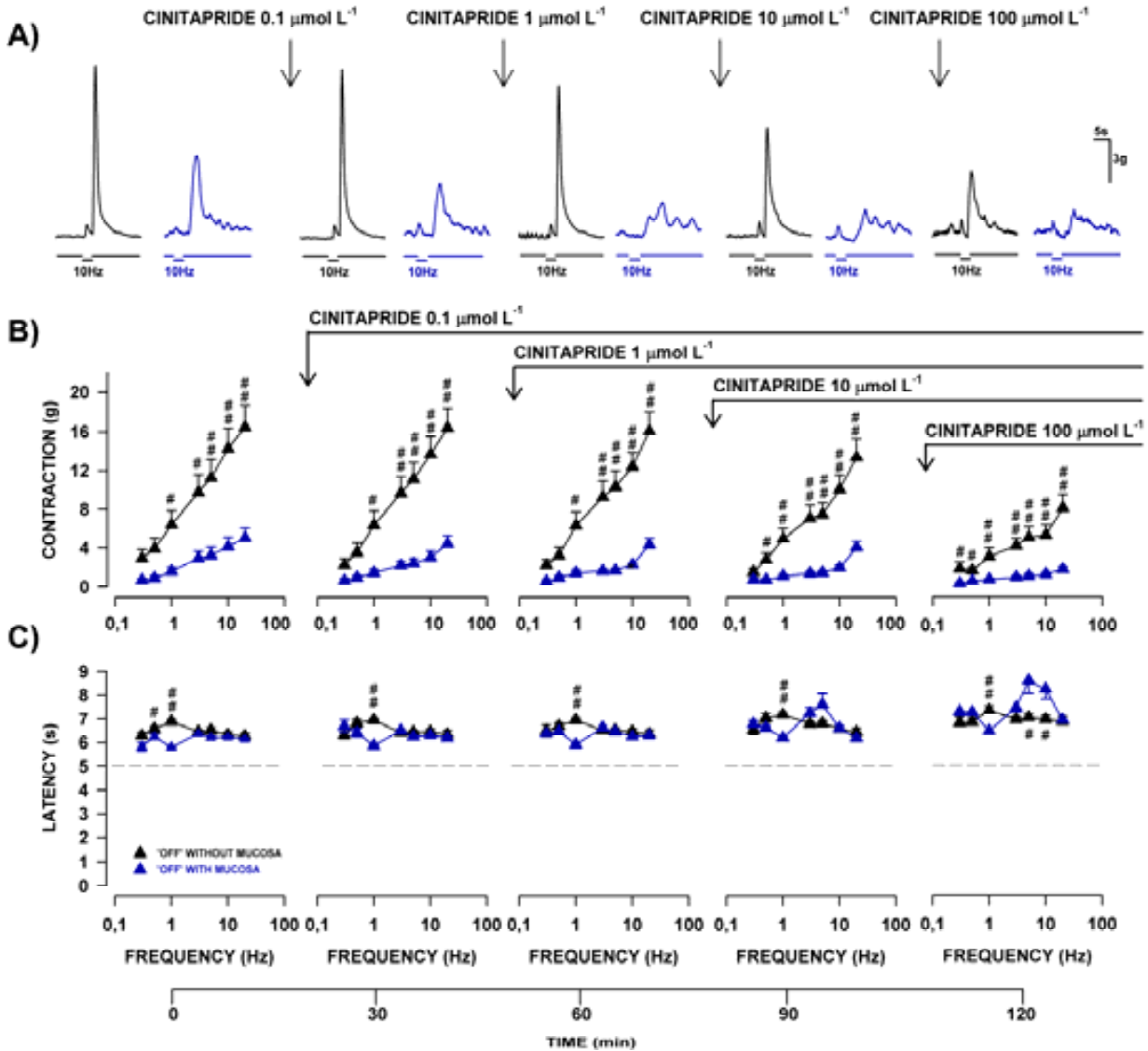
Strips with mucosa in standard Krebs solution



**Figure 12. Effect of cinitapride on strips with mucosa of porcine esophageal body in standard Krebs solution.** Effect of increasing and consecutive concentrations of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist cinitapride on EB strips with mucosa: from 0.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride concentrations significantly reduced *amplitude* and increased *latency* of *off*-contractions. ( $n = 5$ ,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $***P < 0.001$  vs previous response; †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$ , †††  $P < 0.001$  vs control response).

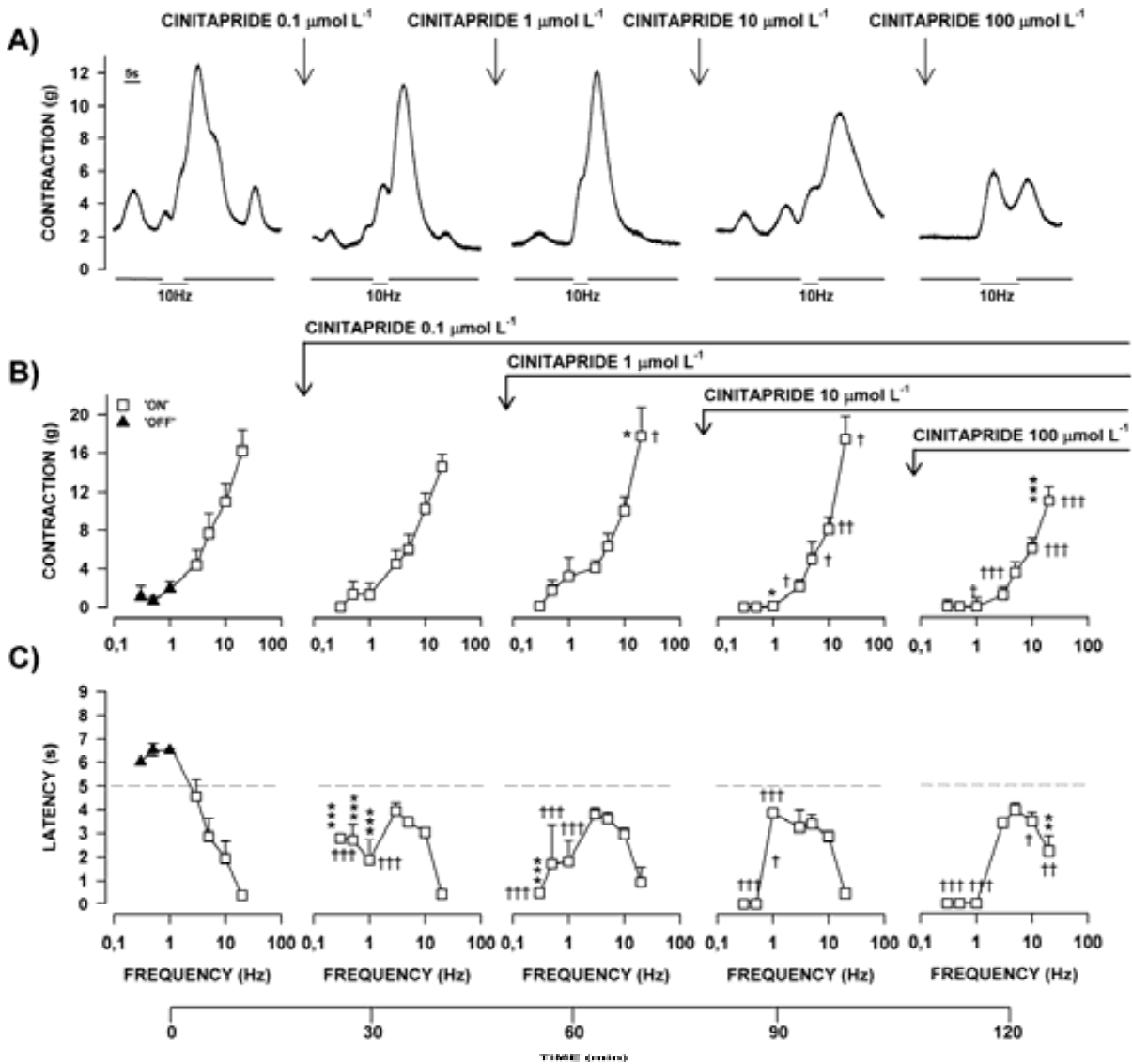


Comparative experiments. Effect of cinitapride in strips without mucosa vs strips with mucosa in standard Krebs solution



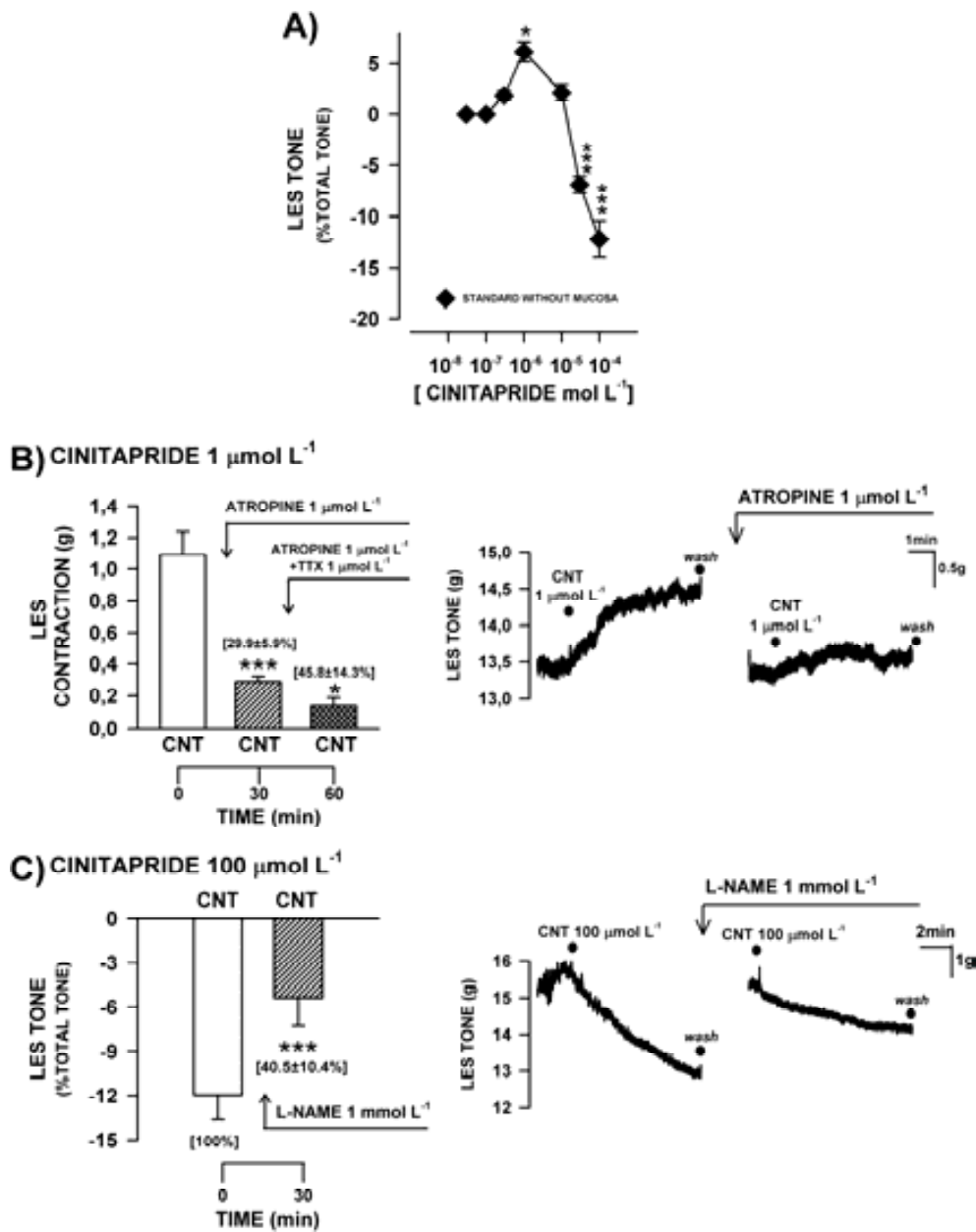
**Figure 13. Comparative experiments showing the effect of cinitapride in strips with mucosa versus strips without mucosa in porcine esophageal body.** In this figure we compared the effect of increasing concentrations of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist cinitapride on both EB strips with and without mucosa in standard Krebs solution: *Amplitude* of EFS-induced *off*-contraction was significantly higher at both all frequencies and cinitapride concentrations at strips without mucosa compared with strips with mucosa. *Latency* of *off*-contractions was lower at strips with mucosa irrespective strips without mucosa until 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride, from 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  to 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride concentrations *latency* was significantly higher at almost all frequencies. (#  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  strips with mucosa vs strips without mucosa at each concentration;  $n = 8$  and  $n = 5$ , respectively).

Effect of cinitapride in strips without mucosa in NANNNP Krebs solution (selective stimulation of excitatory enteric MNs)



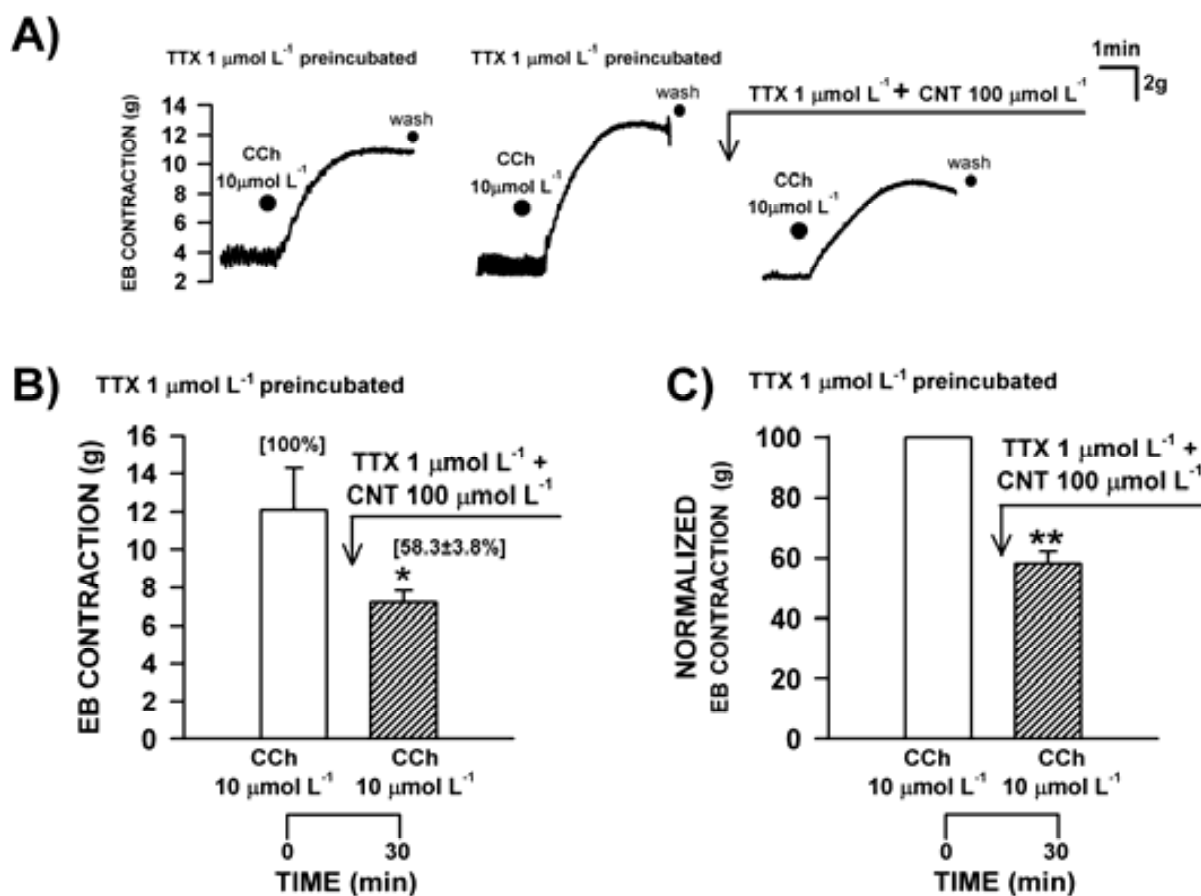
**Figure 14. Effect of cinitapride in strips without mucosa of porcine esophageal body in NANNNP Krebs experiments.** At NANNNP control conditions strips from the EB responded to electrical stimulation of enteric MNs with an *on*-contraction at the beginning of the stimulus at higher frequencies and with an *off*-contraction following the end of the stimulus only at lower frequencies. Increasing and consecutive concentrations of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist cinitapride on EB strips: 0.1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride did not affect *amplitude* of EFS-induced contractions and significantly reduced *latency* and switched *off*-contraction to *on*-contraction during EFS. 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride significantly reduced *latency* at lower frequencies and increased *amplitude* of *on*-contractions at higher frequencies. Subsequent addition of 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride significantly reduced *amplitude* of contraction at lower frequencies. 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride significantly reduced *amplitude* and increased *latency* of contractions at higher frequencies. ( $n = 4$ , \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs previous response; †  $P < 0.05$ , ††  $P < 0.01$ , †††  $P < 0.001$  vs control response).

iii) Effect of cinitapride on porcine clasp LES strips



**Figure 15. Effect of cinitapride on porcine clasp lower esophageal sphincter strips:** A) Log concentration-response curve (30 nmol L<sup>-1</sup>-100 μmol L<sup>-1</sup>) induced by cinitapride (CNT, 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist) on LES total tone in standard Krebs solution (*n* = 4, \* *P* < 0.05 vs first concentration response, 30 nmol L<sup>-1</sup>). Cinitapride induced contraction and relaxation responses at lower and higher concentrations; (B, C) **Quantitative effects.** On clasp LES strips B) 1 μmol L<sup>-1</sup> CNT induced a contraction response significantly reduced by atropine (1 μmol L<sup>-1</sup>) (*n* = 6); and C) 100 μmol L<sup>-1</sup> CNT induced a relaxation of LES strips significantly reduced by L-NAME (1 mmol L<sup>-1</sup>), by nitric oxide synthesis blockade (*n* = 4, \* *P* < 0.05, \*\* *P* < 0.01, \*\*\* *P* < 0.001).

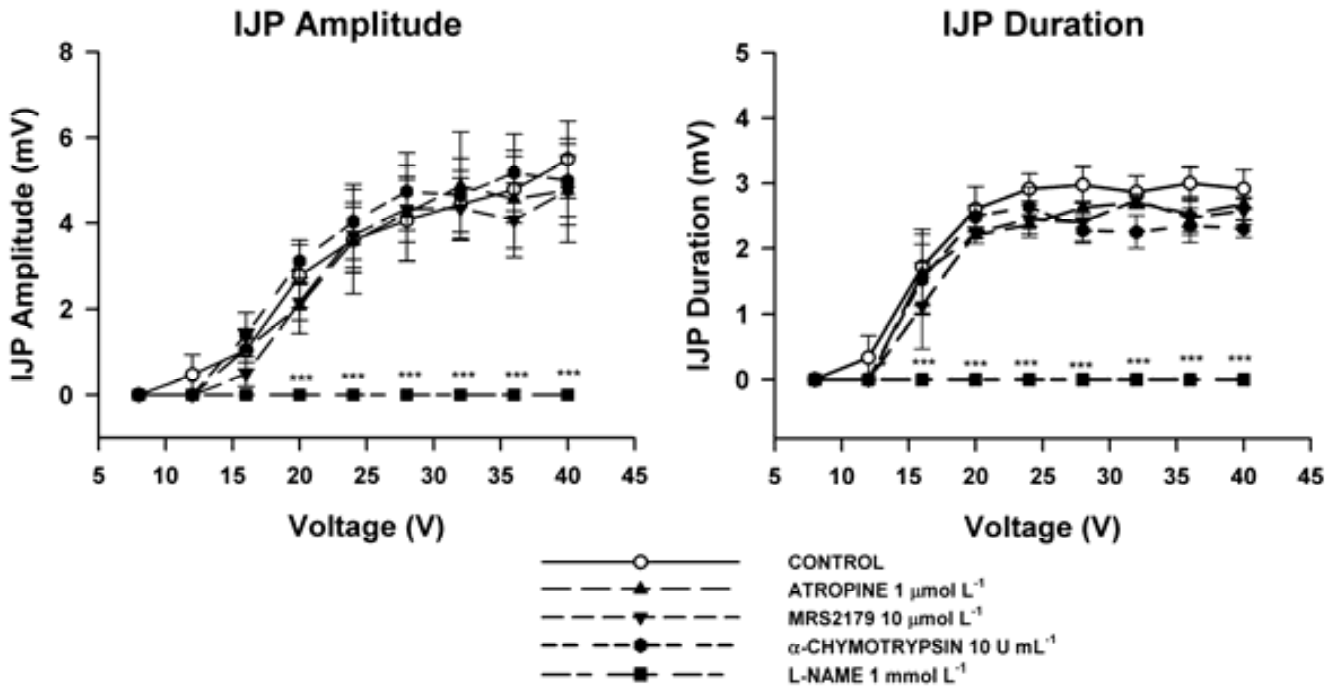
iv) Effect of cinitapride on porcine EB strips



**Figure 16. Effect of cinitapride on porcine esophageal circular smooth muscle cells.** Effect of 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride (CNT), the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist, on 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  CCh-induced contraction response on EB strips, preincubated with the neurotoxin TTX 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  in standard Krebs solution: A) Representative tracing and, B, C) Quantitative effects. 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  cinitapride significantly reduced the medium value of the amplitude of CCh-induced control contraction. (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs previous response;  $n = 4$ ).

## 2.1. Electrophysiological studies

### The inhibitory junction potential in the porcine esophageal body



**Figure 17. Electrophysiological studies on porcine esophageal body.** Plot graphs showing the sequential effect of atropine 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , MRS2179 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $\alpha$ -chymotrypsin 10 U  $\text{mL}^{-1}$  and L-NAME 1  $\text{mmol L}^{-1}$  on the *amplitude* (left panel) and *duration* (right panel) of EFS-induced IJP at different voltages of stimulation (8-40 V). ( $n = 4$ , \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ).



## DISCUSIÓN GENERAL

Esta tesis doctoral consta de un conjunto de estudios **in vitro** sobre los mecanismos de control de la actividad motora tanto en el esófago humano como en un modelo experimental de cerdo, que comparte muchas similitudes estructurales y funcionales con el esófago humano. Los estudios se han llevado a cabo, fundamentalmente, con la técnica de *baño de órganos* y se han complementado con estudios de electrofisiología (técnica de *microelectrodos*) y *algunos estudios histológicos*. Todo ello nos ha permitido evaluar, en profundidad, la fisiología básica de las respuestas motoras de las siguientes regiones del esófago: el **cuerpo esofágico (EB)** y el **esfínter esofágico inferior (LES)**.

Las áreas de estudio hacia las que hemos dirigido nuestras investigaciones son las siguientes:

(1) Anatomía y estructura del esófago, descripciones del **EB** y del **LES** en los dos modelos experimentales, a saber, el humano (como objetivo final de la investigación) y el animal (cerdo) como modelo experimental. Exponemos las similitudes entre ambos modelos, y la idoneidad del modelo porcino para emplearlo como referencia para los estudios humanos;

(2) Neurotransmisores implicados en la motilidad del LES humano y porcino, en el **LES humano** descripción de la neurotransmisión neuroefectora y en el **LES porcino** descripción de la neurotransmisión neuro-neuronal a través de los receptores tipo *canales iónicos dependientes de ligando*, LGIC, que relacionan y conectan a las motoneuronas (MNs) neuroefectoras con el resto de elementos del plexo mientérico (MP) y la inervación extrínseca;

(3) Peristalsis en el EB, descripción de los neurotransmisores responsables de las respuestas contráctiles obtenidas en ambos modelos humano y porcino;

(4) Modulación de las contracciones del EB porcino, descripción de la modulación de las respuestas a través de dos vías, por un lado, la modulación de la neurotransmisión neuro-neuronal a través de los receptores tipo LGIC, y por otro, la neurotransmisión neuromuscular a través de la modulación farmacológica mediante **cinitaprida** (agonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>4</sub>).

-----

La motilidad del esófago ha sido objeto de estudio mediante investigaciones *in vitro* a lo largo de los años, aunque ha recibido menos atención que otros tramos del tracto gastrointestinal. Los primeros trabajos significativos se iniciaron en los años 60-70 del pasado siglo XX. Christensen *et al.*, estudiaron los fenómenos asociados a la activación del músculo liso esofágico longitudinal en el

esófago felino, mediante las respuestas mecánicas y eléctricas a varios fármacos autonómicos. Estos estudios permitieron explicar algunas características de los receptores adrenérgicos en este tejido. Observaron que los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos eran excitatorios y parecían estar localizados en los nervios colinérgicos postganglionicos del plexo mientérico esofágico. En cambio, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos eran inhibitorios y se encontrarían en las células del músculo liso (Christensen & Daniel, 1966). En la misma especie, exploraron la función de los receptores adrenérgicos en el **LES** pero esta vez en preparaciones de músculo circular. Observaron que en el **LES**, los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos eran excitatorios y los  $\beta$ -adrenérgicos inhibitorios (Christensen & Daniel, 1968). Christensen & Lund, estudiaron en preparaciones de músculo liso esofágico de la zarigüeya si concentraciones altas de **atropina** tenían un efecto indirecto modulando la liberación de neurotransmisores locales, o bien si su acción era directa sobre el músculo liso. Por las respuestas obtenidas concluyeron que reflejaba una acción directa del antagonista colinérgico sobre el músculo (Christensen & Lund, 1968). Estos mismos investigadores llevaron a cabo estudios tanto **in vivo** como **in vitro** en el **esófago** de la zarigüeya para mostrar las respuestas a la distensión y a la estimulación eléctrica del esófago distal intacto (in vivo) y aislado (in vitro). Las observaciones **in vivo** permitieron definir de forma más precisa los principales patrones de las respuestas esofágicas, como la *respuesta-on*, la *respuesta-off* y la *respuesta de duración*, y fueron capaces de inducir las también **in vitro** viendo que en el esófago aislado las respuestas a la distensión y a la estimulación eléctrica eran muy similares (Christensen & Lund, 1969).

Posteriormente, en un estudio **in vitro** comparativo en tres especies, zarigüeya, gato y mono rhesus, se determinó que la estimulación eléctrica del estómago, el cuerpo esofágico y la unión gastroesofágica (GEJ) inducía respuestas diferentes y características en cada zona en las tres especies, siendo la GEJ la que presentaba una especialización intrínseca en la naturaleza de la inervación y en las propiedades mecánicas de la capa de músculo interno. En este trabajo determinaron el estiramiento óptimo de las tiras de la GEJ, que debía ser del 160% de su longitud inicial (Christensen *et al.*, 1973). En otro trabajo **in vitro** en diferentes niveles del esófago de la zarigüeya, Christensen *et al.*, estudiaron la posible influencia de varias variables sobre la *latencia* de la **contracción-off**, variables de tipo: (i) metodológicas: dimensión y estiramiento de las tiras; (ii) farmacológicas: variación de la concentración del potasio extracelular, antagonistas

gangliónicos, agonistas colinérgicos, agonistas y antagonistas adrenérgicos. Llegaron a la conclusión de que la *latencia* no está fija y que si el gradiente de la latencia estaba relacionado con la naturaleza progresiva de la peristalsis, la velocidad de la misma podría modularse **in vivo**, mediante cambios en los niveles de acetilcolina u otros neurotransmisores que actuaran sobre el músculo liso (Christensen *et al.*, 1979).

A inicios de la década de los 90, diversos estudios **in vivo** daban información sobre la motilidad del **esófago humano**-fácilmente accesible al estudio mediante manometría esofágica-, mientras que los estudios **in vitro** se llevaban a cabo en modelos animales, que estaban limitados por las diferencias entre las especies. En esos años, en un conjunto de trabajos realizados por farmacólogos y gastroenterólogos de la Universidad de Aarhus (Dinamarca), Tøttrup *et al.*, llevaron a cabo el primer estudio de las propiedades mecánicas del **esófago humano** (Tøttrup *et al.*, 1990c). Afirmaban que un estudio **in vitro** sobre la función neuromuscular esofágica humana exige un conocimiento de las características mecánicas del músculo liso en el área de los resultados en los modelos animales. Por ello, examinaron las propiedades mecánicas activas y pasivas del músculo liso esofágico humano aislado, obtenido del **EB** y de la **GEJ**, con el objeto de definir cuáles serían las condiciones experimentales óptimas en los estudios realizados con este tejido. Concluyeron que era posible preparar y montar tiras de músculo aisladas procedentes del **esófago inferior humano** en un *baño de órganos* bajo condiciones estandarizadas (Tøttrup *et al.*, 1990c). En la misma época, realizaron otro trabajo en el **esfínter esofágico inferior (LES) humano** con el que establecieron la técnica de *estimulación de campo transmural (TMS)*, que exploraba los efectos de los nervios autonómicos en dicha región. Como necesitaban estimular los nervios sin excitar de forma directa el músculo liso, emplearon la TMS que les permitió determinar cuáles eran los parámetros de estimulación necesarios para obtener las respuestas óptimas en dicha especie. Con la TMS investigaron la excitación de los nervios en preparaciones de músculo liso circular y longitudinal aisladas. Emplearon una metodología gracias a la cual les fue posible dilucidar los componentes responsables de las respuestas obtenidas de las capas musculares en el **EB** y la **GEJ**, así en la *capa muscular longitudinal* la respuesta se debía a una transmisión colinérgica, mientras que en la *capa circular* estaban implicados transmisores no-adrenérgicos no-colinérgicos (NANC) en la inhibición y colinérgicos en la contracción. Establecieron las pautas a seguir en los experimentos **in vitro** de *baño de órganos* en el

**esófago humano** (Tøttrup *et al.*, 1990b). Con este método y en el *baño de órganos* también pudieron estudiar preparaciones de músculo aislado de ambas capas musculares, procedentes de pacientes con acalasia, para evaluar la función de la inervación postgangliónica de la GEJ (Tøttrup *et al.*, 1990a).

Saltando hacia delante en el tiempo, y aplicando los parámetros establecidos y estandarizados por los anteriores investigadores, nuestro grupo también encaminó sus investigaciones hacia la exploración **in vitro** del **esófago** tanto humano como animal. En términos generales, nuestros estudios siguen fielmente la metodología de estudio **in vitro** descrita por estos autores, tanto en lo que hace referencia al estiramiento y condiciones mecánicas de las tiras como a los parámetros eléctricos necesarios para estimular las MNs del plexo mientérico.

Como la información sobre la anatomía y fisiología del circuito neuronal que controla directamente el músculo liso del esófago era escasa, González *et al.*, llevaron a cabo un estudio **in vitro** en el que comparaban los efectos de la estimulación de las MNs inhibitorias y excitatorias intrínsecas en el músculo liso esofágico humano con **nicotina**, por un lado, y mediante la estimulación directa con **estimulación eléctrica de campo (EFS)** por el otro (González *et al.*, 2004).

También en el *baño de órganos* y empleando el cerdo como modelo animal, Farré *et al.*, estudiaron, **in vitro**, los mecanismos y los neurotransmisores que controlaban el tono y la relajación del **LES** tras la estimulación de las MNs entéricas inhibitorias mediante los mismos estímulos que se emplearon en el esófago humano, la **nicotina** a través de los **receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs)** y la **EFS** (Farré *et al.*, 2006). Así mismo, con el modelo porcino, realizaron un estudio comparativo sobre las propiedades funcionales de los músculos **clasp** y **sling** del **LES** (Farré *et al.*, 2007a). Todos estos estudios previos de nuestro grupo se han realizado utilizando una metodología validada y conocida, y esa misma metodología es la que hemos empleado en esta tesis.

### 1) Anatomía y estructura comparada del esófago humano y porcino adulto

En esta tesis hemos empleado dos modelos experimentales para estudiar la fisiología esofágica. Por un lado, el modelo humano, y por otro, el modelo animal (cerdo). Ambas especies comparten muchas similitudes estructurales y funcionales. Según nuestras observaciones, el **esófago porcino** tenía una longitud total, aproximada, de 20-24 cm,



estaba compuesto por músculo estriado en las zonas proximal/media y por músculo liso en la zona inferior/distal con una longitud de 5-7 cm (Wu *et al.*, 2003). Los cerdos pesaban 75-80 kg y tenían seis meses de edad. El **esófago humano** tiene una longitud de 21-25 cm y está compuesto por músculo estriado en el esófago cervical (5-17%), mixto (23-37%) y por músculo liso los tercios medio y distal (56-60%) (Wörl & Neuhuber, 2005).

Como hemos indicado, para estudiar la fisiología esofágica empleamos dos modelos: el modelo humano, que es el tejido a estudiar por excelencia, pero que presenta una disponibilidad bastante limitada. Esto nos llevó, por tanto, a utilizar en nuestros estudios neurogastroenterológicos un segundo modelo, el modelo animal, el **cerdo**. La organización anatómica y las características neuroquímicas y electrofisiológicas de las redes neuronales intrínsecas que controlan las funciones digestivas, son más complejas en los modelos de animales grandes (incluidos los **humanos**) que en los modelos de animales pequeños de laboratorio como la rata o la cobaya (Brown & Timmermans, 2004). Nosotros utilizamos el modelo porcino porque está considerado como un modelo animal homólogo al humano, debido a que ambas especies presentan grandes similitudes en: (a) el tamaño de los órganos del tracto gastrointestinal (GI); (b) la organización anatómica: b.1) tanto en el esófago porcino, ya que igual que el humano, tiene músculo liso en la zona distal (y predomina en el **LES**), a diferencia de otros modelos animales (Aggestrup *et al.*, 1986) como el perro, la rata, el ratón, el conejo, la oveja, la cobaya en los que la región inferior/distal del esófago está formada totalmente por músculo estriado; y por mixto en el gato y el mono (Wörl & Neuhuber, 2005), b.2) como en el LES porcino, porque la distribución macroscópica de las fibras de músculo liso del **LES** es similar en cerdos y humanos, existiendo una *asimetría anatómica transversal* (fibras **clasp** y **sling**) (Aggestrup *et al.*, 1986; Farré *et al.*, 2007a; Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Vicente *et al.*, 2001); (c) la histología (células musculares lisas); (d) la organización del sistema nervioso entérico (ENS) (Wu *et al.*, 2003), los neurotransmisores, las MNs entéricas, el código neuroquímico en cerdo y en humano (Aggestrup *et al.*, 1986; Brown & Timmermans, 2004). Por otro lado, en estudios *in vivo* en cerdos, observaron una relajación del **LES**, inducida por deglución, seguida de contracciones que era muy similar en los humanos (Vicente *et al.*, 2001).

En nuestros estudios del esófago definimos y determinamos, de forma muy precisa, las zonas (tanto del **EB** como del **LES**) de las que

obtendríamos las tiras que pasarían a incluirse en los estudios *in vitro*: (i) en la exploración del **EB** empleamos tiras esofágicas procedentes de las zonas proximal (modelo porcino) y distal (modelo porcino y humano) (éstas últimas gracias a los especímenes procedentes de pacientes con cáncer esofágico) de la región de músculo liso del cuerpo esofágico (Capítulos 2 y 3); (ii) en la exploración del **LES** empleamos preparaciones que se correspondían con las regiones **clasp** y **sling** del **LES**. En este caso, con el modelo porcino estudiamos las tiras **clasp** (Capítulo 1), y con el modelo humano pudimos realizar una comparativa de las dos regiones anatómicamente diferenciadas del **LES** (Capítulo 2), gracias a que también tuvimos la oportunidad de estudiar especímenes procedentes de donantes de órganos intactos desde el punto de vista anatómico.

En todos nuestros estudios, tanto en los presentes como en los anteriores, hemos descrito el origen anatómico de las tiras del LES incluidas en nuestro trabajo basándonos en un criterio anatómico (Korn *et al.*, 1997) aceptado durante años en la literatura médica y quirúrgica, establecido por anatomistas y cirujanos. Confirmando dicho criterio, igual que se ha visto en estudios previos en **cerdos** (Vicente *et al.*, 2001), nosotros también observamos que, tanto en el **cerdo** como en el **humano**, el **LES** está formado por las fibras **clasp** (fibras musculares transversales semicirculares), que abrazan la zona de la curvatura menor en la región derecha, y por las fibras **sling** gástricas oblicuas en la curvatura mayor en la región izquierda (Liebermann-Meffert *et al.*, 2001; Vicente *et al.*, 2001). Como veremos más adelante, esta organización está ampliamente aceptada en la comunidad científica y sólo un pequeño grupo de farmacólogos difiere conceptualmente de este modelo de anatomía funcional del **LES humano**.

Cuando exploramos el **LES**, independientemente de la especie empleada, nuestro grupo utiliza dos criterios estrictos para seleccionar las tiras como pertenecientes al esfínter esofágico inferior:

(i) El primer criterio es anatómico y lo establecemos antes del experimento y durante la disección del espécimen, como ya hemos descrito previamente. Además, en el estudio del **humano** realizamos una disección de la zona de la GEJ abriéndola a lo largo de la cara anterior, para obtener, simultáneamente, tiras de ambas regiones derecha/izquierda de la **GEJ** de los especímenes de donantes de órganos, y así poder compararlas. Obteníamos tiras de un tamaño 10 x 3 mm, comenzando a nivel de la *línea de transición* y progresando oralmente.

(ii) El segundo criterio es **funcional y se establece durante el experimento**, ya que sólo las tiras obtenidas de estas regiones (**clasp** y **sling**) que: (1) desarrollaban *tono miogénico activo* durante el periodo de equilibrado, y (2) que se relajaban tras la estimulación de los nervios inhibitorios se consideraban como pertenecientes a cada lado del LES.

Sólo se incluyeron las tiras que cumplían ambos criterios. Nuestra opinión es que el desarrollo del tono espontáneo, activo y de origen miogénico es una condición obligada para considerar que la tira pertenece a un **esfínter liso** del tracto digestivo.

**Controversia respecto a la definición anatómica y funcional del LES:** En los últimos años se ha venido desarrollando un debate en la literatura sobre la definición del **esfínter esofágico inferior (LES)**, debido a que no existe un acuerdo entre las definiciones anatómica y fisiológica del **LES humano**.

Anatómicamente, el concepto clásico del LES lo describe como un anillo de músculo liso circular, como puede observarse en el perro (Friedland *et al.*, 1971), el gato (Preiksaitis *et al.*, 1994a) y la zarigüeya (Christensen & Torres, 1975). Sin embargo, esto no es así en el cerdo (Farré *et al.*, 2007a; Vegesna *et al.*, 2010) ni en los humanos. En los humanos, anatómicamente, no existe un anillo que rodee la **GEJ**, sino que este esfínter está formado por una pared gruesa de músculo liso con haces de la capa interna que no rodea la circunferencia del **esófago**, sino que son semicirculares, con una “abrazadera” muscular semicircular transversal corta en la zona de la *curvatura menor* (**fibras clasp**) y fibras semicirculares gástricas oblicuas en el ángulo de His de la *curvatura mayor* en el lado izquierdo (**fibras sling**) (Korn *et al.*, 1997; Liebermann-Meffert *et al.*, 1979; Stein *et al.*, 1995b). Esta estructura es idéntica en el **esfínter esofágico inferior (LES)** del cerdo (Farré *et al.*, 2007a).

Pero llegado a este punto se dan dos enfoques diferentes por parte de los investigadores: (1) un grupo de investigadores, principalmente científicos básicos, consideran que el LES es un **complejo de fibras musculares clasp y sling** (Farré *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004; Korn *et al.*, 2000; Preiksaitis *et al.*, 1994b; Stein *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1995a; Vicente *et al.*, 2001); (2) otro grupo de investigadores, principalmente investigadores clínicos, consideran que el LES es un **músculo liso circular (LEC)** cercano al extremo distal del esófago por encima de las fibras **clasp** y **sling** descritas anatómicamente (Miller *et al.*, 2009; Vegesna *et al.*, 2010). En este grupo, existen

estudios fisiológicos **in vivo** que describen el LES desde un punto de vista funcional con: (i) un **componente funcional de músculo liso más proximal**, “**LES superior**”, que se mueve con el esfínter crural implicando un acoplamiento rígido de los ligamentos freno-esofágicos; y (ii) otro **componente músculo liso más distal**, “**LES inferior**”, distal al diafragma aproximadamente en la localización de las **fibras musculares clasp-sling** en la unión esófago-cardias (Brasseur *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2011). Miller *et al.*, proponen que el **tercer componente esfintérico** está asociado a los **grupos de músculos clasp-sling**, pudiendo ser la primera línea de defensa contra el reflujo de los contenidos gástricos en el esófago, y pudiendo tener un papel significativo en la protección contra la *enfermedad por reflujo gastroesofágico* (GERD) (Miller *et al.*, 2011). Sin embargo, estos términos no están aceptados de forma general ni se han utilizado en los estudios **in vitro** que exploran la **asimetría funcional del LES** y que hemos utilizado nosotros como referencia.

La controversia se produce porque, de un lado, los *investigadores básicos* no creen en la existencia del LEC, de otro, los *investigadores clínicos* no creen que el **complejo de fibras musculares clasp-sling** pertenezca funcionalmente al **esfínter esofágico inferior** (Vegesna *et al.*, 2010). Estos últimos investigadores nunca han probado en sus estudios **in vivo** (manométricos y ultrasonográficos) que exista una estructura anatómica con propiedades esfintéricas por encima del **complejo clasp-sling**.

En nuestra opinión, el debate se produce porque: (i) existen diferencias entre las especies **humana** y **animal** utilizadas en algunos estudios previos; (ii) en ambos grupos de investigación se emplean distintas metodologías (**in vivo** vs **in vitro**) a la hora de estudiar el LES. Por ejemplo, en los estudios **in vivo** del LES, éste recibe la influencia mecánica del **diafragma crural**, sin embargo, en los estudios **in vitro** el diafragma no está presente y no puede ser un punto de referencia anatómico que defina la localización anatómica del LES.

Nuestros estudios no se diseñaron específicamente para solucionar esta discrepancia, aún así, podemos decir que nosotros no encontramos fibras circulares en el extremo distal del esófago humano cuyo comportamiento fisiológico in vitro, fuese compatible con la definición funcional de un esfínter liso.

## 2) Neurotransmisores implicados en la motilidad del LES

### 2.1 Neurotransmisión neuroefectora

#### 2.1.1 *LES humano*:

##### (a) **Primer objetivo: asimetría funcional**

La neurotransmisión en el **LES humano** la exploramos en las preparaciones procedentes de las regiones **clasp** y **sling**, mediante experimentos **in vitro** en *baño de órganos y microelectrodos*. La exploración de tiras emparejadas de ambas zonas procedentes de un mismo espécimen, nos permitió comparar entre sí las respuestas a un mismo estímulo de las dos regiones anatómicas definidas, y así poder evaluar la existencia de una asimetría funcional en el **LES humano** (*especialización transversal, clasp vs sling*) que ya ha sido observada previamente por nuestro grupo en el **cerdo** (Farré *et al.*, 2007a). Para estudiar dicha asimetría funcional, empleamos los siguientes estímulos: (i) la estimulación eléctrica de campo (**EFS**), (ii) la estimulación de las motoneuronas mediante la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos (**nAChRs**) con **nicotina**.

Nuestro primer objetivo consistió en evaluar en dichas respuestas, la implicación de los componentes nitrérgico (en las respuestas a EFS, en las respuestas a nicotina) y colinérgico (en las respuestas a EFS). Lo primero que observamos fue que como tiras pertenecientes al **LES** (regiones **clasp** y **sling**), éstas desarrollaban, durante el periodo de equilibrado, un tono total pero de diferente magnitud siendo mayor el de las **tiras clasp**. Estas diferencias en el tono total también las encontraron otros autores en otros estudios **in vivo** en el **LES humano** (Preiksaitis *et al.*, 1994b) y felino (Muinuddin *et al.*, 2004) sin embargo, en el **LES porcino** observamos previamente, que eran las fibras **sling** las que desarrollaban un tono total mayor (Farré *et al.*, 2007a).

En los estudios de estimulación vimos:

(i) Estimulación de las MNs entéricas del **LES humano** mediante EFS

**Respuesta de relajación del LES: Resultados mecánicos (Baño de órganos):**

En los estudios **in vitro** de las preparaciones del **esfínter esofágico inferior (LES)** en los que se explora la estimulación eléctrica (**EFS**) de las MNs del plexo mientérico, se ha descrito una respuesta patrón consistente en una relajación intensa que se produce durante el estímulo eléctrico (**relajación-on**), seguida de una

contracción que se produce cuando acaba el estímulo (**contracción-off**). Esta respuesta patrón característica se observa tanto en el modelo animal (cobaya (Beveridge & Taylor, 1989), zarigüeya (Tøttrup *et al.*, 1991), gato (Fields *et al.*, 1995), rata (Farré *et al.*, 2007b), cerdo (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006)) como en el modelo humano (González *et al.*, 2004). Su correlación **in vivo** se corresponde con la relajación del **LES**. Cuando se inicia la deglución, el **LES** se relaja durante 8-10s y seguidamente se contrae (*aftercontraction*) en la parte rostral/proximal del **LES**, esta contracción es continuidad de la contracción peristáltica en el **EB**. Esta serie de fenómenos permite el paso del bolo deglutido a través del **LES** con una resistencia mínima y restablece la barrera al contenido gástrico inmediatamente después de su paso (Chang *et al.*, 2003).

En nuestro estudio **in vitro**, vimos que la respuesta a la estimulación eléctrica en ambas zonas **clasp** y **sling** consiste en una relajación que se produce durante el estímulo (**relajación-on**) seguida de una contracción que aparece una vez finaliza el estímulo (**contracción-off**, que describiremos seguidamente en la página 162) (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006). Comparando las relajaciones control de ambas zonas, observamos que las relajaciones de las preparaciones **clasp** eran de mayor *amplitud* que las obtenidas en la zona **sling** en todas las frecuencias estudiadas. Resultados éstos que se correlacionan con los obtenidos en el estudio **in vitro** previo realizado en el cerdo (Farré *et al.*, 2007a), en el que se evaluó la asimetría funcional del **LES porcino**.

Para evaluar estas diferencias a la estimulación eléctrica de las tiras **clasp** y **sling** emparejadas, diseñamos un protocolo experimental que nos permitiera caracterizar farmacológicamente estas respuestas inducidas por **EFS**. Por ello, para estudiar en las dos regiones anatómicas cuál es la contribución de los diferentes neurotransmisores responsables de dichas respuestas, utilizamos antagonistas de cada uno de ellos. Comenzamos estudiando la implicación del óxido nítrico (NO), y la obtuvimos calculando la diferencia entre la respuesta control y la inducida tras la incubación del antagonista de la síntesis del NO, el L-NNA. Vimos que el componente nitrérgico estaba presente en ambas regiones anatómicas pero su contribución en las relajaciones de cada una de ellas difería. En la **zona clasp** observamos una mayor implicación nitrérgica a bajas frecuencias de estimulación eléctrica, mientras que en la **zona sling** era mayor en las frecuencias altas. En ambas regiones observamos una **contracción-on** (comentada más adelante) seguida de una **relajación-off**. Aunque en

ambas zonas obtuvimos dicha **relajación-off no-nitrérgica**, en las **tiras clasp** esta respuesta presentaba una *amplitud* similar a la *amplitud* de la propia **relajación-on** control y, una *amplitud* mucho mayor que la obtenida en las **tiras sling**. En dicha **relajación-off** estudiamos el **componente no-nitrérgico** (componentes *purinérgico* y *peptidérgico* que comentaremos más adelante, en la página 163) de la respuesta. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente en el **LES porcino**, en las **fibras clasp** y **sling** del **cerdo** la estimulación neuronal indujo respuestas nitrérgicas más intensas en la zona **clasp** que en la **sling** (Farré *et al.*, 2007a), y además, las respuestas en el lado **clasp** mostraban también un componente inhibitorio doble (**nitrérgico** y **no-nitrérgico**) mientras que en la zona **sling** era mayoritariamente nitrérgico (Farré *et al.*, 2007a). Los resultados en ambas especies sugieren mecanismos de co-neurotransmisión en la relajación del **LES**.

### Respuesta de contracción del LES: Resultados mecánicos (*Baño de órganos*):

Al estimular eléctricamente ambas regiones vimos que la respuesta de **contracción-off** control, producida tras la relajación una vez que finaliza el estímulo, también es diferente en ambas zonas **clasp** y **sling** del **LES humano**. Comparándolas hemos observado que eran de mayor amplitud las contracciones de las preparaciones **sling** en casi la totalidad de las frecuencias estudiadas. Una vez incubamos el L-NNA, para el estudio del **componente nitrérgico**, observamos en ambas zonas una **contracción-on** de similar *amplitud* a frecuencias altas de estimulación, y en dicha respuesta contráctil evaluamos el **componente colinérgico** con el antagonista **atropina**. Vimos que en ambas zonas la **atropina** abolía la contracción en todas las frecuencias estudiadas, sin embargo, mientras que en las **tiras sling** no observamos ninguna relajación, en las **tiras clasp** obtuvimos una importante **relajación-off** remanente/residual en la que estudiaríamos el **componente no-nitrérgico** (que comentaremos más adelante, en la página 163) de la respuesta. La contribución del **componente colinérgico** era mayor en la **zona sling**. En cuanto a las contracciones observadas en el **LES porcino** por Farré *et al.*, vieron que tras la estimulación neuronal era en la zona **clasp** la que presentaba una **contracción-off** control de mayor *amplitud*, no la región **sling**. Posteriormente, al inhibir la guanilato ciclasa con **ODQ** también se evidenciaron **contracciones-on** en ambos lados del **LES**, siendo de mayor *amplitud* en el lado **sling** que en el **clasp**. En ambas regiones se estudió el **componente colinérgico**, que resultó ser más débil en las **tiras clasp** y más intenso en las **sling** (Farré *et al.*, 2007a).

(ii) Estimulación de las MNs entéricas del **LES humano** a través de los **nAChRs** con **nicotina**

Cuando estimulamos las MNs a través de los **nAChR** con **nicotina**, vimos que la relajación presentaba una magnitud diferente en cada zona **clasp** y **sling** del **LES**, siendo mayor la de la zona **clasp**. En las **tiras clasp** observamos los **componentes nitrérgico** y **no-nitrérgico** (comentamos más adelante, en la página 163) de la respuesta, siendo de tipo inhibitorio ambos y de tipo excitatorio el segundo, mientras que en las **tiras sling** sólo observamos el **componente nitrérgico**. Por tanto, los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios liberados por las MNs cuando se emplea la **nicotina** como estímulo químico tienen una importancia diferente según sea la zona del **LES**. En el estudio previo de nuestro laboratorio en el **LES porcino** (Farré *et al.*, 2007a), aunque la **nicotina** indujo relajaciones similares en ambas regiones del **LES**, en las preparaciones **clasp** se evidenciaron también unos **componentes de tipo inhibitorio nitrérgico** y **no-nitrérgico** importantes, mientras que en las **sling** sólo estaba presente el **componente nitrérgico** (Farré *et al.*, 2007a). La fisiología clásica del sistema nervioso entérico del **esófago humano** supone la existencia de **receptores nicotínicos** en las MNs inhibitorias y excitatorias. Estos estudios han confirmado nuestros trabajos previos que evidencian la presencia de estos receptores en las motoneuronas inhibitorias pero no en las excitatorias (González *et al.*, 2004).

### (b) Segundo objetivo: Origen de la asimetría funcional

Como hemos explicado previamente, hemos observado **diferencias funcionales** en ambas regiones del **LES humano**. Éstas podrían deberse a dos grandes factores: (i) la existencia de una mayor sensibilidad o eficacia a los neurotransmisores inhibitorios y excitatorios por parte de las fibras musculares, ó (ii) a la existencia de una diferente inervación selectiva (distribución de MNs inhibitorias y excitatorias) en estas dos regiones. Para distinguir la causa de dicha diferencia funcional, realizamos un grupo de experimentos en los que exploramos las **diferencias regionales miogénicas** entre las **zonas clasp** y **sling** del **LES humano** para fármacos representativos de los principales neurotransmisores putativos inhibitorio (**SNP**, **nitroprusiato de sodio**) y excitatorio (**CCh**, **carbacol**). Cuando añadimos de forma exógena los agonistas **SNP** y **CCh** a las preparaciones **clasp** y **sling** vimos que: en **ambas** regiones **clasp** y **sling** (i) las mismas concentraciones de **SNP** inducían relajaciones de similar *amplitud*, presentando una curva de concentración con valores de  $EC_{50}$  y *efecto máximo* parejos, y (ii) las mismas concentraciones

de CCh provocaban contracciones, también, de *amplitud* similar con un *efecto máximo* semejante. Por tanto, estos resultados indicarían que las respuestas farmacológicas miogénicas a estos agonistas exógenos son muy parecidas en las **zonas clasp** y **slings** del LES, sin embargo, en dichas zonas diferían las respuestas obtenidas tras la estimulación eléctrica de las MNs y la posterior liberación endógena de los neurotransmisores. En conjunto, estos resultados sugerirían una fuerte especialización a nivel del plexo mientérico. En el estudio previo en el **LES porcino** (Farré *et al.*, 2007a), se vio que las **fibras clasp** y **slings** respondían con distinta magnitud a la adición exógena del SNP y del CCh. La misma concentración de SNP relajaba más las tiras **clasp** que las **slings**, y la contracción inducida por la misma concentración de **carbacol** era casi el doble en las tiras **slings** que en las **clasp**. En el cerdo, las tiras de cada región del LES mostraban unos perfiles de la curva de concentración diferentes para el SNP y el CCh, evidenciando en cada zona una sensibilidad diferente para el SNP y una eficacia diferente para el CCh (Farré *et al.*, 2007a). Futuros estudios con técnicas de biología molecular, que permiten cuantificar la expresión de estos receptores, combinados con estudios inmunohistoquímicos permitirán resolver esta cuestión.

Estudiamos, también, el efecto de los antagonistas de las vías inhibitoria (L-NNA) y excitatoria (**atropina**) sobre el *tono total* desarrollado por las tiras en ambas zonas del **LES humano**, con ello evaluábamos la actividad neural tónica ejercida sobre el mismo: vimos, por un lado, que el L-NNA provocaba un incremento del *tono* mayor en la zona **clasp** que en la **slings**; y por otro, que la **atropina** no provocaba ningún cambio en el *tono basal* de las fibras de ambas regiones. En el estudio previo en el **LES porcino** (Farré *et al.*, 2007a), el ODQ incrementó significativamente el *tono* sólo en la zona **slings**, mientras que la **atropina** lo disminuyó en ambas zonas con una mayor caída del mismo en la zona **slings** (Farré *et al.*, 2007a). Así, en el cerdo la modulación neural era nitrérgica y colinérgica en la zona **slings** mientras que en la zona **clasp** era únicamente colinérgica y de menor magnitud (Farré *et al.*, 2007a).

Llegado a este punto y compendiando los datos obtenidos respecto al *tono* muscular del LES humano diríamos que: (i) el *tono basal* desarrollado es mayor en las fibras **clasp** que en las fibras **slings**; (ii) tiene un origen miogénico dado que se desarrolla de forma progresiva durante el periodo de equilibrado, y el SNP relaja casi totalmente las fibras de ambas regiones del LES, aboliéndolo; (iii) muestra una influencia neural debida a la liberación

tónica de pequeñas cantidades de neurotransmisores, principalmente, desde las MNs intrínsecas de tipo inhibitorio (nitrérgico).

### (c) Tercer objetivo: estudiar el componente no-nitrérgico de la relajación en la zona clasp del LES humano

Como hemos explicado anteriormente, tras la evaluación de los componentes nitrérgico y colinérgico de las respuestas inducidas mediante la estimulación neuronal con EFS o con **nicotina** en ambas zonas del **LES humano**, sólo observamos un componente no-nitrérgico, evidenciado por una **relajación-off** remanente/residual, en las respuestas inhibitorias de la **región clasp**, ya que en la **región slings** la respuesta inhibitoria era mayoritariamente nitrérgica. Estos resultados confirman la mayor preponderancia de la inervación inhibitoria en la **zona clasp** y coinciden con los observados previamente en el **LES porcino**, ya que también en esta especie se encontró un componente mayoritariamente nitrérgico en la zona **slings**, y un doble componente inhibitorio en la zona **clasp**. Por esa razón, también en los estudios previos en el cerdo utilizamos previamente las **fibras clasp** para estudiar la neurotransmisión caracterizándola farmacológicamente (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006).

Por tanto y volviendo a esta tesis y al tejido **humano**, *nuestro tercer objetivo* consistió en estudiar, en las **preparaciones clasp** la neurotransmisión inhibitoria no-nitrérgica mediante: (1) la evaluación del efecto farmacológico directo de los neurotransmisores no-nitrérgicos (**purinas** a través de los receptores P2Y<sub>1</sub> y P2X; y **VIP**) sobre el *tono* del LES (Farré *et al.*, 2006); (2) la evaluación de la liberación endógena de estos neurotransmisores mediante la caracterización farmacológica de la **relajación-off** inducida tras la estimulación de las motoneuronas inhibitorias con EFS y **nicotina** (Farré *et al.*, 2006).

(1) Para evaluar los posibles neurotransmisores inhibitorios implicados en la **relajación-off** de la **zona clasp** del **LES humano**, estudiamos el efecto de la aplicación exógena de los agonistas de los receptores purinérgicos P2Y<sub>1</sub>, P2X y de los receptores peptidérgicos con el ADPβS, el α,β-meATP y el VIP, respectivamente. Los agonistas ADPβS y VIP indujeron una relajación, mientras que el α,β-meATP indujo una contracción tras la estimulación de los receptores P2X. La α-**quimotripsina** (peptidasa que facilita la fragmentación de enlaces peptídicos mediante una reacción de hidrólisis) bloqueó la relajación directa inducida por el VIP. En el **LES porcino** tanto el ATP como el VIP indujeron una respuesta inhibitoria a través de un mecanismo insensible a la TTX. Mientras que el ATP relajaba completamente

el **LES** induciendo una respuesta bifásica, el **VIP** era menos eficiente e inducía una respuesta monofásica (Farré *et al.*, 2006). Los experimentos realizados con **TTX** mostraban claramente que el efecto de estos agonistas se producía a través de su interacción con receptores musculares en la célula muscular lisa del **LES**.

(2) Para estudiar la naturaleza de los neurotransmisores no-nitrérgicos liberados de forma endógena por la estimulación neural con **EFS** y con **nicotina**, diseñamos un protocolo experimental de bloqueo secuencial empleando distintos antagonistas (Farré *et al.*, 2006): (i) Evaluamos el componente purinérgico de la respuesta inducida por **EFS** una vez bloqueados los componentes nitrérgico y colinérgico de la misma. En la respuesta inducida con **nicotina**, evaluamos el componente purinérgico tras el bloqueo nitrérgico; (ii) En cuanto al componente peptidérgico de las respuestas inducidas, bien con **EFS** bien con **nicotina**, lo evaluamos tras los bloqueos nitrérgico y purinérgico de las mismas. Esto nos permite ir evaluando los neurotransmisores responsables de cada tipo de relajación.

Los resultados en el **LES humano** demuestran que la respuesta inhibitoria no-nitrérgica presenta un componente purinérgico y un componente peptidérgico, componentes que se observaron previamente en el estudio *in vitro* en el **LES porcino**, y que, en el cerdo, contribuían también en diferente grado a la respuesta inhibitoria resistente al bloqueo nitrérgico y colinérgico (Farré *et al.*, 2006). En la relajación-off no-nitrérgica de las fibras **clasp** del **LES humano**, el componente purinérgico se debe a una purina que actúa sobre receptores P2Y<sub>1</sub>. Estos resultados se evidencian por la inhibición de la respuesta-off por parte del **MRS2179** (antagonista P2Y<sub>1</sub>). Igualmente observamos que dicho antagonista no afectaba a la relajación control del **LES**, (relajación-on), en la que no habíamos ejercido el bloqueo nitrérgico previo. En el **LES porcino** (Farré *et al.*, 2006), se evidenció un componente sensible a la apamina que estaba mediado por **ATP** o una **purina** relacionada que actuaba sobre receptores P2Y<sub>1</sub>, en esta especie y a diferencia del **humano**, se encontró también un efecto menor sobre receptores P2X pre- i/o post-sinápticos, evidenciado por la inhibición de la respuesta en presencia de **NF279** (antagonista P2X) (Farré *et al.*, 2006).

Nuestros experimentos en el **LES humano** sugieren que el componente peptidérgico se debe fundamentalmente a un receptor de la familia **VIP/PACAP**. Encontramos que la  **$\alpha$ -quimotripsina** antagonizaba la relajación no-nitrérgica tras el bloqueo nitrérgico con **L-NNA** y

purinérgico con **MRS2179**. Estos resultados sugieren la participación del **VIP** en la relajación del **LES** inducida tras la estimulación de las MNs inhibitorias mediante estímulo eléctrico y a través de los receptores **nAChRs**. También en el **LES porcino** se mostró un componente peptidérgico (Farré *et al.*, 2006), evidenciado por un efecto menor ejercido sobre la relajación en presencia de la  **$\alpha$ -quimotripsina**. El **PACAP**, y no el **VIP**, era el responsable de esta respuesta ya que en el estudio de adición exógena se vio que la relajación rápida, inducida por este agonista en el **LES porcino**, se antagonizaba con **apamina** (Farré *et al.*, 2006).

Por tanto, nuestros resultados mecánicos en el baño de órganos en el LES humano sugieren que la estimulación de las motoneuronas del plexo mientérico, tanto mediante **EFS** como por estimulación de los **nAChRs** inducen la liberación de: (i) el óxido nítrico (NO), siendo el neurotransmisor inhibitorio principal en la zona **clasp** y único en la zona **sling** del **LES**; (ii) una purina, con una contribución menor, que actúa sobre los receptores P2Y<sub>1</sub> únicamente en la zona **clasp**; (iii) y el **VIP** en la zona **clasp**.

#### (d) Cuarto objetivo: estudiar las respuestas electrofisiológicas en las zonas **clasp** y **sling** del **LES** (*Microelectrodos*)

Nuestro *cuarto objetivo* consistió en evaluar la naturaleza de los neurotransmisores inhibitorios en las regiones **clasp** y **sling** del **LES**, también mediante *estudios electrofisiológicos* con: (1) la caracterización farmacológica de la respuesta inducida por la estimulación eléctrica de las MNs inhibitorias; (2) la administración exógena de dos agonistas *purinérgicos* y uno *peptidérgico* en las preparaciones **clasp** del **LES humano**.

(1) En primer lugar, diseñamos un protocolo experimental en el que evaluamos el bloqueo secuencial del **IJP** ó *potencial postunión inhibitorio*, la respuesta obtenida, con diferentes antagonistas. Obtuvimos, en ambas zonas **clasp** y **sling** del **LES humano**, una hiperpolarización control monofásica y sostenida. La *amplitud* y *duración* del **IJP** eran muy similares en ambas regiones aunque ligeramente superiores en las fibras **clasp**.

Nuestras preparaciones manifestaban pequeñas y continuas fluctuaciones de potencial de membrana. Los *potenciales de unión inhibitorios espontáneos* (**sIJP**) se producen como consecuencia de una liberación tónica y continua de neurotransmisores inhibitorios (Gil *et al.*, 2010), y pueden estudiarse midiendo su desviación estándar (**SD-sIJP**, expresado en mV) (Powell *et al.*, 2001). Siguiendo

la línea descrita por el Doctor Marcel Jiménez, investigador de la UAB, para el estudio de estos IJPs, evaluamos el **SD-sIJP** en ambas zonas del **LES**. Obtuvimos valores similares entre ellos, y mucho menores a los encontrados en otras zonas del tracto GI, como el colon (Gil *et al.*, 2010) y el esfínter anal interno (Opazo *et al.*, 2011) de rata. Estos datos sugieren que en el **LES humano** (regiones **clasp** y **sling**) el potencial de membrana es más estable que el encontrado en otras zonas del tracto GI, como el colon (Gil *et al.*, 2010) y el esfínter anal interno (Opazo *et al.*, 2011) de rata, y que hay muy pocos potenciales unitarios espontáneos (*spontaneous unitary potentials*) en las condiciones experimentales en las que nosotros estudiamos las tiras. Una posible explicación para esta discrepancia podría ser la aplicación de un grado de estiramiento diferente en el estudio **in vitro** de los diversos tejidos, a la dificultad para estirar el **esófago humano** debido al grosor importante de la pared muscular y a la marcada resistencia a la distensión de la región del **LES**.

Con respecto al estudio farmacológico de las respuestas electrofisiológicas: (i) En primer lugar, evaluamos los componentes purinérgico y nitrérgico del **IJP** previo bloqueo colinérgico, por este orden. Los resultados nos indican que el **IJP** del **esófago humano** está mediado únicamente por NO y que no se evidencia un componente *purinérgico*, ya que el **MRS2179** no afectaba ni a la *amplitud* ni a la *duración* de la respuesta; (ii) En segundo lugar, evaluamos también de forma independiente, la implicación de un componente peptidérgico en el **IJP** de la región **clasp** del **LES humano**, pero no observamos efecto alguno en presencia de la  **$\alpha$ -quimotripsina**; (iii) En tercer lugar, estudiamos el **IJP** de la región **clasp**, con un nuevo protocolo experimental en el que invertimos el orden de los antagonistas siguiendo la misma secuencia que empleamos en los *estudios mecánicos (baño de órganos)*, es decir, aplicamos inicialmente un bloqueo nitrérgico, y a continuación administramos **atropina** y **MRS2179** para poder desenmascarar la posible existencia de un **IJP** mediado por los receptores P2Y<sub>1</sub> (componente purinérgico), pero de nuevo encontramos que el **IJP** en las preparaciones **clasp** del **LES humano** era completamente nitrérgico; (iv) En cuarto lugar, analizando el efecto de los antagonistas empleados sobre el *potencial de membrana en reposo (RMP)* vimos que la adición secuencial de la **atropina**, **MRS2179**,  **$\alpha$ -quimotripsina** y L-NNA no modificaba significativamente dicho **RMP**.

En nuestros estudios previos en las **preparaciones clasp** del **LES porcino** (ver Figure 5 en Apéndice de Capítulo 1, página 71) también evaluamos los neurotransmisores implicados en el

**IJP** aplicando los dos protocolos experimentales que empleamos en el **LES humano**. Intentamos evidenciar el componente purinérgico con dos bloqueos secuenciales: (i) evidenciarlo tras el bloqueo colinérgico inicial y previamente al bloqueo nitrérgico por el **L-NAME**; y (ii) evidenciarlo tras los bloqueos nitrérgico y colinérgico. En ambas condiciones experimentales vimos que el **MRS2179** no afectaba al **IJP** inducido en el **LES porcino**. Estos resultados nos indicaban que el **IJP** era nitrérgico ya que se bloqueó completamente con el **L-NAME**.

#### Discrepancias entre los resultados mecánicos y electrofisiológicos:

Por tanto, comparando los resultados de los *estudios mecánicos (baño de órganos)* con los obtenidos en los *estudios electrofisiológicos (microelectrodos)* en el **LES humano**, vimos que aunque hemos podido demostrar la participación del NO, de purinas (receptores P2Y<sub>1</sub>) y de VIP en la relajación del **LES humano** tras la estimulación de las MNs inhibitorias, el **IJP**, sin embargo, era totalmente nitrérgico.

La discrepancia electro-mecánica consistiría en: (i) en el estudio del **LES humano** los registros mecánicos muestran una relajación-on nitrérgica durante el pulso eléctrico y una relajación-off una vez acaba el estímulo de EFS. Sin embargo, los registros electrofisiológicos únicamente muestran un IJP nitrérgico durante el estímulo eléctrico. Por tanto, tras la estimulación de las MNs inhibitorias en los *estudios de baño de órganos* tenemos la posibilidad de explorar tanto las respuestas-on (nitrérgica) como las respuestas-off (no-nitrérgicas) mientras que en los *estudios electrofisiológicos* sólo podemos estudiar las respuestas-on ya que el **IJP** era completamente nitrérgico; (ii) También encontramos esta discrepancia entre registros *mecánicos* y *electrofisiológicos* en el **LES porcino** siguiendo los mismos protocolos experimentales; (iii) La *amplitud* del **IJP** es similar en ambas zonas **clasp** y **sling** del **LES humano**, sin embargo en las fibras **clasp** la relajación mecánica que vimos tras la estimulación de las MNs entéricas inhibitorias era mayor que en las fibras **sling**; (iv) queriendo profundizar en este análisis, evaluamos el efecto directo de los agonistas purinérgicos **ADP $\beta$ S** y **MRS2365** y peptidérgico **VIP** sobre el *tono* (mecánico) y el *potencial de membrana en reposo (RMP)* (electrofisiológico) de las preparaciones **clasp** del **LES humano**.

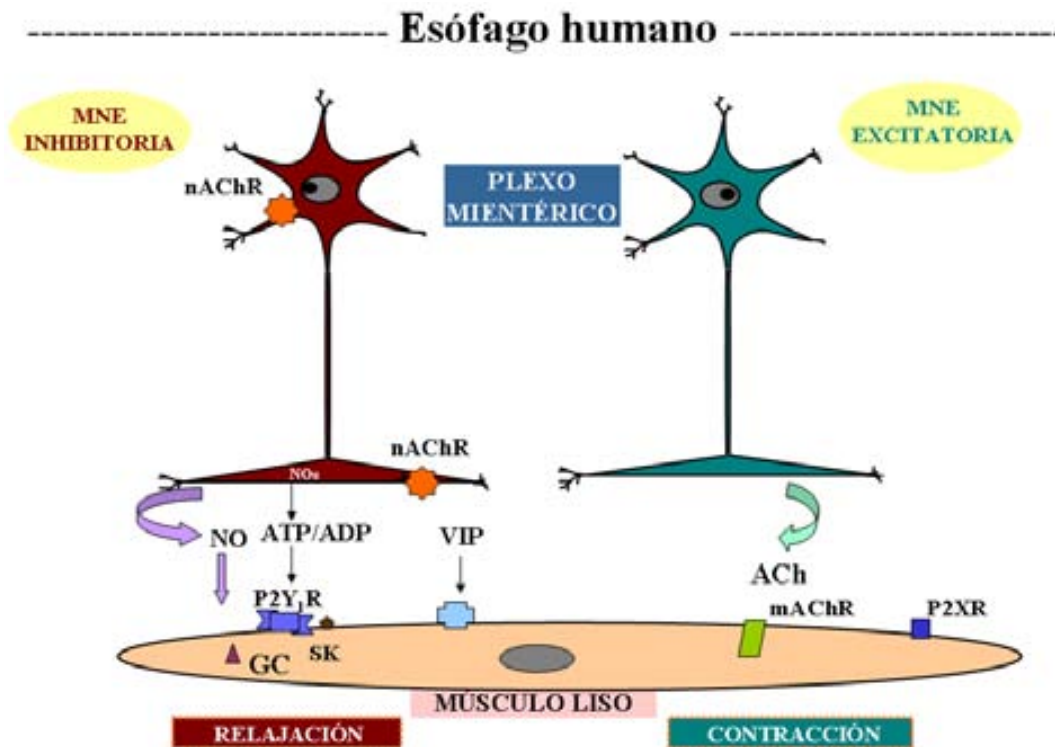
Los resultados nos mostraron la misma desigualdad al comparar las respuestas *mecánica* y *electrofisiológica* del agonista P2Y **ADP $\beta$ S**, el agonista específico P2Y<sub>1</sub> **MRS2365** y el agonista peptidérgico **VIP**, ya que los tres agonistas inducían



una relajación mecánica pero no una hiperpolarización de las fibras **clasp**.

Por tanto, nuestros resultados electrofisiológicos indican que el **IJP** en el **LES humano** es completamente nitrérgico independientemente de la región estudiada, del orden de los antagonistas establecido para su caracterización y de las características del estímulo eléctrico. Estos resultados complementan los obtenidos en los *estudios mecánicos* y permiten

completar la caracterización de los principales aspectos de la neurotransmisión neuroefectora inhibitoria en el **LES humano**.



**Figura 1. Representación esquemática de las dos vías paralelas principales de la neurotransmisión neuroefectora en el esófago humano.** La relajación del LES está mediada: (i) en la zona clasp, por el NO y con una contribución menor por una purina actuando sobre los receptores P2Y<sub>1</sub> y por el VIP; en la zona sling, por el NO de forma mayoritaria.

## 2.2 Neurotransmisión neuro-neuronal

Los mecanismos de transmisión sináptica y estimulación de las motoneuronas, tanto excitatorias como inhibitorias, del plexo mientérico esofágico también han sido motivo de nuestra atención y estudio. Las motoneuronas neuroefectoras son estimuladas por fibras vagales durante la *peristalsis primaria* y por redes de interneuronas del plexo mientérico durante la *peristalsis secundaria*.

### Ligand-gated ion channels (LGIC)

En los estudios *in vitro* en el **LES humano** (González *et al.*, 2004) y **porcino** (Farré *et al.*, 2006) previos que desarrollamos en nuestro laboratorio, vimos que era posible estimular las

MNs entéricas inhibitorias de forma fácil y eficiente empleando tanto la estimulación eléctrica (**EFS**) como la estimulación química (**nicotina**) a través de los **receptores nAChRs**, ya que en ambos procedimientos se observaba una relajación intensa y de similar *amplitud*. Sin embargo, las conclusiones obtenidas correspondientes a la respuesta de las MNs entéricas excitatorias a estos mismos estímulos fueron diferentes. Cuando se bloqueaba la vía inhibitoria con los antagonistas **L-NNA** (González *et al.*, 2004) ó **L-NAME** (Farré *et al.*, 2006) (componente nitrérgico) y **apamina** (González *et al.*, 2004; Farré *et al.*, 2006) (componente purinérgico) aunque si bien es cierto que ambos estímulos inducían una contracción del LES de componente colinérgico, estas contracciones diferían en su magnitud: mientras que con **EFS amplitud** de la contracción observada era importante, con la **nicotina** la contracción resultó



mucho menor. Estas diferencias evidenciaban la dificultad para estimular, **in vitro**, a las MNs excitatorias a través de los **nAChRs** con **nicotina** en el **LES humano** y **porcino**. Esta necesidad de bloquear los componentes nitrérgico y purinérgico de la vía inhibitoria para poder mostrar las respuestas de las MNs excitatorias colinérgicas ya se había observado previamente en un estudio **in vivo** en el **LES** de la cobaya (Yuan & Brookes, 1999).

Aunque es bien sabido que la **ACh** que se libera de las fibras vagales y que actúa en las MNs inhibitorias y excitatorias a través de los **nAChRs** sería el principal mecanismo de transmisión en estas vías, esto no estaría tan claro en el caso concreto de la vía excitatoria (Chang *et al.*, 2003). Como hemos comentado anteriormente, en el **LES humano** y **porcino** la vía excitatoria presentaba un componente nicotínico débil, así pues la neurotransmisión podría deberse a un componente no-nicotínico. Este hecho ya se evidenció en anteriores estudios **in vivo** en el **LES** de la zarigüeya, en los que se vio la implicación de los **receptores muscarínicos M1** (Gilbert *et al.*, 1984) y de los **serotoninérgicos (5-HT<sub>3</sub>)** (Paterson *et al.*, 1992) en la transmisión gangliónica al **LES** en la vía inhibitoria vagal. Y ya en estudios más recientes en otros tejidos gastrointestinales, se ha descrito la participación de los **receptores nAChRs, purinérgicos (P2X) y serotoninérgicos (5-HT<sub>3</sub>)** en la transmisión sináptica rápida (**fEPSP, potenciales postsinápticos excitatorios rápidos**) a las MNs entéricas (Galligan, 2002; Galligan *et al.*, 2000). Los **receptores nAChRs, P2X y 5-HT<sub>3</sub>** son receptores tipo *canales iónicos dependientes de ligando (LGIC)* que expresan las MNs (neuronas S) del sistema nervioso entérico (Galligan, 2002). Por tanto, teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, podemos decir que mientras que la estimulación de las MNs inhibitorias por parte de las fibras vagales es fácil y eficiente, las MNs excitatorias requieren neurotransmisores no-nicotínicos u otros circuitos que no se conocen en su totalidad. Este fue el punto de partida que utilizamos para explorar la naturaleza de estos mecanismos no-nicotínicos de estimulación de las motoneuronas inhibitorias y excitatorias.

Para ello, diseñamos una estrategia experimental que nos permitiera estudiar estos mecanismos no-nicotínicos de estimulación de las MNs en el **LES porcino**. En dicha estrategia combinábamos tres herramientas: (1) el medio Krebs, que en función de la vía motora a explorar podía ser bien estándar (lo que permitía la estimulación simultánea de ambas vías, inhibitoria y excitatoria) ó bien modificado (**NANC, NANNNP**

para las vías exclusivamente inhibitoria ó exclusivamente excitatoria, respectivamente); (2) la estimulación eléctrica de campo (EFS), una vez decidida la vía a estudiar y seleccionado el medio Krebs correspondiente, la **EFS** nos permitía evidenciar la integridad de dichas vías en cada uno de los medios; (3) los receptores interneuronales implicados en ambas vías motoras y a través de los cuales pretendíamos estimular a las MNs inhibitorias y/o a las MNs excitatorias (Galligan, 2002) en el **LES porcino**.

### 2.2.1 LES porcino

#### (a) Primer objetivo: estudio de los LGIC en el LES (clasp) porcino, medio Krebs estándar

*Medio Krebs estándar:* medio en el que estimulamos de forma simultánea a las MNs inhibitorias y a las MNs excitatorias.

*Nuestro primer objetivo* en este estudio consistió en describir la función de los **LGIC** en las respuestas (efecto de la estimulación) de la región **clasp** del **LES porcino** y que estarían implicados en la neurotransmisión gangliónica en las vías motoras inhibitoria y excitatoria. Para evaluar el efecto de la estimulación de los **LGIC** en la zona **clasp** del **LES porcino** hemos utilizado dos tipos de estímulos en un medio Krebs estándar: (i) la estimulación de campo eléctrico (EFS), y (ii) la estimulación de las MNs a través de la activación de los **receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs)**, los **purinérgicos P2X**, los **serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>**, mediante la adición exógena de sus agonistas. También estudiamos los **receptores de glicina, glutamato y GABA**, aunque éstos los expresarían las neuronas AH (Galligan, 2002).

(i) Desarrollando el primer punto y como ya vimos en anteriores trabajos de nuestro laboratorio (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006), las **tiras clasp** del **LES porcino**, de este estudio, nos respondieron a la estimulación de **EFS** con una **relajación-on** durante el estímulo, seguida de una pronunciada **contracción-off** una vez finalizado el mismo. Caracterizamos la respuesta inducida por **EFS**. Esta respuesta a **EFS** la bloqueamos con **TTX** en su totalidad, demostrando que las respuestas están causadas por la activación simultánea de las MNs inhibitorias y excitatorias. Además, el bloqueador gangliónico **hexametonio** no afectó a la respuesta, mostrando que la **EFS** no producía una activación de las fibras preganglionares y que el origen de las respuestas se debe a la estimulación del soma de las MNs neuroefectoras (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006). Con el empleo de la neurotoxina  **$\omega$ -conotoxina (GVIA)**, bloqueador de

los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N (Daniel *et al.*, 2000), estudiamos el efecto de la inhibición de la liberación de neurotransmisores desde las varicosidades nerviosas en las respuestas inducidas por EFS. Observamos que la contracción se reducía de forma importante, mientras que la relajación sólo se veía afectada de forma moderada. Este resultado sugiere: por un lado, la participación de mecanismos de exocitosis y canales de calcio de tipo N en la liberación de neurotransmisores excitatorios; y por otro, que una parte importante de la liberación de neurotransmisores inhibitorios desde las MNs-principalmente de NO- no está mediada por los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo N, como ya se vio en estudios previos en el LES del perro (Daniel *et al.*, 2000).

Y empleamos el antagonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**, **ondansetron**, para conocer la posible implicación de dichos receptores en las respuestas inducidas tras la estimulación eléctrica simultánea de las MNs inhibitorias y de las MNs excitatorias. Vimos que el **ondansetron** inhibía parcialmente la **contracción-off** del LES sin afectar a su **relajación-on**, sugiriendo la presencia de los **5-HT<sub>3</sub>** en la vía motora excitatoria.

(ii) Desarrollando el segundo punto, para evaluar la función de los LGIC expresados por las motoneuronas, e implicados en las respuestas del LES, estudiamos el efecto de la estimulación de dichos receptores mediante la aplicación exógena de **nicotina** (agonista del receptor **nAChR**) y **citisina** (agonista de  **$\beta_4$ -nAChR**), **serotonina** (**5-HT**, agonista no selectivo de los receptores **5-HTR**) y **2-Me-5-HT** (agonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**),  **$\alpha,\beta$ -meATP** (agonista del receptor **P2X**). En nuestro estudio, encontramos que el LES porcino se relajaba con la **nicotina**, **citisina** y el  **$\alpha,\beta$ -meATP**, y se contraía con la **5-HT**, el **2-Me-5-HT** y el  **$\alpha,\beta$ -meATP**, pero con respuestas que diferían bastante en su magnitud. Debido a la posibilidad de desensibilización de los LGIC por parte de los agonistas, hicimos unos estudios previos en los que evaluamos la magnitud de las respuestas tras la adición repetida de los mismos. Vimos que la **nicotina** (Farré *et al.*, 2006), el  **$\alpha,\beta$ -meATP**, la **5-HT** y la **2-Me-5HT** no desensibilizaron a sus receptores específicos ya que las adiciones repetidas no indujeron ningún cambio en la magnitud de sus respuestas.

(A) Receptores nAChR: En nuestro estudio en el medio Krebs estándar en el que podemos estimular ambas MNs inhibitorias y excitatorias simultáneamente, vimos que la **nicotina** estimuló con intensidad la vía motora inhibitoria, relajando el LES porcino con una magnitud similar a la magnitud de las respuestas obtenidas mediante estimulación eléctrica. El **hexametonio** abolió la

respuesta indicando la especificidad de este agonista por los receptores **nAChRs** (Farré *et al.*, 2006). La **TTX** inhibió parcialmente la relajación inducida por **nicotina**, hecho que nos sugiere la presencia de receptores nicotínicos, tanto en regiones somatodendríticas como en las terminaciones nerviosas de las MN inhibitorias (Farré *et al.*, 2006). Los **nAChRs** neuronales están formados por diferentes combinaciones de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que determinan las propiedades de cada subtipo diferente de **nAChR** (Galligan & North, 2004). La **citisina** es un agonista selectivo de los **nAChRs** que contienen la subunidad  **$\beta_4$** , y presenta la misma efectividad que la **nicotina** provocando una depolarización rápida en el 70% de las neuronas S, y no depolariza las neuronas AH que excita la **nicotina** (Schneider *et al.*, 2000). En nuestro estudio vimos que la **citisina** relajaba el LES porcino con una respuesta de menor *amplitud* que la inducida por la **nicotina** y por la EFS.

(B) Receptores 5-HTR (5-HT<sub>3</sub>R): En nuestro estudio en el medio Krebs estándar en el que podemos estimular ambas MNs inhibitorias y excitatorias simultáneamente, vimos que tanto la **5-HT** como el agonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**, la **2-Me-5-HT**, contrajeron el LES porcino, siendo de menor magnitud la contracción inducida por la **2-Me-5-HT** (48%). Estos resultados son similares a los de un estudio previo en las neuronas mientéricas del intestino de la cobaya, que mostró una respuesta para la **2-Me-5-HT** del 20% de la obtenida con la **5-HT** (Zhou & Galligan, 1999). La máxima respuesta de la **5-HT** era significativamente menor (59%) que la inducida por la estimulación eléctrica de las MN. A continuación evaluamos la acción de diferentes antagonistas y bloqueadores sobre las respuestas inducidas por dichos agonistas, para dilucidar la implicación de ambos agonistas en las vías motoras inhibitoria y excitatoria. La **TTX**, por una parte, redujo parcialmente la contracción inducida por la **5-HT**, y por otra, inhibió casi en su totalidad la inducida por la **2-Me-5-HT**, sugiriendo la localización de **receptores 5-HT<sub>3</sub>** en las MNs excitatorias. La **atropina** redujo parcialmente ambas respuestas. El **ondansetron** (antagonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**) redujo moderadamente la contracción inducida por **5-HT** y de forma más intensa, pero no completamente, la de la **2-Me-5-HT**. Este resultado coincide con estudios previos en el tracto GI de la cobaya (González & Puig, 1997; Yamano & Miyata, 1996) en el que ya se vio este antagonismo competitivo del **ondansetron** respecto a la **2-Me-5-HT** (Butler *et al.*, 1988; Cohen *et al.*, 1989; Costall *et al.*, 1987; Mohan & Ravikuar, 1995). También evaluamos el efecto del **SR140333** (antagonista taquiquinético del receptor **NK<sub>1</sub>**) sobre las contracciones inducidas por la **5-HT** y la

**2-Me-5-HT**, y observamos que ambas se reducían. Además, bloqueamos simultáneamente los componentes colinérgico y taquiquinérgico (**atropina** y **SR140333**, respectivamente) de la respuesta inducida por la **2-Me-5-HT** en el **LES porcino**, y no se evidenciaba ninguna relajación de las tiras, únicamente vimos que se reducía de forma importante la contracción inducida por **2-Me-5-HT**.

Por tanto, estos resultados de los agonistas serotoninérgicos, que nos muestran una contracción del **LES porcino** sin conseguir inducir ninguna relajación bajo ninguna circunstancia experimental, sugieren que las MNs inhibitorias no responderían a los agonistas 5-HT<sub>3</sub>. Hecho que corroboramos al ver que el antagonista del receptor 5-HT<sub>3</sub>, ondansetron, sólo reducía la contracción inducida por **EFS** sin afectar a la relajación del **LES**. Michel *et al.*, ya habían mostrado previamente en el fundus gástrico de la cobaya, que los agonistas 5-HT<sub>3</sub> activaban específicamente las neuronas excitatorias colinérgicas, sin mediar en las respuestas inhibitorias (Michel *et al.*, 1997). Este tema es controvertido, ya que en anteriores estudios in vivo en otras especies, como el hurón (Blackshaw *et al.*, 1995) ó la zarigüeya (Rattan & Goyal, 1978), se vio la participación de receptores serotoninérgicos en la vía inhibitoria, ya que los antagonistas de los mismos atenuaban la relajación del **LES** inducida por estimulación vagal. Sin embargo, Paterson *et al.*, estudiando la vía motora inhibitoria hacia el **LES** de la zarigüeya, no encontraron ningún papel importante para los **receptores** de la **5-HT** (Paterson *et al.*, 1992).

(C) Receptores P2X: En nuestro estudio en el medio Krebs estándar en el que podemos estimular ambas MNs inhibitorias y excitatorias simultáneamente, el **α,β-meATP**, agonista del **receptor P2X**, produjo dos tipos de respuestas en el **LES porcino**. En el 60% de las tiras indujo una contracción moderada y mucho menor que la inducida eléctricamente, mientras que en el 40% restante indujo una relajación cuya magnitud era un 49 % menor que la de las respuestas a **EFS**. Diseñamos un protocolo de adición secuencial de los antagonistas de los **receptores P2X** (**NF279**) y **P2Y** (**MRS2179**) para evaluar la respuesta inhibitoria del **LES** inducida por el **α,β-meATP**, y que aplicamos únicamente, por tanto, en el grupo de tiras del **LES** que presentaban una relajación como respuesta control. Vimos que el **NF279** reducía la relajación de forma moderada y el **MRS2179** abolía la relajación residual. Estos resultados sugieren que el **α,β-meATP** podría estimular tanto **receptores P2X** como **receptores P2Y** en las vías motoras inhibitoria y excitatoria hacia el **LES**. En el estudio previo en el **LES porcino** ya se demostró el componente purinérgico en la relajación no-

nitrérgica sensible a la **apamina** y este componente estaba mediado principalmente por una purina a través del **receptor P2Y** y en menor magnitud por el **receptor P2X** (Farré *et al.*, 2006).

(D) Receptores de Glicina, Glutamato, GABA: En nuestro estudio en el medio Krebs estándar en el que podemos estimular ambas MNs inhibitorias y excitatorias simultáneamente, evaluamos la adición exógena de los respectivos agonistas **glicina**, **glutamato** y **GABA**. En nuestro trabajo vimos que la **glicina** contraía el **LES porcino** y el **glutamato** inducía una respuesta bifásica, en ambos casos de forma moderada pero únicamente a concentraciones muy altas. El **GABA** no indujo ninguna respuesta en nuestras preparaciones del **LES porcino**. Hemos querido evaluar el efecto de la adición exógena de dichos agonistas sobre el tono del **LES porcino** aún sabiendo que son las neuronas AH (subgrupo de neuronas clasificadas así de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas en el intestino (Hirst *et al.*, 1974)) las que expresan dichos receptores (Galligan, 2002).

En conclusión, durante los experimentos en el medio Krebs estándar observamos que cuando estimulamos simultáneamente las MNs inhibitorias y excitatorias a través de los **LGIC** vemos: *relajaciones muy intensas* a través de los **nAChRs** localizados tanto en las regiones del soma como en el terminal nervioso de las MNs inhibitorias, una *contracción* y sin conseguir ninguna relajación a través de la estimulación de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>**, y observamos *relajaciones moderadas* en el 40% de las tiras y *contracciones* en el 60% a través de los **receptores P2X**.

#### ¿NEUROTRANSMISIÓN GANGLIÓNICA Ó PRESINÁPTICA?

En la introducción del Capítulo 3 (esófago porcino) utilizamos el término *receptor presináptico* (*Ligand-gated ion channels*) para referirnos a los receptores localizados en las MNs entéricas y que interaccionan con los neurotransmisores liberados por las interneuronas y las fibras vagales. Pero el editor del artículo de la revista *Neurogastroenterology & Motility* nos indicó que lo sustituyéramos por *transmisión gangliónica*, que se establecía entre las **fibras eferentes vagales** y las **neuronas intramurales excitatoria e inhibitoria**.

Nosotros nos referíamos a los *receptores presinápticos* teniendo en cuenta que en la transmisión neuromuscular la MN inhibitoria o excitatoria sería la neurona transmisora y los receptores localizados en ellas serían

“presinápticos” mientras que la célula muscular sería la célula receptora ó postsináptica.

Encontramos ejemplos en la literatura sobre la nomenclatura de estos receptores y los denominan presinápticos en el trabajo de Galligan (Galligan, 2002) que es el que hemos utilizado como base a nuestro estudio. Sin embargo, en un artículo previo los mismos autores se refieren a esta transmisión como gangliónica (Galligan *et al.*, 2000).

### **(b) Segundo objetivo: estudio de la respuesta a la estimulación selectiva de las motoneuronas inhibitorias y excitatorias a través de los LGIC en el LES (clasp)**

En el punto anterior hemos comentado, por un lado, la existencia de un componente no-nicotínico en la neurotransmisión de la vía excitatoria en el **LES humano** y **porcino**, y por otro la implicación de los LGIC en estas respuestas en otros tejidos gastrointestinales de otras especies.

Nuestro *segundo objetivo* consistió en evaluar qué receptores (LGIC) estaban implicados en la estimulación de las vías motoras inhibitoria ó excitatoria desde las interneuronas y las fibras vagales hacia el **LES porcino**. Para ello estudiamos la estimulación selectiva de las MNs inhibitorias ó excitatorias intrínsecas a través de los receptores nAChRs, P2X, 5-HT<sub>3</sub>.

Hasta este punto, hemos discutido el estudio de la implicación de los LGIC en las vías motoras inhibitoria y excitatoria hacia el **LES porcino** en un medio Krebs estándar. Es importante señalar el medio empleado en el punto anterior, porque en él la estimulación de las MNs del plexo mientérico se realiza de forma simultánea y no específica (se estimulan tanto las excitatorias como las inhibitorias). En esas condiciones experimentales hemos encontrado que la estimulación de diferentes LGIC inducen diferentes respuestas: (i) contracción; (ii) relajación; (iii) ambas de forma secuencial.

Por tanto, nuestro siguiente paso en el estudio de la transmisión neuro-neuronal tuvo como objetivo evaluar la posibilidad de estimular de forma selectiva las MNs inhibitorias ó las MNs excitatorias a través de diferentes LGIC. Para ello era necesario disponer de dos medios concretos: (1) un medio específico para poder evidenciar el efecto de estimular selectivamente las MNs inhibitorias, en este caso utilizamos la conocida **solución de Krebs NANC** (no-adrenérgico, no-colinérgico), empleada desde hace años para explorar los mecanismos que median las respuestas inhibitorias en el tracto GI; y (2) un medio específico para poder evidenciar el efecto de estimular selectivamente las MNs excitatorias, que definimos como **solución Krebs NANNP** (no-adrenérgico, no-nitrérgico, no-purinérgico) que concretamos siguiendo el estudio previo en las tiras **clasp** del **LES porcino** (Farré *et*

*al.*, 2006), ya que fue en éste trabajo donde se determinaron los diferentes componentes que contribuían a la respuesta inhibitoria del **LES porcino**.

Empleando los dos medios de forma independiente pasamos a nuestro objetivo principal, que era ver si éramos capaces de estimular de forma selectiva las MNs inhibitorias ó las MNs excitatorias intrínsecas a través de diferentes agonistas de LGIC.

#### **2.2.1.1 Medio NANC (no-adrenérgico, no-colinérgico)**

Como hemos indicado previamente, el **medio NANC** se emplea para el estudio de las respuestas de la vía inhibitoria mientras se bloquean los efectos de los neurotransmisores liberados por las MNs excitatorias.

En el **medio NANC** se bloquean los componentes adrenérgico con **fenotamina** y **propranolol** (antagonistas de los **receptores  $\alpha$ -y  $\beta$ -adrenérgicos** respectivamente) y el colinérgico con **atropina**. Es una solución clásica y ampliamente utilizada a lo largo de los años para el estudio y caracterización de la vía inhibitoria (Bennett, 1997).

Como en nuestros estudios previos en la zona **clasp** del **LES porcino** se evidenció un componente no-colinérgico en la contracción (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006), evaluamos la posible contribución de un componente taquiquinérgico en dicha respuesta con dos métodos: (i) Caracterizamos la respuesta inducida por **EFS** con los antagonistas de los receptores taquiquinérgicos **NK<sub>1</sub> (SR140333)** y **NK<sub>2</sub> (NK<sub>2</sub>ra)** y vimos que los receptores implicados en la vía excitatoria en el cerdo eran únicamente los **NK<sub>1</sub>**. Ambos antagonistas no afectaron a la relajación; (ii) Evaluamos, por tanto, en las tiras **clasp** del **LES porcino** el efecto de la adición exógena del agonista taquiquinérgico del **receptor NK<sub>1</sub>**, la **substancia P (SP)**. Observamos que inducía una contracción que prácticamente se reducía con **SR140333** y no se afectaba con el antagonista del receptor **NK<sub>2</sub>**. Nuestros resultados indican que los receptores taquiquinérgicos que podrían mediar parcialmente la contracción del **LES porcino** inducida por **EFS** serían los **NK<sub>1</sub>**. Pensamos inicialmente en modificar la **solución NANC** añadiendo el bloqueo no-taquiquinérgico (**solución NANCNT**) con el **SR140333**, pero su disolución con etanol nos dificultaba el estudio y finalmente decidimos utilizar la **solución NANC** en su composición tradicional.

En el **medio NANC**, observamos que la estimulación eléctrica (**EFS**) de las MNs en las preparaciones **clasp** del **LES porcino** inducía una **relajación-on** de magnitud similar a la obtenida en condiciones estándar -incluso mayor a altas

frecuencias-, seguida de una **contracción-off** de *amplitud* muy disminuida respecto al control. Por tanto en este medio nos dispusimos a estudiar la posibilidad de estimular selectivamente las MNs inhibitorias a través de diferentes agonistas de los **LGIC**, entre ellos:

(A) Receptores nAChR: en este medio en el que estimulamos selectivamente las MNs inhibitorias, vimos que la **nicotina** estimuló la vía motora inhibitoria relajando el **LES porcino** pero con una intensidad menor que la observada en el medio estándar. La **citisina** no indujo ninguna respuesta significativa. Observamos pues que las respuestas de ambos agonistas nicotínicos eran menos intensas en este **medio NANC** que en **condiciones estándar**. Este hecho ya lo habíamos observado en el **LES humano**, el cómo la **atropina** antagonizaba la relajación inducida por la **nicotina** (González *et al.*, 2004). Por otro lado, y como ya hemos descrito en condiciones estándar y en estudios previos (Farré *et al.*, 2007a; Farré *et al.*, 2006), vimos que la **TTX** antagonizaba parcialmente la relajación del **LES** inducida por **nicotina** y sugería la presencia de **nAChRs** en el soma y en los terminales nerviosos de las MNs inhibitorias. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, diseñamos en este estudio un protocolo experimental para evaluar el efecto de la **atropina** en la relajación inducida por **nicotina** en el **LES porcino**. Consistió en explorar el efecto de concentraciones crecientes de **atropina** sobre la relajación inducida por **nicotina**, ésta a concentración única, tanto en condiciones estándar como en presencia de **TTX**, en estas últimas se estimulaban selectivamente los **nAChRs** del terminal nervioso de las MNs inhibitorias. Observamos que a medida que aumentábamos la concentración de **atropina** se reducía la relajación inducida por **nicotina** hasta abolirla a una concentración de **atropina** 100 veces superior a la empleada en el **medio NANC**. En presencia de **TTX**, la **atropina** también redujo la relajación y finalmente la bloqueó. Estos resultados sugerían un antagonismo farmacológico directo de la **atropina** a concentraciones altas, sobre los **nAChRs**. Con este experimento se seleccionó una concentración de **atropina** ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para los estudios posteriores que no tuviera efectos importantes sobre las respuestas de la **nicotina**. Sin embargo, para explicar el antagonismo del **medio NANC** (que contiene **atropina**  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) sobre las respuestas inducidas por **nicotina** que observamos en nuestro estudio, nuestra primera hipótesis sigue siendo el efecto de un antagonismo farmacológico directo. En estudios previos ya se vio que la **atropina** puede bloquear varios subtipos de **receptores nAChRs neuronales** a concentraciones tan bajas como **0.1**

$\mu\text{mol L}^{-1}$  (que se usa frecuentemente en experimentos para antagonizar **receptores muscarínicos (mAChRs)**) (Barajas-López *et al.*, 2001; Zwart & Vijverberg, 1997).

Otro punto interesante que se nos presentó con este **medio NANC** es si su empleo ofrecía ó no una información extra respecto a un **medio únicamente NC** (no-colinérgico), nosotros decidimos utilizar el **medio NANC** porque dicho **medio NANC** es el que se utiliza para explorar la naturaleza de los neurotransmisores responsables de la transmisión entre los nervios y las células musculares lisas (Makhlouf & Grider, 1963). En un principio se creía que las transmisiones entre las neuronas entéricas estaban mediadas por **acetilcolina** y **noradrenalina** (paradigma clasico), pero se vio que esto no era correcto gracias a experimentos electrofisiológicos que demostraron la existencia de hiperpolarizaciones mediadas por transmisores no-adrenérgicos no-colinérgicos (Bennett *et al.*, 1966). Clásicamente, es bien conocido que el principal mecanismo para relajar el **LES** es mediante la liberación de transmisores inhibitorios NANC sobre el músculo liso circular (Sanders & Ward, 1992).

(B) Receptores serotoninérgicos, 5-HT<sub>3</sub>: en este medio en el que estimulamos selectivamente las MNs inhibitorias, vimos que tanto la **5-HT** como el agonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**, la **2-Me-5-HT**, indujeron de nuevo una contracción del **LES porcino**, aunque de magnitud mucho menor (62-78%) a las obtenidas en condiciones estándar. En ambos casos no observamos ninguna relajación del **LES porcino**. La **TTX** redujo parcialmente la contracción inducida por la **5-HT** y por la **2-Me-5-HT** sugiriendo la localización de **receptores 5-HT<sub>3</sub>** en las MNs excitatorias. Y como hemos comentado anteriormente en las condiciones estándar, estudiamos el bloqueo simultáneo de los componentes colinérgico y taquiquinérgico (**atropina** y **SR140333**, respectivamente) en un intento de aplicar un **medio NCNT** (**no-colinérgico no-taquiquinérgico**) pero incluso ni en estas condiciones experimentales tan favorables para la estimulación selectiva de las motoneuronas inhibitorias pudimos evidenciar una relajación del **LES porcino**. Estos resultados sugerirían, igual que en condiciones estándar, que las MNs inhibitorias no responden a los agonistas de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>**, y que la vía serotoninérgica no es una vía relevante para la estimulación de las MNs inhibitorias del **LES**.

(C) Receptores purinérgicos P2X: en este medio en el que estimulamos selectivamente las MNs inhibitorias, vimos que el  **$\alpha,\beta$ -meATP**, agonista del **receptor P2X**, indujo únicamente una respuesta de relajación en todas las tiras de **LES porcino** estudiadas. Esta respuesta inhibitoria no se

veía afectada por TTX o L-NAME sugiriendo la presencia de **receptores P2X** en las células musculares lisas del **LES porcino**. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en el **LES porcino**, en los que el antagonista **NF279** antagonizaba parcialmente la relajación del **LES** no-nitrérgica después de estimular las MNs inhibitorias (Farré *et al.*, 2006). Ishiguchi *et al.*, describieron previamente en el píloro de la rata que la relajación inducida por el **ATP** se atribuía a **receptores P2X** localizados en las células musculares lisas, resultado totalmente en línea con nuestras observaciones (Ishiguchi *et al.*, 2000). Ya hemos visto anteriormente en las condiciones estándar la inhibición de las respuestas de relajación por parte de los antagonistas **NF279** y **MRS2179**, entonces teniendo en cuenta los resultados en ambos medios el  $\alpha, \beta$ -meATP podría estimular los **receptores P2X** y **P2Y** inhibitorios en las células musculares lisas del **LES porcino**. Estudios previos de nuestro grupo realizados por Farré *et al.*, ya demostraron previamente que los **receptores P2Y<sub>1</sub>** musculares y en menor medida los **receptores P2X** musculares participan en la vía inhibitoria del **LES porcino** (Farré *et al.*, 2006).

En conclusión, durante los experimentos en el medio NANC observamos que cuando estimulamos selectivamente las MNs inhibitorias a través de los LGIC vemos: relajaciones muy intensas a través de los **nAChRs** localizados tanto en las regiones del soma como en el terminal nervioso de las MNs inhibitorias, no observamos ninguna relajación a través de la estimulación de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>** y observamos relajaciones intensas a través de los **receptores P2X** localizados en la célula muscular lisa.

### 2.2.1.2 Medio NANNNP (no-adrenérgico, no-nitrérgico, no-purinérgico)

Como hemos indicado previamente, hemos empleado el **medio NANNNP** para el estudio de las respuestas de la vía excitatoria mientras se bloquean los efectos de los neurotransmisores liberados por las MNs inhibitorias. En este **medio NANNNP** se bloquean los componentes adrenérgico con **fenotamina** y **propranolol** (antagonistas de los **receptores  $\alpha$ -** y  **$\beta$ - adrenérgicos** respectivamente), el nitrérgico con **L-NAME** (inhibidor de la sintasa de NO) y el purinérgico con **apamina** (bloqueador de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de baja conductancia, ( $K_{(Ca, slow)}$ )).

En los experimentos en el **medio NANNNP**, observamos que la estimulación eléctrica de las MNs en las preparaciones **clasp** del **LES porcino** inducía una respuesta en la que se inhibe

prácticamente la relajación y transforma la **contracción-off** en una **contracción-on** de mayor *amplitud*. Por tanto, en este medio nos dispusimos a estudiar la posibilidad de estimular selectivamente las MNs excitatorias a través de agonistas de los **LGIC** mediante el estímulo de:

(A) Receptores nAChR: en este medio en el que estimulamos selectivamente las MNs excitatorias, vimos que la **nicotina** estimuló la vía motora excitatoria ya que contraía el **LES porcino**, pero lo hacía de forma muy débil, llegando sólo al 10% de la contracción obtenida al estimular eléctricamente las MNs excitatorias. La **citisina** no indujo ninguna respuesta significativa. Estos resultados nos indicarían que no podemos estimular significativamente la vía motora excitatoria mediante estos agonistas nicotínicos en el **LES porcino**. Nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos en estudios previos en el **LES humano** (González *et al.*, 2004) y **porcino** (Farré *et al.*, 2006) en nuestro laboratorio. En estudios clásicos *in vivo* en el **LES** de la zarigüeya, el grupo de Goyal ya sugería que la única influencia vagal que recibía el esfínter era inhibitoria, es decir, que el vago no mediaba ninguna influencia sobre las MNs excitatorias en el **LES** (Rattan & Goyal, 1975; Rattan & Goyal, 1974). Y coincidiendo con nuestros resultados, estudios posteriores realizados en el mismo animal también encontraron que la estimulación vagal no producía respuestas excitatorias tras el bloqueo completo de las vías del **LES** inhibitorias, sugiriendo que las MNs excitatorias en el **LES** carecen de influencia vagal nicotínica directa (Yuan *et al.*, 1998). Estos interesantes resultados abren la cuestión sobre cuáles son los mediadores y los mecanismos que participan en la estimulación vagal de las motoneuronas excitatorias.

(B) Receptores 5-HTR (5-HT<sub>3R</sub>): en este medio en el que observábamos el efecto de la estimulación selectiva de las MNs excitatorias, también vimos que tanto la **5-HT** como el agonista del receptor **5-HT<sub>3</sub>**, la **2-Me-5-HT**, indujeron de nuevo una contracción del **LES** de magnitud menor en el caso de la **5-HT** (62%) y mucho menor en la **2-Me-5-HT** (37%) comparada con la obtenida en condiciones estándar. Para estudiar dichas diferencias, diseñamos un protocolo que nos permitiera evaluar el efecto de los distintos antagonistas sobre las respuestas pero de forma secuencial. Vimos que ambas contracciones no eran sensibles a la **apamina**, pero al bloquear el componente adrenérgico con **fenotamina** se redujo moderadamente la contracción de **5-HT** e intensamente la de **2-Me-5-HT**. Estos resultados nos indicarían que los **receptores  $\alpha$ -adrenérgicos**

podrían interferir con la activación de las MNs colinérgicas por parte de los **agonistas de la 5-HT** (Gonella *et al.*, 1979). En este **medio NANNNP**, la **TTX** también redujo la contracción inducida por los agonistas serotoninérgicos, de forma moderada pero significativa la respuesta de la **5-HT** y en su mayor parte la de la **2-Me-5-HT**, sugiriendo la localización de **receptores 5-HT<sub>3</sub>** en las MNs excitatorias del **LES porcino**.

(C) **Receptores P2X**: en este medio en el que observamos el efecto de la estimulación selectiva de las **MNs excitatorias**, vimos que el  **$\alpha,\beta$ -meATP** indujo únicamente una contracción en **todas las tiras** de **LES porcino** estudiadas y que presentaba una magnitud mucho mayor que la obtenida en condiciones estándar, no se observó una relajación en ningún caso. La **TTX** redujo parcialmente la contracción inducida por el agonista de los **receptores P2X**. Estos resultados nos indicarían que el  **$\alpha,\beta$ -meATP** estaría actuando sólo sobre los **receptores P2X** localizados en la vía motora excitatoria porque los **receptores P2X** inhibitorios musculares estarían bloqueados con la **apamina** de ahí que no se produzca relajación ninguna. Además recordemos que en condiciones estándar cuando bloqueábamos la respuesta inhibitoria del  **$\alpha,\beta$ -meATP** con **NF279** y **MRS2179** se incrementaba la respuesta contráctil. En conjunto, esto sugeriría que el **efecto neto** del  **$\alpha,\beta$ -meATP** es un equilibrio por el balance de las respuestas inhibitoria y excitatoria.

En conclusión, durante los experimentos en el medio NANNNP observamos que cuando estimulamos selectivamente las MNs excitatorias a través de los LGIC obtenemos contracciones muy débiles a través de los **nAChRs**, *contracciones* intensas a través de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>** localizados en las MNs excitatorias colinérgicas, *contracciones* muy intensas a través de los **receptores P2X** localizados en las MNs excitatorias colinérgicas.

### 3) Cuerpo esofágico humano y porcino

#### 3.1 EB humano

La zona de músculo liso del **cuerpo esofágico (EB)** presenta la propiedad para contraerse en dos intervalos diferentes en relación a su estimulación, en el inicio de la estimulación con una **respuesta-on**, y tras el cese de la estimulación con una **respuesta-off** (Diamant & El-Sharkawi, 1977). Los estudios llevados a cabo en el **EB** muestran:

(i) en los estudios **in vitro** de las preparaciones del músculo liso del **cuerpo esofágico (EB)** en los que se explora la estimulación eléctrica (EFS) de las MNs del plexo mientérico, se obtiene una **respuesta patrón** consistente en una contracción inicial que se produce durante el estímulo (**contracción-on**) seguida de una contracción que se produce una vez cesa el estímulo (**contracción-off**) (Christensen & Lund, 1969; Crist *et al.*, 1984a). Ambas respuestas presentan un *periodo de latencia* que se corresponde con el tiempo que transcurre desde el inicio del estímulo hasta que comienza la contracción. Esta *latencia* de la contracción es más corta en los **segmentos proximales** que en los **segmentos distales esofágicos**, y la duración de este *periodo de latencia* se incrementa progresivamente desde el esófago proximal al distal (Crist *et al.*, 1984b; Weisbrodt & Christensen, 1972). Al evaluarse las respuestas a lo largo del esófago se define el *gradiente de latencia* (diferencia entre las *latencias* de las contracciones de tiras obtenidas en distintas zonas a lo largo del esófago) lo que determina la *velocidad de peristalsis* (Crist *et al.*, 1984a; Crist *et al.*, 1984b).

De la misma forma, cuando se realizan estudios **ex vivo** sobre el **esófago completo aislado** en los que se evalúa el efecto bien de la estimulación del nervio vago, bien de la estimulación eléctrica local ó de la estimulación con balón de distensión se obtiene una respuesta de contracción transitoria al inicio de la estimulación, **respuesta-on**, y una contracción intensa que se produce con un retraso variable tras el cese de la estimulación, **respuesta-off**, con una progresión peristáltica a lo largo del músculo liso esofágico (Christensen, 1970; Christensen & Lund, 1969; Diamant, 1974; Tieffenbach & Roman, 1972).

(ii) En cuanto a los estudios **in vivo**, la respuesta manométrica que se obtiene en respuesta a la deglución es una contracción peristáltica normal, peristalsis primaria, que presenta un *gradiente de latencia* creciente a lo largo del esófago (Yamato *et al.*, 1992). Por otro lado, la estimulación eferente vagal causa una respuesta al inicio del periodo de estimulación, **contracción A**, y una respuesta una vez finalizado éste, **contracción B** (Dodds *et al.*, 1978; Yamato *et al.*, 1992). La *velocidad de peristalsis* de las **ondas A** era similar a las contracciones inducidas por deglución, mientras que las **ondas B** se producían casi simultáneamente, poco después del cese del estímulo (Dodds *et al.*, 1978).

Entre los estudios **in vivo e in vitro** existen diferencias con respecto a la *velocidad observada o calculada* a la que la onda peristáltica puede o podría pasar a través del esófago de músculo liso, dependiendo de si la *velocidad peristáltica* se

observa tras la deglución, tras un periodo variable de distensión de balón o de estimulación vagal, o se calcula a partir de la gradación de los retrasos de la **respuesta-off** vista en las tiras de músculo aislada (Diamant & El-Sharkawi, 1977). La velocidad de peristalsis in vivo es más lenta que la velocidad más lenta observada en los estudios **in vitro** (Crist *et al.*, 1984b; Diamant & El-Sharkawi, 1977).

La neurotransmisión en el **cuerpo esofágico (EB) humano** la exploramos en preparaciones procedentes de la parte distal de la zona de músculo liso esofágico mediante experimentos **in vitro** empleando las técnicas de *baño de órganos* y *microelectrodos*. Dichas preparaciones las obtuvimos de los dos grupos de especímenes que ya hemos descrito previamente en la discusión del **LES humano**, a saber: (i) de donantes de órganos, que nos permitió extraer tiras del **EB** y de las dos zonas del **LES** de un mismo espécimen y así realizar dos tipos de comparaciones regionales, una comparación transversal (*asimetría funcional* del **LES**, descrita previamente) y una comparación vertical ó longitudinal (*diferencia vertical de la inervación colinérgica*) de los mecanismos mientéricos de control de la motilidad; (ii) de pacientes con cáncer esofágico.

Nuestros objetivos en este estudio fueron: (1) explorar la neurotransmisión inhibitoria (nitrérgica y no-nitrérgica) en el **EB humano**; (2) evaluar la existencia de una gradiente vertical esofágico, comparando las respuestas mecánicas obtenidas en el **EB humano** con las obtenidas en ambas zonas del **LES humano**. Para llevarlos a cabo utilizamos como estímulo la estimulación neuronal del plexo mientérico mediante **EFS**.

En estudios previos en el **esófago humano** llevados a cabo en nuestro laboratorio, ya demostramos que era posible preparar y montar en *baño de órganos* tiras musculares aisladas procedentes del **LES** y del **EB** bajo unas condiciones estandarizadas (González *et al.*, 2004). En el presente estudio, lo primero que observamos fue que las tiras del **EB humano** no desarrollaban un *tono total activo* (González *et al.*, 2004), cosa que sí vimos en las preparaciones de ambas zonas del **LES**. Ya en trabajos anteriores se demostró que el *tono* desarrollado por el **LES** es un *tono activo* causado específicamente por la contracción activa de las células musculares lisas del **LES**, ya que desaparece cuando se elimina el **calcio extracelular** en presencia de concentraciones altas de un **antagonista de los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo-L**, o con donadores de NO (González *et al.*, 2004; Tøttrup *et al.*, 1990a; Tøttrup *et al.*, 1990b).

### **(a) Primer objetivo: estudio de la neurotransmisión inhibitoria nitrérgica y no-nitrérgica en baño de órganos y microelectrodos**

(i) Estimulación de las MNs entéricas del **EB humano** mediante **EFS (Resultados mecánicos, baño de órganos)**:

En el **cuerpo esofágico humano**, vimos que la *respuesta mecánica* a la estimulación eléctrica consistía en una **contracción-on** de menor magnitud que se producía durante el estímulo, y una **contracción-off** de mayor magnitud poco después del cese del estímulo. Ambas respuestas están definidas por dos parámetros que son la *amplitud* y la *latencia* (González *et al.*, 2004). Cuando hablamos de *amplitud* nos referimos a la magnitud de la contracción, y definimos la *latencia* como el periodo de tiempo que transcurre desde el inicio del estímulo (**EFS**) hasta el inicio de la contracción (Aulí *et al.*, 2008; González *et al.*, 2004). Estas respuestas son muy similares a la que se observan en las ondas esofágicas peristálticas en los estudios **in vivo**.

En el trabajo previo en el **EB humano** que se llevó a cabo en nuestro laboratorio (González *et al.*, 2004), se observó que las tiras circulares de músculo liso distal del **EB** presentaban una **contracción-on** colinérgica y una **contracción-off** que sólo lo era en parte, sugiriendo la participación de un segundo mecanismo no-colinérgico (depolarización de rebote) ó de un segundo neurotransmisor excitatorio (taquiquininas). La inhibición del componente nitrérgico (inhibición de la síntesis de NO con **L-NNA**) transformó la **contracción-off** en una **contracción-on** colinérgica y de mayor *amplitud* completamente bloqueada por **atropina** (González *et al.*, 2004).

En el presente estudio, *nuestro primer objetivo* consistió en evaluar la contribución de los diferentes neurotransmisores responsables de la *amplitud* y la *latencia* de las respuestas del **EB humano** inducidas mediante **EFS**. Para ello diseñamos protocolos experimentales que nos permitieron caracterizar farmacológicamente las *respuestas mecánicas* estudiando en ellas la contribución de los componentes nitrérgico y no-nitrérgico. Realizamos adiciones secuenciales de los antagonistas de los diferentes neurotransmisores, y comenzamos analizando la posible contribución de las **purinas** en los dos parámetros que definen las respuestas contráctiles del **EB humano**. Los cambios en la *amplitud* y la *latencia* los obtuvimos calculando la diferencia en gramos y segundos, respectivamente, entre la contracción control y la inducida tras la incubación de antagonista del receptor P2Y, el **MRS2179**. Vimos que el componente purinérgico no estaba presente en la *latencia*, pero sí en la *amplitud* de la respuesta



porque el **MRS2179** redujo la *amplitud* de ambas **contracciones -on** y **-off** sugiriendo la modulación de las neuronas colinérgicas mediante los receptores P2Y<sub>1</sub> localizados en las motoneuronas excitatorias (Aulí *et al.*, 2008). De forma secuencial, estudiamos la contribución del óxido nítrico (NO) a las respuestas con el L-NNA, inhibidor de la síntesis del NO. Vimos que el L-NNA abolía la *latencia* de la **contracción-off** transformando esta respuesta en una **contracción-on** de mayor *amplitud*. Estos resultados sugerían, por un lado, que la *latencia* de la **contracción-off** presentaba un componente totalmente nitrérgico, y por otro, que su *amplitud* se veía sometida a un efecto inhibitorio de las MNs entéricas nitrérgicas, resultados que coincidían con el estudio previo en el **EB humano** (González *et al.*, 2004). También estudiamos una posible contribución de un componente peptidérgico en las respuestas y vimos que tampoco estaba presente en la *latencia* de la **contracción-off** porque esta *latencia* no se veía afectada en presencia de la  $\alpha$ -quimotripsina, pero sí afectaba mínimamente a la *amplitud* de la **contracción**.

(ii) Estimulación de las MNs entéricas del **EB humano** mediante **EFS (Resultados electrofisiológicos, microelectrodos)**:

Evaluamos también la naturaleza de los diferentes neurotransmisores inhibitorios responsables de la *amplitud* y la *duración* de las *respuestas electrofisiológicas* en el **EB humano**. De la misma forma, exploramos la contribución de los componentes nitrérgico y no-nitrérgico diseñando protocolos experimentales que nos permitieran caracterizar farmacológicamente las respuestas electrofisiológicas. Estudiamos el bloqueo secuencial de los posibles componentes responsables de las respuestas de **IJP** mediante los diferentes antagonistas que utilizamos en los *estudios mecánicos*. En el presente estudio, *nuestro primer objetivo* consistió en evaluar la contribución de los diferentes neurotransmisores responsables de la *amplitud* y la *latencia* de las respuestas inducidas mediante **EFS** en el **EB humano**.

Lo primero que observamos en el **EB** fue que el *potencial de membrana en reposo (RMP)* era más negativo que el obtenido en el **LES** (tanto **clasp** como **sling**), nuestros resultados coincidían con estudios previos en la zarigüeya en los que se mostraba que las células de músculo liso del **LES** presentaban una mayor despolarización y un **RMP** menos negativo que las células de músculo liso del **EB**, con valores de -41 mV respecto a los -50 mV del **cuerpo esofágico** (Zhang *et al.*, 2000). Esta diferencia explicaba que en el **LES** se indujeran *potenciales de acción espontáneos* (“*tipo-spike*”) y se generara su *tono basal* (Zhang *et al.*, 2000). El desarrollo de este *tono activo/espontáneo* en el **LES**

es el que marca la diferencia entre el músculo liso del **EB** y el del **LES**, y estas propiedades especializadas que presentan las células musculares lisas en el **LES** justificarían el origen principalmente miogénico de su *tono basal* (Farré & Sifrim, 2008). De acuerdo con los estudios previos, y como hemos comentado con anterioridad, nuestras preparaciones de **EB humano** no desarrollaron un *tono total activo* a diferencia de las preparaciones de ambas zonas del **LES** que sí que lo hicieron.

En el **EB humano**, igual que en ambas zonas del **LES**, también observamos pequeñas y continuas fluctuaciones del potencial de membrana, los **sIJP** (*potenciales de unión inhibitorios espontáneos*) cuya frecuencia evaluamos con el parámetro **SD-sIJP** (*desviación estándar*) (Powell *et al.*, 2001), viendo que era menor que en otras zonas del tracto GI (Gil *et al.*, 2010; Opazo *et al.*, 2011). Nuestros resultados sugerían que la estabilidad del potencial de membrana en el **EB** era mayor que en otras zonas del tracto GI estudiadas también por nuestro grupo (colon e íleon humano) y que presentaba pocos **sIJP** en las condiciones experimentales en las que se estudiaron las preparaciones.

En el estudio del **IJP** en nuestras preparaciones de **EB humano** obtuvimos una hiperpolarización control monofásica y sostenida. La exploración farmacológica de las respuestas de **IJP** la llevamos a cabo de la siguiente forma: (i) evaluamos la posible contribución de los componentes purinérgico y nitrérgico en el **IJP**, previo bloqueo colinérgico y por este orden. Observamos que el **IJP** en el **EB humano** se debe por completo al **NO** ya que se abolía con el L-NNA, y no se evidenció ningún componente purinérgico porque el **MRS2179** no afectaba ni a la *amplitud* ni a la *duración* de la respuesta; (ii) evaluamos también de forma independiente, la posible existencia de un componente peptidérgico en el **IJP**, y tampoco observamos ningún efecto en las respuestas en presencia de la  $\alpha$ -quimotripsina.

También analizamos el efecto de estos antagonistas sobre el *potencial de membrana en reposo (RMP)* y observamos que la adición secuencial de **atropina**, **MRS2179** y L-NNA, así como la  $\alpha$ -quimotripsina de forma independiente, no modificaban significativamente el **RMP**. Tampoco se vio afectada por dichos antagonistas la frecuencia de los *potenciales de unión inhibitorios espontáneos (sIJP)* debido a que no evidenciamos ninguna variación en el valor del parámetro **SD-sIJP**.

Igual que hicimos con el **LES humano**, también para el **EB humano** comparamos los resultados obtenidos en los *estudios mecánicos (baño de órganos)* con los obtenidos en los *estudios*

*electrofisiológicos (microelectrodos)*. Pudimos demostrar que tras la estimulación de las MNs entéricas inhibitorias tanto la *latencia* de la **contracción-off**, obtenida en los *estudios de baño de órganos*, como el **IJP**, obtenido en los *estudios electrofisiológicos*, eran completamente nitrérgicos. En ningún caso encontramos implicación de las **purinas** o el **VIP** en la vía inhibitoria. Por tanto, y en esta zona esofágica y a diferencia del **LES**, nuestros resultados indicarían que no existen discrepancias mecánico-eléctricas.

### (b) Segundo objetivo: asimetría vertical, EB versus LES (Baño de órganos)

Nuestro segundo objetivo en el estudio del **EB humano** consistió en comparar las *respuestas mecánicas* obtenidas en el **EB** con las obtenidas en ambas zonas **clasp** y **sling** del **LES**, para explorar la posible existencia de una asimetría/gradiente vertical en la inervación esofágica.

**Comparación de las respuestas mecánicas:** Tomamos como elementos de comparación entre el **EB** y el **LES** (ambas zonas **clasp** y **sling**) las respuestas contráctiles inducidas por **EFS** a las dos frecuencias más altas (10Hz y 20Hz), y confrontamos la *amplitud* de dichas contracciones en las tres regiones esofágicas (**corpo esofágico** vs las dos regiones del **LES**). Vimos que tanto las **contracciones-off** control como las **contracciones-on** obtenidas a las mismas frecuencias y tras el bloqueo nitrérgico con el **L-NNA**, respectivamente, presentaban una mayor *amplitud* en el **EB** que en ambas zonas **clasp** y **sling** del **LES**. El bloqueo colinérgico posterior abolió las **contracciones-on** tanto del **EB** como del **LES**. Nuestros resultados sugerían que el efecto de las neuronas colinérgicas era mayor en el **EB** que en el **LES**, y que podía apreciarse un efecto decreciente de la inervación colinérgica intrínseca desde el **EB** hasta ambas zonas del **LES** humano. Este gradiente se había sugerido en estudios animales pero nunca en el humano.

Estudio de las propiedades miogénicas: Como ya comentamos previamente en el **LES**, estudiamos las diferencias regionales miogénicas de las preparaciones de las zonas **clasp** y **sling** del **LES** entre sí, y las de éstas con las obtenidas en el **EB**, procedentes todas del mismo espécimen. Gracias a ello pudimos comparar las respuestas obtenidas en las tres zonas. En el **EB** también exploramos los principales neurotransmisores mediante agonistas inhibitorio (**SNP**) y excitatorio (**CCh**). Cuando añadimos de forma exógena los agonistas **SNP** y **CCh** a las preparaciones de **EB** vimos que: (i) las mismas concentraciones de **SNP** inducían relajaciones de menor magnitud en el **EB** que en ambas zonas del **LES**; (ii) las mismas

concentraciones de **CCh** provocaban contracciones de mayor amplitud en el **EB** que en ambas zonas del **LES**.

Estudiamos también en el **EB**, igual que hicimos con el **LES**, el efecto de los antagonistas de las vías inhibitoria y excitatoria sobre el *tono total* desarrollado por las tiras del **EB**. Así evaluamos qué tipo de influencia neural se ejercía sobre estas preparaciones y pudimos comparar los resultados con los obtenidos en el **LES**. Por un lado, el bloqueo nitrérgico con **L-NNA** produjo un ligero incremento del tono del **EB** que era menor que el causado en ambas zonas del **LES**. Por otro, el bloqueo colinérgico con **atropina** indujo una ligera reducción del mismo con un efecto mayor que el visto en las tiras de ambas zonas del **LES**, regiones en las que no se vio afectado.

En nuestro estudio en el **EB humano**, los resultados indicarían que existe una compleja interacción entre los sistemas excitatorio colinérgico y el inhibitorio nitrérgico. El óxido nítrico (**NO**) liberado de las MNs entéricas inhibitorias sería responsable de la *latencia* y estaría implicado en el control de la *amplitud* de las contracciones esofágicas, y la acetilcolina (**ACh**) liberada de las MNs excitatorias sería responsable de la *amplitud* de las contracciones esofágicas. Estas MNs excitatorias colinérgicas estarían moduladas por **purinas** actuando sobre **receptores P2Y<sub>1</sub>**. Además, nuestro estudio muestra que en el **esófago humano** se observa una especialización regional a la estimulación de las MNs entéricas, con respuestas inhibitorias más intensas en las fibras **clasp** del **LES** y respuestas excitatorias colinérgicas más intensas en el **EB**.

Estudios clásicos *in vitro* en la zarigüeya ya definieron un mecanismo periférico mientérico de control de la peristalsis, que consistía en la descripción de gradientes de neuronas colinérgicas y no-colinérgicas a lo largo de la porción de músculo liso esofágica. La influencia colinérgica predomina en el **esófago proximal** y decrece **distalmente**. Al contrario, la influencia no-colinérgica es mínima en la **zona proximal** y se incrementa en la parte **distal** del esófago (Crist *et al.*, 1984b). Esto quería decir que, por un lado la estimulación de los nervios colinérgicos incrementaban la *amplitud* y la *duración* de la peristalsis esofágica, siendo mayor la influencia de las MNs entéricas colinérgicas en la **zona proximal** de la porción de músculo liso del esófago. Y por otro, también describieron que el **NO** liberado de las MNs inhibitorias controlaba tanto la *latencia* como la *amplitud* de las **respuestas-off** en la **zona distal** del músculo liso esofágico (Crist *et al.*, 1984b). Estudios *in vitro* en la misma especie, describieron que tras el bloqueo nitrérgico se abolía

la **respuesta-off** y se acortaba la *latencia*, obteniéndose una **contracción-on** colinérgica de mayor amplitud que las **contracciones -on** y **-off** previas (Crist *et al.*, 1984b; Murray *et al.*, 1991). En nuestro estudio en el **EB humano**, las **contracciones -on** y **-off** obtenidas eran muy similares a las de los trabajos anteriores. Yamato *et al.*, describieron en un estudio **in vivo** en la zarigüeya, que la contracción que se producía durante la estimulación vagal era principalmente colinérgica y se denominó “ondas A”. La otra contracción que se producía tras el estímulo se denominó “ondas B”. Al bloquear el componente nitrérgico aumentó la velocidad de la **onda A** al decrecer el tiempo de llegada al **esófago distal** (Yamato *et al.*, 1992). Estos resultados son totalmente superponibles a los que hemos encontrado modulando la *latencia* en el **EB humano**.

### 3.2 EB porcino

En el **cuerpo esofágico del cerdo**, nuestro *primer objetivo* fue caracterizar los mecanismos neuronales y los neurotransmisores implicados en el origen de la *peristalsis* en el **EB porcino**.

La neurotransmisión en el **EB porcino** la exploramos, **in vitro**, con las técnicas de *baño de órganos* y *microelectrodos* en preparaciones procedentes de la zona de músculo liso circular esofágico. Preparaciones que obtuvimos de dos áreas situadas por encima de la *línea de transición*. De esta región estudiamos dos grupos de tiras, por un lado tiras de la parte distal (3-5 cm sobre el **LES**) en las que llevamos a cabo el grueso de la investigación, y por otro, tiras de la parte proximal (5-6 cm sobre el **LES**) que nos aportaron una mayor comprensión de los resultados. De ahora en adelante, los resultados comentados se corresponden con los estudios de las tiras de la parte distal, e indicaremos claramente cuando lo sean de la parte proximal.

#### 3.2.1 Estudios de *baño de órganos* (Resultados mecánicos)

Lo primero que observamos en los estudios mecánicos en *baño de órganos* es que las tiras de **EB porcino**, procedieran de la parte distal o de la proximal, no desarrollaban un *tono activo* que sí se observa en ambas zonas del **LES** en la misma especie (Farré *et al.*, 2007a).

Para explorar la neurotransmisión a nivel de la unión neuromuscular utilizamos como estímulo la estimulación eléctrica (**EFS**). Vimos que la respuesta a la **EFS** en el **EB** consistió en una **contracción-on** de pequeña magnitud que se producía en el inicio del estímulo, seguida de una

**contracción-off** intensa que se inicia poco después del cese del estímulo. A diferencia del estudio en el **esófago humano**, en este trabajo la mínima magnitud de la **contracción-on** nos hizo centrarnos exclusivamente en la exploración de las **respuestas -off**. Aun así, estas **contracciones-off** se definen por los dos mismos parámetros que vimos en el **EB humano**, a saber, la *amplitud* y la *latencia* (González *et al.*, 2004). Recordamos que la *amplitud* define la magnitud de la contracción, y la *latencia* el periodo de tiempo que transcurre desde el inicio de la **EFS** hasta el inicio de la contracción (Aulí *et al.*, 2008; González *et al.*, 2004).

En el cerdo, vimos que esta **contracción-off** inducida por **EFS** se debía a la estimulación de las MNs entéricas, tanto inhibitorias como excitatorias, ya que la **TTX** abolía estas respuestas, siendo estos resultados similares a los observados en publicaciones previas en otras especies, ya sea animal como la zarigüeya (Crist *et al.*, 1984a; Lund & Christensen, 1969) o en humanos (González *et al.*, 2004). Sin embargo, y contrariamente a los hallazgos de estudios previos (Bennett & Stockley, 1975; Crist *et al.*, 1984a) la **contracción-on** era insensible a la neurotoxina y se produciría por estimulación directa del músculo (Lund & Christensen, 1969). De nuevo, la morfología de las respuestas mecánicas obtenidas **in vitro** en nuestro estudio era muy similar a la morfología de la onda esofágica que puede observarse **in vivo** en el **cuerpo esofágico** liso del cerdo (Vicente *et al.*, 2001).

Nuestro objetivo en el estudio del **EB porcino** consistió en explorar la contribución de los diferentes neurotransmisores que se liberan al estimular eléctricamente las MNs inhibitorias y excitatorias y que serían responsables de la *amplitud* y la *latencia* de las **contracciones-off**. Para ello, caracterizamos farmacológicamente las respuestas inducidas con **EFS** con los antagonistas de los diversos neurotransmisores ya utilizados en el **LES**. Diseñamos varios protocolos experimentales en los que añadíamos los antagonistas de forma secuencial, y así estudiábamos los posibles componentes implicados en los dos parámetros que definen las respuestas.

En un primer grupo de experimentos exploramos los componentes nitrérgico (**L-NAME**), purinérgico (**MRS2179**) y colinérgico (**atropina**) de forma secuencial. Realizamos tres protocolos en los que alternamos el orden de adición de los tres antagonistas correspondientes en la secuencia, y así evaluamos, por un lado, la contribución neta de cada uno de ellos, y por otro su efecto tras los bloqueos previos.

En un segundo grupo de experimentos independientes exploramos el componente taquiquinérgico (antagonistas **SR140333-NK<sub>1</sub>ra-**,

**GR94800-NK<sub>2</sub>ra**) y la influencia adrenérgica (**fentolamina**, **propranolol** antagonistas  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos, respectivamente).

La amplitud de las respuestas la obtenemos calculando la diferencia en gramos entre las contracciones inducidas con **EFS** previa y posteriormente a la adición del fármaco a estudiar.

Nuestros resultados en el **EB porcino** demuestran que la amplitud de la **contracción-off** se debe a la acetilcolina (**ACh**) y a un componente insensible a la atropina, que en el cerdo sería responsable de un 60-70% de la respuesta, en su mayor contribución a la misma, y que se ha descrito previamente en **humanos** (Krysiak & Preiksaitis, 2001) y en animales como la zarigüeya (Crist *et al.*, 1984a) y el gato (Preiksaitis & Laurier, 1998). Observamos que las **taquiquininas** mediaban moderadamente esta respuesta a través de **receptores NK<sub>2</sub>** (Krysiak & Preiksaitis, 2001), resultados que se evidenciaban por la modesta inhibición por parte del **GR94800**. Por otro lado, en nuestro estudio vimos que la respuesta contráctil también estaba mediada por un componente nitrérgico, un componente purinérgico y un componente peptidérgico, evidenciado por la reducción de la amplitud de las **contracciones-off**, inducidas eléctricamente, por parte del **L-NAME**, el **MRS2179** y la  **$\alpha$ -quimotripsina** respectivamente. En el caso de los antagonistas de los neurotransmisores nitrérgico y purinérgico, la inhibición de la respuesta se daba igual cuando se evaluaban conjuntamente, y así se veía en estudios previos en el colon humano (Aulí *et al.*, 2008), o como en nuestro trabajo independientemente de su orden de adición. En el **EB porcino** vimos que cuando inhibíamos la síntesis de **NO** se reducía la **respuesta-off** coincidiendo con estudios previos en la zarigüeya (Crist *et al.*, 1984b; Murray *et al.*, 1991). La inhibición de la amplitud en presencia de la  **$\alpha$ -quimotripsina** podría ser atribuible también a un mecanismo similar de inhibición de la hiperpolarización. Con respecto al componente purinérgico, nuestros resultados en el **EB porcino** coinciden con los que observamos en el **esófago humano**, la inhibición purinérgica que se pone de manifiesto por el efecto del **MRS2179** sugiere que los receptores P2Y<sub>1</sub> excitatorios ejercerían un efecto de modulación de las neuronas colinérgicas (Aulí *et al.*, 2008), como se ha descrito recientemente en el esófago del gato (Cho *et al.*, 2010).

Nuestros resultados en el **EB porcino** demuestran que la latencia de la **contracción-off** se debe a la estimulación de las MNs entéricas inhibitorias que liberan principalmente **NO** y un segundo neurotransmisor no-nitrérgico, probablemente **ATP**, actuando sobre receptores P2Y<sub>1</sub> con una contribución leve (Farré *et al.*, 2006). Estos resultados se evidencian en la transformación

de la **respuesta-off** en una **contracción-on** que sería consecuencia, por tanto, del bloqueo de la latencia producida tras la adición secuencial de **L-NAME** y **MRS2179**. Pero hemos de señalar un hecho importante en la exploración de la contribución de los componentes nitrérgico y purinérgico en la latencia, y es que observamos un efecto diferente sobre la latencia en función del antagonista de los neurotransmisores inhibitorios que se incubara/explorara en primer lugar. Cuando el primer bloqueo que se llevó a cabo fue el purinérgico vimos que no afectaba a la latencia y sólo se acortó tras el bloqueo nitrérgico secuencial. Cuando la secuencia la iniciamos con el **L-NAME**, aunque observamos la transformación de la **respuesta -off** en **-on** en un alto grado, evidenciamos que era necesario el **MRS2179** para bloquear la latencia en su totalidad. Por otro lado, no vimos ningún efecto sobre la latencia en presencia de la  **$\alpha$ -quimotripsina**.

En la evaluación de la contribución del componente colinérgico en la latencia advertimos que la **atropina**: (i) incrementaba la latencia de todas las respuestas, aunque no de forma significativa, (ii) cuando se incubaba en primer lugar en el bloqueo secuencial, impedía el efecto que los antagonistas de los neurotransmisores inhibitorios deberían haber ejercido sobre la latencia y que sí evidenciamos en los otros órdenes secuenciales explorados en nuestro estudio, esta paradoja ya se describió previamente en la *taenia coli* de la cobaya (Knudsen & Tøttrup, 1992; Ward *et al.*, 1996). No se conoce bien cómo impide/evita la **atropina** estas respuestas dependientes del **NO**. Algunas teorías proponían que se producía una regulación muscarínica en la liberación del NO ó una regulación muscarínica de otro neurotransmisor excitatorio (taquiquininas) que al bloquearse enmascaraban los efectos post-sinápticos del **NO** (Ward *et al.*, 1996). Estos autores exponían que el **NO**, además de su papel como principal neurotransmisor neuroefector inhibitorio, podía tener un papel neuromodulador controlando la liberación de otros neurotransmisores (Ward *et al.*, 1996).

A continuación estudiamos el comportamiento de tiras del EB porcino pero obtenidas de la zona proximal del cuerpo esofágico. Nuestro objetivo era evaluar la influencia muscarínica sobre la amplitud y la latencia en esta parte del esófago y, como está descrito en la literatura, que la **atropina** incrementaba la latencia en el esófago pero de forma importante en la parte **proximal** del músculo liso (Crist *et al.*, 1984b; Dodds *et al.*, 1978; Dodds *et al.*, 1981). En las **preparaciones proximales** también empleamos como estímulo la estimulación eléctrica de campo (**EFS**), y respondieron con una **contracción-on** de

mayor magnitud y una **contracción-off** de menor magnitud comparándolas con las respuestas de la zona **distal** del **EB**.

Estudiamos de forma secuencial la contribución de los componentes colinérgico y nitrérgico a las contracciones obtenidas en la **zona proximal**, y en este orden para poder contrastar el efecto producido por el bloqueo muscarínico en las **preparaciones proximales versus las distales**. En el **EB porcino** vimos que los efectos muscarínicos son más importantes en el **EB proximal**, coincidiendo con lo descrito previamente en el **esófago** de la zarigüeya (Crist *et al.*, 1984b). En nuestro estudio observamos que la **ACh** es la principal responsable de la *amplitud* de la **contracción-off**, estos resultados se evidencian por la intensa inhibición por parte de la **atropina**, sin embargo, ésta no afectó a la *amplitud* de la **respuesta-on**. También observamos que incrementaba significativamente la *latencia* de la **contracción-off**, resultados que confirmaban que los efectos muscarínicos son más importantes en el **EB proximal** que en la parte **distal** (Crist *et al.*, 1984b). El posterior bloqueo nitrérgico, por un lado, incrementó la **contracción-on** y, por otro, no consiguió inhibir la *latencia* de la **respuesta-off**, la **atropina**, igual que en las preparaciones **distales**, impidió el efecto del **L-NAME**.

Por tanto, respecto a la *latencia* hemos observado que: (i) en la zona **distal** del **cuerpo esofágico** para poder inhibir la *latencia*, y que con ello se transforme la **contracción-off** en una **contracción-on**, son necesarios ambos bloqueos nitrérgico y purinérgico; (ii) el efecto de estos neurotransmisores inhibitorios sobre la *latencia* depende de la integridad funcional de las MNs colinérgicas, ya que hemos visto, tanto en la **zona distal** como en la **proximal**, que la **atropina** evitaba/impedía el efecto de los antagonistas de estos neurotransmisores; (iii) la influencia muscarínica es mayor/más importante en el **EB proximal** que en el **distal**. Estos resultados describen la compleja interacción entre las motoneuronas inhibitorias y excitatorias en la génesis de la peristalsis esofágica.

### 3.2.2 Estudios de *microelectrodos* (Resultados electrofisiológicos)

Estimulación de las MNs entéricas del **EB porcino** mediante **EFS (microelectrodos)**:

Siguiendo los resultados que obtuvimos en los estudios de *baño de órganos* nos dispusimos a evaluar, también mediante *estudios electrofisiológicos*, la contribución de los diferentes neurotransmisores inhibitorios en la *amplitud* y la *duración* de las respuestas en el **EB distal porcino**. Diseñamos un protocolo experimental para explorar la contribución de los componentes nitrérgico y no-

nitrérgico, y que nos permitiera caracterizar farmacológicamente las respuestas eléctricas. Con los mismos antagonistas que utilizamos en los *estudios mecánicos (baño de órganos)*, estudiamos el bloqueo secuencial de las respuestas obtenidas mediante estimulación eléctrica (**IJP**) para dilucidar los posibles componentes responsables de dichas respuestas.

En el estudio del **IJP** en nuestras preparaciones en el **EB porcino** obtuvimos una hiperpolarización control monofásica y sostenida. Igual que en ambas regiones del **LES**. La exploración farmacológica de las respuestas de **IJP** la llevamos a cabo de la siguiente forma: evaluamos la posible contribución de los componentes purinérgico, peptidérgico y nitrérgico en el **IJP**, previo bloqueo colinérgico y por este orden. Observamos que el **IJP** en el **EB porcino** se debe por completo al **NO** ya que se abolía con el **L-NAME**, y no se evidenció ningún componente purinérgico ni peptidérgico porque ni el **MRS2179** ni en presencia de la  **$\alpha$ -quimotripsina** se apreciaba ningún efecto sobre la *amplitud* y la *duración* de la respuesta.

También analizamos el efecto de estos antagonistas sobre el *potencial de membrana en reposo (RMP)* y observamos que la adición secuencial de **atropina**, **MRS2179**,  **$\alpha$ -quimotripsina** y **L-NAME** no modificaban significativamente el **RMP**. Igual que hicimos con el **EB** y el **LES humanos** y el **LES porcino**, también para el **EB porcino** comparamos los resultados obtenidos en los *estudios mecánicos* con los obtenidos en los *estudios electrofisiológicos*. Nuestros *resultados mecánicos (Baño de órganos)* en el **EB porcino distal** indican que habríamos podido evidenciar la participación del **NO**, de **purinas** (receptores **P2Y<sub>1</sub>**) en la *latencia* de la **contracción del EB** tras la estimulación de las MNs inhibitorias. Sin embargo, el **IJP** era totalmente nitrérgico. La discrepancia electro-mecánica consistiría en: (i) en el estudio de estimulación de las MNs inhibitorias en el **EB porcino distal** los *registros mecánicos* muestran una *latencia (respuesta inhibitoria)* que se inhibe necesariamente con la combinación de los antagonistas nitrérgico y purinérgico. Sin embargo, en los *registros electrofisiológicos* obtenidos en nuestras particulares condiciones de estimulación de las MNs inhibitorias en el **EB porcino distal**, muestran un **IJP** que se debe completamente a un componente nitrérgico. Como hemos descrito previamente, esta discrepancia mecánico-electrofisiológica que se produce entre las respuestas inhibitorias *mecánicas* (nitrérgica y purinérgica) y las *electrofisiológicas* (nitrérgica)

también la encontramos en el **LES humano** y en el **LES porcino**, sin embargo, en el **EB humano** ambos métodos experimentales eran coincidentes. En nuestro estudio hemos atribuido dichas discrepancias a las diferentes características en el estímulo eléctrico que utilizamos en cada técnica, que probablemente estimula con intensidad diferente a las motoneuronas en ambos sistemas experimentales. Lo que hemos observado en los casos en que sí existe discrepancia es que únicamente previo bloqueo nitrérgico somos capaces de poner de manifiesto/desenmascarar la contribución de un componente purinérgico en las respuestas inhibitorias. Nuestros resultados indicarían que en la **especie porcina** podemos adjudicar un papel/rol a las **purinas** a través de **receptores P2Y<sub>1</sub>** en la respuesta inhibitoria en el **esófago**, mientras que en el **humano** sólo podemos atribuirle un papel en la relajación del **LES** pero no en la **latencia** del **EB**.

### 3.2.3 Función de los LGIC en las respuestas contráctiles del EB porcino

Existen en la literatura estudios tanto **in vivo** como **in vitro** que versan sobre el origen de la peristalsis esofágica. En estudios clásicos **in vivo** en la zarigüeya propusieron que la onda peristáltica normal se producía como resultado de la interacción combinada de la inervación a lo largo del **esófago** (Anand & Paterson, 1994; Dodds *et al.*, 1978; Sugarbaker *et al.*, 1984; Yamato *et al.*, 1992), y esto mismo se ha observado **in vitro** en especies tanto animal, como la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1979; Crist *et al.*, 1984a; Crist *et al.*, 1984b; Weisbrodt & Christensen, 1972) y por lo visto en nuestros resultados también en el **cerdo**, como en el **humano** en nuestro presente estudio y en estudios previos (Tøttrup *et al.*, 1990b).

En nuestro estudio **in vitro** en el **EB porcino** (tanto **distal** como **proximal**) hemos visto que era necesaria la integridad de la transmisión colinérgica para que los **antagonistas de los neurotransmisores inhibitorios** pudieran ejercer su efecto sobre la **latencia**, nuestros resultados coincidían con estudios previos **in vitro** en la zarigüeya (Christensen *et al.*, 1979; Cohen & Green, 1974) en los que describían que los **agonistas colinérgicos** reducían la **latencia** en el **esófago distal** y sugerían que la velocidad peristáltica podía modularse **in vivo** con cambios en los niveles de acetilcolina que actúan sobre el músculo liso. Este es un hecho significativo por el interés clínico de controlar la velocidad de la peristalsis esofágica. Esta vez en estudios **in vivo** con estimulación vagal, también en esta misma especie, describieron que el bloqueo colinérgico incrementaba la **latencia** de la **contracción-off** en la

**zona proximal** del **EB** y tenía poco o ningún efecto en la **zona distal** (Dodds *et al.*, 1978). Posteriormente y estudiando el efecto de la **atropina** sobre la peristalsis primaria en el **esófago humano**, Dodds *et al.*, encontraron que incrementaba la **latencia** de las contracciones en todas las zonas esofágicas, pero particularmente en la parte **proximal** del músculo liso (Dodds *et al.*, 1981). Estos estudios eran coincidentes con los resultados obtenidos en nuestro estudio **in vitro** en el **EB porcino**. Crist *et al.*, también describieron previamente en un estudio clásico **in vitro** que en las zonas **proximal** y **distal** del esófago de la zarigüeya, la **atropina** incrementaba la **latencia** de las **respuestas-off** (Crist *et al.*, 1984b). Por tanto, los mecanismos colinérgico-dependientes podrían ser una diana farmacológica para modular la velocidad de la peristalsis esofágica, dado que la **latencia** determina la velocidad de propagación de las contracciones esofágicas a lo largo del esófago (Krysiak & Preiksaitis, 2001).

El desarrollo de fármacos procinéticos con efecto sobre la **amplitud** de la peristalsis esofágica es de gran interés clínico. En nuestro estudio en el **EB porcino** nos fijamos dos objetivos respecto al estudio de la modulación de la contracción del EB: (i) evaluación de la modulación de las respuestas motoras en el **EB** a través de los antagonistas de los **receptores gangliónicos** (a continuación); (ii) caracterización del efecto de la **cinitaprida** (agente procinético de amplio uso en pacientes con **GERD, enfermedad por reflujo gastroesofágico**) (punto 3.2.4 de la Discusión General, página 182).

Anteriormente, hemos explicado que en el **LES porcino** (apartado 2.2.1 página 167) encontramos mecanismos selectivos en la estimulación de las vías motoras inhibitoria y excitatoria a través de los **receptores nAChRs, P2X** y **5-HT<sub>3</sub>**. Estos receptores tipo **LGIC** expresados por las motoneuronas (Galligan, 2002), son los que estudiamos en el **LES porcino**, por tanto nos dispusimos a explorar qué papel desempeñaban estos **LGIC** en la neurotransmisión gangliónica en las vías motoras inhibitoria y excitatoria en el **EB porcino**. Nuestro *primer objetivo* en el estudio de la modulación de la contracción en el **EB porcino** consistió en evaluar qué función tenían estos receptores tipo **LGIC** en las respuestas contráctiles del **EB porcino** que obteníamos mediante estimulación eléctrica (EFS).

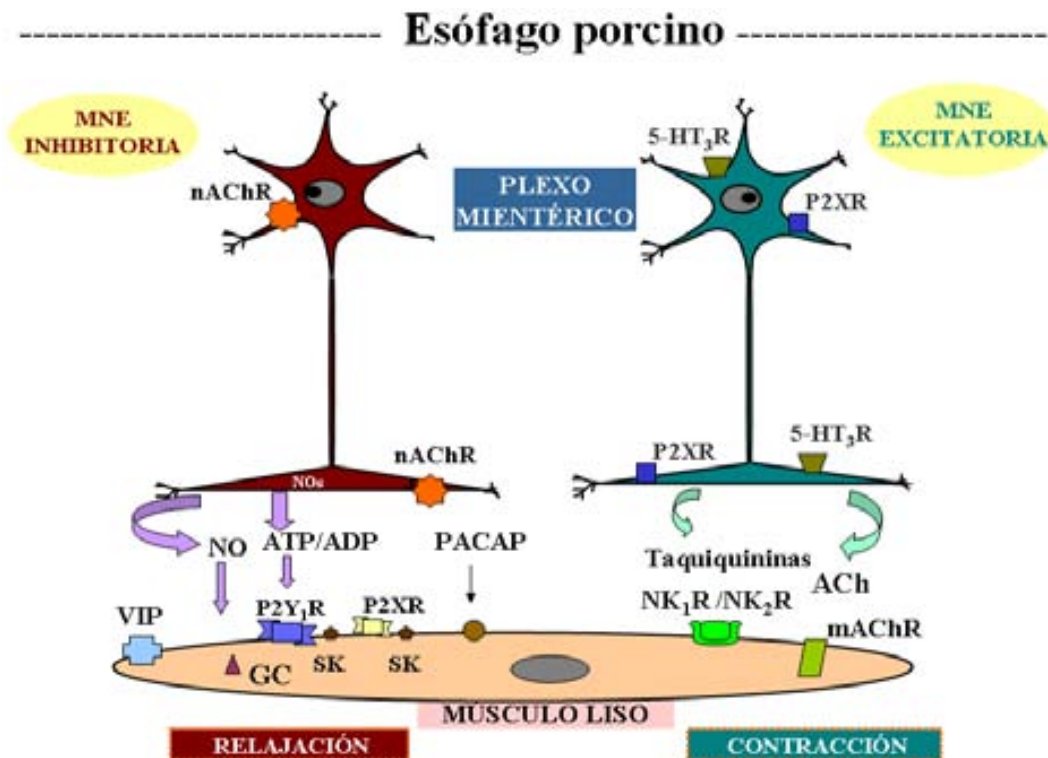
Para ello diseñamos varios protocolos independientes en los que estudiamos qué efecto producían los **antagonistas** de los **receptores nAChR (hexametonio), P2X (NF279)** y **5-HT<sub>3</sub> (ondansetron)** sobre los parámetros de la **latencia** y

la *amplitud* de las contracciones inducidas eléctricamente.

En nuestro estudio observamos que en el **cuerpo esofágico** los tres antagonistas (**hexametonio**, **NF279** y **ondansetron**) inducían un efecto uniforme y modesto sobre las respuestas, y se ponía de manifiesto al observar que la *amplitud* disminuía ligeramente y que en la *latencia* no se apreciaba ningún cambio. Al ser unos resultados moderados, podría darse el caso que el efecto asignado a los antagonistas utilizados se debiera, en realidad, bien a la fatiga propia de las tiras del **cuerpo esofágico**, bien a un efecto del vehículo empleado en este estudio. Por ello, realizamos otro grupo de experimentos secundarios en los que evaluamos, por un lado, el efecto del tiempo de incubación (30 min) para determinar la fatiga del tejido, y, por otro lado, el vehículo empleado en la dilución de los tres

antagonistas (agua destilada) y observamos que en ambas situaciones experimentales no se producía una disminución significativa de las respuestas inducidas por **EFS**.

Nuestros resultados sugerirían que en la vía motora excitatoria estarían presentes los **receptores nAChRs, P2X y 5-HT<sub>3</sub>**.



**Figura 2. Representación esquemática de los LGIC de las vías motoras inhibitoria y excitatoria en el esófago porcino.** Los LGIC que participan en la transmisión a las motoneuronas entéricas inhibitorias y excitatorias en el esófago porcino son: (i) en el **LES (zona clasp)**, los **receptores nAChRs** están involucrados en la estimulación de la vía motora inhibitoria y por tanto, en la relajación, los **receptores 5-HT<sub>3</sub>** están presentes en la vía motora excitatoria y por tanto implicados en la contracción, los **receptores P2X** están presentes en la vía motora excitatoria y en la célula de músculo liso con implicación en contracción y relajación; (ii) en el **EB**, los **receptores nAChRs, 5-HT<sub>3</sub> y P2X** estarían presentes en la vía motora excitatoria y por tanto, implicados en la *amplitud* de la contracción esofágica.



### 3.2.4 Función de la cinitaprida, agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>, en las respuestas contráctiles del EB porcino

El reflejo peristáltico se inicia con la estimulación de las neuronas sensoriales primarias por contacto con el bolo alimenticio, y que produce, entre otros efectos, una contracción del músculo circular ascendente con una relajación descendente y con la consiguiente propulsión caudal. Está descrito en la literatura que la 5-HT liberada desde las células enterocromafines por la presión luminal juega un papel clave en la traducción del estímulo de presión en un estímulo nervioso, el reflejo peristáltico se suprime tanto reduciendo el reservorio de 5-HT de la mucosa o bloqueando los **receptores 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>** (Spiller, 2002).

El papel de la 5-HT en la modulación de la motilidad digestiva es muy complejo, y todavía no está claro el efecto de los diversos subtipos de receptores serotoninérgicos en el control general de la motilidad gastrointestinal, y en particular en el esófago.

Los agonistas de los **receptores 5-HT<sub>4</sub>** son conocidos como fármacos procinéticos porque facilitan la neurotransmisión en los circuitos neuronales responsables (Gershon & Tack, 2007).

Se sabe que la activación del receptor juega un importante papel modulador en la función de varios tejidos. Estudios funcionales y de radioligando en el intestino sugieren que los **receptores 5-HT<sub>4</sub>** están presentes en todos los segmentos del tracto gastrointestinal humano, y se expresan en las células enterocromafines, las IPANs, las interneuronas y las neuronas eferentes del plexo mientérico y en las células musculares lisas (Gershon & Tack, 2007; Cash & Chey, 2005; DeMaeyer *et al.*, 2008; Tonini & Pace, 2006).

En los últimos años, se han llevado a cabo estudios **in vivo** explorando el efecto de diversos agonistas de los receptores 5-HT<sub>4</sub> sobre la función esofágica. Se vio que la cisaprida incrementaba el tono del esfínter esofágico inferior y la peristalsis esofágica, aceleraba el vaciado gástrico (Maddern *et al.*, 1991; Pehlivanov *et al.*, 2002), la mosaprida (Ruth *et al.*, 1998) disminuía el reflujo ácido e incrementaba la función motora esofágica en pacientes con **GERD**. Sin embargo, en el **esófago de la rata** el velusetrag (TD-5108) produjo una relajación concentración-dependiente, y en este mismo estudio se vio el mismo tipo de respuesta por parte de diferentes agonistas como el tegaserod, la cisaprida y la mosaprida (Beattie *et al.*, 2008).

En España, desde 1990, se ha comercializado la **cinitaprida** como fármaco procinético gastroentérico. Actualmente está indicado para el **reflujo gastroesofágico**, y en los análisis de datos de prescripción muestra su

distribución de uso en **dispepsia** (35%) y en **reflujo gastroesofágico** (28%) (Portincasa *et al.*, 2009). En estudios clínicos previos en pacientes con **dispepsia** funcional, observaron que la **cinitaprida** mejoraba sus síntomas e incrementaba el vaciado gástrico (Portincasa *et al.*, 2009), y en pacientes con **enfermedad por reflujo gastroesofágico**, mejoraba los síntomas de **acidez/pirosis/ardor**, **disfagia esofágica** y **regurgitación** (Surós *et al.*, 1992).

La **cinitaprida** presenta un mecanismo farmacológico de acción principal como agonista de los receptores 5-HT<sub>4</sub>, y un efecto más reducido como agonista del receptor 5-HT<sub>1</sub> y como antagonista del receptor 5-HT<sub>2</sub> (Fernández & Roberts, 1991).

En los estudios **in vitro** de la **cinitaprida**, que se llevaron a cabo con anterioridad, concretamente en el **intestino** de la cobaya, observaron que la **cinitaprida** era un estimulante potente del músculo liso intestinal de la cobaya con un mecanismo de acción que implicaba un incremento pre-unión de la liberación de la ACh desde las neuronas colinérgicas intramurales (Massingham *et al.*, 1985).

En nuestro trabajo en el **EB porcino**, el *segundo objetivo* en el estudio de la modulación de la contracción en el **EB porcino** consistió en la exploración **in vitro** del efecto de la **cinitaprida** (agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>) sobre la motilidad esofágica en nuestro modelo experimental. Nuestro interés se centraba, principalmente, en el estudio del efecto de este agente procinético sobre la *latencia* y la *amplitud* de las contracciones del **EB** inducidas mediante la estimulación eléctrica de las MNs entéricas. Por otra parte, también exploramos su efecto sobre el tono del **LES porcino**. Volviendo al **cuerpo esofágico**, realizamos diversos estudios sobre el efecto de la **cinitaprida** en las preparaciones del **EB porcino** que separaríamos en dos grupos independientes (1) El primer grupo se correspondería con la exploración del efecto del agonista sobre las vías motoras inhibitoria y excitatoria, y, (2) el segundo grupo se correspondería con una exploración específica de su efecto directo sobre el músculo liso.

(1) Para ello, y en primer lugar, evaluamos qué efecto ejercían concentraciones secuenciales crecientes del agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> cinitaprida sobre las respuestas obtenidas al estimular eléctricamente las MNs entéricas en dos condiciones experimentales: (i) cuando, gracias a un medio **Krebs NANNP**, estimulamos eléctricamente las MNs excitatorias de forma selectiva; (ii) cuando, en un medio **Krebs estándar**, estimulamos eléctricamente las MNs inhibitorias y excitatorias de forma simultánea. Comparamos los efectos inducidos por la **cinitaprida** en ambos



medios para ver si existían diferencias en sus respuestas.

(2) En segundo lugar, y de forma complementaria, también evaluamos si la **cinitaprida** ejercía algún efecto directo sobre la contractibilidad del músculo liso.

(1) En el primer gran grupo, por un lado, comenzamos diseñando un protocolo experimental que nos permitiera estudiar el efecto de la **cinitaprida** sobre la vía motora excitatoria. Para ello, y como ya vimos y definimos en el apartado del **LES porcino** (apartado 2.2.1.2 página 172), empleamos como medio la solución **Krebs NANNP** que bloqueaba el efecto de los neurotransmisores inhibitorios y nos permitía evaluar de forma específica el mecanismo de estimulación de las MNs excitatorias. En este **medio Krebs modificado NANNP**, cuando estimulamos eléctricamente las preparaciones de **EB porcino** éstas respondieron con una **contracción-on** control durante el estímulo. Por otro lado, diseñamos otro protocolo en el que pudiéramos evaluar el efecto de la **cinitaprida** sobre ambas vías motoras inhibitoria y excitatoria. En el medio **Krebs estándar**, evaluamos el efecto de la **cinitaprida** sobre ambas vías motoras inhibitoria y excitatoria, y, como ya hemos visto en el apartado anterior (apartado 3.2.1, página 177), la estimulación eléctrica inducía una **contracción-on** seguida de una **contracción-off** como respuesta control.

(2) En el segundo grupo, y para explorar un efecto directo sobre el músculo liso, indujimos una contracción con **carbacol (CCh)** en tiras de **EB porcino**, que previamente habíamos tratado con **TTX**, y evaluamos qué efecto inducía la **cinitaprida** sobre estas respuestas.

(1) Volviendo al primer gran grupo, en él exploramos qué efecto producían concentraciones crecientes de **cinitaprida** [ $0.1 \mu\text{molL}^{-1}$  –  $100 \mu\text{molL}^{-1}$ ] sobre los parámetros que definían las contracciones del **cuerpo esofágico**, en este caso, la *latencia* y la *amplitud* de las **contracción-on**, en el medio **Krebs NANNP** en el que estimulamos selectivamente a las MNs excitatorias. Observamos que la **cinitaprida**: (i) a concentraciones menores de  $10 \mu\text{molL}^{-1}$  incrementaba la *amplitud* de las **contracciones-on** inducidas por **EFS**; (ii) a concentraciones mayores de  $10 \mu\text{molL}^{-1}$  reducía la *amplitud* de las contracciones colinérgicas inducidas mediante **EFS**; (iii) incrementó la *latencia* de estas contracciones. Por otro lado, en el **medio Krebs estándar** observamos que el agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub>, y únicamente a altas concentraciones, reducía la *amplitud* y aumentaba ligeramente la *latencia* de la **contracción-off**.

(2) En cuanto al segundo grupo de estudios observamos que la **cinitaprida** afectaba al tono elevado inducido por el **CCh**.

En un grupo independiente exploramos también el efecto de la **cinitaprida** sobre el *tono* del **LES porcino** en un medio **Krebs estándar**. En nuestro estudio vimos que este agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> inducía una respuesta doble en función de la concentración ya que: Por un lado, y a concentraciones  $\leq 10 \mu\text{molL}^{-1}$ , inducía una contracción colinérgica que se ponía de manifiesto por la abolición de la respuesta por parte de la **atropina** y de la **TTX**, y que sugería la presencia de receptores 5-HT<sub>4</sub> en las neuronas excitatorias colinérgicas. Por otro lado, y a concentraciones mayores, indujo una relajación nitrérgica que sugería la presencia de los receptores 5-HT<sub>4</sub> en las neuronas inhibitorias dado que se inhibía casi completamente con **L-NAME**.

Volviendo al **cuerpo esofágico**, nuestros resultados en el **EB porcino** sugieren que el agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> ejercería un efecto estimulante en ambas MNs inhibitorias y excitatorias, y se pone de manifiesto por el incremento tanto de la *latencia* como de la *amplitud*, esta misma función de los **receptores 5-HT<sub>4</sub>** se ha descrito previamente en el colón humano (Cellek *et al.*, 2006). Además, la **cinitaprida** activaría **receptores 5-HT<sub>4</sub>** inhibitorios en el músculo liso ya que, como pudimos ver, concentraciones altas de **cinitaprida** redujeron la *amplitud* de las **contracciones-off**. Dicho efecto inhibitorio sobre la contracción inducida mediante **EFS**, se podría atribuir a un antagonismo funcional ejercido sobre la misma, que se debería a la activación de **receptores 5-HT<sub>4</sub>** inhibitorios en el músculo liso por parte de la **cinitaprida**, ya que, como también hemos visto, este agonista reducía el incremento del tono del **EB** (Cellek *et al.*, 2006; Leclere *et al.*, 2005).

En una visión global de los resultados de los estudios de la **cinitaprida** en el **EB** y en el **LES porcinos** vemos que en ambas regiones esofágicas las respuestas funcionales que se obtienen son duales y que dependen de la concentración del agonista utilizada. Podemos decir, pues, que los efectos netos/globales del agonista del receptor 5-HT<sub>4</sub> sobre el **esófago** son un equilibrio de los efectos estimulantes sobre ambas MNs inhibitorias y excitatorias y la inhibición de la contractibilidad de las células de músculo liso. El efecto procinético se obtendría seleccionando el rango de concentraciones en el que se produce la estimulación de las motoneuronas excitatorias.

En conjunto, los resultados que hemos obtenido en el estudio de la transmisión neuromuscular en el **EB porcino** indicarían que la modulación de estas respuestas esofágicas tipo-peristalsis se llevaría a cabo de la siguiente manera: (i) por parte de los antagonistas de los receptores expresados por las neuronas del plexo mientérico esofágico se induciría un efecto menor; (ii) con un efecto intenso a través de la modulación farmacológica de la neurotransmisión neuromuscular.

Tras haber expuesto los resultados obtenidos en la exploración del papel que desempeñan los receptores tipo **LGIC** expresados por las neuronas del plexo mientérico en las respuestas tanto del **LES** como del **EB porcino**, podemos decir que:

(i) Los **receptores nAChR**: en el **LES** estarían involucrados en la estimulación de la vía motora inhibitoria, y por tanto, implicados en las respuestas de relajación. En el **EB** estarían presentes en la vía motora excitatoria, y por tanto, implicados en la *amplitud* de la contracción.

(ii) Los **receptores 5-HT<sub>3</sub>**: en el **LES** estarían presentes en la estimulación de la vía motora excitatoria, y por tanto, implicados en las respuestas de contracción. En el **EB** estarían presentes en la vía motora excitatoria, y por tanto, implicados en la *amplitud* de la contracción.

(iii) Los **receptores P2X**: en el **LES** estarían presentes en la vía motora excitatoria y en la célula

de músculo liso, y por tanto, su implicación es más compleja ya que participarían tanto en las respuestas de relajación como en las de contracción. En el **EB** estarían presentes en la vía motora excitatoria, y por tanto, implicados en la *amplitud* de la contracción.

Por tanto hemos visto que la importancia funcional de estos **receptores nAChRs, 5-HT<sub>3</sub>, P2X** tipo **LGIC** era diferente en ambas regiones esofágicas: (i) En el **LES** nos permiten estimular de forma eficiente y selectiva las MNs inhibitorias a través de los **nAChRs** y las MNs excitatorias a través de los **5-HT<sub>3</sub>**, (ii) en el **EB** presentan un papel mínimo y únicamente en la vía motora excitatoria. En el **cuerpo esofágico** sería el **receptor 5-HT<sub>4</sub>** el que nos permitiría la modulación de las respuestas motoras a través de la modulación de la transmisión neuromuscular. Estudios futuros deben permitir determinar si estos mecanismos de estimulación selectiva tienen un potencial efecto terapéutico en pacientes con **GERD** (estimulación selectiva de motoneuronas excitatorias) y/o pacientes con **acalasia** o **trastornos motores primarios** (estimulación selectiva de la motoneuronas inhibitorias). Es evidente el interés del estudio de estas dos dianas farmacológicas, puesto que ninguno de estos dos grupos de enfermedades de la motilidad esofágica (**GERD, acalasia**) tiene en la actualidad un tratamiento farmacológico específico.

REFERENCIAS

- Aggestrup S, Uddman R, Lindkær J, Håkanson R, Sundler F, De Muckadell O & Emson P (1986). Regulatory peptides in lower esophageal sphincter of pig and man. *Dig Dis Sci* **31**: 1370-1375.
- Anand N & Paterson WG (1994). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis. *Am J Physiol* **266**: G123-G131.
- Aulí M, Martínez E, Gallego D, Opazo A, Espín F, Martí-Gallostra M, Jiménez M & Clavé P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**: 1043-1055.
- Barajas-López C, Karanjia R & Espinosa-Luna R (2001). 5-Hydroxytryptamine and atropine inhibit nicotinic receptors in submucosal neurons. *Eur J Pharmacol* **414**: 113-23.
- Beattie DT, Armstrong SR, Shaw JP, Marquess D, Sandlund C, Smith JA, Taylor JA & Humphrey PP (2008). The in vivo gastrointestinal activity of TD-5108, a selective 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist with high intrinsic activity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **378**: 139-147.
- Bennett MR (1997). Non-adrenergic non-cholinergic (NANC) transmission to smooth muscle: 35 years on. *Progress in Neurobiology* **52**: 159-195.
- Bennett MR, Burnstock G & Holman ME (1966). Transmission from perivascular inhibitory nerves to the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J Physiol* **182**: 527-540.
- Bennett A & Stockley HL (1975). The intrinsic innervation of the human alimentary tract. *Gut* **16**: 443-453.
- Beveridge AA & Taylor GS (1989). Evidence for a lower oesophageal sphincter in the guinea-pig. *Comp Biochem Physiol C* **93**: 293-301.
- Blackshaw LA, Nisyrios V & Dent J (1995). Responses to ferret lower esophageal sphincter to 5-hydroxytryptamine: pathways and receptor subtypes. *Am J Physiol* **268**: G1004-G1011.
- Brasseur JG, Ulerich R, Dai Q, Patel DK, Soliman AMS & Miller (2007). Pharmacological dissection of the human gastro-esophageal segment into three sphincteric components. *J Physiol* **580**: 961-975.
- Brown DR & Timmermans JP (2004). Lessons from the porcine enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 (Suppl. 1)**: 50-54.
- Butler A, Hill JM, Ireland SJ, Jordan CC & Tyers MB (1988). Pharmacological properties GR38032F, a novel antagonist at 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Pharmacol* **94**: 397-412.
- Cash BD & Chey WD (2005). Review article: The role of serotonergic agents in the treatment of patients with primary chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* **22**: 1047-1060.
- Cellek S, John AK, Thangiah R, Dass NB, Bassil AK, Jarvie EM, Lalude O, Vivekanandan S & Sanger GJ (2006). 5-HT<sub>4</sub> receptors agonists enhance both cholinergic and nitrergic nerves in human isolated colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* **18**: 853-861.
- Chang HY, Mashimo H & Goyal RK (2003). Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflex? IV. Current concepts of vagal efferent projections to the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**: G357-G366.
- Christensen J (1970). Patterns and origin of some esophageal responses to stretch and electrical stimulation. *Gastroenterology* **59**: 909-916.
- Christensen J, Arthur C & Conklin JL (1979). Some determinants of latency of off-response to electrical field stimulation in circular layer of smooth muscle of opossum esophagus. *Gastroenterology* **77**: 677-681.
- Christensen J, Conklin JL & Freeman BW (1973). Physiologic specialization at esophagogastric junction in three species. *Am J Physiol* **225**: 1265-1270.
- Christensen J & Daniel EE (1968). Effects of some autonomic drugs on circular esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **159**: 243-249.
- Christensen J & Daniel EE (1966). Electric and motor effects of autonomic drugs on longitudinal esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* **211**: 387-394.
- Christensen J & Lund GF (1968). Atropine excitation of esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **163**: 287-289.
- Christensen J & Lund GF (1969). Esophageal responses to distension and electrical stimulation. *J Clin Invest* **48**: 408-419.
- Christensen J & Torres EI (1975). Three layers of the opossum stomach: responses to nerve stimulation. *Gastroenterology* **69**: 641-648.
- Cho YR, Jang HS, Kim W, Park SY & Sohn UD (2010). P2X and P2Y receptors mediate contraction induced by Electrical Field Stimulation in feline esophageal smooth muscle. *Korean J Physiol Pharmacol* **14**: 311-316.

## Discusión General

---

- Cohen ML, Bloomquist W, Gidda JS & Lacefield W (1989). Comparison of the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist properties of ICS 205-930, GR38032F and zacopride. *J Pharmacol Exp Ther* **248**: 197-201.
- Cohen S & Green F (1974). Force-velocity characteristics of esophageal muscle: effect of acetylcholine and norepinephrine. *Am J Physiol* **226**: 1250-1256.
- Costall B, Gunning SJ, Naylor RJ & Tyers MB (1987). The effect of GR38032F, novel 5-HT<sub>3</sub>-receptor antagonist on gastric emptying in the guinea-pig. *Br J Pharmacol* **91**: 263-4.
- Crist J, Gidda JS & Goyal RK (1984a). Characteristics of "on" and "off" contractions in esophageal circular muscle in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **246**: G137-G144.
- Crist J, Gidda JS & Goyal RK (1984b). Intramural mechanism of esophageal peristalsis: roles of cholinergic and noncholinergic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 3595-3599.
- Daniel EE, Jury J, Salapatek AM, Bowes T, Lam A, Thomas S, Ramnarain M, Nguyen V & Mistry V (2000). Nitric oxide from enteric nerves acts by a different mechanism from myogenic nitric oxide in canine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 270-279.
- De Maeyer JH, Lefebvre RA & Schuurkes JAJ (2008). 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists: similar but not the same. *Neurogastroenterol Motil* **20**: 99-112.
- Diamant NE (1974). Electrical activity of the cat smooth muscle esophagus: a study of hyperpolarizing responses. In Proceedings of the Fourth International Symposium on Gastrointestinal Motility Edited by EE Daniel, Vancouver, Mitchell Press Ltd. P 593-605.
- Diamant NE & El-Sharkawi TY (1977). Progress in gastroenterology. Neural control of esophageal peristalsis. A conceptual analysis. *Gastroenterology* **72**: 546-556.
- Dodds WJ, Christensen J, Dent J, Wood JD & Arndorfer RC (1978). Esophageal contractions induced by vagal stimulation in the opossum. *Am J Physiol* **235**: E392-E401.
- Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ & Arndorfer RC (1981). Effect of atropine on esophageal motor functions in humans. *Am J Physiol* **240**: G290-G296.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Estrada O, Sunol X & Clavé P (2007a). Mechanisms controlling function in the clasp and sling regions of porcine lower oesophageal sphincter. *Br J Surg* **94**: 1427-1436.
- Farré R, Aulí M, Lecea B, Martínez E & Clavé P (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**: 1238-1248.
- Farré R & Sifrim D (2008). Regulation of basal tone, relaxation and contraction of the lower oesophageal sphincter. Relevance to drug discovery for oesophageal disorders. *Br J Pharmacol* **153**: 858-869.
- Farré R, Wang XY, Vidal E, Domènech A, Pumarola M, Clavé P, Huizinga JD & Jiménez M (2007b). Interstitial cells of Cajal and neuromuscular transmission in the rat lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **19**: 484-496.
- Fernández AG & Roberts DJ (1991). Cinitapride hydrogen tartrate. *Drugs* **16**: 885-892.
- Fields JZ, Jacyno M, Wasylwiw R & Keshavarzian A (1995). Ethanol inhibits contractility of esophageal smooth muscle strips. *Alcohol Clin Exp Res* **19**: 1403-1413.
- Friedland GW, Kohatsu S & Lewin K (1971). Comparative anatomy of feline and canine gastric sling fibers. Analogy to human anatomy. *Am J Dig Dis* **16**: 493-507.
- Galligan JJ (2002). Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **14**: 611-623.
- Galligan JJ, LePard KJ, Schneider DA & Zhou X (2000). Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* **81**: 97-103.
- Galligan JJ & North RA (2004) Pharmacology and function of nicotinic acetylcholine and P2X receptors in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**: 64-70.
- Gershon MD & Tack J (2007). The serotonin signalling system: From basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* **132**: 397-414.
- Gil V, Gallego D, Grasa L, Martín MT & Jiménez M (2010). Purinergic and nitrenergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**: G158-G169.

- Gilbert R, Rattan S & Goyal RK (1984). Pharmacologic identification, activation and antagonism of two muscarinic receptor subtypes in the lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **230**: 284-291.
- Gonella J, Niel P & Roman C (1979). Sympathetic control of lower esophageal sphincter motility in the cat. *J Physiol* **287**: 177-190.
- González AA, Farré R & Clavé 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-G306.
- González AA & Puig MM (1997). Ondansetron facilitates neuromuscular transmission in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* **328**: 201-7.
- Hirst GD, Holman ME & Spence I (1974). Two types of neurons in the myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J Physiol* **236**: 303-26.
- Ishiguchi T, Takahashi T, Itoh H & Owyang C (2000). Nitroergic and purinergic regulation of the rat pylorus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G740-G747.
- Knudsen MA & Tøttrup A (1992). A possible role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* **107**: 837-841.
- Korn O, Csendes A, Burdiles P, Braghetto I & Stein HJ (2000). Anatomic dilatation of the cardia and competence of the lower esophageal sphincter: a clinical and experimental study. *J Gastrointest Surg* **4**: 398-406.
- Korn O, Stein HJ, Richter TH & Liebermann-Meffert D (1997). Gastroesophageal sphincter: a model. *Dis Esophagus* **10**: 105-109.
- Krysiak PS & Preiksaitis HG (2001). Tachykinins contributed to nerve-mediated contractions in the human esophagus. *Gastroenterology* **120**: 39-48.
- Leclere PG, Prins NH, Schuurkes JAJ & Lefebvre RA (2005). 5-HT<sub>4</sub> receptors located on cholinergic nerves in human colon circular muscle. *Neurogastroenterol Motil* **17**: 366-375.
- Liebermann-Meffert D, Allgower M, Schmid P & Blum AL (1979). Muscular equivalent of the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **76**: 31-38.
- Lund GF & Christensen J (1969). Electrical stimulation of esophageal smooth muscle and effects of antagonists. *Am J Physiol* **217**: 1369-1374.
- Maddern GJ, Jamieson GG, Myers JC & Collins PJ (1991). Effects of cisapride on delayed gastric emptying in gastro-oesophageal reflux disease. *Gut* **32**: 470-474.
- Makhlouf GM & Grider JR (1963). Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitters of the gut. *News Physiol Sci* **8**: 195-199.
- Massingham R, Bou J & Roberts DJ (1985). A comparison of the stimulatory effects of metoclopramide and cinitapride in the guinea-pig isolated ileum. *J Auton Pharmacol* **5**: 41-53.
- Michel K, Sann H, Schaaf C & Schemann M (1997). Subpopulations of gastric myenteric neurons are differentially activated via distinct serotonin receptors: projection, neurochemical coding, and functional implications. *J Neurosci* **17**: 8009-8017.
- Miller L, Dai Q, Vegesna A, Korimilli A, Ulerich R, Schiffner B & Brasseur J (2009). A missing sphincteric component of the gastro-oesophageal junction in patients with GORD. *Neurogastroenterol Motil* **21**: 813-e52.
- Miller LS, Vegesna AK, Brasseur JG, Braverman AS & Ruggieri MR (2011). The esophagogastric junction. *Ann N Y Acad Sci* **1232**: 323-330.
- Mohan KC & Ravikuar K (1995). Ondansetron hydrochloride: a competitive serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptor blocker. *Acta Crystallogr C* **51**: 2627-9.
- Muinuddin A, Neshatian L, Gaisano HY & Diamant NE (2004). Calcium source diversity in feline lower esophageal sphincter circular and sling muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**: G271-G277.
- Murray J, Du C, Ledlow A, Bates JN & Conklin JL (1991). Nitric oxide: mediator of nonadrenergic noncholinergic responses of opossum esophageal muscle. *Am J Physiol* **261**: G401-G406.
- Opazo A, Lecea B, Gil V, Jiménez M Clavé P & Gallego D (2011). Specific and complementary roles for nitric oxide and ATP in the inhibitory motor pathways to rat internal anal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **23**: e-11-25.
- Paterson WG, Anderson MA R & Anand N (1992). Pharmacological characterization of lower esophageal sphincter relaxation induced by swallowing, vagal efferent nerve stimulation, and esophageal distention. *Can J Physiol Pharmacol* **70**: 1011-1015.
- Pehlivanov N, Sarosiek I, Whitman R, Olyae M & McCallum R (2002). Effect of cisapride on nocturnal transient oesophageal sphincter relaxations and nocturnal gastro-oesophageal reflux in patients with oesophagitis: a

- doube-blind, placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* **16**: 743-747.
- Portincasa P, Mearin F, Robert M, Plazas MJ & Heras J (2009). [Efficacy and tolerability of cinitapride in the treatment of functional dyspepsia and delayed gastric emptying]. *Gastroenterol Hepatol* **32**: 669-76.
- Powell AK, Fida R & Bywater RA (2001). Ongoing nicotinic and non-nicotinic inputs to inhibitory neurons in the mouse colon. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**: 792-798.
- Preiksaitis HG & Laurier LG (1998). Pharmacological and molecular characterization of muscarinic receptors in cat esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **285**: 853-861.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994a). Cholinergic responses in the cat lower esophageal sphincter show regional variation. *Gastroenterology* **106**: 381-388.
- Preiksaitis HG, Tremblay L & Diamant NE (1994b). Nitric oxide mediates inhibitory nerve effects in human esophagus and lower esophageal sphincter. *Dig Dis Sci* **39**: 770-775.
- Rattan S & Goyal RK (1975). Effect of nicotine on the lower esophageal sphincter. Studies on the mechanism of action. *Gastroenterology* **69**:154-159.
- Rattan S & Goyal RK (1978). Evidence of 5-HT participation in vagal inhibitory pathway to opossum LES. *Am J Physiol* **234**: E273-E276.
- Rattan S & Goyal RK (1974) Neural control of the lower esophageal sphincter: influence of the vagus nerves. *J Clin Invest* **54**: 899-906.
- Ruth M, Hamelin B, Röhss K & Lundell I (1998). The effect of mosapride, a novel prokinetic, on acid reflux variables in patients with gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* **12**: 35-40.
- Sanders KM & Ward SM (1992). Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* **262**: G379-G392.
- Schneider DA & Galligan JJ (2000) Presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the myenteric plexus of guinea pig intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**:G528-G535.
- Spiller R. Serotonergic modulating drugs for functional gastrointestinal diseases. *J Clin Pharmacol* 2002; **54**: 11-20.
- Stein HJ, Crookes PF & DeMeester TR (1995a). Three-dimensional manometric imaging of the lower esophageal sphincter. *Surg Annu* **27**: 199-214.
- Stein HJ, DeMeester TR, Naspetti R, Jamieson J & Perry RE (1991). Three-dimensional imaging of the lower esophageal sphincter in gastroesophageal reflux disease. *Ann Surg* **214**: 374-383.
- Stein HJ, Liebermann-Meffert D, DeMeester TR & Siewert JR (1995b). Three-dimensional pressure image and muscular structure of the human lower esophageal sphincter. *Surgery* **117**: 692-698.
- Sugarbaker DJ, Rattan S & Goyal RK (1984). Mechanical and electrical activity of esophageal smooth muscle during peristalsis. *Am J Physiol* **246**: G145-G150.
- Surós A, Adell F, De Novoa V, Castellarnau J, Diosdado D, Carrasquer J & Merelló J (1992). [Cinitapride in the treatment of gastroesophageal reflux. Comparative study with metoclopramide and placebo]. *Rev Med Univ Navarra* **37**: 18-23.
- Tieffenbach L & Roman C (1972). The role of extrinsic vagal innervation in the motility of the smooth-muscle portion of the esophagus: electromyographic study in the cat and the baboon. *J Physiol* **64**: 193-226.
- Tonini M & Pace F (2006). Drugs acting on serotonin receptors for the treatment of functional GI disorders. *Dig Dis* **24**: 59-69.
- Tøttrup A, Forman A, Funch-Jensen P, Raundahl U & Andersson KE (1990a). Effects of postganglionic nerve stimulation in oesophageal achalasia: an in vitro study. *Gut* **31**: 17-20.
- Tøttrup A, Forman A, Funch-Jensen P, Raundahl U & Andersson KE (1990b). Effects of transmural field stimulation in isolated muscle strips from human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **258**: G344-G351.
- Tøttrup A, Forman A, Uldbjerg N, Funch-Jensen P & Andersson KE (1990c). Mechanical properties of isolated human esophageal smooth muscle. *Am J Physiol* **258**: G338-G343.
- Tøttrup A, Svane S & Forman A (1991). Nitric oxide mediating NANC inhibition in opossum lower oesophageal sphincter. *Am J Physiol* **260**: G385-G389.
- Vegesna AK, Braverman AS, Miller LS, Tallarida RJ, Tiwana MI, Khayyam U & Ruggieri Sr MR (2010). Comparison of human and porcine gastric clasp and sling fiber contraction by M2 and M3 muscarinic receptors.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**: G530-G534.
- Vicente Y, Da Rocha C, Yu J, Hernández-Peredo G, Martínez L, Pérez-Mies B & Tovar JA (2001). Architecture and function of the gastroesophageal barriers in the piglet. *Dig Dis Sci* **46**: 1899-1908.
- Ward SM, Dalziel HH, Khoyi MA, Westfall AS, Sanders KM & Westfall DP (1996). Hyperpolarization and inhibition of contraction mediated by nitric oxide released from enteric inhibitory neurones in guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* **118**: 49-56.
- Weisbrodt NW & Christensen J (1972). Gradients of contractions in the opossum esophagus. *Gastroenterology* **62**: 1159-1166.
- Wörl J & Neuhuber WL (2005). Enteric co-innervation of motor endplates in the esophagus: state of the art ten years after. *Histochem Cell Biol* **123**: 117-130.
- Wu M, Majewski M, Wojtkiewicz J, Vanderwinden JM, Adriaensen D & Timmermans JP (2003). Anatomical and neurochemical features of the extrinsic and intrinsic innervation of the striated muscle in the porcine esophagus. *Cell Tissue Res* **311**: 289-297.
- Yamano M & Miyata K (1996). Investigation of 5-HT<sub>3</sub> receptor-mediated contraction in guinea-pig distal colon. *Eur J Pharmacol* **317**: 353-9.
- Yamato S, Spechler SJ & Goyal RK (1992). Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* **103**: 197-204.
- Yuan S & Brookes SJ (1999). Neural control of the gastric sling muscle of the guinea pig. *J Comp Neurol* **412**: 669-680.
- Yuan S, Costa M & Brookes SJ (1998). Neuronal pathways and transmission to the lower esophageal sphincter of the guinea pig. *Gastroenterology* **115**: 661-671g.
- Zhang Y, Miller DV & Paterson WG (2000). Opposing roles of K(+) and Cl(-) channels in maintenance of opossum lower esophageal sphincter tone. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**: G1226-G1234.
- Zhou X & Galligan JJ (1999). Synaptic activation and properties of 5-hydroxytryptamine(3) receptors in myenteric neurons of guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **290**: 803-810.
- Zwart R & Vijverberg HP (1997). Potentiation and inhibition of neuronal nicotinic receptors by atropine: competitive and noncompetitive effects. *Mol Pharmacol* **52**: 886-95.





## Conclusiones

(1). En el **esfínter esofágico inferior (LES) humano**, la activación de las motoneuronas inhibitorias del plexo mientérico provoca una relajación en ambas regiones **clasp (curvatura menor)** y **sling (ángulo de His, curvatura mayor)**.

→En la zona clasp, la relajación depende de forma mayoritaria de la liberación de óxido nítrico (**NO**) y también de una contribución, de menor magnitud, de una **purina** que actúa a través de receptores P2Y<sub>1</sub> y también del **VIP**. En la zona sling, la relajación depende completamente de la liberación de **NO**.

→La *amplitud* de la relajación del **LES** es mayor en la zona clasp que en la zona sling, reflejando la existencia de una *asimetría transversal* en el **LES humano** que afecta a las respuestas inhibitorias.

(2). En el **LES porcino**, existen mecanismos de estimulación selectiva de las vías motoras excitatorias ó inhibitorias a través de los receptores tipo *canales iónicos dependientes de ligando (LGIC)*:

→Por un lado, la estimulación selectiva de las *motoneuronas inhibitorias* que provoca la relajación del **LES**, se consigue de forma intensa y específica a través de los **receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs)**, pero es ineficiente a través de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>**.

→Por otro, la estimulación selectiva de las *motoneuronas excitatorias*, que provoca la contracción del **LES**, se consigue de forma intensa a través de los **receptores 5-HT<sub>3</sub>**, pero es muy poco efectiva a través de los **receptores nAChRs**.

(3). En el **cuerpo esofágico (EB) humano**, la estimulación eléctrica de las motoneuronas del plexo mientérico induce una respuesta consistente en una breve contracción al inicio del estímulo (**contracción-on**) seguida de una contracción intensa una vez finalizado el estímulo (**contracción-off**):

→La **contracción-off** está siempre precedida por un *periodo de latencia* que está totalmente mediado por la liberación de **NO** desde las motoneuronas inhibitorias, y la *amplitud* de dicha contracción está mediada por la estimulación de las motoneuronas excitatorias colinérgicas y modulada por una **purina** actuando sobre receptores P2Y<sub>1</sub> situados en estas neuronas excitatorias.

→En el **cuerpo esofágico (EB) humano**, la estimulación de las motoneuronas excitatorias del plexo mientérico induce respuestas colinérgicas de efecto más intenso en el **EB** que en ambas regiones (**clasp** y **sling**) del **LES**, lo que demuestra la existencia de un *gradiente vertical* descendente desde el **cuerpo esofágico** hacia el **LES**.

→Tanto la *asimetría funcional transversal* en el **LES** como este *gradiente vertical* descendente en el **cuerpo esofágico** se deben a diferencias en la respuesta a la estimulación neural del plexo mientérico y representa un importante mecanismo de especialización regional intrínseca en el **esófago humano**.

(4). En el **cuerpo esofágico (EB) porcino**, la activación de las motoneuronas del plexo mientérico induce una respuesta contráctil al inicio del estímulo (**contracción-on**) seguida de una contracción que se inicia una vez que finaliza el estímulo (**contracción-off**) y que está precedida por un *periodo de latencia*:

→La *latencia* está mediada por la estimulación de las motoneuronas inhibitorias que liberan **NO** y una **purina**, actuando ésta última sobre los receptores P2Y<sub>1</sub>, mientras que la *amplitud* de dicha contracción está mediada por las motoneuronas excitatorias que liberan acetilcolina (**ACh**) y **taquiquininas** actuando estas últimas sobre receptores NK<sub>1</sub> y NK<sub>2</sub>.

(5). Tanto en el **cuerpo esofágico humano** como en el **porcino**, existe una compleja interacción entre las motoneuronas inhibitorias y las excitatorias del plexo mientérico tanto en el origen como en el control de las respuestas contráctiles de tipo peristáltico:

→En el **esófago humano**, la *amplitud* de la contracción está mediada de forma predominante por las motoneuronas excitatorias colinérgicas ejerciendo un efecto decreciente desde el **EB** hacia las dos zonas del **LES**, y está modulada por un efecto inhibitorio de las motoneuronas inhibitorias;

→En el **cuerpo esofágico porcino**, la activación de las motoneuronas inhibitorias también ejerce un importante efecto modulador sobre la *amplitud* de la contracción. Además la activación de las motoneuronas excitatorias también modula la *latencia* y el *timing* de la misma, siendo fundamental la integridad de la transmisión colinérgica para la preservación de la *latencia* de la contracción y por tanto para la modulación de la *velocidad de la peristalsis esofágica*.