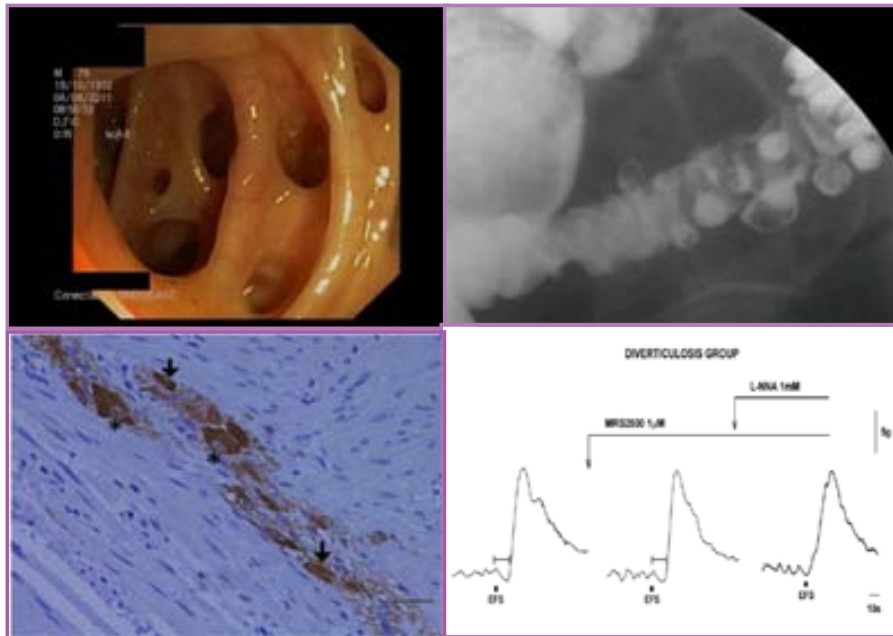


Estudio de la fisiopatología de las alteraciones de la contractilidad in vitro del colon sigmoide en pacientes con diverticulosis



Tesis presentada por Francisco Espin Alvarez
para optar al grado de Doctor en Cirugía

Facultat de Medicina

Departament de Cirurgia
Universitat Autònoma de Barcelona

Mataró, 2014

Tesis doctoral dirigida por:
Pere Clavé i Civit
Diana Gallego Pérez
Xavier Rius i Cornadó

Francisco Espin Alvarez

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. Pere Clavé i Civit

Dra. Diana Gallego Pérez

Dr. Xavier Rius i Cornadó



**CONSORCI SANITARI
DEL MARESME**



Universitat Autònoma de Barcelona

Estudio de la fisiopatología de las alteraciones de la contractilidad in vitro del colon sigmoide en pacientes con diverticulosis.

**Tesis presentada por Francisco Espin Alvarez
para optar al grado de Doctor en Cirugía**

Programa de Doctorado en Cirugía

Hospital de Mataró, septiembre de 2014

**HOSPITAL DE MATARÓ
Servei de Cirurgia General i Digestiva**

**FACULTAT DE MEDICINA
Departament de Cirurgia
Universitat Autònoma de Barcelona**

Tesis doctoral dirigida por los Dres.

**Pere Clavé i Civit,
Diana Gallego Pérez y
Xavier Rius i Cornadó**

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 Departamento de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona; **DIANA GALLEGO PÉREZ**, Investigadora postdoctoral Centro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Instituto de Salud Carlos III; y **XAVIER RIUS i CORNADÓ**, Catedrático del Departamento de Cirugía de la Universitat Autònoma de Barcelona.

HACEMOS CONSTAR:

Que la memoria titulada "Estudio de la fisiopatología de las alteraciones de la contractilidad in vitro del colon sigmoide en pacientes con diverticulosis" presentada por FRANCISCO ESPIN ALVAREZ para optar al grado de Doctor, llevada a cabo en el marco del Grupo de Investigación CIBEREHD CSdM-UAB, se ha realizado bajo nuestra dirección, y al considerarla concluida, autorizamos su presentación para ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos firmamos la presente.
Hospital de Mataró, septiembre de 2014.

Dr. Pere Clavé i Civit, MD, PhD^{1,2}.
Director de la tesis

Dra. Diana Gallego Pérez, PhD².
Directora de la Tesis

Prof. D. Xavier Rius i Cornadó MD, PhD³.
Director de la Tesis

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

²CIBEREHD, Centro de Investigación Biomédica en Red: Enfermedades Hepáticas y Digestivas. Instituto de Salud Carlos III.

³Departament de Cirurgia, Universitat Autònoma de Barcelona.

Las imágenes superiores de la portada corresponden a la imagen endoscópica i a la traducción radiológica de un paciente con diverticulosis sigmoidea.

La dos imágenes inferiores corresponden a la tinción inmunohistoquímica con el marcador S-100 donde se puede ver el plexo mientérico (Derecha) y a los registros mecánicos donde se muestran las respuestas inducidas mediante estimulación eléctrica de campo (EFS) de las motoneuronas del plexo mientérico en el sigma humano (respuesta después de incubación con MRS2500 y L-NNA).

La carga genética.

Es bien conocida y universalmente aceptada la teoría de la evolución de las especies y la selección natural de Charles Darwin, si bien parece más discutible argumentar que la modificación en el código genético para algunos y la “carga” genética para muchos pudiera ser alterada, mejorándola o empeorándola. Para ello tenemos que retroceder hasta 1802 y revisar los tratados de Jean-Baptiste Lamarck*, según los cuales “el uso frecuente y sostenido de un órgano cualquiera, lo fortifica poco a poco, dándole una potencia proporcionada a la duración de este uso, mientras que el desuso constante de tal órgano lo debilita y hasta lo hace desaparecer”. Pues bien, creo que esta teoría puede explicar en gran medida la expresión actual de mi lastre genético y que me ha llevado hasta aquí. Siendo no solo el “poco” uso frecuente de un órgano sino el efecto de los que hasta ahora me han acompañado en el uso del órgano en sí, el resultado final.

Muestro así mi agradecimiento:

A mis padres por la “carga” genética de base.

A Esther, por mucho y muchísimas cosas, por lo pasado, lo presente y lo que vendrá, por TODO y porque SÍ. A nuestras mezclas genéticas, y por la teoría de la “genética inversa” en la que la descendencia de uno modifica la suya propia.

A los que sí me cambiaron la “*genetis surgicae*”, éstos son muchos, yo diría que todos... pero en especial a mi padre adoptivo, Alberto Bianchi, por transmitirme la pasión de la cirugía y enseñarme, entre muchísimas cosas, que el ojo guía la mano, con Kegel 448** mejor por supuesto; y a JM Gubern, por enseñarme modales, a caminar y sobre todo a que como cirujano y persona NUNCA se es suficientemente humilde.

A los que siempre serán mis Jefes de Servicio, Dr. AM Lacy, Dr. Ramon Charco y especialmente al Dr. Xavier Suñol. A ellos por contar conmigo y darme la oportunidad de seguir adelante a pesar de la “carga”.

A mi Resi mayor, a mis Resis pequeños y a todos los Resis, porque ellos si que usan el órgano, hasta desfallecer y volver de nuevo al uso, y porque viendo usar el órgano de otros también mejora el mío propio.

A Emma por ser la primera en explicarme como se bañan los órganos, a Irene y Claudia por su inestimable colaboración en los protocolos, a Omar por estar pendiente siempre de quirófano, a la Dra. Laia Rofes “per fer que la PCR fos REALment possible”, también a Natàlia, Jakub, Dani y Lluís por poder contar siempre con su ayuda. Pero sobretodo a todos ellos por los muchos y buenos momentos compartidos.

Al Dr. Pere Clavé por insistir e insistir y volver a insistir en el uso del órgano, por haber creado del esfuerzo y la perseverancia todo lo que esta Tesis ha podido ser.

Por último pero nunca menos importante, a Diana Gallego por su rigor, su paciencia, su compañía y su esfuerzo, y en especial por creerse la teoría de que toda genética se puede alterar a base de usar el órgano.

A todos gracias.

F. Espin Alvarez
Cerdanyola del Vallés,
Septiembre de 2014.

*Lamarck, *Filosofía zoológica*. P. 175-176.

**K448, Sonata para dos pianos, Mozart.

“There comes a time in every race when a competitor meets the real opponent, and understands that it’s himself...”

Giving up was never an option”

Lance Armstrong

Resumen completo de la Tesis doctoral

El objetivo de esta tesis ha sido estudiar la fisiopatología de las alteraciones de la contractilidad in Vitro del colon sigmoide en pacientes con enfermedad diverticular asintomática (diverticulosis). Se han llevado a cabo estudios fisiológicos in vitro mediante técnicas de *baño de órganos* y *microelectrodos*, estudios histológicos e inmunohistoquímicos y de biología molecular y expresión génica (expresión relativa de mRNA - qRT-PCR) en tejido de colon sigma procedente de resecciones quirúrgicas en pacientes con y sin diverticulosis (DS).

El objetivo del primer estudio, consistió en **evaluar la motilidad espontánea, el potencial de membrana en reposo (RMP) y el efecto de la estimulación de las MNs inhibitorias y excitatorias en colon sigmoide humano de pacientes con DS** comparado con muestras procedentes del grupo control. Además se llevaron a cabo **estudios histológicos e inmunohistológicos** para valorar si los cambios a nivel de motilidad in Vitro y electrofisiológicos se correlacionaban con cambios estructurales en las capas musculares, plexo mientérico o células Intersticiales de Cajal (ICCs). Nuestros resultados indican que la motilidad espontánea (contracciones rítmicas espontáneas (CRE) está muy reducida en pacientes con DS (amplitud y área bajo la curva). La respuesta a la estimulación eléctrica de campo también fue diferente en los pacientes con DS, las contracciones en ON (fruto de la estimulación de MNs excitatorias) fueron mayores (amplitud) en estos pacientes. También fueron mayores la latencia de las contracciones en OFF y el potencial post-uniión inhibitorio (fruto de la estimulación de MNs inhibitorias). Las muestras de pacientes con DS también presentaron un RMP más hiperpolarizado. Sin embargo, no se observaron diferencias a nivel histológico (capas musculares, estructuras neurales y gliales del plexo mientérico, densidad de ICCs). Estos hallazgos sugieren que hay cambios fisiológicos que preceden no sólo a los síntomas sino también a los principales cambios histológicos descritos en esta enfermedad.

El objetivo del segundo estudio, fue **caracterizar los cambios a nivel de neurotransmisión inhibitoria observados con anterioridad**. En éste confirmamos las diferencias en la motilidad in Vitro observadas previamente (disminución de la motilidad espontánea e incremento de la latencia de las contracciones) y demostramos que estas diferencias se deben fundamentalmente a un incremento de la liberación de óxido nítrico (NO), tanto espontánea, como inducida por el estímulo de MNs inhibitorias, ya que después de la incubación con L-NNA, un inhibidor de la n-NOS (enzima de síntesis del NO), la motilidad espontánea incrementó sólo en el grupo de pacientes con DS. Además hubo una reducción casi total de la latencia en ambos grupos después de adición de L-NNA. Mediante estudios moleculares detectamos un aumento de la expresión relativa de n-NOS sin cambios significativos en la expresión relativa de i-NOS, P2Y₁R o en el marcador neuronal PGP9.5. Esto sugiere que las alteraciones en la vía inhibitoria en estadios iniciales se deben principalmente a un incremento en la síntesis y liberación de NO y al subsiguiente incremento de respuestas inhibitorias mediadas por NO.

El tercer objetivo de esta tesis fue **evaluar el efecto fármacológico in Vitro de diversos espasmolíticos utilizados habitualmente en la práctica clínica para tratar las alteraciones motoras de los pacientes con enfermedad diverticular**. Hemos estudiado el efecto del Bromuro de otilonio y de la N-butil-hioscina sobre las contracciones en ON. Los resultados obtenidos sugieren que aunque ambos espasmolíticos son de utilidad en estos pacientes, ambos presentan una menor eficacia y una potencia ligeramente menor en pacientes con DS.

Como **conclusión final**, esta Tesis Doctoral pone de manifiesto que los pacientes con DS presentan una alteración de la contractilidad in vitro tanto en las contracciones espontáneas como en las inducidas por la estimulación de las motoneuronas del plexo mientérico, ya en la fase asintomática de la enfermedad. Los cambios presentes a nivel de la neurotransmisión inhibitoria son fundamentalmente de la vía nitrérgica.

Whole summary of the Doctoral Thesis

The aim of this Doctoral Thesis was to study the pathophysiology of the contractility alterations of the sigmoid colon, in vitro, in patients with asymptomatic diverticulosis (DS). To do this we used organ bath technique and microelectrodes, histological and immunohistochemical studies and molecular biology (mRNA relative gene expression qRT-PCR) with tissue from the human sigmoid colon of patients with and without DS undergoing surgery for colorectal cancer.

The aim of the first study was **to evaluate spontaneous contractility, resting membrane potential and the effect of inhibitory and excitatory enteric motor neuron stimulation, in samples from patients with DS** compared with a control group. For this reason, **histological and immunohistochemical studies** were performed to determine whether changes observed in electrophysiologic and contractility studies in vitro correlate with structural changes in muscular layer, myenteric plexus or interstitial cells of Cajal (ICCs). Our results demonstrated that spontaneous motility (spontaneous rhythmic phasic contractions) was greatly reduced in patients with DS (amplitude and area under the curve). Electrical field stimulation (EFS), also differed between groups, and induced neurally-mediated, enhanced ON contractions (related to excitatory motor neurons - amplitude) in DS patients. EFS also increased the duration of latency of OFF contractions. The resting membrane potential of smooth muscle cells was hyperpolarized as was the amplitude of the inhibitory junction potential (related to the stimulation of inhibitory motor neurons). However, no histological differences were observed (muscular layers, neural and glial structural elements of myenteric plexus and ICCs density). These findings suggest that there are physiological changes that precede not only the symptoms but also the main histological changes described in this disease.

The aim of the second study was to **characterize the changes in the inhibitory neurotransmission observed previously**. In this study we confirmed the differences in motility previously observed in vitro (decreased spontaneous motility and increased latency of contractions) and showed that these differences are mainly due to an increase in the release of nitric oxide (NO), both spontaneous and induced by the stimulation of inhibitory motor neurons. After incubation with L-NNA, an n-NOS inhibitor, the spontaneous motility increased only in the group of patients with DS. In addition there was an almost total reduction of latency in both groups after addition of L-NNA. Using molecular studies, we detected a relative increase in n-NOS expression without significant changes in the relative expression of i-NOS, P2Y1R or in the neuronal marker PGP9.5. This suggests that, in early stages of the disease, alterations in the inhibitory pathway are mainly due to an increase in synthesis and release of NO and the subsequent increase in inhibitory responses mediated by NO.

The third aim of this doctoral thesis was to **evaluate the in vitro pharmacological effect of several spasmolytic treatments commonly used in clinical practice to treat motor abnormalities in patients with diverticular disease**. We studied the effect of Otilonium bromide and N-butyl-hyoscine on ON contractions. The results suggest that although both spasmolytics are useful in patients with asymptomatic diverticulosis, both show a lower efficacy and a slightly lower potency compared with controls.

As a **final conclusion**, this doctoral thesis demonstrates that patients with diverticulosis have an in vitro contractility impairment that affects both spontaneous contractions and those induced by stimulation of the motor neurons of the myenteric plexus, present in early stages of the disease. The changes presented in inhibitory neurotransmission are primarily due to the nitrergic pathway.

Abreviaturas

ACh acetilcolina

ADP adenosina difosfato

ADP β S adenosina 5'- β -2-tiodifosfato

ANOVA análisis de la varianza o "*analysis of variance*"

ATP adenosina 5'-trifosfato

AUC area bajo la curva o "*area under curve*"

cAMP adenosina monofosfato cíclico

cGMP guanosina monofosfato cíclico

ChAT acetilcolintransferasa

CO monóxido de Carbono

CSE cistationina β -sintasa

DAG diacilglicerol

DD o DS Diverticulosis

EFS estimulación eléctrica de campo o "*electrical field stimulation*"

eNOS sintasa de óxido nítrico endotelial

HAPC actividad propulsiva de alta amplitud

H&E Hematoxilina Eosina

H₂S sulfhídrico

IBS Síndrome de intestino irritable o "*irritable bowel syndrome*"

IC₅₀ concentración inhibitoria al cincuenta por ciento

ICCs células intersticiales de Cajal

ICC-MY célula intersticial de cajal del plexo mientérico

ICC-IM célula intersticial de cajal que se encuentran intramuscularmente

ICC-SM célula intersticial de cajal de la capa submucosa

IFAN neurona aferente intestino-fugale

IPAN neurona intrínseca aferente primaria

IJP potencial postunión inhibitorio o "*inhibitory junction potential*"

IJPf potencial postunión inhibitorio rápido "*inhibitory junction potential fast*"

IJP potencial postunión inhibitorio lento o "*inhibitory junction potential slow*"

iNOS sintasa de óxido nítrico inducible

IPAN neurona intrínseca aferentes primaria o "*intrinsic primary afferent neurons*"

LAPC actividad propulsiva de baja amplitud

L-NNA N ω -nitro-L-arginina

2-MeSADP 2-metil-tio adenosina difosfato

MC complejo motor o "*motor complex*"

MMC complejo motor migratorio o "*migrating motor complex*"

MNE/MNEs motoneurona/s entéricas

MRS2500 (1*R**,2*S**)-4-[2-Iodo-6-(metilamino)-9*H*-purin-9-yl]-2-(fosfonoxi)biciclo[3.1.0]hexano-1-metanol dihidrogeno fosfato éster sal de tetramonio

MRS 2179 N⁶-metil 2'-deoxiadenosina 3',5'-bisfosfato

NADPH nicotiamida-adenina dinucleotido fosfato

NANC no adrenérgico no colinérgico

NaNP/SNP sodio nitroprusiato/sodium nitroprusside

NKA neuroquinina A

nNOS sintasa de óxido nítrico neuronal

NO óxido nítrico

NOS sintasa del óxido nítrico

NSE enolasa neural específica

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

RMP potencial de membrana en reposo o "*resting membrane potencial*"

SD desviación estándar

SII síndrome de intestino irritable

SNC sistema nervioso central

ENS o SNE sistema nervioso entérico o "*enteric nervous system*".

SP sustancia P

SRPC contracción rítmica espontánea o "*spontaneous rhythmic phasic contraction*"

TEA tetraetilamonio

TRPV "*transient receptor potential vanilloid-responsive*"

TTX tetrodotoxina

UDP uridina difosfato

UTP uridina trifosfato

VIP polipéptido vasoactivo intestinal o "*vasoactive intestinal polypeptide*"

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

- Gallego D, Espin F, Mikulka J, Smirg O, Gil V, Faundez-Zanuy M, Jimenez M, & Clave P (2013). In vitro motor patterns and electrophysiological changes in patients with colonic diverticular disease. *International Journal of Colorectal Disease* **28**, 1413-1422.
- Espín F, Rofes L, Ortega O, Clavé P, & Gallego D (2014). Nitrergic neuromuscular transmission is up-regulated in patients with diverticulosis. *Neurogastroenterology and Motility* **26**(10): 1458-68.

Y ha sido presentada en los congresos:

- Participación en la: **XIII Reunión Nacional de la Asociación Española de Coloproctología.**
Comunicación oral: **“Estudio in vitro de la actividad motora del sigma de pacientes con enfermedad divertiular”.**
Autores: **“Espin F, Admella C, Gil V, Jiménez M, Clavé P, Gallego D”.**
Lugar: **Barcelona.** Fecha: **27-29 Mayo 2009.**
- Participación en el: **XIX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia.**
Comunicación oral: **“Estudi in Vitro de l’activitat motora del sigma en pacients amb malatia diverticular”.**
Autores: **“Espin F, Gil V, Rofes L, Admella C, Jiménez M, Clavé P, Gallego D”.**
Lugar: **Tarragona.** Fecha: **28-30 Enero 2010.**
Abstract publicado en: **Suplements dels Annals de Medicina Vol.93-Supl 1 p S1-42.**

- Participación en : **“La semana de las enfermedades digestivas 2010”**.
Trabajo (poster): **“Alteraciones estructurales y motoras en el colon de pacientes con enfermedad diverticular”**.
Autores: **“Gallego D, Espín, F, Gil V, Admella C, Jiménez M, Clavé P”**.
Lugar: **Santiago de Compostela**. Fecha: **19-22 Junio 2010**.
Abstract Publicado en: **Revista Española de Enfermedades Digestivas. 210; 102(Supl.I) 19-172 p128**.
- Participación en el: **“2010 Joint International Neurogastroenterology and Motility Meeting”**.
Trabajo (poster): **“Tissue remodelling and dysmotility in strips from colonic diverticular disease patients”**.
Autores: **“Espín F, Gil V, Admella C, Jiménez , Clavé P, Gallego D”**.
Lugar: **Boston, MA (USA)**. Fecha: **26-29 Agosto 2010**.
Abstract Publicado en: **Neurogastroenterology and motility. Vol.22 (1) Supplement 1: S1-96 p35-36**.
- Participación en el: **“18th United European Gastroenterology week”**.
Trabajo (Poster): **“In Vitro characterization of the morphological changes and dysmotility in colonic diverticular disease”**.
Autores: **“Gallego D, Espín, F, Gil V, Jiménez M, Clavé P”**.
Lugar: **Barcelona**. Fecha: **23-27 Octubre 2010**.
Abstract Publicado en: **Gut. November 2010 Vol 59 Supplement III p A199**.
- Participación en el: **“XIX Congrés de la Societat Catalana de Digestologia”**.
Trabajo: **“Alteracions en la neurotransmissió neuromuscular inhibidora en pacients amb diverticulosi”**. Autores: **Espín F, Rofes.L, Ortega O, Jiménez M, Clavé P & Gallego D**. Lugar: **Girona**. Fecha: **26 al 28 Enero 2012**.
Abstract Publicado en: **Suplements dels Annals de Medicina Vol.95-Supl 1 p S1-37**.

INTRODUCCIÓN.	1
1. Anatomía e histología del colon humano.	1
2. Motilidad gastrointestinal y colónica.	4
2.1. Patrones de motilidad del colon humano.	4
3. Control de la motilidad colónica.	7
3.1. Control no neural.	7
3.2. Control neural.	9
4. Enfermedad diverticular.	27
4.1. Definición de divertículo y epidemiología.	27
4.2. Etiología y Fisiopatología.	29
4.4. Complicaciones y tratamiento.	39
5. Diverticulosis y posible relación con el síndrome de intestino irritable (SII).	43
Referencias.	45
HIPÓTESIS.	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	60
CAPÍTULO 1.	61
<i>In Vitro motor patterns and electrophysiological changes in patients with colonic diverticular disease.</i>	
1. Abstract.	61
2. Introduction.	62
3. Material and methods.	64
3.1. Tissue preparation.	64
3.2. Organ bath studies.	64
3.3. Intracellular microelectrode recording.	65
3.4. Experimental design.	66
4. Specimen processing for morphometric analysis.	67
4.1. Image processing and morphometric analysis.	68
5. Data analysis and statistics.	68
6. Results.	69
6.1. Physiological studies.	69
6.2. Morphometric analysis of muscular layers and ENS.	76
7. Discussion.	79
Referencias.	84

ANEXO 1. _____ 87***Estudio morfológico en enfermedad diverticular asintomática, cambios a nivel muscular, de sistema nervioso entérico e ICCs. Desarrollo de un método de análisis histológico semiautomático.***

Resumen. _____	87
1. Introducción. _____	88
2. Características generales y método de procesado. _____	89
2.1. Cuantificación de elementos estructurales y alteraciones histológicas más relevantes. _____	89
3. Método de procesado. _____	92
4. Obtención y procesamiento de las muestras. _____	94
5. Valoración de Capas musculares. _____	96
6. Valoración de células intersticiales de Cajal (ICCs). _____	97
7. Valoración de Neuronas y glia. _____	98
8. Procesado de las imágenes para el análisis morfométrico informatizado. _____	101
9. Estudio comparativo del tiempo de procesado manual y el automático. _____	106
10. Conclusiones. _____	106
Referencias _____	107

CAPÍTULO 2. _____ 111***Nitrgic neuromuscular transmission is up-regulated in patients with diverticulosis.***

1. Abstract. _____	111
2. Introduction. _____	112
3. Material and methods. _____	114
3.1. Patients and tissue samples. _____	114
3.2. Organ Bath technique. _____	115
3.3. Solutions and Drugs. _____	116
3.4. Gene expression by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). _____	117
3.5. Data analysis and statistics. _____	118
4. Results. _____	119
4.1. Spontaneous contractility. _____	119
4.2. Inhibitory neural tone. _____	119
4.3. Pharmacological effect of an NO-donor, Sodium Nitroprusside (SNP), and ADP β S on spontaneous contractility. _____	121

4.4. Endogenous EFS-induced release of inhibitory neurotransmitters. _____	122
4.5. Changes in m-RNA expression. _____	124
5. Discussion. _____	125
References. _____	132
ANEXO 2. _____	135
<i>Evaluación de diferentes estrategias farmacológicas para tratar las alteraciones motoras que presentan los pacientes con enfermedad diverticular.</i>	
1. Resumen. _____	135
2. Introducción. _____	136
3. Material y Métodos. _____	138
3.1. Pacientes y Muestras. _____	138
3.2. Baño de Órganos. _____	139
3.3. Fármacos. _____	139
3.4. Diseño experimental y estadística. _____	140
4. Resultados. _____	140
5. Discusión. _____	144
DISCUSIÓN GENERAL. _____	151
1. Caracterización de las principales alteraciones motoras y electrofisiológicas in Vitro en pacientes con enfermedad diverticular asintomática. _____	151
2. Caracterización de los cambios a nivel de neurotransmisión inhibitoria. _____	154
3. Comparativa con otros estudios en pacientes con enfermedad diverticular. _____	159
4. Factores experimentales que pueden influir a la hora de comparar resultados experimentales. _____	161
5. Alteraciones motoras en pacientes con enfermedad diverticular. Motilidad in Vivo (motilidad) e in Vitro (contractibilidad). _____	162
6. Traslación entre los patrones motores in Vitro y las alteraciones motoras in Vivo en pacientes. _____	164
7. Alteraciones histológicas asociadas a la enfermedad diverticular. _____	166
8. Posibles líneas de tratamiento/prevención atendiendo a los hallazgos descritos. _____	169
9. Futuras líneas de investigación. _____	172
Referencias. _____	175
CONCLUSIONES. _____	181

INTRODUCCIÓN.

1. Anatomía e histología del colon humano.

El colon humano mide unos 150 cm de longitud y entre 5 y 7 cm de diámetro, limita anatómicamente con el íleon y la válvula ileocecal, última porción del intestino delgado, hasta la unión rectosigmoidea a nivel de la reflexión peritoneal.

Desde el punto de vista anatómico, el colon humano posee las siguientes porciones: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide o sigma.

La comunicación del íleon con el intestino grueso se realiza a través de un esfínter o válvula ileocecal que desemboca en el colon ascendente, primera porción del colon, en la primera porción del colon ascendente se encuentra el orificio apendicular, donde desemboca el apéndice vermiforme.

El colon transverso es la segunda porción del colon y se extiende a través del abdomen del lado derecho hacia el lado izquierdo. Sus dos extremos forman dos flexuras o ángulos que se llaman:

- Flexura cólica derecha o ángulo hepático del colon, siendo la unión del colon ascendente con el colon transverso.

- Flexura cólica izquierda o ángulo esplénico, siendo la unión del colon transverso con el colon descendente.

Finalmente el colon descendente que va desde la flexura esplénica hasta su unión con el colon sigma. Por lo tanto, se denomina colon sigmoideo o sigma a la porción distal

del intestino grueso, situada al final del colon descendente hasta la reflexión peritoneal donde se continúa con el recto.

Por su procedencia embriológica y funcional, el colon se puede dividir en dos porciones: el colon proximal o derecho que deriva del intestino medio, que asume funciones de absorción y la mitad distal (colon izquierdo y sigma), que deriva del intestino posterior y desempeña funciones de transporte y reservorio.

Histológicamente el tracto gastrointestinal está formado por capas dispuestas de forma concéntrica. En el colon, desde la luz intestinal hacia afuera, encontramos:

La mucosa, que está recubierta por células epiteliales responsables de la absorción de agua y electrolitos en el caso del colon. Justo por debajo está situada la lámina propia y la muscular de la mucosa, *muscularis mucosae*.

La capa submucosa, situada inmediatamente a continuación de la mucosa, está formada por una matriz de colágeno que contiene vasos sanguíneos y linfáticos. A este nivel se encuentra el plexo submucoso o de Meissner, uno de los dos plexos ganglionados que forman el sistema nervioso entérico. Este plexo contiene neuronas que principalmente inervan la mucosa y vasos sanguíneos.

Las capas musculares están formadas por la capa muscular circular interna, y la capa longitudinal externa, entre ambas capas se sitúa el plexo mientérico o de Auerbach. El plexo mientérico es el segundo de los plexos ganglionares del sistema nervioso entérico y contiene la mayor parte de las interneuronas y motoneuronas excitatorias e inhibitorias.

A lo largo del colon la capa muscular externa orientada longitudinalmente, está formada por tres bandas de un centímetro de anchura aproximadamente, estas son las

tenias del colon y se extienden desde la base del ciego y apéndice vermiforme hasta la porción distal del sigma. Se denomina tenia libera a la situada anteriormente, tenia mesocólica a la que, en las porciones ascendente y descendente del colon, se dispone en posición medial, mientras que en la porción transversa se relaciona con el origen del mesocolon. La tenia omental se sitúa dorsalmente en las porciones ascendente y descendente del colon, mientras que en el colon transversa discurre siguiendo la línea de adherencia del epiplón mayor.

La última capa de la pared del colon es la serosa, capa más externa, que recubre el colon en toda su extensión y está formada por células epiteliales dispuestas en forma de mesotelio (Olsson & Holmgren, 2001; Kunze & Furness, 1999; Guyton & Hall, 1996; Furness, 2006) (Figura 1).

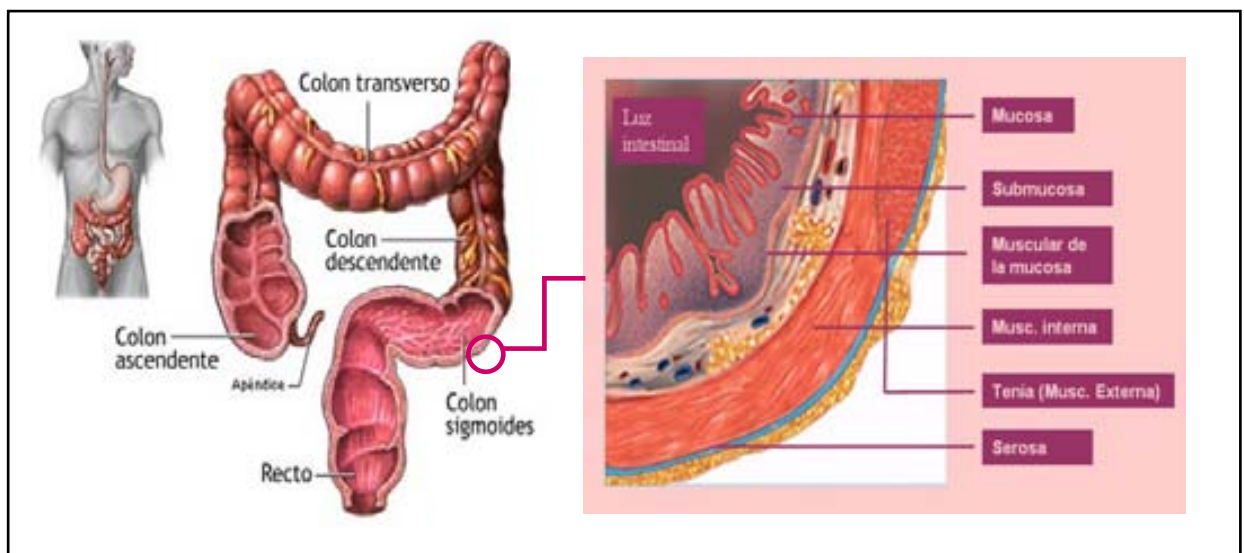


Figura 1. Anatomía y segmentación del colon humano, detalle de corte transversal en que se muestran las capas que lo constituyen. Gray Anatomia para estudiantes. Atlas de anatomia virtual (Drake et al., 2002).

2. Motilidad gastrointestinal y colónica.

Una de las funciones más importantes del tracto gastrointestinal, es el transporte de los alimentos digeridos, a una velocidad adecuada para que los enzimas digestivos puedan facilitar su absorción. En el caso del colon las funciones más importantes son la absorción de agua y electrolitos, que permite concentrar la materia fecal para formar las heces y el almacenamiento de las mismas hasta que son propulsadas hacia el recto donde se da la expulsión bajo control voluntario.

Los patrones de motilidad del tracto gastrointestinal se podrían agrupar en dos grandes grupos: a) movimientos de mezclado y b) movimientos de propulsión. En general estos movimientos se generan localmente en el sistema nervioso entérico. En el caso del colon, estos movimientos están también bajo el control del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático).

2.1. Patrones de motilidad del colon humano.

Mediante estudios manométricos en voluntarios sanos se han establecido dos tipos de respuestas motoras agrupadas en: actividad segmentaria (principalmente relacionada con la actividad de mezcla) y actividad propulsiva (principalmente relacionada con el avance del bolo).

La **actividad segmentaria**, también denominada como contracciones rítmicas fásicas, consiste en contracciones de baja amplitud, entre 5 y 50 mmHg, y supone la mayor parte de la actividad motora colónica. Aunque ocasionalmente se pueden dar contracciones de mayor amplitud, aisladas o agrupadas. Sin embargo, un porcentaje muy pequeño del tiempo, estas contracciones pueden presentar una frecuencia rítmica de unos 3 ciclos por minuto, este es el patrón observado principalmente la

porción sigmoidea. Esta actividad contráctil tiene como finalidad mezclar el contenido fecal y propulsar lentamente la materia fecal hacia el recto, permitiendo una absorción óptima de agua (Figura 2A).

La **actividad propulsiva** se subdivide según su amplitud, existiendo una actividad de baja amplitud o *Low-Amplitude propagated contractions* (LAPC) y las de alta amplitud o *High-Amplitude propagated contractions* (HAPC). Las LAPC son relativamente frecuentes, poseen una amplitud de unos 100 mmHg y se dan un centenar al día. Probablemente la función principal es la de transportar fluidos o gases (Figura 2B).

Las HAPC tienen una amplitud media de más de 100 mmHg y son mucho más infrecuentes, unas 6 al día. Estas contracciones se corresponden con los movimientos en masa, también denominadas contracciones gigantes migratorias, capaces de propulsar gran cantidad de contenido fecal a largas distancias (Bassotti *et al.*, 2005b) (Figura 2C).

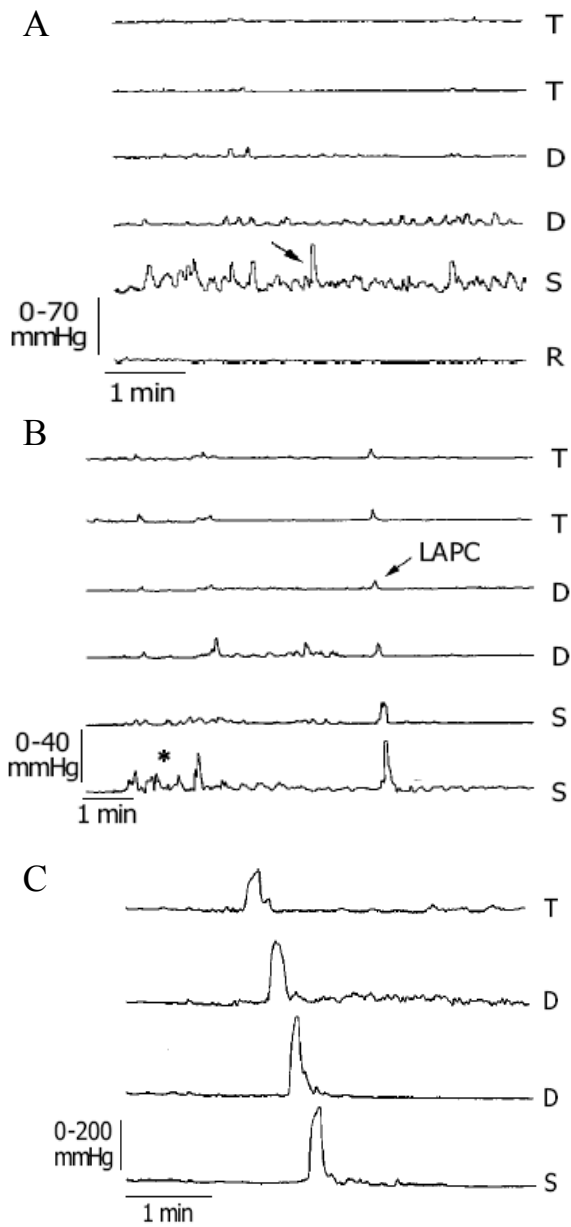


Figura 2. Registros manométricos donde Los puntos de registro están separados 12 cm y proceden de colon transverso (T), distal (D) y sigma (S).

A Registro representativo de la actividad segmentaria. La mayoría de las contracciones son de baja amplitud aunque excepcionalmente (Flecha) pueden exceder los 50 mm de Hg.

B Registro representativo de la actividad propulsiva de baja amplitud LAPC (Flecha) se observa también actividad segmentaria en el colon sigma (asterisco).

C Registro representativo de la actividad propulsiva de alta amplitud HAPC. Reproducido de (Bassotti et al., 2005b).

También se ha propuesto un tercer tipo de actividad contráctil, el tono, gracias a éste y a la reducción de la luz intestinal que éste genera, los movimientos de mezcla y propulsión se ven favorecidos (Gonzalez & Sarna, 2001).

Estudios recientes de Dinnig y colaboradores (Bampton & Dinning, 2013; Dinning et al., 2013) demuestran que existe además actividad peristáltica retrógrada que habitualmente no es detectada con métodos de manometría convencional pero si con

métodos de manometría de alta resolución. Este hecho podría significar la no detección mediante métodos manométricos convencionales alteraciones de motilidad en algunas patologías.

Se ha descrito además, que la motilidad colónica podría verse influenciada por factores hormonales, y que podría seguir un ritmo circadiano, ya que hay estudios que han mostrado una menor actividad motora colónica global en mujeres que en hombres, y que ésta, es inferior en las horas de sueño (Malcolm & Camilleri, 2000; Rao *et al.*, 2001; Sarna, 2006).

3. Control de la motilidad colónica.

3.1. Control no neural.

El potencial de membrana de las células musculares lisas no es estable sino que presenta oscilaciones espontáneas. Estas oscilaciones se denominan ondas lentas. El potencial de membrana, que oscila entre -40 y -80 mV, está determinado por la actividad de la bomba sodio potasio y por canales de potasio de difusión pasiva. Además de éstos últimos, las células musculares poseen canales selectivos para determinados iones que pueden ser regulados por diferencia de potencial y por otros mediadores. Especialmente los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales de potasio activados por calcio, son fundamentales para esta ritmicidad de las células musculares lisas (Boeckstaens, 2002; Hansen, 2003). Esta ritmicidad eléctrica determina la máxima frecuencia de contractilidad del músculo liso. Los potenciales de acción tienen lugar en la parte de mayor despolarización de estas ondas lentas. Los inputs excitatorios de las neuronas entéricas provocan despolarización de la célula

muscular, abertura de canales de calcio operados por voltaje, tipo L, de la célula y la contracción consiguiente (Figura 5).

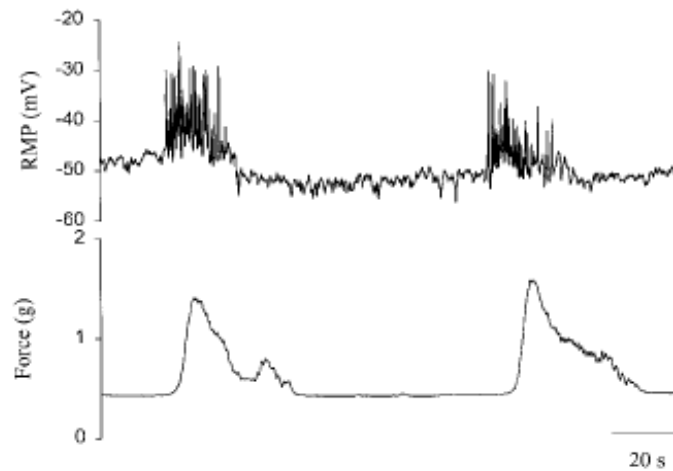


Figura 3. Registro intracelular y mecánico del colon de rata donde se puede observar la correlación entre actividad mecánica (ondas lentas) arriba y las contracciones mecánicas abajo. Adaptado de (Pluja et al., 2001).

En un principio se pensaba que las ondas lentas eran resultado de las propiedades del músculo liso y se denominaron “miogénicas”. Actualmente, se ha demostrado que las ondas lentas se generan en células especializadas de origen mesenquimal, las Células intersticiales de Cajal o (ICCs), descritas por Santiago Ramón y Cajal a principios del siglo XX (Ramón y Cajal, 1904). Se ha propuesto que las ICCs poseen tres funciones principales; la de generar este mecanismo marcapasos, la facilitación de la propagación de fenómenos eléctrico y mediar, en parte, la neurotransmisión. Algunos investigadores han propuesto una cuarta función que sería la de actuar como mecanorreceptores (Sanders, 1996; Sanders et al., 2006).

Según su distribución, las ICCs se pueden clasificar en:

- ICCs de la capa submucosa ICC-SM, que se encuentran en la superficie de la capa muscular circular en contacto con la capa submucosa del colon.
- ICCs de la capa intermuscular ICC-MY, que se encuentran en la región mientérica del colon coexistiendo con el plexo neural mientérico.
- Finalmente, las ICCs que se encuentran intramuscularmente o ICC-IM (Horowitz *et al.*, 1999; Takaki, 2003).

En el colon el mecanismo marcapasos se origina en la red de ICCs cercana a la zona submucosa o ICC-SM. Este hecho se ha demostrado en el colon canino, porcino y humano (Liu & Huizinga, 1993; Smith *et al.*, 1987; Serio *et al.*, 1991; Rae *et al.*, 1998). En este caso las ondas lentas decrecen en amplitud al alejarse de esta zona. Aunque las ICCs del plexo mientérico o ICC-MP generan unas contracciones cíclicas de frecuencia superior denominadas *Myenteric Potencial Oscillations* (MPOs), la actividad eléctrica final es consecuencia de las ondas lentas generadas en ambas regiones (Rae *et al.*, 1998).

3.2. Control neural.

3.2.1. Control neural extrínseco. Sistema Nervioso Simpático y Parasimpático.

El sistema nervioso central es capaz de modular, pero no de ejercer un control total, sobre la motilidad colónica a través de los dos componentes del sistema nervioso autónomo: el Sistema Nervioso Simpático y el Parasimpático (Hansen, 2003; Guyton & Hall, 1996). En ambos casos existe información aferente (sensitiva) y eferente (motora), que es la base de la regulación extrínseca de la motilidad intestinal.

Las fibras eferentes simpáticas y parasimpáticas, representan la ruta de regulación del Sistema Nervioso Entérico por parte del sistema nervioso central. El sistema nervioso autónomo, a través de las fibras eferentes parasimpáticas, regula por ejemplo, las fases digestivas e interdigestivas de la motilidad intestinal regulando los patrones motores, la secreción, el flujo sanguíneo, mientras que la vía simpática conduce la información que media la respuesta a estrés, entre otras.

Las fibras eferentes parasimpáticas (colinérgicas), son preganglionares y terminan en motoneuronas del plexo mientérico, para llevar a cabo un control sobre la actividad motora o bien en motoneuronas colinérgicas del plexo submucoso, para regular la actividad secretora o la circulación visceral. Estas fibras eferentes preganglionares se localizan en los nervios vagales y pélvicos, y las neuronas postganglionares simpáticas se encuentran en los ganglios del sistema nervioso entérico.

Las fibras eferentes simpáticas (principalmente noradrenérgicas aunque también se ha descrito que liberan adrenalina, somatostatina y neuropéptido Y (Hansen, 2003), son postganglionares y algunas de ellas terminan en neuronas colinérgicas del SNE para inhibir la liberación de acetilcolina vía activación de sus receptores α_2 pre-sinápticos, o bien terminan directamente sobre células musculares lisas inhibiendo a la motilidad. Puede actuar también sobre vasos sanguíneos regulando la circulación visceral.

El sistema nervioso autónomo forma grandes redes que sirven como medios de redistribución de las fibras simpáticas o parasimpáticas, son los plexos prevertebrales, como por ejemplo el plexo celiaco; situado en la región epigástrica del abdomen, formado por fibras del nervio vago y por fibras simpáticas. El plexo hipogástrico; está situado frente a la 5ª vértebra lumbar y promontorio del sacro y recibe fibras simpáticas del plexo aórtico y de los ganglios lumbares y fibras parasimpáticas del

nervio pélvico. Sus dos porciones laterales, los plexos pélvicos yacen a cada lado del recto.

A diferencia del colon derecho y transversal, el colon descendente, sigma y recto recibe inervación de núcleos nerviosos situados en la sustancia gris de la porción sacra que se extiende desde el segundo segmento sacro hasta el final de la médula espinal. Las terminaciones nerviosas de los últimos pares raquídeos y el tercer y cuarto nervios sacros se unen formando el plexo pélvico, de éste e originan las fibras parasimpáticas que tienen como función el aumento del tono de la musculatura lisa, estimulación de la actividad peristáltica, relajación de los esfínteres perineales, estimulación de la secreción del epitelio glandular colónico.

3.2.2. Control neural intrínseco. Sistema Nervioso Entérico. Neurotransmisores inhibitorios y excitatorios.

El Sistema Nervioso Entérico (ENS) se encuentra en las paredes de todo el tracto gastrointestinal desde el esófago hasta el esfínter anal. Específicamente en el colon humano, el SNE consta del plexo mientérico (plexo de Auerbach) y del plexo submucoso, que se divide en tres plexos separados, el Plexo submucoso interno (Plexo de Meissner) que está justo debajo de la *muscularis mucosae*, el Plexo submucoso externo (Plexo de Schabadasch o Plexo de Henle), que es adyacente a la capa muscular circular y un Plexo submucoso intermedio que se sitúa entre ambos. En analogía con otras especies, esta distribución anatómica tiene una relevancia funcional, ya que el plexo mientérico, principalmente, regula la actividad muscular mientras que el plexo submucoso, principalmente, está involucrado en la regulación de las funciones de la mucosa, aunque esta distribución funcional no es exclusiva y algunas neuronas del plexo mientérico proyectan a la mucosa y del mismo modo hay algunas neuronas del

plexo submucoso que proyectan a la capa muscular circular (Schemann & Neunlist, 2004).

Las neuronas del ENS son, principalmente, las responsables de los patrones motores intestinales y de la propulsión del bolo. Aunque las neuronas entéricas se pueden clasificar siguiendo varios criterios como su codificación, según sus propiedades electrofisiológicas, su tipología Dogiel, etc., resulta más común su clasificación atendiendo a sus características funcionales en neuronas sensitivas, interneuronas y motoneuronas (Kunze & Furness, 1999;Furness, 2006;Costa *et al.*, 2000;Brookes, 2001).

Las neuronas sensitivas, a su vez, se pueden clasificar en Neuronas intrínsecas aferentes primarias, IPANs y las neuronas aferentes intestinofugales o IFANs. Las primeras tienen sus cuerpos celulares tanto en el plexo mientérico como en el submucoso y proyectan sus terminales hacia la mucosa intestinal, responden a estímulos químicos, mediados principalmente por serotonina y ATP, y también mecánicos (Bertrand & Bornstein, 2002). Mientras que las IFANs sólo se encuentran en los ganglios del plexo mientérico y sus axones migran del tubo digestivo para contactar con los ganglios simpáticos paravertebrales, estas neuronas poseen mecanoreceptores y responden a estiramientos de las capas musculares (Szurszewski *et al.*, 2002).

Las interneuronas han sido identificadas en todas las regiones del tracto gastrointestinal y, posiblemente, son las neuronas que más varían entre regiones, más que los otros dos tipos neuronales. Las interneuronas forman cadenas en dirección oral y aboral. Se pueden diferenciar, por tanto, interneuronas ascendentes y descendentes. Las ascendentes parecen estar implicadas en reflejos locales así como algunas de tipo descendente (Bornstein *et al.*, 2004).

Las motoneuronas representan la conexión final motora con las células musculares lisas de las capas circular y longitudinal. Se suele subclasificar las motoneuronas en motoneuronas excitatorias e inhibitorias, según los neurotransmisores que codifican (Furness, 2006), aunque también hay otras subclasificaciones según la capa muscular que inervan (Costa *et al.*, 2000).

Dentro de las motoneuronas podemos encontrar también un pequeño grupo de neuronas secretoras y vasomotoras, que son neuronas que proyectan a mucosa y a vasos sanguíneos locales.

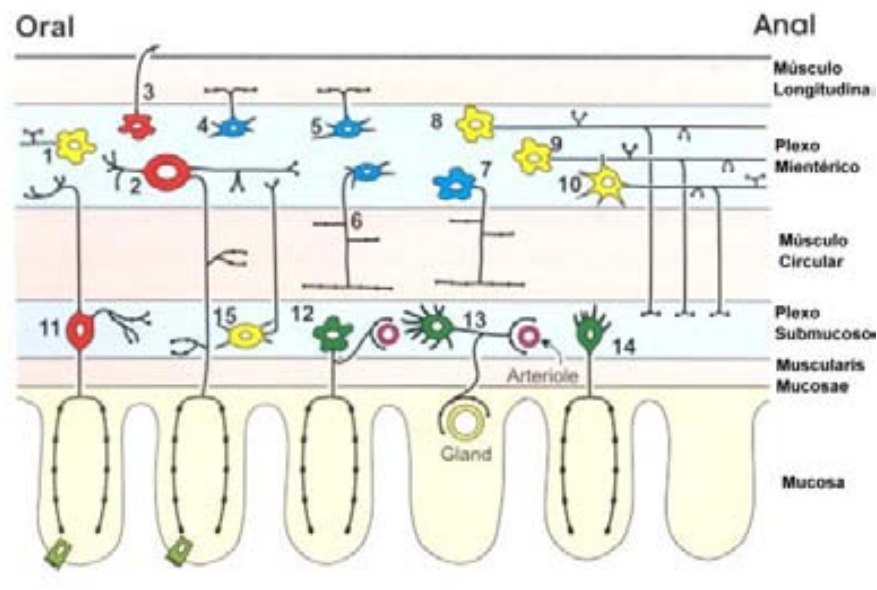


Figura 4. Tipos de neuronas del intestino de cobayo (1) interneurona ascendente, (2) IPAN mientérica, (3) IFAN (4) motoneurona longitudinal excitatoria e inhibitoria (5), motoneurona circular excitatoria (6) e inhibitoria (7), interneurona descendente (8, 9 y 10), IPAN submucosa (11), neuronas secretomotoras y vasodilatadores (12, 13 y 14), neuronas que proyectan al plexo mientérico (15). Adaptado de (Furness *et al.*, 2004).

Neurotransmisión inhibitoria y excitatoria.

Como se ha comentado previamente las motoneuronas se pueden subclasificar según los neurotransmisores para los que codifican y liberan en la unión neuromuscular. Como principales neurotransmisores inhibitorios en el tracto gastrointestinal se han propuesto el óxido nítrico (NO), el ATP, el VIP, el PACAP y el monóxido de carbono (CO). De la misma forma, se ha establecido que los neurotransmisores excitadores que codifican preferentemente las motoneuronas excitatorias son la acetilcolina (ACh) y las taquiquininas (Principalmente la NKA y la Substancia P). También se ha descrito que el ATP puede comportarse como un neurotransmisor excitatorio actuando a través de los receptores P2X₁ (Lecci *et al.*, 2002).

3.2.3. Neurotransmisión inhibitoria.

Óxido nítrico (NO).

El óxido nítrico NO ha sido propuesto como uno de los neurotransmisores no adrenérgicos no colinérgicos inhibitorios en el tracto gastrointestinal (Bult *et al.*, 1990). Se ha descrito que este neurotransmisor tiene una función importante en la relajación del esfínter esofágico inferior (LES) (Gonzalez *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011), en la acomodación y el vaciado gástrico (Andrews *et al.*, 2007), en la relajación del esfínter anal interno (O'Kelly *et al.*, 1993; Opazo *et al.*, 2011), y que media también la relajación del músculo liso en las diversas áreas del tubo digestivo entre ellas el colon (Keef *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1993; Boeckxstaens *et al.*, 1993; Gallego *et al.*, 2008a; Auli *et al.*, 2008). La carencia de óxido nítrico, o de su enzima de síntesis, está implicada en diversas patologías como la acalasia (Mearin *et al.*, 1993), la estenosis hipertrófica pilórica o la disfunción motora causada por la neuropatía diabética. Incluso hay algunos estudios

que han asociado la enfermedad diverticular con una pérdida de NO o de su enzima de síntesis (Tomita *et al.*, 2000;Golder *et al.*, 2007).

El óxido nítrico (NO) es una molécula generada por una familia de enzimas denominadas NO sintasas (NOS), que producen óxido nítrico a partir de L-arginina. Hay tres genes independientes que codifican para la NOS, la neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Todos ellos producen óxido nítrico a través de mecanismos independientes y con diferentes mecanismos de regulación (Shah *et al.*, 2004).

La producción de NO como neurotransmisor inhibitorio en el tracto gastrointestinal se lleva a cabo por parte de la nNOS. La nNOS se encuentra principalmente en neuronas (aunque podría encontrarse en otros tipos celulares como las células musculares en mucha menor proporción). El NO que tiene efecto sobre la función vascular es producido por la eNOS. Tanto la nNOS como la eNOS son dos enzimas que se expresan de forma constitutiva, es decir, se produce de forma más o menos constante con diferentes mecanismos de regulación. Mientras que la iNOS es un enzima que no se expresa de forma constitutiva, lo que implica que su síntesis se induce en determinadas situaciones como la inflamación, hay estudios que demuestran que mediadores que se producen en la inflamación como las citoquinas inducen la expresión y producción de este enzima, su producción en estas condiciones por parte de la mayoría de células del tracto gastrointestinal pero principalmente se produce por células del sistema inmune (Shah *et al.*, 2004) (Figura 5).

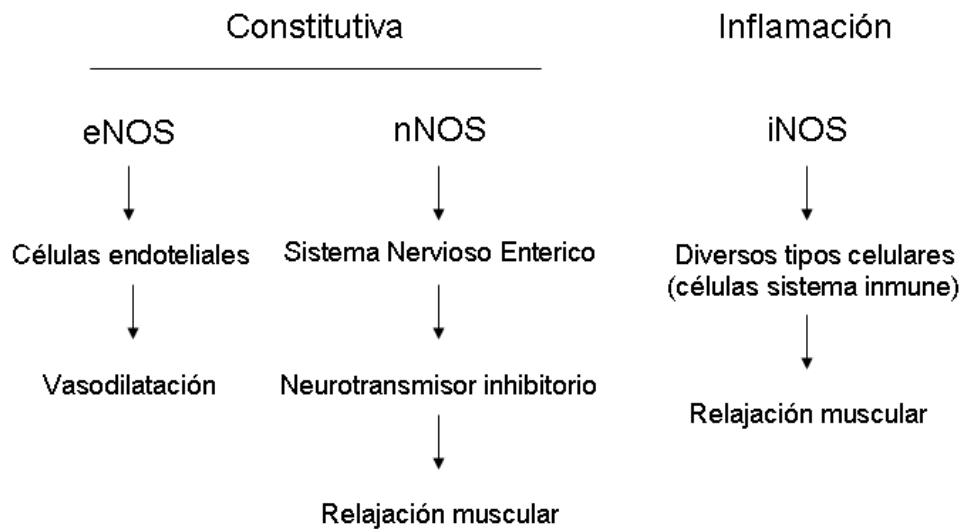


Figura 5. Esquema de las diferentes vías de producción de NO por parte de la familia de enzimas NOS.

En el colon humano se ha descrito recientemente que el NO sería uno de los dos principales neurotransmisores junto con el ATP o una purina relacionada (Auli *et al.*, 2008). Ambos neurotransmisores tendrían funciones diferentes y complementarias, el NO sería responsable de una relajación tónica más sostenida, mientras que el ATP tendría una función más fásica y menos sostenida (Gallego *et al.*, 2008a).

Receptores y vía intracelular.

El NO es lipofílico, con lo cual, difunde a través de la membrana plasmática. Por tanto, puede señalizar intra e intercelularmente. La vía intracelular más caracterizada para el NO es la mediada por la guanilato ciclasa, que produce GMP cíclico (De Man *et al.*, 2007), que activa una protein kinasa G generando una cascada de fosforilaciones. En algunas condiciones fisiopatológicas se ha descrito que podría tener un efecto independiente de GMP (Bolotina *et al.*, 1994).

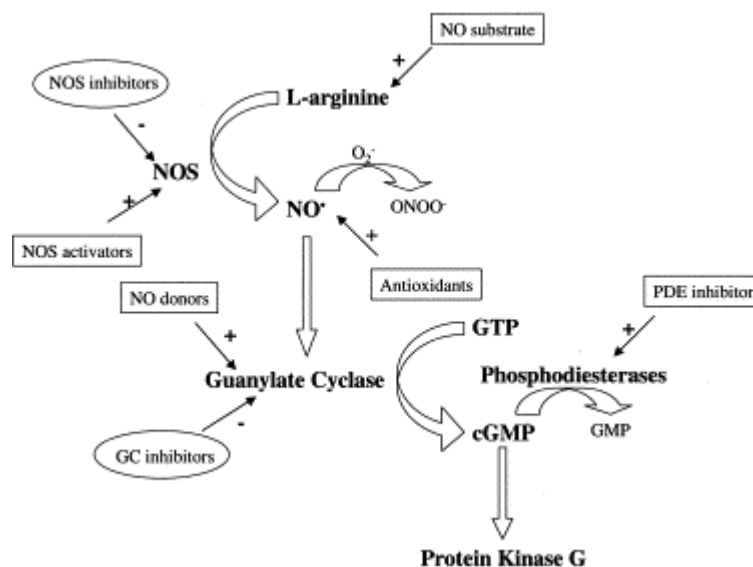


Figura 6. Esquema donde se muestra la síntesis y vía intracelular del NO. Reproducido de Shah *et al* 2004 (Shah *et al.*, 2004).

ATP o purinas relacionadas.

En 1970, el ATP o un nucleótido relacionado fue propuesto por Burnstock y colaboradores como neurotransmisor no adrenérgico no colinérgico en diversas especies de mamíferos. Se ha demostrado su liberación por parte de neuronas entéricas, sus efectos relajando el músculo liso por adición exógena y su presencia mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando quinacrina, (un marcador de estructuras proteicas unidas a ATP) (Burnstock *et al.*, 1970; Burnstock, 2006).

Posteriormente estos resultados fueron corroborados en el intestino humano valorando el potencial de membrana y también en la actividad mecánica. Estos estudios demostraron que, el ATP era el neurotransmisor responsable de las hiperpolarizaciones del músculo liso o IJPs (potenciales post-unión inhibitorios) (Zagorodnyuk *et al.*, 1989).

Diversos estudios posteriores han propuesto una posible co-transmisión entre el óxido nítrico y el ATP, siendo el ATP o un componente sensible a apamina el que mediaría el componente rápido del IJP, y el óxido nítrico el componente lento de esta hiperpolarización, como es el caso del colon humano y de rata (Boeckxstaens *et al.*, 1993; Keef *et al.*, 1993; Pluja *et al.*, 1999).

Diversos factores han dificultado el esclarecimiento de los receptores y vías de acción del ATP y análogos. Entre estos factores se encuentran el hecho de que los antagonistas utilizados como específicos para la vía purinérgica como la apamina, el PPADS o la suramina presentaran interferencias con otras vías o presentan poca especificidad para un solo tipo de receptor. El desarrollo de fármacos específicos como el MRS2179, el MRS2279 y el MRS2500 que bloquean específicamente los receptores P2Y₁ con diferentes rangos de potencia ha permitido profundizar en el estudio de estas vías (Camaioni *et al.*, 1998; Cattaneo *et al.*, 2004; Auli *et al.*, 2008; Grasa *et al.*, 2009; Gallego *et al.*, 2011).

Utilizando estas herramientas farmacológicas, se ha demostrado en el colon humano que el ATP, o una purina relacionada, actúa a través de receptores P2Y₁, situados post-sinápticamente (Gallego *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2008b; Auli *et al.*, 2008) y que media la transmisión neuromuscular (motoneurona-músculo). Se sabe también que el MRS2500 es el antagonista más potente (con una menor IC₅₀) para este

receptor (Gallego *et al.*, 2011) (Gallego 2011). Esta observación llevada a cabo mediante una aproximación farmacológica ha sido confirmada recientemente mediante ratones modificados genéticamente (Knocked out) y que no poseen este receptor (Hwang *et al.*, 2011; Gallego *et al.*, 2012).

Receptores y vía intracelular.

Hay dos familias de receptores para purinas (adenosina, ATP y ADP) y pirimidinas (UDP y UTP):

Los receptores P1 que son receptores para adenosina, se han descrito cuatro subtipos los A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃.

Los receptores P2 reconocen principalmente ATP, ADP, UDP y UTP. Dentro de esta familia encontramos dos subclases de receptores:

Los P2X, que son ionotrópicos, es decir, son receptores unidos a canales iónicos que median la entrada de cationes de forma selectiva y rápida. Se han descrito siete receptores P2X₁-P2X₇ y todos ellos están unidos a canales catiónicos para sodio, potasio y calcio.

Los P2Y, que son metabotrópicos, están unidos a proteínas G y se han descrito ocho subtipos, entre los que se encuentran los receptores P2Y₁ que son los principales responsables de la neurotransmisión purinérgica en el tracto gastrointestinal (Gallego *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2013) (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ y P2Y₁₄). Su respuesta es más lenta que la de los receptores ionotrópicos. La mayoría de ellos están unidos a una proteína G que activa la fosfolipasa C dando lugar a diacilglicerol (DAG) y fosfoinositoltrifosfato (IP₃), y por tanto, produciendo una movilización del calcio intracelular, se ha descrito que esta es la vía que median los receptores P2Y₁ en algunas especies como el cobayo aunque en

humanos no hay evidencias concluyentes (Ralevic & Burnstock, 1998; Burnstock & Knight, 2004; Hu *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2006).

Otros posibles neurotransmisores inhibitorios.

Monóxido de carbono (CO).

El monóxido de carbono (CO) se ha propuesto recientemente como neurotransmisor NANC. Se ha demostrado que este gas hiperpolariza las células musculares lisas del intestino humano y canino (Farrugia *et al.*, 1998). Se ha descrito también como uno de los neurotransmisores que intervienen en la relajación de esfínteres como el esfínter anal interno de zarigüeya, de rata o el esfínter esofágico inferior (LES) porcino (Chakder *et al.*, 2000; Rattan *et al.*, 2004; Farre *et al.*, 2006). Aunque en el colon humano no se ha descrito hasta la fecha un papel relevante para este neurotransmisor.

El CO es producido a partir de protoporfirina, principalmente por dos enzimas la hemooxigenasa 1 y la hemooxigenasa 2.

Receptores y vía intracelular.

El monóxido de carbono, igual que el óxido nítrico, difunde a través de la membrana plasmática. La vía intracelular también es común a la del NO, ya que activa la guanilato ciclasa y la producción de GMP cíclico (Gibbons & Farrugia, 2004).

VIP (Péptido intestinal vasoactivo) y péptidos relacionados.

También se ha propuesto el VIP como neurotransmisor inhibitorio, ya que fue detectado en fibras nerviosas que inervaban el músculo liso intestinal. Diversos estudios respaldaron esta observación, ya que se demostró que este péptido era un potente relajante del músculo liso gastrointestinal (Bitar & Makhoul, 1982) y que éste era liberado por las neuronas entéricas (Bitar *et al.*, 1980).

En diversas regiones del tracto gastrointestinal el VIP contribuye a la relajación muscular pero en otras su contribución es mínima.

Otro péptido de la familia del VIP, el PACAP, relaja el músculo liso gastrointestinal y se encuentra en neuronas entéricas. Se ha demostrado que tiene un papel importante en la relajación NANC en el colon humano (Schworer *et al.*, 1993), de rata (Pluja *et al.*, 2000) y en el esfínter esofágico inferior porcino (Farre *et al.*, 2006).

Receptores y vía intracelular.

Se han propuesto tres receptores para VIP y PACAP. Éstos han sido identificados y caracterizados según su afinidad por los diferentes péptidos de la familia del VIP. Los receptores VPAC₁ y VPAC₂ se unen al VIP y al PACAP con la misma afinidad que el tercer receptor descrito, el PAC₁, se une preferencialmente al PACAP en el tracto gastrointestinal.

Todos ellos están unidos a proteína G, que activa la adenilato ciclasa y produce, por tanto, un incremento del AMP cíclico, y éste activa a su vez una proteinkinasa, la PKA, que lleva a cabo una serie de fosforilaciones que desencadenan la relajación del músculo liso (Harmar *et al.*, 1998).

3.2.4. Neurotransmisión excitatoria.

Acetilcolina.

Numerosos estudios tanto funcionales como inmunohistoquímicos han puesto de manifiesto que la acetilcolina (ACh) se libera por parte de motoneuronas excitatorias produciendo contracción del músculo liso colónico (Caulfield *et al.*, 1993; Porter *et al.*, 2002). Además es un hecho bastante aceptado que es el neurotransmisor excitatorio predominante en el tracto digestivo (Bennett & Stockley, 1975; Sanger *et al.*, 2013).

Se ha demostrado mediante estudios farmacológicos y funcionales en diferentes especies, que la ACh a través receptores muscarínicos tiene un efecto contráctil sobre el músculo liso del tracto gastrointestinal. Se ha demostrado su papel no sólo en la neurtransmisión entérica sino en la secreción y control del reflejo vascular y en la inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores. Su presencia se ha demostrado en diferentes subtipos de células, tanto en el músculo intestinal y colónico como en el epitelio mucoso (Eglen *et al.*, 2001).

Receptores y vía intracelular.

La acetilcolintransferasa (ChAT) el enzima de síntesis de la ACh, en presencia de sus dos precursores acetilcoenzima A y colina. Esto hace que la ChAT sea el punto de control de los niveles de ACh.

Aunque todos los receptores colinérgicos por definición, responden a la acetilcolina, pueden igualmente unirse a otros ligandos. De esta manera destacan dos grandes grupos:

- Receptor nicotínico (*nAChR*, llamado también *receptor de acetilcolina ionotrópico*), al que se une la nicotina.
- Receptor muscarínico (*mAChR*, llamado también *receptor de acetilcolina metabotrópico*), y presenta especificidad por la muscarina.

Estudios de biología molecular han demostrado que los receptores muscarínicos y nicotínicos pertenecen a una superfamilia distinta de proteínas.

Los nAChR, son principalmente recptores presinápticos que están localizados en la región somatodendrítica de las interneuronas y las motoneuronas donde median la

excitación de las mismas (Kunze & Furness, 1999; Torocsik *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 al bloqueador neural tetrodotoxina TTX (MacDermott *et al.*, 1999; McGehee & Role, 1995; Wonnacott, 1997). La estimulación de los receptores nACh de las motoneuronas inhibitorias provoca una intensa activación de las mismas y la liberación de neurotransmisores inhibitorios en el esfínter esofágico inferior y colon sigma humano y en el esfínter anal interno, parcialmente bloqueada por TTX, lo que sugiere la presencia de receptores para nicotina en el soma y terminaciones nerviosas de MNEs (Auli *et al.*, 2008; Opazo *et al.*, 2011; Lecea *et al.*, 2009). Por el contrario, la estimulación de los receptores nicotínicos en las motoneuronas excitadoras provoca una estimulación mucho más débil de las mismas con una escasa liberación de neurotransmisores excitatorios (Lecea *et al.*, 2009).

Los mAChR son receptores acoplados a proteínas G y pueden activar a otros canales iónicos por medio de una cascada mediada por un segundo mensajeros. Los receptores muscarínicos se clasifican en 4 subtipos, M₁, M₂, M₃ y M₄, cada uno de ellos corresponden con sus 4 genes precursores (m1, m2, m3 y m4) (Hulme, 1990; Eglén *et al.*, 1996). Los receptores muscarínicos se encuentran ampliamente distribuidos y juegan un papel importante en la regulación fisiológica de diversos órganos periféricos, entre ellos el intestino y colon humano. En términos generales, el receptor M₂ comporta el 70-80% de la población total de receptores, mientras que el receptor M₃ representa el 20-30% (Eglén *et al.*, 2001). Pese a ello, muchos de los estudios

publicados apuntan a que son los receptores M_3 son los principales responsables de la contracción con una contribución menor de los receptores M_2 . Recientemente se ha publicado un estudio, en el colon humano, donde se identifica mayor densidad de M_2R y M_3R en capa muscular, y M_1R en ganglios del plexo mientérico y submucosa. Aunque también se ha descrito la presencia de M_3R en la población de motoneuronas del plexo mientérico(Harrington *et al.*, 2010a;Harrington *et al.*, 2010b).

Taquiquininas.

Las taquiquininas son un grupo de péptidos que tienen en común una secuencia pentapeptídica como C-terminal. Dentro del conjunto de taquiquininas, tanto en el ser humano como en el resto de mamíferos, son considerados como neurotransmisores, sustancia P, la neuroquinina (NK) A y B. Las taquiquininas actúan como neurotransmisores excitatorios, en diversas áreas del tracto gastrointestinal, incluyendo tanto el intestino delgado como el colon, afectando a todas las capas. Además, se les atribuye la mediación de la transmisión sináptica y la modulación excitatoria neuronal en el sistema nervioso entérico, causando la secreción de fluidos y electrolitos en la mucosa intestinal, gestionan el flujo sanguíneo arterial y venoso del tracto gastrointestinal e incrementa la permeabilidad vascular.

Receptores y vía intracelular.

La acción de las taquiquininas está mediada por receptores específicos. Estos receptores forman parte una familia de receptores transmembrana ligados a proteína G.

Tres de los diferentes tipos de receptores para neurokinina han sido caracterizados y ampliamente estudiados, estos son los subtipos NK₁, con más afinidad para sustancia P, NK₂, con más afinidad para NKA y NK₃, que muestran una mayor afinidad para NKB.

Dos subtipos de receptor NK₁ han sido identificados en diferentes especies (NK-1r en rata y NK-1h en humanos). Dos subtipos de NK₂ (NK_{2A} y NK_{2B}), NK_{2A} ha sido identificado en humanos, ratas y cobayas, mientras que NK_{2B} no ha sido encontrado en humanos.

También 2 son los subtipos para el receptor NK3 (NK_{3GP} y NK_{3R}).

Se ha encontrado expresión tanto de sustancia P como de NKA en diferentes áreas del colon humano, incluyendo diversas poblaciones neuronales. También se ha demostrado que tanto el receptor NK₁ como NK₂, participan en la neurotransmisión excitatoria, tanto en intestino delgado como en colon sigma (Cao *et al.*, 2000). Además se ha descrito que la NKA es el principal neurotransmisor taquiquinérgico excitatorio en el colon humano, actuando fundamentalmente a través de receptores NK_{2A} (Cao *et al.*, 2000; Auli *et al.*, 2008).

Liberación de neurotransmisores excitatorios-inhibitorios *in Vitro*.

En un estudio publicado por nuestro grupo de investigación se pudo observar cómo en muestras de colon humano, *In Vitro*, la latencia de las contracciones inducidas por campo eléctrico se origina por la estimulación de MNEs inhibitorias, que liberan NO y ATP o una purina relacionada, actuando a nivel de los receptores P2Y₁. Mientras que la amplitud de las contracciones inducidas por EFS se deberían a la estimulación de MNEs liberadoras de ACh y taquiquininas que actúan sobre receptores muscarínicos y NK₂ respectivamente (Auli *et al.*, 2008). Este estudio también muestra como las MNEs inhibitorias pueden ser estimuladas no sólo eléctricamente sino también de forma farmacológica utilizando nicotina que activaría no sólo los receptores nicotínicos

somatodendríticos sino también los receptores axonales, inhibiendo la actividad motora espontánea (Auli *et al.*, 2008).

A modo de resumen esquemático, en la siguiente figura se muestran los elementos que intervienen en la transmisión neuro-muscular (motoneuronas inhibitorias y excitatorias) en el colon humano (figura 7).

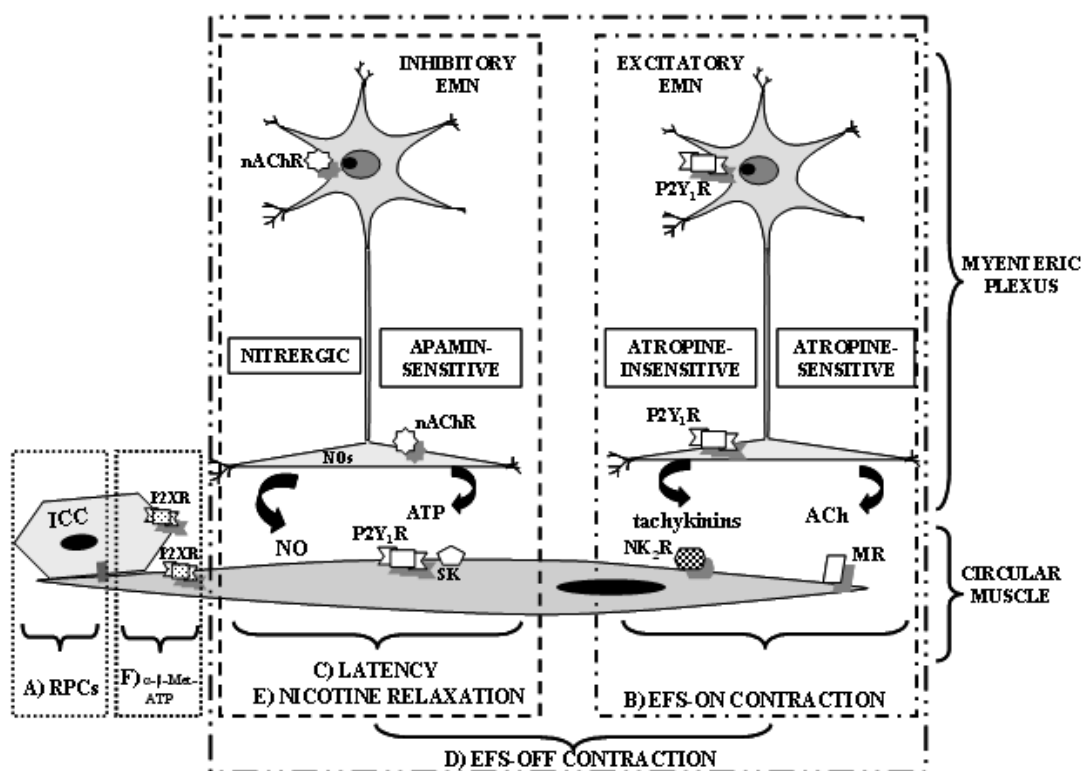


Figura 7. Esquema representativo de la transmisión neuromuscular *In Vitro* del colon sigma humano las contracciones en ON inducidas por EFS están originadas por la estimulación de MNEs excitatorias causando la liberación de acetilcolina (ACh) que actúa sobre receptores muscarínicos musculares y taquiquininas que actúan sobre receptores NK₂. Los receptores presinápticos P2Y₁ podrían modular la neurotransmisión excitatoria. C) La latencia de las contracciones OFF está mediada por la estimulación de MNEs inhibitorias que liberan NO y por ATP o una purina que actúa sobre los receptores P2Y₁, en parte, a través de canales sensibles a apamina, la amplitud de las contracciones tipo OFF se encuentra también mediada por la estimulación de MNEs excitatorias (D); E) Las MNEs Inhibitorias pueden ser estimuladas selectivamente por receptores nicotínicos localizados tanto en el soma como en los terminales neurales de éstas. Reproducido de (Auli *et al.*, 2008).

4. Enfermedad diverticular.

4.1. Definición de divertículo y epidemiología.

La enfermedad diverticular colónica consiste en la presencia de saculaciones o herniaciones sacciformes de la mucosa y la submucosa a través de la muscular propia, en zonas en las que vasos sanguíneos atraviesan la capa muscular de la pared del colon.

La enfermedad diverticular es la enfermedad colónica más frecuente en los países occidentales. Se ha descrito también que hay diversos factores que predisponen o son factores de riesgo de esta enfermedad como son la edad ya que su incidencia aumenta con la edad y su prevalencia se sitúa en torno al 50% en personas mayores de 70 años. Es raro que se de en personas menores de 30 años. Después de los 40 años de edad su incidencia incrementa y llega a ser del 40% a la edad de 60 años y hasta de un 60% de las personas de 80 años padecen esta enfermedad. Se ha descrito también una prevalencia superior en hombres que en mujeres con un ratio de entre 2:3 a 3:1, se ha descrito además que los pacientes con diverticulitis o enfermedad sintomática por debajo de 65 años suelen ser hombres y que estos presentan una mayor incidencia de sangrado diverticular (McConnell *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2010). No parece existir un patrón hereditario en la, aunque está incrementando la incidencia en pacientes más jóvenes, siendo en estos casos más extensa y agresiva (Colecchia *et al.*, 2003; Stollman & Raskin, 2004).

La obesidad es también un factor de riesgo, ya que hay varios estudios que asocian esta enfermedad sobretudo en pacientes jóvenes con un índice de masa corporal elevado (Strate *et al.*, 2009). Otros factores de riesgo son el tabaquismo, el

sedentarismo, el consumo de cafeína o un gran consumo de proteínas en la dieta o de antiinflamatorios no esteroideos (Hall *et al.*, 2010).

Los divertículos se observan con mayor frecuencia en el colon sigmoideo y descendente, y son menos habituales en el colon derecho hasta tal punto que se ha propuesto que la presencia de divertículos en el colon derecho podría considerarse otra enfermedad (Figura 7). La enfermedad diverticular ocasiona inicialmente síntomas clínicos recurrentes entre el 10 y el 25% de los pacientes, presentando la mayoría de ellos dolor abdominal y alteraciones del ritmo deposicional. Su evolución puede dar lugar a complicaciones severas como se describirá posteriormente. Aproximadamente el 2% de los pacientes con enfermedad diverticular requieren hospitalización y el 0,5% intervención quirúrgica (Colecchia *et al.*, 2003;Humes *et al.*, 2011b). Esto supone un importante gasto sanitario para una enfermedad en la que no existe tratamiento específico, ni prevención eficaz y además la mortalidad y morbilidad asociada a las complicaciones graves es elevada (Morris *et al.*, 2003;Etzioni *et al.*, 2009).

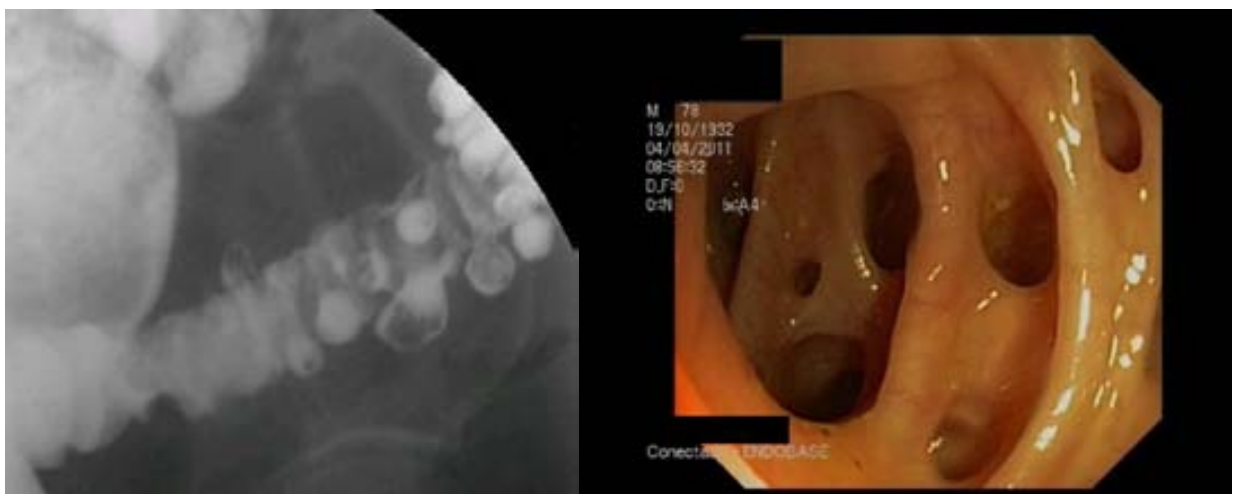


Figura 8. Imagen que muestra Enema opaco, en el que se puede apreciar área de colon sigmoideo con múltiples formaciones diverticulares, a la derecha la imagen endoluminal correspondiente a la eboscopia de este segmento de colon.

4.2. Etiología y Fisiopatología.

Como se ha comentado previamente el origen de la enfermedad diverticular se desconoce y probablemente se debe a una interacción entre varios factores, el factor más comúnmente aceptado es una falta de fibra en la dieta. La baja incidencia de divertículos en países en vías de desarrollo ha hecho pensar que esta enfermedad guarda relación con la dieta occidental, muy refinada y pobre en fibra o residuos. Se ha propuesto que este tipo de dieta da origen a una masa fecal disminuida, a un estrechamiento del colon y a un incremento de la presión intraluminal causada por contracciones intestinales más intensas con objeto de movilizar la masa fecal más pequeña. Sin embargo, todavía no se ha determinado el papel que desempeña la cantidad de fibra de la dieta en el desarrollo y el tratamiento de la enfermedad diverticular ya que hay datos controvertidos sobre este tema, hay estudios que defienden una mejoría de los pacientes con enfermedad diverticular después de un incremento de fibra en la dieta mientras que en otros estudios no se observa ninguna mejoría (Commane *et al.*, 2009;Kiguli-Malwadde & Kasozi, 2002;Calder, 1979;Heise, 2008;Humes *et al.*, 2007).

También se ha asociado la aparición de los divertículos a otros factores como un trastorno motor “espástico” poco conocido localizado en los segmentos afectados (principalmente sigma y colon izquierdo) que ocasiona un incremento en la presión intracolónica, especialmente en el sigma, con menor diámetro que el resto del colon, y una menor compliancia (Ford *et al.*, 1995). Estudios de manometría han demostrado una mayor presión intraluminal o una mayor espasticidad en pacientes con diverticulosis, respecto a controles, e incluso una mayor presión en diverticulosis

sintomática respecto a asintomática (Trotman & Misiewicz, 1988; Bassotti *et al.*, 2001; Shafik *et al.*, 2004).

Del mismo modo se ha correlacionado con la formación de divertículos la presencia de cambios estructurales que debilitarían la pared colónica favoreciendo su formación. Se ha demostrado un que se producen cambios en los de colágeno y depósito de elastina, de forma fisiológica en el envejecimiento, lo que respaldaría su incremento de incidencia con la edad (Mimura *et al.*, 2004). Esta teoría se ve respaldada por el hecho de que enfermedades que afectan al tejido conectivo como el síndrome de Marfan o el síndrome Ehlers-Danlos se han relacionado con la enfermedad diverticular en pacientes jóvenes (Sheth *et al.*, 2008). A parte de estas alteraciones estructurales en la tabla 1 se sumarizan algunas de las alteraciones que se han descrito en estos pacientes que podrían ser tanto causa como efecto de la enfermedad.

Otros factores que se han relacionado también con el desarrollo de la enfermedad diverticular son cambios en la flora intestinal que inducirían fenómenos de inflamación leve que podrían (Petruzzello *et al.*, 2006; Bassotti *et al.*, 2003; Eastwood, 2003). Aunque como se ha comentado previamente seguramente la aparición de esta enfermedad se debe a la combinación de estos factores.

Referencia	Tipo de muestra	ICCs	Cels. gliales	Motoneurona entérica
(Vuong <i>et al.</i> , 1985)	E. Diverticular no complicada. (Tinción argéntica) n=15	No alteradas	—	No alteradas
(Bassotti <i>et al.</i> , 2005a)	E. Diverticular complicada. n=37 (n=4, diverticulitis aguda)	Disminuidas	No alteradas	No alteradas
(Iwase <i>et al.</i> , 2005)	E. Diverticular complicada (n=14, diverticulitis aguda) Diverticulosis n=12.	—	—	Disminuidas
(Wedel <i>et al.</i> , 2010)	E. Diverticular complicada. n=27	—	Disminuidas (Aumento índice glia/neurona)	Disminuidas
Otras alteraciones				
(Whiteway & Morson, 1985)	E. Diverticular no complicada n=25	Ausencia de hipertrofia o hiperplasia. Importante elastosis en capa longitudinal.		
(Mimura <i>et al.</i> , 2004)	E. Diverticular no complicada (n=6) Diverticulitis (n=5)	Aumento de fibras de colágeno en muscular propia de pacientes con diverticulosis. Mayor depósito de colágeno en diverticulitis respecto a diverticulosis no complicada.		
(Golder <i>et al.</i> , 2003)	E. Diverticular no complicada. (n=10, diverticulosis sintomática)	Pérdida de motoneuronas colinérgicas en capa muscular.		
(Golder <i>et al.</i> , 2007)	E. Diverticular no complicada n=25	Ausencia de hipertrofia o hiperplasia. Importante elastosis en capa longitudinal.		

Tabla 1. Resumen de los principales cambios histológicos descritos en diverticulosis y enfermedad diverticular. ICCs: Células intersticiales de Cajal.

Estudios in Vitro.

Diversos estudios in Vitro, valorando motilidad o contractilidad in Vitro, han tratado de profundizar en el conocimiento de la etiología de esta enfermedad, algunos de ellos han descrito hallazgos contradictorios.

Respecto a la transmisión neuro-neuromuscular excitatoria (vía colinérgica y taquiquinérgica), diversos estudios llevados a cabo in Vitro han descrito alteraciones en la vía colinérgica como un incremento de actividad no propulsiva sino espástica en respuesta a la administración de ACh (Huizinga *et al.*, 1999; Huizinga, 1986).

En estudios recientes llevados a cabo en pacientes con enfermedad diverticular no complicada se ha descrito una reducción de acetilcolintransferasa (ChAT). Esta disminución de síntesis y liberación tiene como consecuencia un incremento en los receptores M₃ debido a una up-regulación y a un aumento de la sensibilidad para ACh exógena (Golder *et al.*, 2003). Esta mayor sensibilidad a acetilcolina exógena, así como después de la administración de acetilcolinesterasa con incremento en la concentración de ACh postsináptica (Sugihara *et al.*, 1983), se traduciría una mayor espasticidad, especialmente en fase postprandial respecto a controles.

También se ha observado un incremento de las respuestas colinérgicas en respuesta a campo eléctrico en muestras procedentes de estos pacientes (Tomita *et al.*, 1999). En la misma línea Maselli y colaboradores observaron que tanto el estiramiento activo (inducido por campo eléctrico) o pasivo (tono) superior en pacientes con enfermedad diverticular. Las respuestas inducidas por campo eléctrico fueron inhibidas por la combinación de antagonistas colinérgicos y taquiquinérgicos por lo que concluyen que podrían verse ambas vías incrementadas (Maselli *et al.*, 2004).

Otros estudios como el de Liu y colaboradores (Liu *et al.*, 2002) han estudiado sólo la contracción inducida por la adición exógena de agonistas colinérgicos y taquiquinérgicos, mientras el efecto de la acetilcolina no presentó diferencias significativas en pacientes con diverticulosis respecto a los controles, la Sustancia P tuvo un efecto menor en pacientes con enfermedad diverticular, estos datos concuerdan con los obtenidos por Burcher y colaboradores (Burcher *et al.*, 2008) que observaron cambios en la respuesta a agonistas taquiquinérgicos, en este caso vieron un efecto menor en respuesta NKA, mientras que no observaron diferencias respecto a la adición exógena de sustancia P. Este agonista tuvo un efecto contráctil menor que no es debido a una menor presencia de receptores taquiquinérgicos, ya que ni su expresión, ni su funcionalidad se vio afectada respecto a pacientes control.

Recientemente se ha descrito una disminución de los precursores de síntesis de los receptores NK₂ en pacientes con enfermedad diverticular complicada que podría explicar la menor respuesta a agonistas taquiquinérgicos observada en los estudios anteriores (Liu *et al.*, 2011).

Transmisión neuro-muscular inhibitoria (Vía nitrérgica).

Respecto a esta vía se ha observado en pacientes con enfermedad diverticular una disminución de respuestas nitrérgicas en respuesta a campo eléctrico junto con un incremento de las respuestas colinérgicas (Tomita *et al.*, 2000).

Además se ha podido observar una disminución la presencia del enzima de síntesis nNOS (NOS1) y una menor sensibilidad en respuesta a sodio nitroprusiato (un donador de NO) por parte de la capa muscular longitudinal en estos pacientes (Golder *et al.*, 2007).

También se ha descrito en estos pacientes un incremento de péptidos intestinales como el VIP, que podría explicar algunas de las alteraciones motoras y de sustancia P que podría estar relacionado con la nocicepción (Tomita *et al.*, 1993).

Cambios en la modulación Pre-sináptica (receptores cannabinoides y serotoninérgicos):

A diferencia de estudios anteriores, Guagnini y colaboradores (Guagnini *et al.*, 2006) observaron que en pacientes con enfermedad diverticular las respuestas a campo eléctrico eran iguales que en pacientes control. De hecho, observaron una respuesta contráctil menor ya un 30% de las muestras de pacientes fueron descartadas por falta de respuesta. Además de esta discrepancia respecto a estudios anteriores observaron un incremento de ligandos para el receptor cannabinoide CB₁ (Anandamida) con lo que se producía una desensibilización de este receptor que ejerce una acción inhibitoria sobre la vía colinérgica (Aviello *et al.*, 2008) con lo cual, la desensibilización de este mecanismo se traduciría en una mayor espasticidad.

Recientemente se ha descrito una disminución de receptores serotoninérgicos 5HT₄ en las capas musculares de estos pacientes, los receptores 5HT₄ tienen un efecto facilitador de la liberación de ACh (Gershon & Tack, 2007) y este cambio se interpreta como un mecanismo compensatorio al incremento de receptores M₃ descrito por otros estudios.

Hay que tomar en cuenta que algunos de los estudios anteriores están llevados a cabo en pacientes que han experimentado, al menos, dos episodios de inflamación aguda o diverticulitis y esta inflamación, esta inflamación podría, per se, provocar cambios. Es por ello que muchos autores hacen referencia al estadio en que se encuentran los

pacientes para establecer en que punto de la progresión de la enfermedad se encuentran los pacientes incluidos en el estudio.

4.3.1. Estadios de la enfermedad diverticular.

Actualmente está aceptado por la mayoría de los autores que esta enfermedad sigue una progresión con diferentes estadios, la clasificación más extendida propone tres estadios: pacientes con diverticulosis (pacientes con divertículos que no presentan sintomatología), y pacientes sintomáticos, subdividiendo a estos últimos en enfermedad diverticular complicada y no complicada (Figura 9).

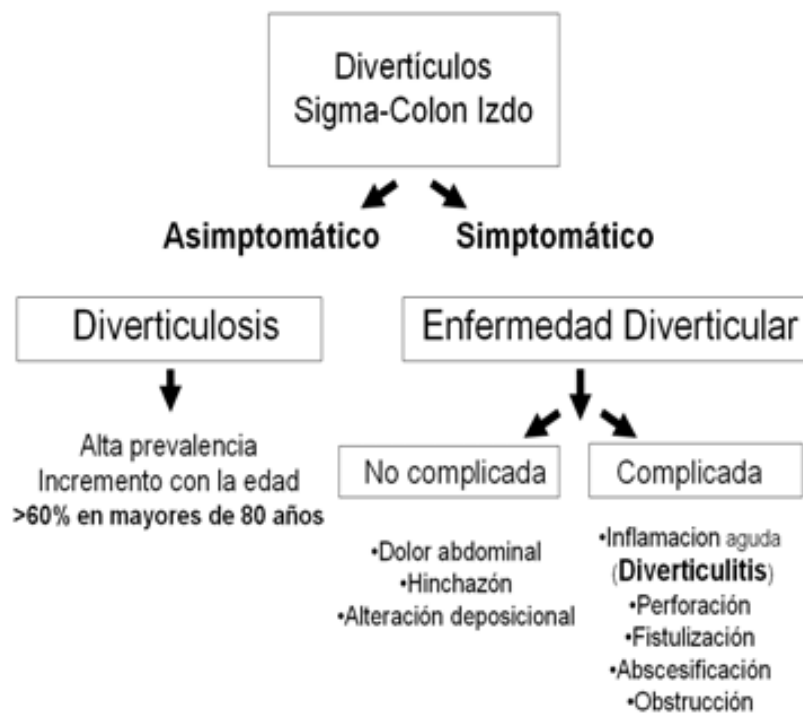


Figura 9. Esquema de los estadios de la enfermedad diverticular. Modificado de Humes et al 2011, Colonic diverticular disease. Clinical evidence (Humes et al., 2011a).

La enfermedad diverticular no complicada es aquella que se caracteriza por la presencia de diversos síntomas como el dolor abdominal, la hinchazón o el estreñimiento entre otros. Este estadio pasaría a denominarse enfermedad

diverticular complicada cuando hay un episodio de inflamación aguda o diverticulitis, abscesos, fístulas, obstrucción intestinal o hemorragia diverticular.

4.3.2. Diverticulosis (presencia de divertículos asintomática).

La mayoría de pacientes, aproximadamente un 80%, aunque es difícil aproximar la incidencia real, permanecerán asintomáticos durante su vida. Siendo el diagnóstico de diverticulosis en muchos casos un hallazgo casual, como resultado de una colonoscopia de cribado de cáncer de colon y recto. En estos casos no se lleva a cabo tratamiento ni se realiza seguimiento. En este punto se ha postulado si una dieta rica en fibra podría mejorar el pronóstico de la enfermedad y durante mucho tiempo han aparecido estudios en un sentido y en otro, destacando un amplio estudio de la *American Dietary Association* que incluye este consejo en su guía de práctica clínica con un alto nivel de evidencia (Aldoori *et al.*, 1998; Marlett *et al.*, 2002).

4.3.3. Enfermedad diverticular no complicada.

Cuando los pacientes con diverticulosis pasan a tener síntomas como, dolor abdominal inespecífico, habitualmente lateralizado a la izquierda, hinchazón o alteraciones en el ritmo deposicional, sin la presencia clínica de inflamación aguda, pasamos a hablar de enfermedad diverticular no complicada. Se ha descrito que, en estos pacientes, el dolor se exacerba con las comidas y puede disminuir con las deposiciones. Estos pacientes pueden experimentar cierto estreñimiento y flatulencias. La exploración física suele ser anodina o presentar dolor en fosa ilíaca izquierda sin signos de irritación peritoneal. Los estudios de laboratorio pueden ser normales o presentar discreta leucocitosis (Stollman & Raskin, 2004).

4.3.4. Enfermedad diverticular complicada.

Cuando estos pacientes presentan complicaciones, siendo la más frecuente, la inflamación aguda, denominada diverticulitis pasamos a hablar de enfermedad diverticular complicada. A continuación se detallan las diferentes complicaciones de este estadio.

Diverticulitis aguda.

Es la complicación más frecuente en estos pacientes, es una inflamación aguda que se puede producir en el interior del saco diverticular o alrededor del mismo. La causa es probablemente mecánica, y se relaciona con la retención de residuos alimentarios no digeridos y bacterias en el interior del divertículo, formando una masa dura denominada fecalito. Este fecalito afecta a la irrigación sanguínea de la fina pared del saco diverticular (constituida únicamente por mucosa y serosa), facilitando su invasión por las bacterias del colon. El proceso inflamatorio puede variar en gravedad, desde un pequeño absceso intramural (Figura 10), a una peritonitis fecaloidea generalizada.

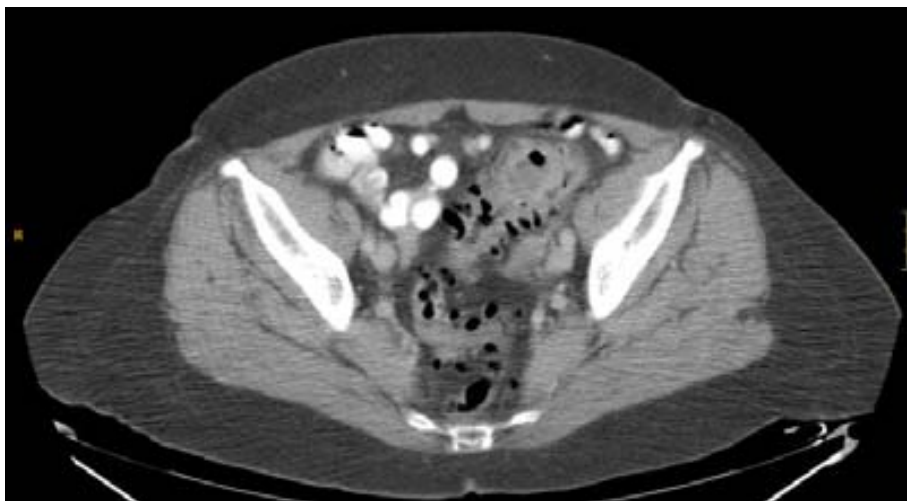


Figura 10. Imagen que muestra una tomografía computerizada abdominal, diverticulitis aguda en región de sigma proximal, nótese la presencia de múltiples formaciones sacciformes a lo largo de la totalidad del colon sigmoideo.

La diverticulitis se produce con mayor frecuencia en los hombres que en las mujeres. En la mayoría de casos se da sobre el tramo final del colon izquierdo y el sigma, hecho que sugiere que la diverticulosis puede relacionarse con el aumento de la presión intraluminal y con la mayor consistencia del material fecal en esta zona del colon.

Con frecuencia en los pacientes que han sufrido episodios de diverticulitis, debido a la pericolicitis inflamatoria reiterada se puede establecer una estenosis fibrosa que se puede acompañar de obstrucción cólonica (Stollman & Raskin, 2004).

Hemorragia diverticular.

La hemorragia de origen diverticular es una de las causas más frecuente de hemorragia digestiva baja, junto con otras como las ectasias vasculares, colitis o neoplasias, supone hasta un 40% de las mismas.

Estudios con microangiografía de fragmentos de sigma resecados por sangrado diverticular muestran aumento de espesor de la capa íntima y adelgazamiento de la capa media de la vasa recta a su paso por la cúpula de los divertículos, siendo estos defectos asimétricos a lo largo de las arterias del sigma. Los factores que conllevan estos cambios son desconocidos aunque parece ser que la inflamación no es un factor que predisponga al sangrado, siendo este inusual en la diverticulitis (Stollman & Raskin, 2004). La relación del uso de antiinflamatorios no esteroideos ha sido estudiada atribuyendo a éstos una relación similar a la que muestran el sangrado de la úlcera duodenal (Aldoori *et al.*, 1998).

La presencia de sangrado diverticular se puede presentar en forma de hemorragia con sangre fresca, hematoquecia o incluso melenas. La hemorragia cede de forma espontánea en el 75% de los casos, siendo la probabilidad de nueva hemorragia del 22 al 38%. Cuando un segundo episodio de sangrado acontece algunos autores

recomiendan pasar a la resección quirúrgica (Stollman & Raskin, 2004; Wong *et al.*, 2000).

4.4. Complicaciones y tratamiento.

El fundamento actual del tratamiento de esta enfermedad se basa en paliar sus síntomas y complicaciones. No se dispone de ni de un tratamiento específico de esta enfermedad ni de un tratamiento efectivo para las alteraciones motoras asociadas ni se conoce de ninguna estrategia farmacológica que impida su desarrollo.

Diverticulosis.

En presencia de diverticulosis no se recomienda ningún tipo de tratamiento, si bien basándose en la patogenia de esta enfermedad, una dieta rica en fibra es recomendable para reducir el tiempo de tránsito y reducir la presión intraluminal (Commane *et al.*, 2009).

Enfermedad diverticular no complicada.

Por lo que al tratamiento se refiere, en estos pacientes con diverticulosis sintomática no complicada, un régimen dietético rico en fibra que parece presentar beneficios considerables y reduce la sintomatología. Aunque estudios recientes apuntan que el incremento de fibra puede no mejorar el estreñimiento habitual de estos pacientes y si incrementar o exacerbar los episodios de dolor y gases (Smith *et al.*, 2011) y su uso es controvertido (Marlett *et al.*, 2002).

El incremento en la motilidad observado en este grupo de pacientes parece justificar el uso de anticolinérgicos y agentes espasmolítico, si bien no existe amplia evidencia al respecto (Morris *et al.*, 2003). Como se ha comentado en el apartado anterior antibióticos no absorbibles pueden mejorar la sintomatología en tanto que reducen el

sobrecrecimiento bacteriano y por tanto el aumento de presión intraluminal por la formación secundaria de gas. Incluso se ha observado una disminución en el peso medio de las heces debido a una menor degradación de la fibra ingerida (D'Inca *et al.*, 2007; Bianchi *et al.*, 2011). A este respecto Rifaximina ha demostrado ser el agente con más estudiado y con mejor efectividad durante ciclos largos de tratamiento acompañado de fibra soluble (Papi *et al.*, 2005).

Otra posible opción de tratamiento es el uso de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium spp*), su efecto incluye la producción de agentes antimicrobianos y inhibición de la translocación de patógenos. El uso de prebióticos, aunque poco estudiados, parece mejorar la sintomatología en estos pacientes (Festi & Colecchia, 2009).

Respecto al uso de inmunomoduladores locales, el tratamiento con Mesalazina, con capacidad antiinflamatoria, ha demostrado utilidad en el control de la fase aguda de la diverticulitis y en la prevención de recurrencias en tandas cortas de tratamiento (Gatta *et al.*, 2010; Tursi *et al.*, 2006). Cabe destacar el estudio de llevado a cabo por Morris y colaboradores, estudio caso control que demuestra que los antagonistas de canales de calcio como la Nifedipina previenen la perforación en pacientes con enfermedad diverticular, dado su efecto sobre la relajación de la musculatura lisa intestinal y el aumento de flujo sanguíneo a nivel de la mucosa que protege contra la inmunosupresión secundaria a cambios inflamatorios, mientras los antagonistas muscarínicos, con efecto sobre la reducción del tono y disminución del incremento sobre la actividad contráctil postprandial, no tiene efecto protector en la diverticulitis aguda perforada (Morris *et al.*, 2003).

Después de diversas discusiones y revisiones de las guías de práctica clínica todavía no existe un consenso claro sobre cómo manejar el dolor y la clínica abdominal que refieren estos pacientes, así como, no existe una posición clara sobre cuando y como hacer uso de fármacos espasmolíticos. (Stollman & Raskin, 2004; Wong *et al.*, 2000) .

Enfermedad diverticular complicada.

Respecto al **tratamiento de la diverticulitis**, la primera decisión que se debe tomar ante una diverticulitis aguda es la necesidad de ingreso, si estamos ante una diverticulitis aguda complicada o moderadamente grave o si el paciente presenta una diverticulitis leve que con tratamiento antibiótico, con actividad frente a anaerobios y Gram negativos, durante una semana puede resolverse. La exploración clínica dirigida, pruebas de laboratorio y el estado general del paciente y la posibilidad de mantener tolerancia oral adecuada nos ayudaran a tomar una decisión.

La prueba de imagen principal es la tomografía computerizada que alcanza una sensibilidad prácticamente del 100% precisión casi total si se realiza con enema de bario y podría objetivar fácilmente la presencia de abscesos o fístulas. La mejoría clínica se suele dar en 2 días, precisando de un seguimiento y la realización de endoscopia para descartar otros diagnósticos, sobretodo el cáncer de colon. Una de las clasificaciones del grado de peritonitis diverticular más frecuentemente utilizada es la establecida por Hinchey en cuatro grados; flemón-absceso pericólico o mesentérico, absceso pélvico, peritonitis generalizada purulenta y peritonitis generalizada fecal.

Los casos de diverticultis aguda que precisen ingreso se beneficiaran de una dieta absoluta, tratamiento antibiótico, reintroduciendo la dieta oral progresiva según la gravedad del cuadro y su evolución. La no mejoría clínica del tratamiento conservador descrito, implicará la búsqueda de complicaciones o de posibles diagnósticos

alternativos al inicial, teniendo en cuenta que entre el 15 y el 30% necesitaran de tratamiento quirúrgico para tratar una complicación secundaria durante la fase aguda. Una de las principales cuestiones a resolver a este nivel es la necesidad de llevar a cabo de una cirugía exéretica profiláctica. La posibilidad de recurrencia sintomática después de un episodio de diverticulitis aguda se sitúa entre el 7 y el 45%, siendo una tercera recurrencia más probable, con datos de la *America Society of Colon and Rectal Surgeons*, algunos autores postulan que un segundo episodio resuelto satisfactoriamente de forma conservadora hacen al paciente candidato de cirugía electiva, teniendo en cuenta la relación entre riesgo y beneficio para cada caso en particular y las ventajas que la cirugía laparoscópica aporta. (Stollman & Raskin, 2004; Wong *et al.*, 2000).

En la práctica clínica habitual no existe un consenso claro al respecto y depende del estado general del paciente y sus características basales así como el grado de peritonitis. En muchos casos el coste de una intervención de Hartmann ha llevado a muchos grupos a plantear opciones que van desde el tratamiento conservador, la resección del segmento de sigma afectado con anastomosis primaria (con o sin ileostomía de protección) o el lavado peritoneal.

Al respecto una postura coherente parece ser la de primar el estado general del paciente y no el grado de peritonitis a la hora de decidir un tipo de cirugía o otra, así Mueller y colegas consideran que una anastomosis con ileostomía de protección como una opción factible y segura en muchos casos (Kreis *et al.*, 2012) Por otro lado atendiendo a la menor agresividad de la cirugía laparoscópica se contempla la posibilidad de realizar lavado peritoneal y drenaje de colecciones (O'Sullivan *et al.*, 1996), en la actualidad este manejo está siendo reconsiderado y utilizado por muchos

grupos, demostrando eficacia y seguridad en casos de diverticulitis purulentas perforadas. Actualmente existe un estudio randomizado en pacientes Hinchey III donde se aleatoriza lavado peritoneal y resección (Thornell *et al.*, 2011; Daniels *et al.*, 2012).

Queda claramente demostrado y refuerza el potencial uso de las terapias antes descritas, que el uso de antiinflamatorios no esteroideos producen un deterioro en la perfusión y alteración en los mecanismos de defensa locales que inducen actividad inflamatoria y en consecuencia aumento de presión intraluminal, colonización bacteriana y la aparición de complicaciones (Davies, 1995).

5. Diverticulosis y posible relación con el síndrome de intestino irritable (SII).

Hay diversos estudios que argumentan que el Síndrome de intestino irritable (SII), que existen ciertas similitudes entre la sintomatología que nos pueden hacer recordar a la descrita por los pacientes con diverticulosis, haciendo referencia a la hipersensibilidad visceral y al aumento de la percepción en la distensión colónica, especialmente en colon izquierdo. Es por ello, que resulta interesante buscar una relación o un sustrato causal común para ambas enfermedades.

En un artículo reciente, con fuerte componente epidemiológico y sintomático, han demostrado una mayor probabilidad de diverticulosis en los pacientes con SII, especialmente en los subgrupos con SII mixto y con predominio de diarrea. Mientras que no se ha demostrado una mayor predisposición a presentar diverticulitis entre el grupo de pacientes con SII. Por otro lado Jung y colaboradores pone en duda la creencia de que la presencia de diverticulosis comporta enlentecimiento del tránsito

intestinal y por lo tanto estreñimiento (Humes *et al.*, 2011a;Spiller, 2012;Spiller *et al.*, 2010;Jung *et al.*, 2010).

La simple presencia de divertículos comporta cierto grado de inflamación local y en algunos casos hasta una colitis crónica de bajo grado que se ha podido demostrar mediante biopsias (Floch, 2006), sin que esto deba comportar una diverticulitis clínica como tal. Se han descrito alteraciones en la densidad de receptores TRPV1, de las neuronas entéricas, en los nervios sensitivos asociados a la enfermedad inflamatoria intestinal (Yiangou *et al.*, 2001) y se ha sugerido que en los pacientes con diverticulosis podría haber daños axonales similares a los que se dan en la enfermedad inflamatoria intestinal (Brewer *et al.*, 1990). Diferentes estudios postulan que hasta la mitad de los pacientes con SII, al igual que Enfermedad diverticular, presentan una sensibilidad visceral aumentada que se traduce en una disminución en el umbral de la percepción a la distensión rectal, zona con carencia de divertículos y a la percepción de las contracciones colónicas como dolorosas, respecto a personas sin SII o divertículos (Humes *et al.*, 2008;Simpson, 2012;Spiller, 2012).

La presencia y depósito de restos fecales en el interior de los divertículos comporta la presencia de esta inflamación crónica con la consiguiente sensibilización de neuronas aferentes primarias de la submucosa y del plexo mientérico, como se ha comentado previamente, lo que comportaría cambios en la motilidad y por lo tanto podría comportar una sintomatología similar a la que vemos en el SII (Petruzzello *et al.*, 2006;Barbara *et al.*, 2002). Por todo lo que algunos autores han propuesto una etiopatogenia común para ambas entidades, también cabe la posibilidad que el desarrollo de posibles dianas farmacológicas para tratar el desarrollo de esta enfermedad sea también adecuadas para los pacientes con SII.

Referencias

Aldoori WH, Giovannucci EL, Rockett HR, Sampson L, Rimm EB, & Willett WC (1998). A prospective study of dietary fiber types and symptomatic diverticular disease in men. *J Nutr* **128**, 714-719.

Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide B, Burton D, Baxter K, & Zinsmeister AR (2007). Nitroergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1359-G1365.

Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M, & Clave P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.

Aviello G, Romano B, & Izzo AA (2008). Cannabinoids and gastrointestinal motility: animal and human studies. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **12 Suppl 1**, 81-93.

Bampton PA & Dinning PG (2013). High resolution colonic manometry--what have we learnt?--A review of the literature 2012. *Curr Gastroenterol Rep* **15**, 328.

Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, & Corinaldesi R (2002). A role for inflammation in irritable bowel syndrome? *Gut* **51 Suppl 1**, i41-i44.

Bassotti G, Battaglia E, Bellone G, Dughera L, Fisogni S, Zambelli C, Morelli A, Mioli P, Emanuelli G, & Villanacci V (2005a). Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease 5. *J Clin Pathol* **58**, 973-977.

Bassotti G, Battaglia E, Spinozzi F, Pelli MA, & Tonini M (2001). Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity 1. *Dis Colon Rectum* **44**, 1814-1820.

Bassotti G, Chistolini F, & Morelli A (2003). Pathophysiological aspects of diverticular disease of colon and role of large bowel motility 6. *World J Gastroenterol* **9**, 2140-2142.

Bassotti G, de RG, Castellani D, Sediari L, & Morelli A (2005b). Normal aspects of colorectal motility and abnormalities in slow transit constipation. *World J Gastroenterol* **11**, 2691-2696.

Bennett A & Stockley HL (1975). The intrinsic innervation of the human alimentary tract and its relation to function. *Gut* **16**, 443-453.

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.

Bianchi M, Festa V, Moretti A, Ciaco A, Mangone M, Tornatore V, Dezi A, Luchetti R, De PB, Papi C, & Koch M (2011). Meta-analysis: long-term therapy with rifaximin in the management of uncomplicated diverticular disease. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 902-910.

Bitar KN & Makhlof GM (1982). Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal peptide. *Science* **216**, 531-533.

Bitar KN, Said SI, Weir GC, Saffouri B, & Makhlof GM (1980). Neural release of vasoactive intestinal peptide from the gut. *Gastroenterology* **79**, 1288-1294.

Boeckxstaens GE (2002). Understanding and controlling the enteric nervous system. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **16**, 1013-1023.

Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Herman AG, & Van Maercke YM (1993). Involvement of nitric oxide in the inhibitory innervation of the human isolated colon. *Gastroenterology* **104**, 690-697.

Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, & Cohen RA (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* **368**, 850-853.

Bornstein JC, Costa M, & Grider JR (2004). Enteric motor and interneuronal circuits controlling motility. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 34-38.

Brewer DB, Thompson H, Haynes IG, & Alexander-Williams J (1990). Axonal damage in Crohn's disease is frequent, but non-specific. *J Pathol* **161**, 301-311.

Brookes SJ (2001). Classes of enteric nerve cells in the guinea-pig small intestine. *Anat Rec* **262**, 58-70.

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.

Burcher E, Shang F, Warner FJ, Du Q, Lubowski DZ, King DW, & Liu L (2008). Tachykinin NK2 receptor and functional mechanisms in human colon: changes with indomethacin and in diverticular disease and ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 170-178.

Burnstock G (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 166-176.

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

Burnstock G & Knight GE (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **240**, 31-304.

Calder JF (1979). Diverticular disease of the colon in Africans. *Br Med J* **1**, 1465-1466.

Camaioni E, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK, & Jacobson KA (1998). Deoxyadenosine bisphosphate derivatives as potent antagonists at P2Y1 receptors. *J Med Chem* **41**, 183-190.

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.

Cattaneo M, Lecchi A, Ohno M, Joshi BV, Besada P, Tchilibon S, Lombardi R, Bischofberger N, Harden TK, & Jacobson KA (2004). Antiaggregatory activity in human platelets of potent antagonists of the P2Y 1 receptor. *Biochem Pharmacol* **68**, 1995-2002.

Caulfield MP, Robbins J, Higashida H, & Brown DA (1993). Postsynaptic actions of acetylcholine: the coupling of muscarinic receptor subtypes to neuronal ion channels. *Prog Brain Res* **98**, 293-301.

Chakder S, Cao GY, Lynn RB, & Rattan S (2000). Heme oxygenase activity in the internal anal sphincter: effects of nonadrenergic, noncholinergic nerve stimulation. *Gastroenterology* **118**, 477-486.

Colecchia A, Sandri L, Capodicasa S, Vestito A, Mazzella G, Staniscia T, Roda E, & Festi D (2003). Diverticular disease of the colon: new perspectives in symptom development and treatment. *World J Gastroenterol* **9**, 1385-1389.

Commane DM, Arasaradnam RP, Mills S, Mathers JC, & Bradburn M (2009). Diet, ageing and genetic factors in the pathogenesis of diverticular disease. *World J Gastroenterol* **15**, 2479-2488.

Costa M, Brookes SJ, & Hennig GW (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* **47 Suppl 4**, iv15-iv19.

D'Inca R, Pomerri F, Vettorato MG, Dal Pont E, Di Leo, V, Ferronato A, Medici V, & Sturniolo GC (2007). Interaction between rifaximin and dietary fibre in patients with diverticular disease. *Aliment Pharmacol Ther* **25**, 771-779.

Daniels L, de KN, Winter D, Boermeester MA, & Stockmann HB (2012). Overtreatment of sigmoid diverticulitis: plea for a less aggressive approach. *Dig Dis* **30**, 86-91.

Davies NM (1995). Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. *Dis Colon Rectum* **38**, 1311-1321.

De Man JG, De Winter BY, Herman AG, & Pelckmans PA (2007). Study on the cyclic GMP-dependency of relaxations to endogenous and exogenous nitric oxide in the mouse gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* **150**, 88-96.

Dinning PG, Wiklendt L, Gibbins I, Patton V, Bampton P, Lubowski DZ, Cook IJ, & Arkwright JW (2013). Low-resolution colonic manometry leads to a gross misinterpretation of the frequency and polarity of propagating sequences: Initial results from fiber-optic high-resolution manometry studies. *Neurogastroenterol Motil* **25**, e640-e649.

Drake R, Vogl W, & Mitchell A (2002). *Gray anatomia para estudiantes* Elsevier.

Eastwood M (2003). Colonic diverticula 1. *Proc Nutr Soc* **62**, 31-36.

Eglen RM, Choppin A, & Watson N (2001). Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 409-414.

Eglen RM, Hegde SS, & Watson N (1996). Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev* **48**, 531-565.

Etzioni DA, Cannom RR, Ault GT, Beart RW, Jr., & Kaiser AM (2009). Diverticulitis in California from 1995 to 2006: increased rates of treatment for younger patients. *Am Surg* **75**, 981-985.

Fang X, Hu HZ, Gao N, Liu S, Wang GD, Wang XY, Xia Y, & Wood JD (2006). Neurogenic secretion mediated by the purinergic P2Y1 receptor in guinea-pig small intestine. *Eur J Pharmacol* **536**, 113-122.

Farre R, Auli M, Lecea B, Martinez E, & Clave P (2006). Pharmacologic characterization of intrinsic mechanisms controlling tone and relaxation of porcine lower esophageal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 1238-1248.

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

Festi D & Colecchia A (2009). Mesalazine and rifaximin in symptomatic uncomplicated diverticular disease. *Am J Gastroenterol* **104**, 532.

Floch MH (2006). A hypothesis: is diverticulitis a type of inflammatory bowel disease? *J Clin Gastroenterol* **40 Suppl 3**, S121-S125.

Ford MJ, Camilleri M, Wiste JA, & Hanson RB (1995). Differences in colonic tone and phasic response to a meal in the transverse and sigmoid human colon. *Gut* **37**, 264-269.

Furness JB. The Enteric Nervous System. 3. 2006. Massachusetts, Blackwell Publishing. Ref Type: Serial (Book, Monograph)

Furness JB, Jones C, Nurgali K, & Clerc N (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* **72**, 143-164.

Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P, & Jimenez M (2008a). Purinergic and nitrergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G522-G533.

Gallego D, Gil V, Aleu J, Martinez-Cutillas M, Clave P, & Jimenez M (2011). Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 792-e338.

Gallego D, Gil V, Martinez-Cutillas M, Mane N, Martin MT, & Jimenez M (2012). Purinergic neuromuscular transmission is absent in the colon of P2Y(1) knocked out mice. *J Physiol* **590**, 1943-1956.

Gallego D, Hernandez P, Clave P, & Jimenez M (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G584-G594.

Gallego D, Vanden Berghe P, Farre R, Tack J, & Jimenez M (2008b). P2Y1 receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission and enteric neuronal activation in small intestine. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 159-168.

Gatta L, Vakil N, Vaira D, Pilotto A, Curlo M, Comparato G, Leandro G, Ferro U, Lera M, Milletti S, & Di Mario F (2010). Efficacy of 5-ASA in the treatment of colonic diverticular disease. *J Clin Gastroenterol* **44**, 113-119.

Gershon MD & Tack J (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* **132**, 397-414.

Gibbons SJ & Farrugia G (2004). The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* **556**, 325-336.

Gil V, Martinez-Cutillas M, Mane N, Martin MT, Jimenez M, & Gallego D (2013). P2Y(1) knockout mice lack purinergic neuromuscular transmission in the antrum and cecum. *Neurogastroenterol Motil* **25**, e170-e182.

Golder M, Burleigh DE, Belai A, Ghali L, Ashby D, Lunniss PJ, Navsaria HA, & Williams NS (2003). Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *Lancet* **361**, 1945-1951.

Golder M, Burleigh DE, Ghali L, Feakins RM, Lunniss PJ, Williams NS, & Navsaria HA (2007). Longitudinal muscle shows abnormal relaxation responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease. *Colorectal Dis* **9**, 218-228.

Gonzalez A & Sarna SK (2001). Neural regulation of in vitro giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G275-G282.

Gonzalez AA, Farre R, & Clave P (2004). Different responsiveness of excitatory and inhibitory enteric motor neurons in the human esophagus to electrical field stimulation and to nicotine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G299-G306.

Grasa L, Gil V, Gallego D, Martin MT, & Jimenez M (2009). P2Y(1) receptors mediate inhibitory neuromuscular transmission in the rat colon. *Br J Pharmacol* **158**, 1641-1652.

Guagnini F, Valenti M, Mukenge S, Matias I, Bianchetti A, Di PS, Ferla G, Di Marzo, V, & Croci T (2006). Neural contractions in colonic strips from patients with diverticular disease: role of endocannabinoids and substance P 3. *Gut* **55**, 946-953.

Guyton AC & Hall JE (1996). *Tratado de fisiología médica*, 9 ed. Mc Graw-Hill interamericana, Madrid.

Hall JF, Roberts PL, Ricciardi R, Marcello PW, Scheirey C, Wald C, Scholz FJ, & Schoetz D (2010). Colonic diverticulitis: does age predict severity of disease on CT imaging? *Dis Colon Rectum* **53**, 121-125.

Hansen MB (2003). Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* **52**, 1-30.

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 cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* **50**, 265-270.

Harrington AM, Hutson JM, & Southwell BR (2010a). Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem* **44**, 173-202.

Harrington AM, Peck CJ, Liu L, Burcher E, Hutson JM, & Southwell BR (2010b). Localization of muscarinic receptors M1R, M2R and M3R in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 999-3.

Heise CP (2008). Epidemiology and Pathogenesis of Diverticular Disease. *J Gastrointest Surg*.

Horowitz B, Ward SM, & Sanders KM (1999). Cellular and molecular basis for electrical rhythmicity in gastrointestinal muscles. *Annu Rev Physiol* **61**, 19-43.

Hu HZ, Gao N, Zhu MX, Liu S, Ren J, Gao C, Xia Y, & Wood JD (2003). Slow excitatory synaptic transmission mediated by P2Y1 receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *J Physiol* **550**, 493-504.

Huizinga JD (1986). Electrophysiology of human colon motility in health and disease. *Clin Gastroenterol* **15**, 879-901.

Huizinga JD, Waterfall WE, & Stern HS (1999). Abnormal response to cholinergic stimulation in the circular muscle layer of the human colon in diverticular disease. *Scand J Gastroenterol* **34**, 683-688.

Hulme EC (1990). Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. *Symp Soc Exp Biol* **44**, 39-54.

Humes D, Simpson J, & Spiller RC (2007). Colonic diverticular disease. *Clin Evid (Online)* **2007**.

Humes D, Smith JK, & Spiller RC (2011a). Colonic diverticular disease. *Am Fam Physician* **84**, 1163-1164.

Humes DJ, Fleming KM, Spiller RC, & West J (2011b). Concurrent drug use and the risk of perforated colonic diverticular disease: a population-based case-control study. *Gut* **60**, 219-224.

Humes DJ, Simpson J, Neal KR, Scholefield JH, & Spiller RC (2008). Psychological and colonic factors in painful diverticulosis. *Br J Surg* **95**, 195-198.

Hwang SJ, Blair PJ, Durnin L, Mutafova-Yambolieva V, Sanders KM, & Ward SM (2012). P2Y1 purinoreceptors are fundamental to inhibitory motor control of murine colonic excitability and transit. *J Physiol* **590**, 1957-1972.

Hwang SJ, Durnin L, Dwyer L, Rhee PL, Ward SM, Koh SD, Sanders KM, & Mutafova-Yambolieva VN (2011). beta-nicotinamide adenine dinucleotide is an enteric inhibitory neurotransmitter in human and nonhuman primate colons. *Gastroenterology* **140**, 608-617.

Iwase H, Sadahiro S, Mukoyama S, Makuuchi H, & Yasuda M (2005). Morphology of myenteric plexuses in the human large intestine: comparison between large intestines with and without colonic diverticula. *J Clin Gastroenterol* **39**, 674-678.

Jung HK, Choung RS, Locke GR, III, Schleck CD, Zinsmeister AR, & Talley NJ (2010). Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome is associated with diverticular disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* **105**, 652-661.

Keef KD, Du C, Ward SM, McGregor B, & Sanders KM (1993). Enteric inhibitory neural regulation of human colonic circular muscle: role of nitric oxide. *Gastroenterology* **105**, 1009-1016.

Kiguli-Malwadde E & Kasozi H (2002). Diverticular disease of the colon in Kampala, Uganda. *Afr Health Sci* **2**, 29-32.

Kreis ME, Mueller MH, & Thasler WH (2012). Hartmann's procedure or primary anastomosis? *Dig Dis* **30**, 83-85.

Kunze WA & Furness JB (1999). The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* **61**, 117-142.

Lecci A, Santicioli P, & Maggi CA (2002). Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 630-641.

Lecea B, Gallego D, Farre R, Opazo A, Auli M, Jimenez M, & Clave P (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitrergic and non-nitrergic co-neurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.

Lecea B, Martinez E, Auli M, Opazo A, & Clave P (2009). Selective stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 1342-e130.

Liu L, Markus I, Saghire HE, Perera DS, King DW, & Burcher E (2011). Distinct differences in tachykinin gene expression in ulcerative colitis, Crohn's disease and diverticular disease: a role for hemokinin-1? *Neurogastroenterol Motil*.

Liu L, Shang F, Markus I, & Burcher E (2002). Roles of substance P receptors in human colon circular muscle: alterations in diverticular disease 4. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 627-635.

Liu LW & Huizinga JD (1993). Electrical coupling of circular muscle to longitudinal muscle and interstitial cells of Cajal in canine colon. *J Physiol* **470**, 445-461.

MacDermott AB, Role LW, & Siegelbaum SA (1999). Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. *Annu Rev Neurosci* **22**, 443-485.

Malcolm A & Camilleri M (2000). Coloanal motor coordination in association with high-amplitude colonic contractions after pharmacological stimulation. *Am J Gastroenterol* **95**, 715-719.

Marlett JA, McBurney MI, & Slavin JL (2002). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc* **102**, 993-1000.

Maselli MA, Piepoli AL, Guerra V, Caruso ML, Pezzolla F, Lorusso D, Demma I, & De PF (2004). Colonic smooth muscle responses in patients with diverticular disease of the colon: effect of the NK2 receptor antagonist SR48968. *Dig Liver Dis* **36**, 348-354.

McConnell EJ, Tessier DJ, & Wolff BG (2003). Population-based incidence of complicated diverticular disease of the sigmoid colon based on gender and age. *Dis Colon Rectum* **46**, 1110-1114.

McGehee DS & Role LW (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annu Rev Physiol* **57**, 521-546.

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.

Mimura T, Bateman AC, Lee RL, Johnson PA, McDonald PJ, Talbot IC, Kamm MA, MacDonald TT, & Pender SL (2004). Up-regulation of collagen and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in colonic diverticular disease 7. *Dis Colon Rectum* **47**, 371-378.

Morris CR, Harvey IM, Stebbings WS, Speakman CT, Kennedy HJ, & Hart AR (2003). Do calcium channel blockers and antimuscarinics protect against perforated colonic diverticular disease? A case control study 1. *Gut* **52**, 1734-1737.

O'Kelly T, Brading A, & Mortensen N (1993). Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* **34**, 689-693.

O'Sullivan GC, Murphy D, O'Brien MG, & Ireland A (1996). Laparoscopic management of generalized peritonitis due to perforated colonic diverticula. *Am J Surg* **171**, 432-434.

Olsson C & Holmgren S (2001). The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **128**, 481-503.

Opazo A, Lecea B, Gil V, Jimenez M, Clave 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-e25.

Papi C, Koch M, & Capurso L (2005). Management of diverticular disease: is there room for rifaximin? *Chemotherapy* **51 Suppl 1**, 110-114.

Petruzzello L, Iacopini F, Bulajic M, Shah S, & Costamagna G (2006). Review article: uncomplicated diverticular disease of the colon 2. *Aliment Pharmacol Ther* **23**, 1379-1391.

Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, & Jimenez M (2001). Evidence supporting presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G255-G266.

Pluja L, Fernandez E, & Jimenez M (1999). Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* **126**, 883-892.

Pluja L, Fernandez E, & Jimenez M (2000). Electrical and mechanical effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat colon involve different mechanisms. *Eur J Pharmacol* **389**, 217-224.

Porter AC, Bymaster FP, DeLapp NW, Yamada M, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, & Felder CC (2002). M1 muscarinic receptor signaling in mouse hippocampus and cortex. *Brain Res* **944**, 82-89.

Rae MG, Fleming N, McGregor DB, Sanders KM, & Keef KD (1998). Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol* **510 (Pt 1)**, 309-320.

Ralevic V & Burnstock G (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* **50**, 413-492.

Rao SS, Sadeghi P, Beaty J, Kavlock R, & Ackerson K (2001). Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G629-G639.

Rattan S, Al HR, & De Godoy MA (2004). Mechanism of internal anal sphincter relaxation by CORM-1, authentic CO, and NANC nerve stimulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G605-G611.

Sanders KM (1996). A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **111**, 492-515.

Sanders KM, Koh SD, & Ward SM (2006). Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* **68**, 307-343.

Sanger GJ, Broad J, Kung V, & Knowles CH (2013). Translational neuropharmacology: the use of human isolated gastrointestinal tissues. *Br J Pharmacol* **168**, 28-43.

Sarna SK (2006). Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G545-G555.

Schemann M & Neunlist M (2004). The human enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 55-59.

Schworer H, Clemens A, Katsoulis S, Kohler H, Creutzfeldt W, & Schmidt WE (1993). Pituitary adenylate cyclase-activating peptide is a potent modulator of human colonic motility. *Scand J Gastroenterol* **28**, 625-632.

Serio R, Barajas-Lopez C, Daniel EE, Berezin I, & Huizinga JD (1991). Slow-wave activity in colon: role of network of submucosal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* **260**, G636-G645.

Shafik A, Ahmed I, Shafik AA, & El Sibai O (2004). Diverticular disease: electrophysiologic study and a new concept of pathogenesis. *World J Surg* **28**, 411-415.

Shah V, Lyford G, Gores G, & Farrugia G (2004). Nitric oxide in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* **126**, 903-913.

Sheth AA, Longo W, & Floch MH (2008). Diverticular disease and diverticulitis. *Am J Gastroenterol* **103**, 1550-1556.

Simpson J (2012). Perception and the origin of symptoms in diverticular disease. *Dig Dis* **30**, 75-79.

Smith J, Humes DJ, & Spiller RC (2011). Should we treat uncomplicated symptomatic diverticular disease with fibre? *BMJ* **342**, d2951.

Smith TK, Reed JB, & Sanders KM (1987). Origin and propagation of electrical slow waves in circular muscle of canine proximal colon. *Am J Physiol* **252**, C215-C224.

Spiller R (2012). Is it diverticular disease or is it irritable bowel syndrome? *Dig Dis* **30**, 64-69.

Spiller RC, Humes DJ, Campbell E, Hastings M, Neal KR, Dukes GE, & Whorwell PJ (2010). The Patient Health Questionnaire 12 Somatic Symptom scale as a predictor of symptom severity

and consulting behaviour in patients with irritable bowel syndrome and symptomatic diverticular disease. *Aliment Pharmacol Ther* **32**, 811-820.

Stark ME, Bauer AJ, Sarr MG, & Szurszewski JH (1993). Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology* **104**, 398-409.

Stollman N & Raskin JB (2004). Diverticular disease of the colon. *Lancet* **363**, 631-639.

Strate LL, Liu YL, Aldoori WH, Syngal S, & Giovannucci EL (2009). Obesity increases the risks of diverticulitis and diverticular bleeding. *Gastroenterology* **136**, 115-122.

Sugihara K, Muto T, & Morioka Y (1983). Motility study in right sided diverticular disease of the colon. *Gut* **24**, 1130-1134.

Szurszewski JH, Ermilov LG, & Miller SM (2002). Prevertebral ganglia and intestinofugal afferent neurones. *Gut* **51 Suppl 1**, i6-10.

Takaki M (2003). Gut pacemaker cells: the interstitial cells of Cajal (ICC). *J Smooth Muscle Res* **39**, 137-161.

Thornell A, Angenete E, Gonzales E, Heath J, Jess P, Lackberg Z, Ovesen H, Rosenberg J, Skullman S, & Haglind E (2011). Treatment of acute diverticulitis laparoscopic lavage vs. resection (DILALA): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **12**, 186.

Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K, & Fukuzawa M (2000). Role of nitric oxide in the left-sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatogastroenterology* **47**, 692-696.

Tomita R, Munakata K, Aoki N, Tanjoh K, & Kurosu Y (1993). A study on the peptidergic nerves (VIP, substance P) in the colon of patients with diverticular disease. *Regul Pept* **46**, 244-246.

Tomita R, Tanjoh K, Fujisaki S, & Fukuzawa M (1999). Physiological studies on nitric oxide in the right sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatogastroenterology* **46**, 2839-2844.

Torocsik A, Oberfrank F, Sershen H, Lajtha A, Nemesy K, & Vizi ES (1991). Characterization of somatodendritic neuronal nicotinic receptors located on the myenteric plexus. *Eur J Pharmacol* **202**, 297-302.

Trotman IF & Misiewicz JJ (1988). Sigmoid motility in diverticular disease and the irritable bowel syndrome. *Gut* **29**, 218-222.

Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, & Elisei W (2006). Mesalazine and/or Lactobacillus casei in preventing recurrence of symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon: a prospective, randomized, open-label study. *J Clin Gastroenterol* **40**, 312-316.

Vuong NP, Sezeur A, Balaton A, Malafosse M, & Camilleri JP (1985). [Myenteric plexuses and colonic diverticulosis: results of a histological study]. *Gastroenterol Clin Biol* **9**, 434-436.

Wedel T, Busing V, Heinrichs G, Nohroudi K, Bruch HP, Roblick UJ, & Bottner M (2010). Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 407-4.

Whiteway J & Morson BC (1985). Elastosis in diverticular disease of the sigmoid colon 13. *Gut* **26**, 258-266.

Wong RC, Chak A, Kobayashi K, Isenberg GA, Cooper GS, Carr-Locke DL, & Sivak MV, Jr. (2000). Role of Doppler US in acute peptic ulcer hemorrhage: can it predict failure of endoscopic therapy? *Gastrointest Endosc* **52**, 315-321.

Wonnacott S (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* **20**, 92-98.

Yiangou Y, Facer P, Dyer NH, Chan CL, Knowles C, Williams NS, & Anand P (2001). Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. *Lancet* **357**, 1338-1339.

Zagorodnyuk VP, Vladimirova IA, Vovk EV, & Shuba MF (1989). Studies of the inhibitory non-adrenergic neuromuscular transmission in the smooth muscle of the normal human intestine and from a case of Hirschsprung's disease. *J Auton Nerv Syst* **26**, 51-60.

HIPÓTESIS

Actualmente, es todavía desconocida la fisiopatología del trastorno motor asociado a la formación de divertículos (diverticulosis) en el colon humano, ni tampoco la de la enfermedad diverticular sintomática. Tampoco se conocen los factores que desencadenan las complicaciones que esta enfermedad puede presentar.

Nuestra hipótesis es que en pacientes con diverticulosis, las alteraciones de la motilidad del colon izquierdo están presentes de forma previa a la aparición de los síntomas y a las complicaciones que estos pacientes en algunos casos desarrollan. Este trastorno de la motilidad del colon asociado a la diverticulosis puede deberse a cambios estructurales y/o funcionales de los elementos celulares implicados en el control de la motilidad. Se han descrito algunas alteraciones en las respuestas motoras in vivo e in vitro en colon izquierdo y colon sigmoide de pacientes con enfermedad diverticular, pero la fisiopatología asociada a estos cambios es todavía poco clara.

Las alteraciones de la motilidad del colon en pacientes con diverticulosis pueden estudiarse mediante la evaluación de los diferentes patrones de contractilidad in vitro de segmentos de colon procedentes de resecciones quirúrgicas en estudios fisiológicos mediante baño de órganos. Estudios electrofisiológicos in vitro permiten completar la caracterización de las alteraciones de la neurotransmisión neuromuscular que son la base de las alteraciones motoras que presentan estos pacientes.

El estudio de la fisiopatología de estas alteraciones fisiológicas puede abordarse mediante estudios morfométricos que evalúan los posibles cambios en las capas musculares, en los elementos de control del plexo mientérico i/o células marcapasos y mediante estudios de expresión génica que permiten cuantificar las alteraciones en la síntesis de neurotransmisores.

El estudio de estas alteraciones en las fases iniciales de la enfermedad puede permitir la búsqueda de factores pronósticos en su evolución, así como explorar nuevas estrategias terapéuticas para nuestros pacientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1)** Describir las alteraciones de la contractilidad in vitro del colon sigmoide en pacientes con diverticulosis utilizando la técnica de baño de órganos y microelectrodos para valorar las alteraciones en los diferentes patrones motores in vitro y los cambios en la transmisión neuro-muscular.
- 2)** Explorar las posibles alteraciones estructurales y cambios histológicos, en capas musculares (longitudinal y circular), plexo mientérico (motoneuronas entéricas y glia) y células intersticiales de Cajal, en el colon sigmoide de pacientes con diverticulosis.
- 3)** Caracterizar los posibles cambios en la neurotransmisión inhibitoria y los cambios a nivel de la expresión génica de los principales neurotransmisores inhibitorios en pacientes con diverticulosis.
- 4)** Evaluar el efecto farmacológico (perfil farmacodinámico) in vitro de dos espasmolíticos de uso frecuente en la práctica clínica en estos pacientes, como el Bromuro de otilonio y la N-butil-hioscina en los estadios iniciales de la enfermedad.

Capítulo 1.

In Vitro motor patterns and electrophysiological changes in patients with colonic diverticular disease.

1. ABSTRACT.

BACKGROUND: The underlying mechanism responsible for motility changes in colonic diverticular disease (DD) is still unknown. The aim was to investigate the structural and in vitro motor changes in the sigmoid colon of patients with DD. **METHODS:** Muscle bath, microelectrodes and immunohistochemical techniques were performed with samples obtained from the left and sigmoid colon of patients with DD and compared with those of patients without DD. **RESULTS:** The amplitude and area under the curve of the spontaneous rhythmic phasic contractions (SRPC) were greatly reduced in patients with DD whereas their frequency and tone remained unaltered. Electrical field stimulation induced a neurally-mediated, enhanced ON-contraction (amplitude) in patients with DD and increased the duration of latency of OFF-contractions. The resting membrane potential of smooth muscle cells was hyperpolarized and the amplitude of the inhibitory junction potential (IJP) was increased in patients with DD. In contrast, no significant histological differences were observed in patients with DD as smooth muscle (circular and longitudinal layers), ICC, glial cells and myenteric neurons densities remained unaltered. **CONCLUSIONS:** Sigmoid strips from patients with asymptomatic DD showed an altered motor pattern with reduced spontaneous motility and enhanced neurally-mediated colonic responses involving both excitatory and inhibitory motor pathways. No major neural and muscular structural elements were detected at this stage of the disease. These findings could be valuable in understanding the pathophysiology of this prevalent digestive disease.

2. INTRODUCTION.

Colonic diverticular disease (DD), which is characterized by mucosal herniations along the colonic wall, is a common disorder in western countries and is the most common morphological alteration of the large bowel. Despite its high prevalence in the elderly population, among 40-50% over 70 years, its considerable health cost and mortality rate of 2.5/100.000 population per year, its aetiology is unknown to date. Clinical practice is usually aimed at treating the complications related to this disease without treating its aetiological factors as they remain unclear (Matrana & Margolin, 2009).

Although the pathophysiology of DD has not yet been established it has been associated in symptomatic and advanced-stage patients with several aetiological factors such as structural changes like elastosis (Whiteway & Morson, 1985;Golder *et al.*, 2007) or changes in the collagen fibres structure (Mimura *et al.*, 2004;Thomson *et al.*, 1987), or even the loss of intrinsic cholinergic innervation (Huizinga *et al.*, 1999;Tomita *et al.*, 2000) and also with low fibre intake. Several studies have suggested that colon affected by DD exhibit an abnormal motor pattern in vivo characterized by increased tone and enhanced postprandial motility as well as spastic motor activity and excessive segmentary contractions (Bassotti *et al.*, 2001;Trotman & Misiewicz, 1988).

Human colonic motor activity is characterized by two distinct types of phasic motor events that are regulated by intrinsic mechanisms: a) rhythmic contractions allowing mixing of luminal contents, and b) and propagating contractions producing mass movements and stool propulsion (Sarna, 2006;Rao *et al.*, 2001). We recently explored the origin and normal physiology of these motor patterns in vitro and found that spontaneous rhythmic phasic contractions were mediated by the pacemaker activity of

Interstitial Cells of Cajal (ICC) and on and off contractions were caused by activation of excitatory and inhibitory myenteric motor neurons (Auli *et al.*, 2008). Some in vitro studies found higher active and passive tone in strips from patients with DD (Maselli *et al.*, 2004), others reported altered pacemaker activity resulting in a decrease in propulsive activity and favouring segmental contractile activity (Huizinga *et al.*, 1999;Huizinga, 1986). A recent review suggests that an increase in excitatory neurotransmitters and a decrease in nitric oxide may result in hypersegmentation and cause diverticula (Jeyarajah & Papagrigroriadis, 2011), although a clear role is yet to be ascertained.

Controversial data has been reported in several studies regarding the structural changes in the enteric nervous system in patients with DD. Some studies found the number of enteric neurons unaltered (Bassotti *et al.*, 2005;Vuong *et al.*, 1985), other found a decrease (Iwase *et al.*, 2005;Deduchovas *et al.*, 2008;Wedel *et al.*, 2010), and others a reduction in glial cells and ICC (Bassotti *et al.*, 2005). A recent study found that symptomatic DD was associated with enteric neuropathy as patients with DD presented reduced neuronal and glial density and enhanced glia-neuron index in the myenteric plexus (Wedel *et al.*, 2010). It is not known if these alterations are the cause or the consequence of the impaired motility.

In this study we assessed the morphological and physiological changes in vitro in the sigmoid colon of patients with asymptomatic colonic diverticula compared with controls.

3. MATERIALS AND METHODS.

3.1. Tissue preparation.

Tissue specimens of human sigmoid colon were obtained from 37 patients in control group and 29 in the DD group without symptoms of major clinical motility disorders. Both groups were undergoing elective surgery for rectal cancer (T2/T3 stages, age range 32-85 years, 44% women). DD group and control group were diagnosed by colonoscopy prior to surgery. Samples were collected from the proximal resection sigmoid margin and a pathologist confirmed that there was no histological damage in these samples. The experimental protocols were approved by the Institutional Review Board of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain and therefore comply with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its subsequent amendments.

3.2. Organ bath studies.

Preparation of circular muscle strips and isometric tension recording: The colonic segment was cut open longitudinally along the mesenteric border, the mucosal layer was removed and transmural muscle strips (4 mm wide by 10 mm long) were cut in the direction of the circular muscular fibers. A silk thread was attached to either end of the strips and they were placed in 10 mL organ baths filled with Krebs solution (pH 7.4, 37°C) bubbled with 5% CO₂ in O₂ between two parallel platinum wire electrodes. Strips were stretched up to 4g and equilibrated for 1 hour. Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (model 03 Force Transducer and model 7 Series Polygraph, respectively, Grass Instruments Co, Quincy, MA), and recorded on a computer using the data acquisition software AcqKnowledge® (MP100,

Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). Electrical field stimulation (EFS) pulses of 0.4 ms duration, frequency 1–40 Hz, 10s trains at 28V were delivered by an electrical stimulator Model S88 (Grass Instruments Co) and a power booster (Stimu-Splitter II, Med-Lab Instruments, Loveland, CO) in order to obtain six identical and undistorted stimuli. These electrical stimuli were simultaneously recorded with tension tracings through a synchronized Transistor-Transistor logic signal between the electrical stimulator Grass S88 and the computerized Biopac System in order to assess whether the mechanical responses occurred during (“ON”) or after (“OFF”) the electrical stimulus (Auli *et al.*, 2008).

3.3. Intracellular microelectrode recording.

Muscle strips were dissected parallel to the circular muscle and placed in a Sylgard-coated chamber continuously perfused with Krebs solution at $37\pm 1^\circ\text{C}$. Strips were meticulously pinned in a cross-sectioned slab allowing microelectrode recordings from circular muscle. This procedure was previously reported in the human colon. Strips were allowed to equilibrate for approximately 1 hour before recording. Circular smooth muscle cells were impaled with glass microelectrodes filled with 3M KCl (30-60 M Ω of resistance). Membrane potential was measured using standard electrometer Duo773 (WPI Inc., FL, USA). Tracings were displayed on an oscilloscope 4026 (Racal-Dana Ltd., England) and simultaneously digitalized (100 Hz) using PowerLab 4/30 system and Chart 5 software for Windows (all from ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia). Electrical stimulation (100 ms of train duration, 20 Hz, 0.3 ms pulse and increasing amplitude voltage of 5-50 V) (Gallego *et al.*, 2008b) was applied using two silver chloride plates placed perpendicular to the longitudinal axis of the preparation

and 1.5 cm apart. Nifedipine (1 μ M) was used to abolish the spontaneous contractions during electrophysiological experiments and obtain stable impalements.

3.4. Experimental design.

Organ bath studies.

The first part of the study was aimed at evaluating the changes in the spontaneous motility pattern and was carried out with a group of ten patients with DD (56 \pm 11 mean age) and ten control patients (66 \pm 9 mean age) 50% men. The amplitude, basal tone, area under the curve and frequency of these spontaneous contractions were measured and compared between the control group and the DD group. The second part of the study was focused on assessing the mechanical responses following stimulation of enteric motoneurons by electrical field stimulation (EFS) in a group of nine patients with DD (69 \pm 7 mean age) and ten controls (69 \pm 8 mean age), all of them men. In our previous studies we found sigmoid strips responded to EFS with two distinct patterns of contractile responses of neural origin, a) a phasic contraction which began during EFS—ON-contractions or b) a phasic contraction which began after EFS—OFF-contractions (Auli *et al.*, 2008;Gallego *et al.*, 2010). Two parameters were measured, in this group of patients in response to EFS: a) latency of EFS contractions, defined as the period of time from the beginning of EFS to the onset of contraction and mainly caused by stimulation of inhibitory MNs-; and b) maximal amplitude of EFS contractions (in grams), mainly caused by activation of excitatory MNs.

2) Electrophysiological studies. To characterize the differences in the resting membrane potential (RMP) and the amplitude of inhibitory junction potential (IJP), a control group of ten patients (mean age 60 \pm 11, 60% men) and a group of four patients with DD (mean age 61 \pm 6, 50% men) were compared by microelectrode technique.

4. Specimen processing for morphometric analysis.

Specimen processing.

Sigmoid specimens were obtained from 13 patients, 6 with DD (33.3% men; 59±12 years) and 7 controls (71.4% men; 67±6 years). All specimens were cut along their longitudinal axis and oriented to allow full-thickness preparations. Tissue was immediately fixed in 4% buffered paraformaldehyde for 24 hours (pH 7.3). Then specimens were paraffin-embedded, cut into 4 µm-thick sections that were mounted on glass slides. Sections were examined by a Nikon microscope (Nikon eclipse E600, Nikon Instruments Inc. NY, USA) equipped with a digital camera and an image processing system (Olympus Dp20-5e, Tokyo, Japan). For negative controls, sections of each specimen were stained, omitting the primary antibodies.

Tissue staining.

The first section was processed for conventional histology and carefully examined by the pathologist to exclude structural abnormalities. Then slides were deparaffinised, rehydrated, and processed for hematoxylin-eosin (H&E) staining or immunohistochemistry: a) *Muscular layers assessment*. After H&E staining, sample slides were focused along both muscular layers and nuclei were counted for each layer and section; b) *Myenteric neuron and glial cell assessment*. Whole ganglia (neurons and glial cells) were studied using a neuronal marker neural specific enolase (NSE) (Monoclonal Mouse anti-Human Neuron-Specific Enolase 1:200 , Dako, Glostrup, Denmark) and glial cells were studied using S100 (Policlonal Rabbit Anti-Cow S-100 , Dako, Glostrup, Denmark). Sections 1:400. c) *Interstitial cells of Cajal assessment*. The cKit-receptor (CD117) was used as a marker for ICC (Polyclonal Rabbit anti-Human c-Kit 1:100, Dako, Glostrup, Denmark). Images of myenteric plexus (MP-ICC) and intra-

muscular ICC (IM-ICC) were taken with $\times 10$ objective. Data of total number of ICC were given for each region.

4.1. Image processing and morphometric analysis.

Three programmes for semiautomatic image processing were designed and implemented with ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java (ImageJ)). The software can be found on the website: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). These three programmes were used as Plugins to increase the accuracy of data evaluation: 1) To count the nuclei of cells to determine their density in the longitudinal and circular muscular layer, 2) To calculate the area of myenteric plexus and the ganglion to determine density of neurons / glial cells in each ganglion, 3) To assess the number and density of two populations of ICC, those located between the muscular layers (circular and longitudinal), and those located in the myenteric plexus. In order to minimize field-dependent observations, the measurements were taken from five images (fields) of the same sample (patient) and averaged to obtain the results of each variable.

5. Data analysis and statistics.

For **mechanical experiments**, student t-test was used to compare motility (amplitude, AUC, tone and frequency) and two-way ANOVA (disease and frequency) to compare electrical responses (ON and OFF EFS-induced electrical responses). Differences in the proportion of ON- and OFF-contractions were assed using a χ^2 test.

For **intracellular recording experiments**, differences in the resting membrane potential were compared by an unpaired student t-test. The differences between the amplitude and duration of the IJP were compared by two-way ANOVA (group [control or DD] and voltage), using GraphPad prism 4 (Version 4.01, USA).

Results were expressed as mean \pm SD. A P value <0.05 was considered statistically significant.

For **immunohistochemical experiments and morphometric analysis**, density of myenteric neurons, glial cells and MP-ICC were expressed as the sum of cells over the area of the myenteric plexus analyzed section. Values were expressed as mean \pm SD data. Differences were compared by an unpaired student t-test. $P<0.05$ was considered statistically significant. Results were expressed as mean \pm SD.

6. RESULTS.

6.1. Physiological studies.

Spontaneous motor activity. Circular muscle strips (10 controls and 10 DD patients) were spontaneously active and developed rhythmic phasic contractions (RPC) with an amplitude of 4.3 ± 2.6 g for the control group and 1.6 ± 1.7 g for the DD group. The area under the curve of these contractions was 84.9 ± 52.3 g min⁻¹ for the control group and 31.8 ± 27.0 g min⁻¹ for DD group. The frequency of these RPC was 2.8 ± 1.0 contractions min⁻¹ for the control group and 2.8 ± 1.3 contractions min⁻¹ for the DD group. The resting tone of the preparation was 1.7 ± 0.8 for the control group and 1.5 ± 0.9 for the DD group. Significant differences were found in the amplitude of the contractions (N=20, $P<0.001$) and AUC (N=20, $P<0.001$) whereas frequency (N=20, ns) of the SRPC and tone (N=20, ns) remained unaltered (Figure 1).

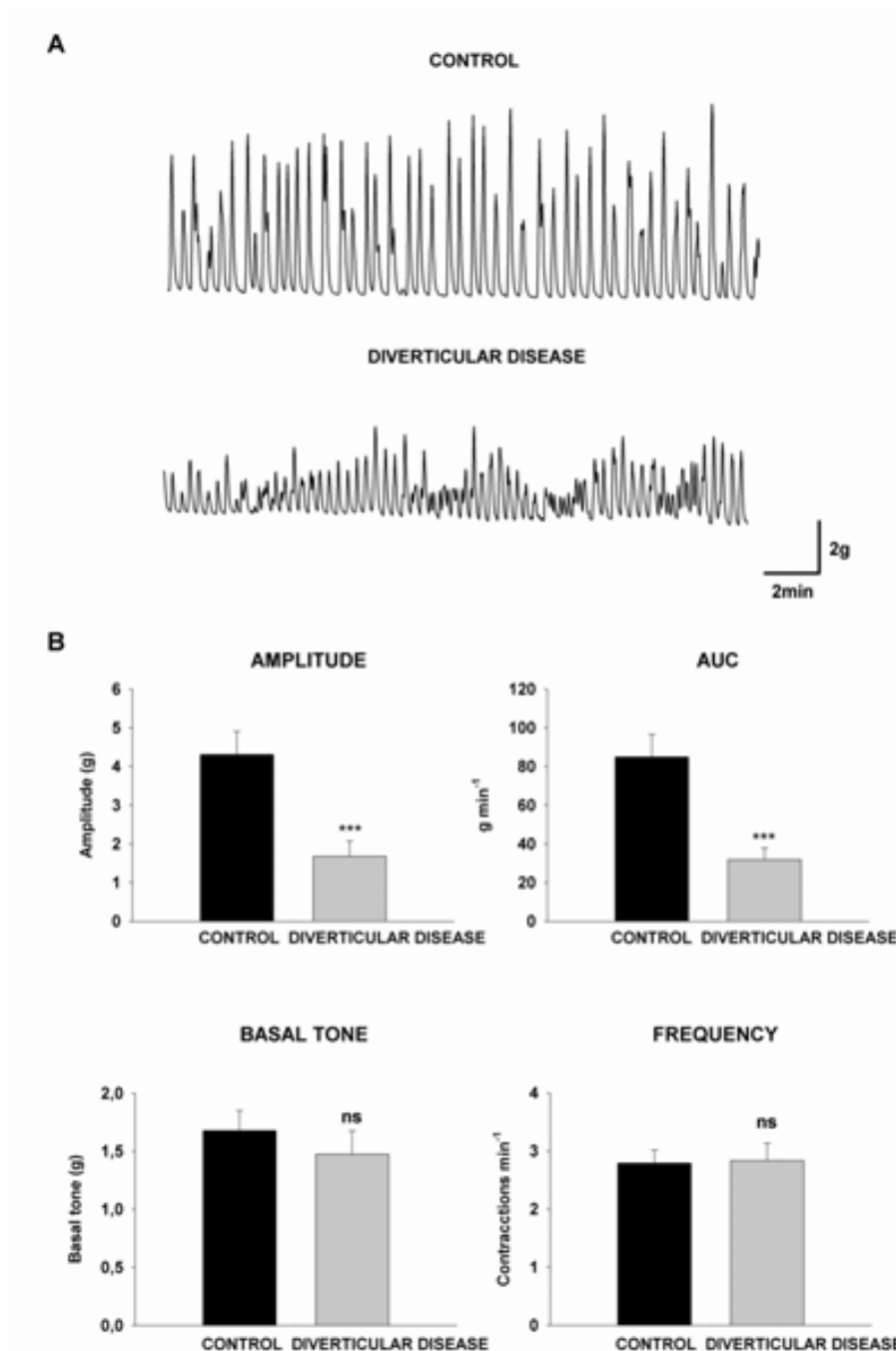


Figure 1. (A) Mechanical recordings showing the motor pattern of spontaneous rhythmic phasic contractions obtained from a control patient (on top) and a patient with diverticular disease (bottom). (B) Histograms showing the differences observed in this spontaneous motor activity, Amplitude, area under curve (AUC), basal tone and frequency of the contractions. Data are expressed as mean ± SD *** $P < 0.001$.

Contractions induced by electrical field stimulation of myenteric plexus.

Electrical field stimulation induced an ON contraction in 54% of the control group strips and in 63% of the DD; therefore 46% of the responses were considered OFF-contractions (transient latency followed by contraction) in the control group and 37% in the DD group. These differences in the proportion of ON and OFF-contractions were not significant. However several significant differences were observed between the control and the DD groups as patients with DD showed an increase in the amplitude of ON-contractions (N=12 $P<0.001$) and an increase in the latency duration of the OFF contractions (N=9 $P<0.001$) (Figures 2 and 3).

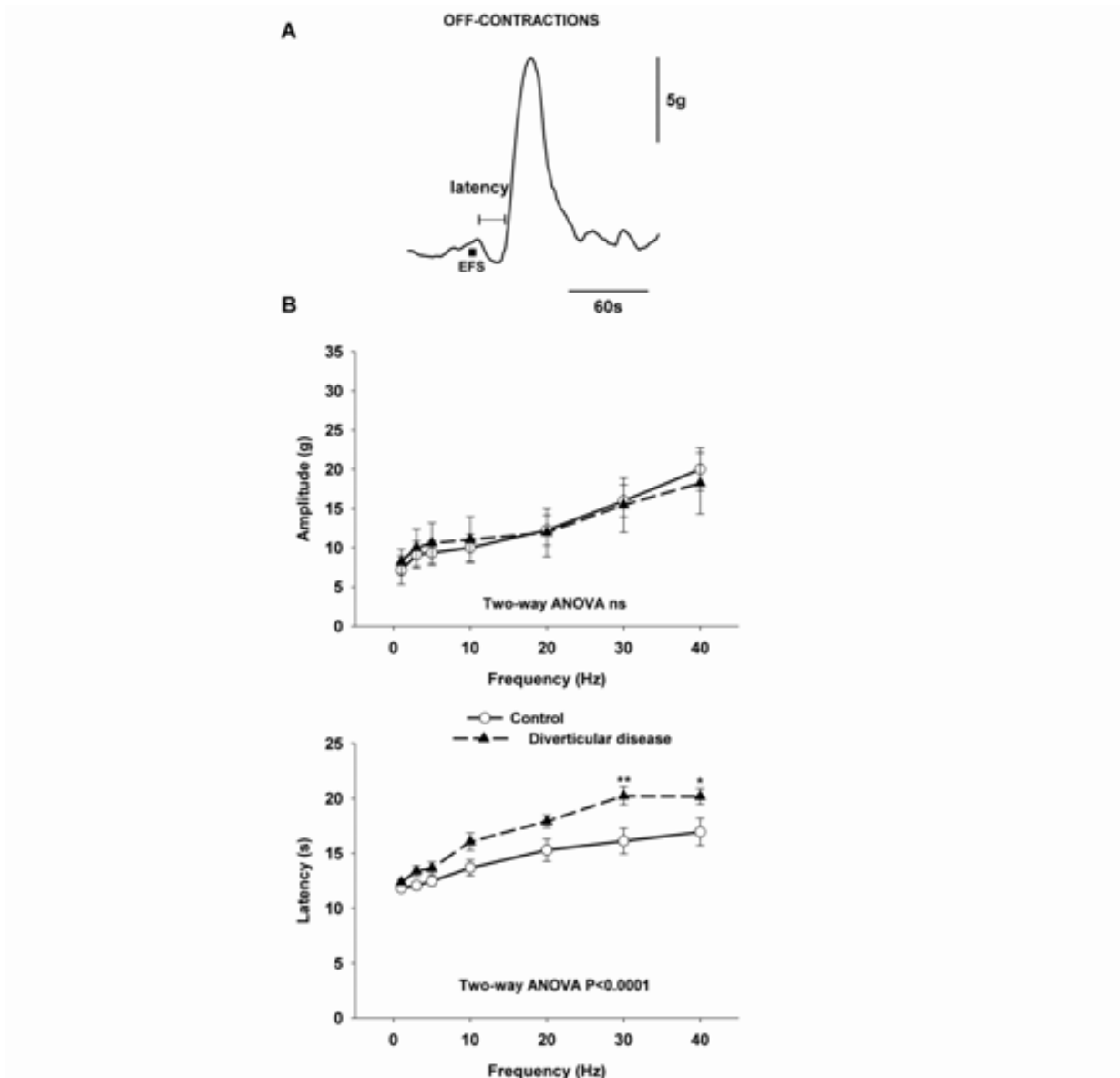


Figure 2. (A) Mechanical recordings showing representative tracings of EFS-induced OFF-contractions. (B) Plot graphs showing the amplitude (top) and latency (bottom) of the EFS-induced contractions of the control group and the diverticular disease group at the different frequencies of stimulation (1, 3, 5, 10, 20, 30 and 40Hz). Data are expressed as mean \pm SD * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

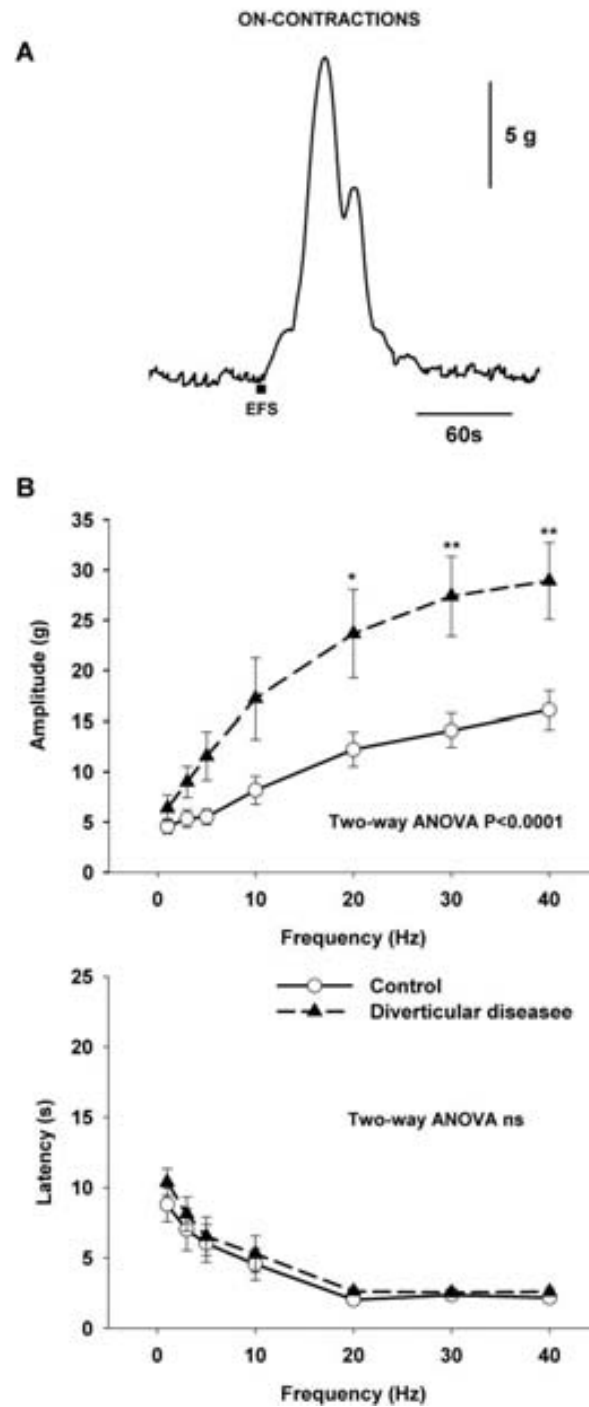


Figure 3. (A) Mechanical recordings showing representative tracings of EFS-induced ON-contractions. (B) Plot graphs showing the amplitude (top) and latency (bottom) of the EFS-induced contractions of the control group and the diverticular disease group at the different frequencies of stimulation (1, 3, 5, 10, 20, 30 and 40Hz). Data are expressed as mean \pm SD * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Electrophysiological results.

The mean resting membrane potential (RMP) of smooth muscle cells from the control group was -42.8 ± 4.0 mV while the RMP of smooth muscle cells from the DD group was more hyperpolarised -50.7 ± 4.6 mV (N=10 controls *versus* N=4 DD; $P < 0.001$). In addition, an increase in the amplitude of the inhibitory junction potential (IJP) was observed in the DD group of patients (N=10 controls *versus* N=4 DD; $P < 0.001$) (Figure 4).

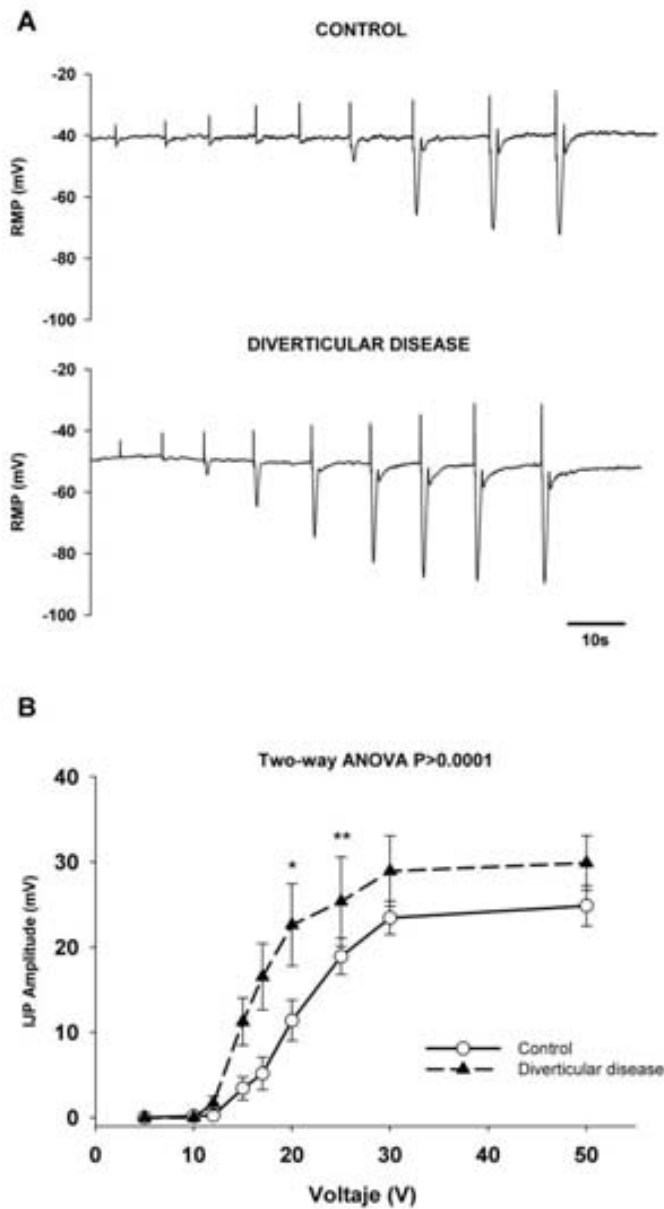


Figure 4. (A) Intracellular recordings showing the resting membrane potential and the inhibitory junction potentials elicited by EFS at different voltages of stimulation (5, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 and 50 Volts) of the control group (on top) and the diverticular disease group (bottom). (B) Plot graph and histogram showing the differences between groups. Data are expressed as mean \pm SD * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

6.2. Morphometric analysis of muscular layers and ENS.

H&E and immunohistochemistry staining showed no inflammatory changes and neither acute nor chronic inflammatory cells were observed in controls or patients with DD. No changes were observed in the number and density of nuclei of longitudinal and circular muscular layers for controls versus DD patients (Figure 5). Patients with DD showed similar size of the analyzed myenteric plexus ganglia, no differences were observed for density of glial cells and myenteric neuron density within the myenteric plexus ganglia area. We did not find any differences in the number of neurons per ganglion, glial cells per ganglion, and the glial index (the ratio between glial cells and neurons) was also similar among both groups (5.2 ± 2.2 control versus 4.8 ± 2.0 DD; $P=0.76$, Figure 5). No significant differences were observed in the number of ICC of both study groups and populations for circular smooth muscle and for longitudinal smooth muscle ICC nor for MP-ICC (Figure 5). See Table 1 for a summary.

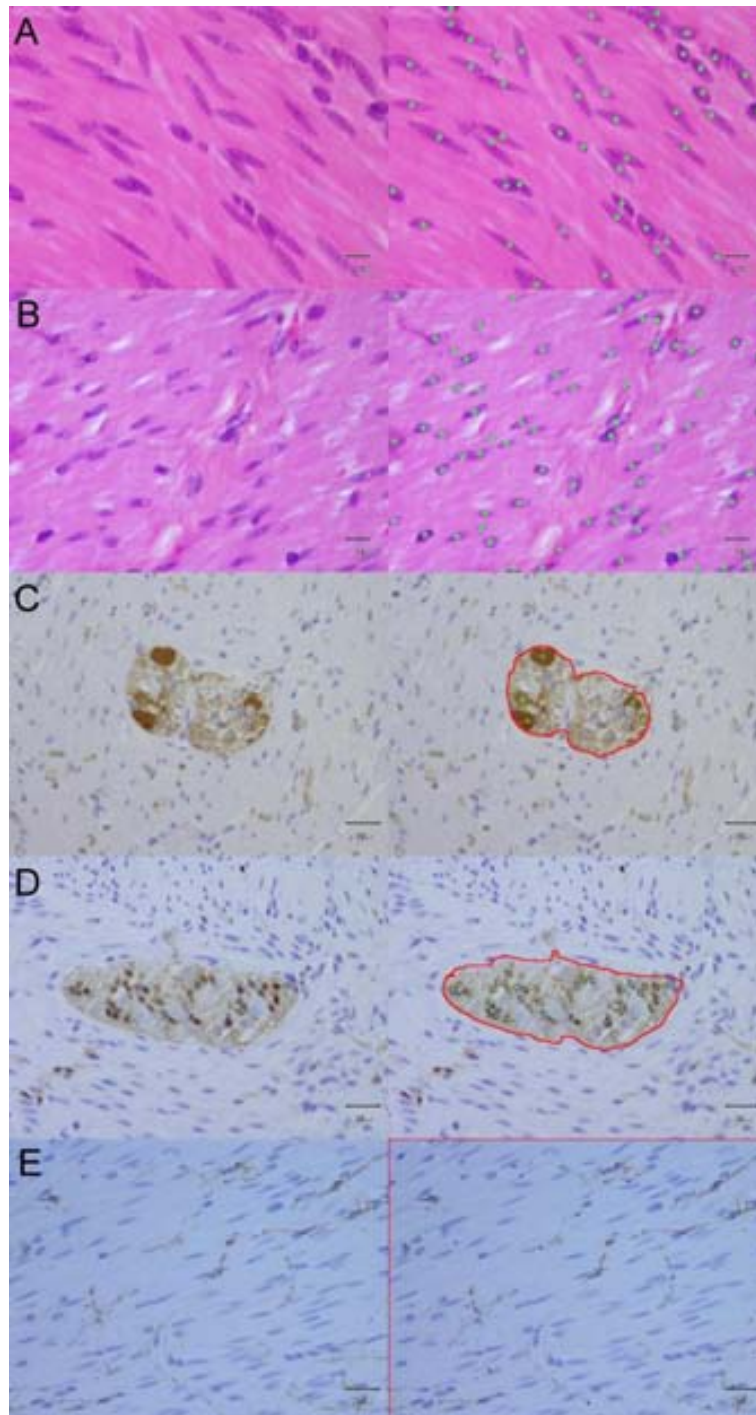


Figure 5. Images of the slides and the way the cells types were counted. **(A)** H&E staining of the circular smooth muscle layer (left) and semiautomatic counting depicting the smooth muscle nuclei (right) (Bar 10 μ m). **(B)** H&E staining of the longitudinal smooth muscle layer (left) and semiautomatic counting depicting the smooth muscle nuclei (right) (Bar 10 μ m). **(C)** Immunostaining with NSE (left) and semiautomatic counting displayed (right) (Bar 30 μ m) **(D)** Immunostaining with S-100 (left) and semiautomatic counting displayed (right) (Bar 30 μ m). **(E)** Immunostaining with c-Kit in the circular smooth muscle layer (left) and semiautomatic counting displayed (right) (Bar 30 μ m).

	Controls	Diverticular disease	P
Longitudinal layer nuclei density (cells/mm ²)	4881.0± 1962	3984.0±1102	0.34
Circular muscular layer nuclei density (cells/mm ²)	2027.0±404.5	1907.0±294.3	0.56
Myenteric plexus ganglia area (µm ²)	12788.0±5992.0	13030.0±3659.0	0.92
Myenteric neuron density (cells/mm ² of ganglia)	500.3±83.9	451.1±74.8	0.291
Glial cell density (cells/mm ² of ganglia)	1543.0± 272.7	1879.5± 334.1	0.07
Glial cells per ganglion	25.7 ±7.4	29.1±6.8	0.41
Myenteric neurons per ganglion	5.8±2.7	6.6±1.6	0.55
Ratio glial cells/neurons	5.2±2.2	4.8±2.0	0.76
MP-ICC (cells/mm ² of ganglia)	888.8±449.2	802.1±260.7	0.69
IM-ICC (cells/mm ²) circular smooth muscle	121.3±22.0	128.6±25.1	0.59
IM-ICC (cells/mm ²) longitudinal smooth muscle	123.4±22.4	133.4±77.8	0.75

Table 1. Summary of comparative morphometric analysis between controls and patients with DD. Values are expressed as mean ± SD.

7. DISCUSSION.

In this study we found that sigmoid and left colon strips from patients with asymptomatic diverticular disease (DD) showed a severe altered In vitro motor pattern consisting of a decrease in the amplitude and area under the curve of spontaneous motility (rhythmic phasic contractions), and altered mechanical responses induced by electrical stimulation of motor neurons with increased ON-contractions (induced by the stimulation of excitatory motoneurons) and increased latency in OFF-contractions (induced by inhibitory motoneurons) and correlated with enhanced inhibitory electrophysiological responses. In addition, these patients did not present any significant morphometric change in smooth muscle layers or in the key structures of the enteric nervous system ENS or ICC at this early stage of the disease, suggesting motor changes preceded further histopathological alterations in DD.

In our study, strips from both patients and controls developed non-neural spontaneous RPCs. Our results on the non-neural origin of this pattern of motility agree with previous human studies where RPCs were found to be caused by a network of ICC located at the submucosal border of the muscular layer and the myenteric plexus area [27]. RPCs are probably linked to the mixture of colonic contents and the uniform exposure of the feces to the absorbent colonic mucosal surface (Auli *et al.*, 2008). No apparent change in pacemaker (ICC) was observed in DD as there were no changes in ICC density and function (frequency of the spontaneous phasic contractions). We also found that our patients with DD had more hyperpolarized smooth muscle cells, and this is probably responsible for the decrease in spontaneous motility as bigger stimuli are necessary to reach L-type calcium channel opening in DD strips.

ON- and OFF-contractions are caused by stimulation of motor neurons in the myenteric plexus; latency of EFS-induced OFF-contractions and IJP are caused by stimulation of inhibitory EMNs co-releasing nitric oxide and a purine acting at muscular P2Y₁ receptors (Gallego *et al.*, 2008b; Auli *et al.*, 2008). EFS-induced *on*-contractions are caused by stimulation of excitatory EMNs co-releasing ACh and tachykinins acting on muscular muscarinic and NK₂ receptors (Auli *et al.*, 2008). In vitro ON-contractions are probably correlated with in vivo simultaneous contractions the most common pattern of pressure activity in the human colon, which can slow transit; and in vitro OFF-contractions are probably the equivalent to GMCs, or high-amplitude propagating contractions observed in in vivo manometric studies [11]. Previous studies suggested alteration in excitatory neurotransmitter synthesis as decreased acetylcholine synthesis and release resulted in hypersensitivity to exogenous acetylcholine, and is a consequence of a muscarinic M₃ receptor up-regulation (Golder *et al.*, 2003) in DD patients. Studies measuring in vivo colonic motility in patients with DD also indicated that the two main motor changes are increased postprandial intracolonic pressure and spasticity (Bassotti *et al.*, 2001; Trotman & Misiewicz, 1988). Our findings showed increased amplitude ON-contractions that are not related to muscular hyperplasia as we did not observe an increase in smooth muscle cells in the circular or longitudinal smooth muscle layers. Nevertheless these findings could be correlated with spasticity, postprandial tone and activity increase and with acetylcholine hypersensitivity and M₃ receptors up-regulation. In contrast, the higher active and passive tone observed in vitro in strips from patients with most advanced stages of DD (Maselli *et al.*, 2004), was not present in our preparations.

We also found changes in motility patterns following electrical stimulation of inhibitory motor neurons in the myenteric plexus with an increase in latency (OFF-contractions) and enhanced amplitude of IJP, suggesting an increase in inhibitory neurotransmitter synthesis and release or a muscular up-regulation of the targets of these inhibitory neurotransmitters. The two main inhibitory neurotransmitters involved in the human colon are nitric oxide and ATP (Gallego *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2008b) whereas peptides such as VIP and gaseous neurotransmitters such as CO or even the proposed neurotransmitter or neuromodulator H₂S (Gallego *et al.*, 2008a) could also play a role in this pathology. These mechanical changes were also well correlated in our study to electrophysiological changes: an altered resting membrane potential of smooth muscle cells hyperpolarized in DD samples and higher inhibitory junction potentials (IJP) induced by the enhanced release of inhibitory neurotransmitters.

Our study finds both decreased and increased in vitro motor responses (decreased spontaneous motility and increased amplitude of ON-contractions induced by stimulation of excitatory myenteric neurons) These results match with the in vivo results described by Parks (Parks & Connell, 1969) using miniature balloon technique (the duration of basal activity was reduced but the amplitude of waves was enhanced compared with controls). Other studies found that these patients presented enhanced motor and propulsive activities in the sigmoid colon mainly in the post prandial period, agreeing with the increased amplitude of ON-contractions observed in our study (Cortesini & Pantalone, 1991; Bassotti *et al.*, 2001). Our in vitro preparation includes only the muscularis propia (circular and longitudinal smooth muscle) and the myenteric plexus. The extrinsic mechanisms of motility control such as influences of autonomic and central nervous system and gastrointestinal hormones, very relevant in

the post prandial period, are not taken into account. Despite these limitations we found clear differences of in vitro motor patterns between the control group and asymptomatic patients with diverticular disease. Further studies are needed to establish possible alterations of the in vitro motor pattern in the different stages of DD and to extrapolate to in vivo motor patterns.

In contrast to these functional motor differences observed in DD patients, no major histological changes were observed in smooth muscle cells, myenteric neurons, glial cells and ICC densities. Although these data has to be carefully interpreted because of the number patients and samples analyzed, the numbers of neurons, ICC and glial cells are quite similar to those obtained in the human colon by other research groups using other experimental designs and methodologies (Bernard *et al.*, 2009;Gomez-Pinilla *et al.*, 2011). Our morphometric data are consistent with previous studies that reported unaltered neural densities in these patients (Bassotti *et al.*, 2005;Vuong *et al.*, 1985) but disagree with other previously published data: with a similar histological analysis, Wedel et al. (Wedel *et al.*, 2010) found a neural and glial cell decrease whereas the area of the myenteric plexus was increased for patients with diverticulitis and another study found that ICC and glial cells were decreased (Bassotti *et al.*, 2005). The discrepancies may be due to the fact that they studied patients at a more advanced stage of symptomatic DD many of whom had had previous episodes of diverticulitis. The histological changes could be attributable to the inflammation in acute episodes of diverticulitis, and several studies support this hypothesis as neural, glial and histological changes have been reported after inflammation (Keranen *et al.*, 1996;Neunlist *et al.*, 2003).

In summary, we found that patients with asymptomatic diverticular disease showed altered motor pattern in the sigmoid colon and electrophysiological responses without a major structural remodelling of the colonic neural and muscular elements. Our findings reveal several motor changes prior to the inflammation and structural changes in these patients and can be useful in the future to understand the natural history of this prevalent colonic disease and develop a pharmacological treatment for impaired motility in patients with DD.

References

Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M, & Clave P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.

Bassotti G, Battaglia E, Bellone G, Dughera L, Fisogni S, Zambelli C, Morelli A, Mioli P, Emanuelli G, & Villanacci V (2005). Interstitial cells of Cajal, enteric nerves, and glial cells in colonic diverticular disease. *J Clin Pathol* **58**, 973-977.

Bassotti G, Battaglia E, Spinozzi F, Pelli MA, & Tonini M (2001). Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity. *Dis Colon Rectum* **44**, 1814-1820.

Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, Linden D, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Camilleri M, Zinsmeister AR, Pozo MJ, Hicks GA, & Farrugia G (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 746-e46.

Cortesini C & Pantalone D (1991). Usefulness of colonic motility study in identifying patients at risk for complicated diverticular disease. *Dis Colon Rectum* **34**, 339-342.

Deduchovas O, Saladzinskas Z, Tamelis A, Pavalkis D, Pauziene N, & Pauza DH (2008). Morphologic pattern of myenteric neural plexus in colonic diverticular disease. A whole-mount study employing histochemical staining for acetylcholinesterase. *Ann Anat* **190**, 525-530.

Gallego D, Auli M, Aleu J, Martinez E, Rofes L, Marti-Rague J, Jimenez M, & Clave P (2010). Effect of otilonium bromide on contractile patterns in the human sigmoid colon. *Neurogastroenterol Motil* **22**, e180-e191.

Gallego D, Clave P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jimenez M, & Beyak MJ (2008a). The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil* **20**, 1306-1316.

Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P, & Jimenez M (2008b). Purinergic and nitrgic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G522-G533.

Gallego D, Hernandez P, Clave P, & Jimenez M (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G584-G594.

Golder M, Burleigh DE, Belai A, Ghali L, Ashby D, Lunniss PJ, Navsaria HA, & Williams NS (2003). Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *Lancet* **361**, 1945-1951.

Golder M, Burleigh DE, Ghali L, Feakins RM, Lunniss PJ, Williams NS, & Navsaria HA (2007). Longitudinal muscle shows abnormal relaxation responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease. *Colorectal Dis* **9**, 218-228.

Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Sarr MG, Kendrick ML, Shen KR, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T, Pozo MJ, & Farrugia G (2011). Changes in interstitial cells of cajal with age in the human stomach and colon. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 36-44.

Huizinga JD (1986). Electrophysiology of human colon motility in health and disease. *Clin Gastroenterol* **15**, 879-901.

Huizinga JD, Waterfall WE, & Stern HS (1999). Abnormal response to cholinergic stimulation in the circular muscle layer of the human colon in diverticular disease. *Scand J Gastroenterol* **34**, 683-688.

Iwase H, Sadahiro S, Mukoyama S, Makuuchi H, & Yasuda M (2005). Morphology of myenteric plexuses in the human large intestine: comparison between large intestines with and without colonic diverticula. *J Clin Gastroenterol* **39**, 674-678.

Jeyarajah S & Papagrigroriadis S (2011). Review article: the pathogenesis of diverticular disease - current perspectives on motility and neurotransmitters. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 789-800.

Keränen U, Jarvinen H, Kiviluoto T, Kivilaakso E, & Soynila S (1996). Substance P- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive innervation in normal and inflamed pouches after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* **41**, 1658-1664.

Maselli MA, Piepoli AL, Guerra V, Caruso ML, Pezzolla F, Lorusso D, Demma I, & De PF (2004). Colonic smooth muscle responses in patients with diverticular disease of the colon: effect of the NK2 receptor antagonist SR48968. *Dig Liver Dis* **36**, 348-354.

Matrana MR & Margolin DA (2009). Epidemiology and pathophysiology of diverticular disease. *Clin Colon Rectal Surg* **22**, 141-146.

Mimura T, Bateman AC, Lee RL, Johnson PA, McDonald PJ, Talbot IC, Kamm MA, MacDonald TT, & Pender SL (2004). Up-regulation of collagen and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in colonic diverticular disease. *Dis Colon Rectum* **47**, 371-378.

Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, & Galmiche JP (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84-90.

Parks TG & Connell AM (1969). Motility Studies in Diverticular Disease of Colon .I. Basal Activity and Response to Food Assessed by Oren-Ended Tube and Miniature Balloon Techniques. *Gut* **10**, 534-&.

Rao SS, Sadeghi P, Beaty J, Kavlock R, & Ackerson K (2001). Ambulatory 24-h colonic manometry in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G629-G639.

Sarna SK (2006). Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G545-G555.

Thomson HJ, Busuttil A, Eastwood MA, Smith AN, & Elton RA (1987). Submucosal collagen changes in the normal colon and in diverticular disease. *Int J Colorectal Dis* **2**, 208-213.

Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K, & Fukuzawa M (2000). Role of nitric oxide in the left-sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatogastroenterology* **47**, 692-696.

Trotman IF & Misiewicz JJ (1988). Sigmoid motility in diverticular disease and the irritable bowel syndrome. *Gut* **29**, 218-222.

Vuong NP, Sezeur A, Balaton A, Malafosse M, & Camilleri JP (1985). [Myenteric plexuses and colonic diverticulosis: results of a histological study]. *Gastroenterol Clin Biol* **9**, 434-436.

Wedel T, Busing V, Heinrichs G, Nohroudi K, Bruch HP, Roblick UJ, & Bottner M (2010). Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 407-4.

Whiteway J & Morson BC (1985). Elastosis in diverticular disease of the sigmoid colon 13. *Gut* **26**, 258-266.

ANEXO 1.

Estudio morfológico en enfermedad diverticular asintomática, cambios a nivel muscular, de sistema nervioso entérico e ICCs. Desarrollo de un método de análisis histológico semiautomático.

Resumen.

Aunque la patogénesis de la enfermedad diverticular probablemente sea multifactorial y responda a diferentes causas, una de las causas a las que se ha atribuido es a cambios histológicos en la pared del colon. Se han descrito cambios morfológicos en ICCs, Células gliales y sistema nervioso entérico de pacientes con enfermedad diverticular, y los datos publicados al respecto son escasos y en algunos casos contradictorios. En este sentido hay que tener en cuenta que en muchos de los estudios no se toma en consideración el estadio evolutivo de la enfermedad en que se encuentran los pacientes y si han sufrido episodios previos de de diverticulitis. Por otro lado, tal y como se comenta en la introducción general de la tesis los cambios observados en algunos de los estudios podrían deberse a la inflamación asociada a la diverticulitis. En el capítulo 1 de esta Tesis se realiza un estudio histológico comparativo entre muestras de colon sigma humano de pacientes con diverticulosis y un grupo control. El objetivo de este Anexo es describir en detalle el método de procesado en el análisis de las muestras, tanto en tinción convencional con Hematoxilina-eosina como mediante técnicas de inmunohistoquímica; así como valorar la presencia o no de cambios estructurales en las muestras de pacientes con diverticulosis. Por otro, lado se detalla también el método de desarrollo de un programa informático para el recuento semiautomático de los diferentes tipos celulares estudiados, a la vez que se analiza su utilidad y rendimiento.

1. Introducción.

El objetivo de este apéndice es profundizar y aportar toda aquella información detallada acerca del proceso de recogida, procesamiento y análisis morfométrico para el estudio histológico comparativo de los elementos de la pared del sigma entre pacientes con diverticulosis y control. Diferentes autores han descrito diferencias histológicas en pacientes con enfermedad diverticular, como se explica en la introducción general (tabla 1), aunque en la mayoría de ocasiones las muestras son heterogéneas en cuanto al estadio en que se encuentran los pacientes, o bien no se toma en cuenta ni el estadio ni los episodios inflamatorios. Por lo tanto hemos creído necesario analizar posibles alteraciones en los principales tipos celulares implicados en el control de la motilidad intestinal, y que participan en la mezcla y propulsión del contenido, ya sea originando o modulando los principales patrones motores (células marcapasos, motoneuronas), o bien, como elemento final en la contracción muscular (células musculares lisas).

Este estudio se ha llevado a cabo en pacientes con diverticulosis, es decir, en presencia de divertículos sin que estos hayan comportado previamente sintomatología alguna, descartando por tanto cualquier paciente que haya sufrido episodios inflamatorios. La presencia de estos divertículos ha sido en todos los casos hallazgo casual en el contexto del diagnóstico de cáncer colorectal. Se ha revisado retrospectivamente la historia clínica previa y los estudios realizados durante el proceso de diagnóstico (Endoscopias, tomografía computerizada, enema opaco) para descartar la presencia trastornos de la motilidad y de cuadro oclusivo en el momento de la cirugía. Hemos

revisado también el informe patológico para corroborar la ausencia de procesos inflamatorios activos o alteraciones estructurales relevantes en las muestras.

A continuación se presentan los métodos de regida y procesado de las muestras. Después del periodo en que se estudiaron las muestras se publicó una propuesta de guía para la estandarización de estudios con muestras histológicas para la evaluación de patologías que afectan al tracto gastrointestinal (Knowles *et al.*, 2009), en este apéndice se detalla nuestra metodología y se correlaciona con ésta normativa. Además se explica cómo se ha desarrollado el programa informático mediante el que se llevó a cabo la cuantificación de los diferentes tipos celulares.

2. Características generales y método de procesado.

2.1. Cuantificación de elementos estructurales y alteraciones histológicas más relevantes.

Túnica muscularis (Hiperplasia e hipertrofia muscular).

Se define como hiperplasia al aumento de número de células, en este caso aumento en el número de miocitos, e hipertrofia al aumento de volumen de la unidad celular, en este caso aumento en el tamaño del miocitos. En referencia a estos dos aspectos no se han descrito cambios en las capas musculares de muestras de pacientes con enfermedad diverticular. Aunque algunos autores argumentan cambios en la proporción de miocitos tanto en capa circular como longitudinal, estos datos son de dudosa significación debido a las particularidades del colon como son la presencia de tenias, en ocasiones adelgazada y sin que ello corresponda a patología subyacente, también puede verse afectado por diferentes variaciones experimentales como la distensión o contracción del segmento colónico en el momento del procesado, se podrían dar incluso cambios con la fijación (Lake *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 2009).

Cabe comentar que la hiperplasia de la capa muscular puede verse como un fenómeno secundario en el colon en casos de estreñimiento con tránsito enlentecido o en segmentos pre-estenóticos de la enfermedad de Hirschsprung (Anauras *et al.*, 1986, Lake *et al.*, 1989; Knowles *et al.*, 2000).

Células intersticiales de Cajal. Mesenquimopatía entérica.

Se define la mesenquimopatía entérica como la alteración tanto en número como en densidad de las Células intersticiales de Cajal (ICCs). Para ello existen tanto criterios cualitativos como cuantitativos (Zárate *et al.*, 2003). Esta alteración se produce de forma fisiológica con la edad y en determinadas condiciones inflamatorias, observándose también en neuropatías degenerativas del Sistema Nervioso entérico (Schuffler *et al.*, 1982; Lindberg *et al.*, 2009). El diagnóstico tan solo puede hacerse con técnicas de inmunohistoquímica, ya sea con tinciones con c-kit o anticuerpos específicos. Sin embargo no existe una determinación clara en la variabilidad del número de ICCs para cada capa del colon humano ni según la edad para ser considerada como normal. Se acepta que una reducción en más del 50% del número de células como patológica (Farrugia *et al.*, 2008), si bien métodos más complejos y costosos como secciones mayores a 20µm evaluadas con microscopio de fluorescencia o microscopía confocal en preparaciones *whole-mount*, podrían aportar mayor información. Los cambios cualitativos en la morfología de las ICCs, acompañados de pérdida en el número de las mismas reafirma el diagnóstico de mesenquimopatía entérica (Knowles *et al.*, 2009).

El marcador de elección para las ICCs suele ser c-Kit aunque actualmente se ha propuesto el marcador ANO1 como más específico para las ICCs ya que no se

encuentra en los mastocitos (Gómez-Pinilla *et al.*, 2009, Blair *et al.*, 2012) aunque son muy pocos los estudios que lo utilizan actualmente, ya que la morfología de las ICCs hace muy difícil que sean confundidas con mastocitos.

Plexo Mientérico (Ganglios mientéricos).

En este estudio hemos valorado los ganglios del plexo mientérico ya que es el plexo que interviene fundamentalmente en el control de la motilidad colónica, mientras que el plexo submucoso interviene principalmente en otras funciones como la secretora.

Como se ha comentado en la introducción el plexo mientérico discurre en ambas capas musculares del colon. Esta estructura neuroanatómica está formada por una serie de ganglios mientéricos donde se encuentran diferentes tipos celulares (neuronas, células gliales e ICCs). Si bien no existe discusión acerca de la definición de plexo mientérico, sí se discute qué estructura debe ser considerada un ganglio mientérico (Wedel *et al.*, 2002). Se ha propuesto que la presencia de dos o más motoneuronas rodeadas de tejido perineural forma una unidad ganglionar (Knowles *et al.*, 2009). Debe tenerse especial consideración el hecho de que una sola unidad neuronal puede corresponder a la sección tangencial de un ganglio mientérico y que una misma motoneurona puede ser contada varias veces dada la naturaleza lobulada de los ganglios en el colon humano (Bassotti *et al.*, 2005; Knowles *et al.*, 2010).

Los criterios utilizados para identificar las motoneuronas son cruciales para un contaje que sea lo más fiel posible a la realidad. La evaluación con histología convencional ha sido utilizada, pero son pocos los autores que han establecido criterios claros para su estudio. Actualmente se considera la resolución que aportan las técnicas de inmunohistoquímica como el estándar para este análisis (Dzienis-Koronkiewicz *et al.*, 2002). Sin embargo son muchas y variadas las técnicas que se pueden aplicar, entre

ellas cabe destacar el marcaje para PGP9.5 (marcador neural y de fibras nerviosas), NSE (tinción de citoplasma neuronal), Chat (marcaje específico de neuronas colinérgicas) y HuC/D (tinción por inmunofluorescencia de núcleos neuronales y leve de en el citoplasma). En nuestro estudio hemos utilizado como marcador la NSE (Neuron Specific Enolase) que marca los pericarion neuronales (Lindberg *et al.*, 2009). La evaluación de células gliales se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando el marcador S100, esta tinción marca la mielina presente en las células gliales, sin embargo no define con claridad todas las subpoblaciones de éstas, además son solo tres grupos de investigadores los que han definido la densidad de células gliales en un número escaso y heterogéneo de publicaciones (Smith *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2009; Knowles *et al.*, 2009).

El acúmulo o incremento de densidad de células gliales es un indicador de degeneración o pérdida neural, traducción de diferentes tipos de neuropatías, primarias o secundarias (Schuffler *et al.*, 1982; Knowles *et al.*, 2009).

3. Método de procesado.

Diferentes aspectos en la técnica de procesado de las muestras puede afectar al resultado final, es por ello que se ha llevado a cabo un protocolo de estandarización y de circuito de muestras para evitar defectos en la posterior valoración y en el deterioro de los tejidos. Aspectos que han sido clave en este punto son el tiempo entre la obtención de las muestras y su procesado, evitar variaciones en el método de fijación, orientación y longitud del tejido, espesor de los cortes. Control de los cambios de temperatura en la fijación de los diferentes anticuerpos.

En líneas generales, existe cierta variabilidad en el grosor de las secciones en las diferentes publicaciones, se suelen estudiar cortes entre 3 y 6 μ m para el estudio con Hematoxilina-Eosina (H&E) y entre 3-6 μ m o 10-16 μ m para las determinaciones con inmunohistoquímica, según sea con microscopio óptico o inmunofluorescencia, respectivamente. Respecto a la orientación del bloque anatómico, y es especial para la evaluación de plexos mientéricos, tanto la orientación transversal como longitudinal pueden ser válidas, sin embargo es la disposición transversal la más utilizada.

Las estructuras anatómicas que podemos observar y evaluar se pueden valorar en la siguiente imagen, donde con detalle y a pocos aumentos se detallan los elementos estructurales que participan en las diferentes capas del colon sigma humano. Se pueden observar como la tinción con H&E puede discriminar bien la capa muscular de los plexos mientérico y submucoso, así como aporta un primer y valioso dato respecto a la calidad del bloque de parafina, respetando los diferentes componentes histológicos, lo que nos permitirá completar el estudio histológico mediante las tinciones específicas de inmunohistoquímica (con los diferentes marcadores para glia, neuronas e ICCs).

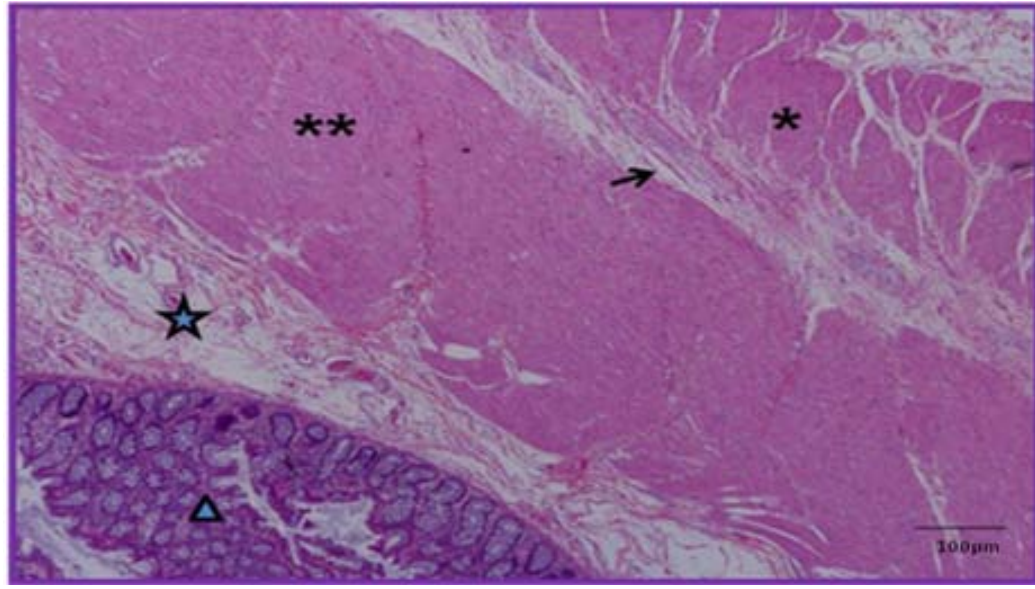


Figura 1. Tinción con Hematoxilina-Eosina a 10x en paciente control. Diferentes capas de un corte transversal de sigma humano. (**) Capa muscular circular, (*) Capa muscular longitudinal, (flecha) Plexo mientérico, (estrella) Plexo submucoso, (triángulo) Capa mucosa.

4. Obtención y procesamiento de las muestras.

Para el estudio morfológico, en todos los casos, se han analizado segmentos de sigma humano dispuestos en cortes transversales a la disposición de las diferentes capas histológicas que componen el intestino grueso. Las muestras de tejido fueron fijadas, inmediatamente después de la resección quirúrgica, en formaldehído frío al 4% preparado con tampón fosfato 0.2M durante 24 horas, y posteriormente deshidratadas e incluidas en parafina. En todos los bloques analizados la orientación engloba el segmento de tenia libera. Las secciones de parafina fueron montadas en portaobjetos de vidrio y guardadas para su posterior procesado en el Servicio de Anatomía Patológica.

Para el estudio histológico convencional que ha dado lugar al análisis de densidad de células en las capas musculares, se ha procedido a la tinción con hematoxilina-eosina utilizando cortes de entre 3-4 μ m. Se han analizado campos en microscopio óptico a 40 aumentos, obteniendo áreas a estudio de 0,221 mm².

Para llevar a cabo el preacondicionamiento de las técnicas de inmunohistoquímica, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas. Posteriormente se realizaron diversos lavados en agua destilada y PBS (pH 7.4). El bloqueo de peroxidasas endógenas se llevó a cabo incubando con peróxido de hidrógeno al 2% en PBS (pH 7.4) durante 25 min. Un bloqueo estándar para evitar posibles uniones inespecíficas se realizó con BSA 0.2% diluido en PBS con Triton X-100 al 0.2% y Tween 20 al 0.05%. El revelado se realizó incubando con Diaminobenzidina (DAB) añadiendo 100µl de peróxido de hidrógeno en PBS. Las muestras fueron contrastadas con Hematoxilina para una mejor exposición de los diferentes elementos celulares. Se ha utilizado un inmunoprocador Dako - Autostainer Plus (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark).

Para el análisis de **neuronas y células gliales del plexo mientérico** se han utilizado técnicas de inmunohistoquímica a partir de Enolasa neural específica, NSE, (Anticuerpo monoclonal anti-NSE humana; dilución 1/200; Dako, Glostrup, Denmark) y la proteína marcador glial S-100, (anti-S-100; dilución 1/50; Dako, Glostrup, Denmark). Se han analizado el número de neuronas y el área ganglionar por campos de microscopía óptica a 20 aumentos, obteniendo como resultado la densidad de motoneuronas en campos de 0,886 mm².

Para el estudio de **Células intersticiales de Cajal (ICCs)**, se han utilizado la tinción específica con el anticuerpo CD-117 (c-kit), a partir del anticuerpo policlonal (*Rabbit polyclonal antibody*; IgG, dilución 1/50; Dako) que marca el receptor de membrana tirosina kinasa específica de este grupo celular. Se ha analizado el número de ICC por campo en plexo mientérico (ICCs-PM) y en la región intramuscular (ICCs-IM). Para el control positivo interno se han utilizado los propios mastocitos identificados en la preparación, ya que estos se encuentran en un pequeño número, en condiciones

normales en la mucosa, si bien una presencia excesiva indica inflamación aguda, este no fue el caso en las muestras estudiadas. Como control positivo externo se utilizaron fragmentos de tumores estromales gastrointestinales (GIST), ambos Kit positivos. Se han analizado el número de ICCs por campo de microscopía óptica a 20 aumentos, obteniendo campos de 0,886 mm².

El control negativo se ha realizado en todos los casos omitiendo el anticuerpo primario. Así, para cada muestra final dispuesta en un portaobjeto se ha contado con un control positivo y uno negativo.

Se ha utilizado un microscopio óptico Nikon eclipse E600 (Nikon Instruments Inc. NY, USA) y las imágenes han sido capturadas y procesadas mediante una cámara digital Olympus (Olympus Dp20-5e, Tokyo, Japan).

A continuación se detalla la valoración y características de cada elemento estructural que hemos estudiado, comentando las dificultades a la hora de cuantificar nuestros datos experimentales y como se llevó a cabo el análisis morfométrico manual y el informatizado.

5. Valoración de Capas musculares.

Se ha considerado la tinción con Hematoxilina- Eosina como una buena tinción para la valoración de las capas musculares del sigma humano, teniendo en cuenta cada miocito como una unidad celular muscular y que a cada unidad le corresponde un único núcleo. Se ha valorado una posible hiperplasia o hipertrofia en la capa muscular como un aumento o disminución indirecta de unidades musculares para un área determinada, respectivamente.

A continuación se muestra una figura donde se puede apreciar la morfología de los núcleos en función de la disposición de las capas musculares, así como la viabilidad de la técnica de recuento, tanto de forma manual como informatizada. Figura 2.

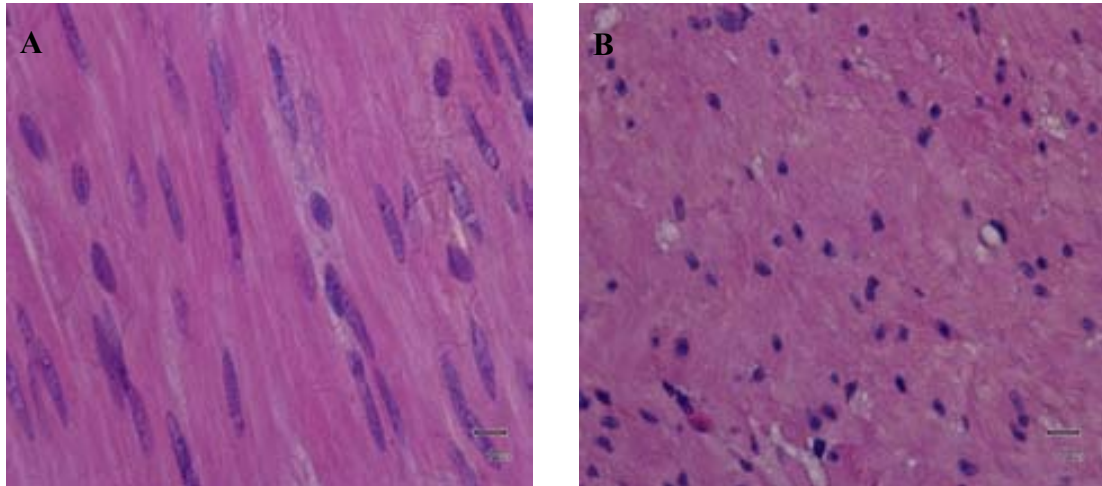


Figura 2. Tinción con Hematoxilina-Eosina de capas musculares lisas. (A) Capa muscular circular en paciente control y (B) capa muscular longitudinal en paciente con diverticulosis. Campo original a 10x. Barra 10 μ m.

6. Valoración de células intersticiales de Cajal (ICCs).

La identificación de ICCs ya ha sido descrita previamente como difícil y complicada debido a la escasa densidad de las mismas en determinadas zonas del sigma humano, en especial en la región submucosa. Para su identificación se ha considerado la tinción con el marcador c-Kit ya que proporciona una gran discriminación en la tinción de este grupo celular, posee un control positivo “natural” como son los mastocitos de la mucosa y de calidad de la tinción como son las muestras de tumor del estroma gastrointestinal. Figura 3.

Inicialmente se ha llevado a cabo un análisis manual estandarizado de las diferentes muestras que nos ha permitido conocer con precisión el rendimiento de las diferentes tinciones, ajustar los métodos de procesado y los campos de contaje. Finalmente este trabajo ha permitido el desarrollo de un programa informático que permite valorar con precisión diferentes elementos celulares implicados en la neurotransmisión neuroefectora a nivel colónico.

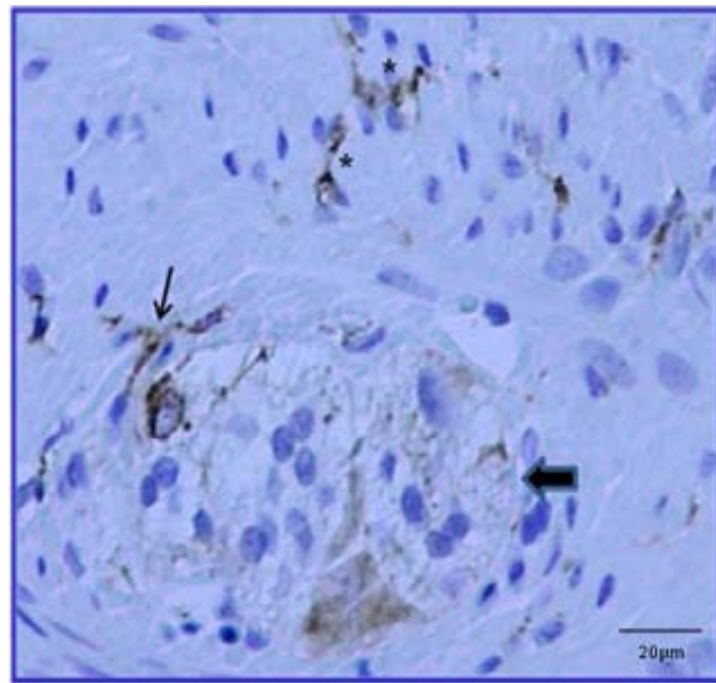


Figura 3. Detalle ampliado de Inmuniistoquímica de plexo mientérico con c-Kit a 20x. Paciente control. Ganglio de plexo mientérico (flecha gruesa) y Células Intersticiales de Cajal (flecha fina) en plexo mientérico (ICC-PM). También pueden observarse Células intersticiales de Cajal (asteriscos) en la región intramuscular (ICC-IM).

7. Valoración de Neuronas y glia.

El estudio del plexo mientérico, neuronas y glia, se ha realizado mediante inmunohistoquímica con Enolasa Neural Específica y tinción S-100. Las neuronas de plexo mientérico pueden definirse con facilidad mediante la tinción de su citoplasma con Enolasa, dejando menos marcados los somas neuronales. Figura 4.

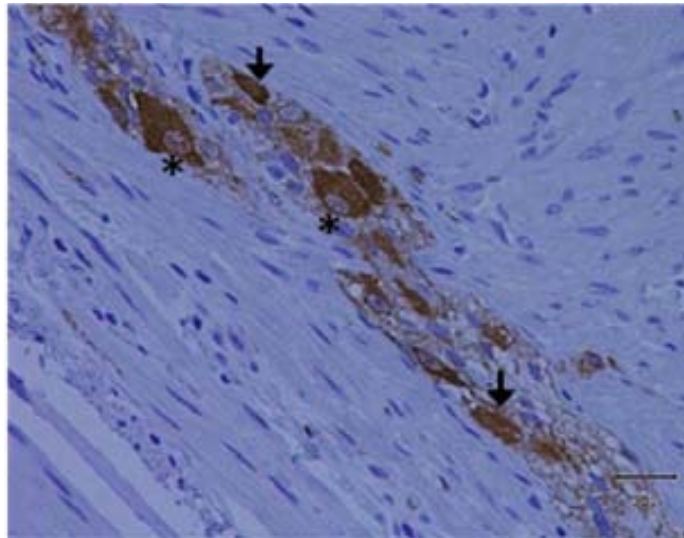


Figura 4. Tinción con Enolasa Neural Específica a 20x en paciente con diverticulosis. Las neuronas son identificadas mediante la expresión de Enolasa que marca su citoplasma (flechas), dejando visibles los núcleos neuronales más basófilos (asteriscos).

La tinción neuroglial con S-100 marca los ganglios del plexo mientérico, considerando núcleos de motoneuronas como aquellos inmunopositivos y rodeados de tejido neuroglial (células gliales y de Schwann) con tinción menos prominente. Se han analizado el número de motoneuronas y el área ganglionar por campos de microscopía óptica a 20 aumentos, obteniendo como resultado la densidad de motoneuronas en campos de 0,886 mm².

En las figuras 5, 6 y 7 se muestran las imágenes de diferentes elementos del plexo mientérico que han sido procesadas para el recuento manual como semiautomático.

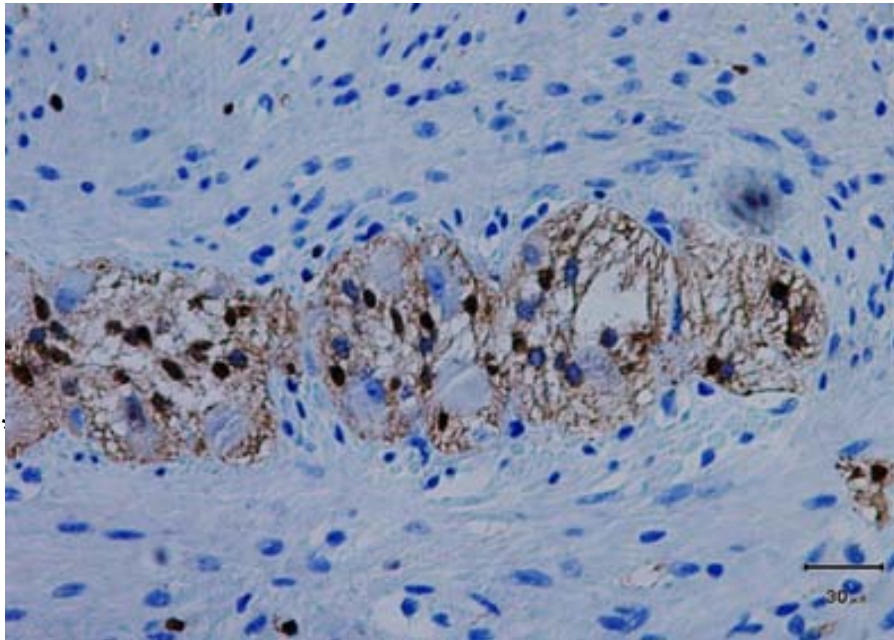


Figura 5. Inmunohistoquímica con S-100 a 20x. Plexo mientérico de un paciente con enfermedad diverticular. En azul se tiñen las capa musculares (circular y longitudinal), en marrón se tiñen los núcleos de las motoneuronas del plexo mientérico.

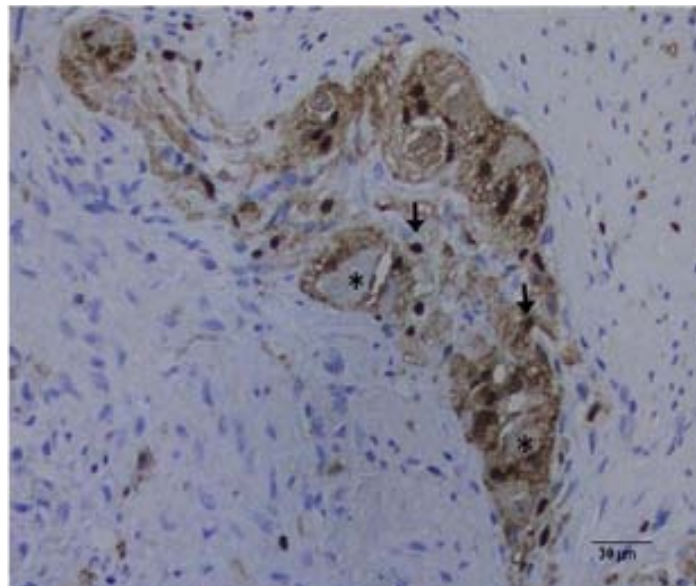


Figura 6. Inmunohistoquímica con S-100 a 20x. Plexo mientérico de un paciente control. Se pueden apreciar las motoneuronas del plexo como más prominentes y con citoplasma denso (asteriscos). Marcadas de color marrón intenso los nucleolos de las células gliales que organizan el plexo mientérico (flechas).

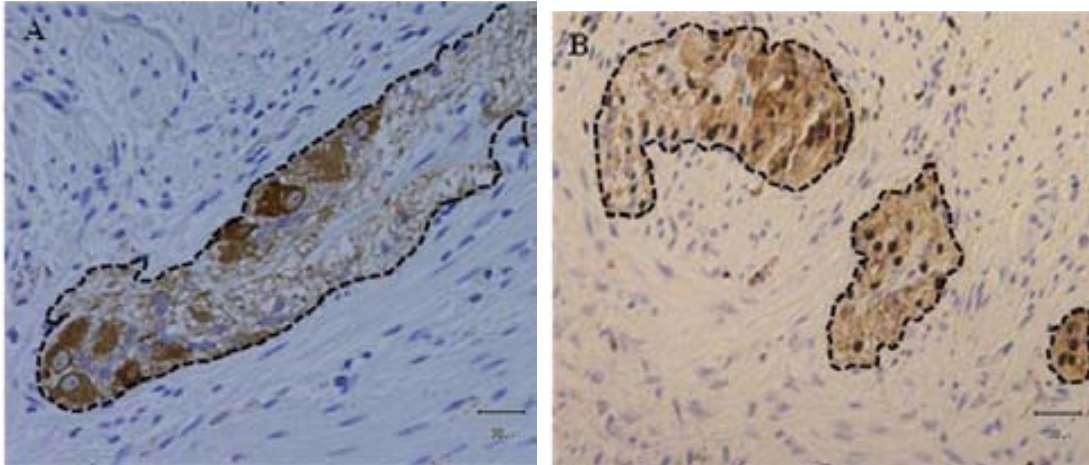


Figura 7. Tinción inmunohistoquímica con Enolasa Neural Específica (A) y S-100 (B) a 20x, para evaluación de plexos mientéricos. Se ha marcado con línea discontinua el área ganglionar.

8. Procesado de las imágenes para el análisis morfométrico informatizado.

En colaboración con la Universidad de Tecnología, Facultad de ingeniería eléctrica y de la comunicación, de Brno (República Checa) y l'Escola Universitària Politècnica de Mataró (Tecnocampus) se inició el desarrollo de un método de contaje informatizado para la evaluación del tejido colónico previamente recogido y procesado. El objetivo de este proyecto fue desarrollar un programa informático que permitiera la detección semiautomática de los diferentes tipos celulares (determinación de áreas ganglionares y la densidad celular en diferentes elementos) reduciendo el tiempo de recuento sin reducir la sensibilidad de dectección.

Para todo ello ha sido necesario diseñar tres nuevas herramientas que se han incorporado al programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java). Éstas son, para el análisis de núcleos de capas musculares, recuento de motoneuronas y glía de plexo mientérico y recuento de ICC en sus diferentes localizaciones. Estas tres nuevas herramientas se han usado como aplicaciones para incrementar la precisión de los

resultados. La documentación del soporte informático se puede visualizar en el enlace siguiente; <http://rsbweb.nih.gov/ij>.

Una de las posibles causas de sesgo ha sido la variabilidad de celularidad según campo de observación, para evitar éste se han analizado cinco campos a 20 aumentos para cada paciente y por cada estructura histológica a analizar, siendo la media de estas mediciones la que se ha tomado para el resultado final.

A continuación definiremos los detalles para una mayor aproximación en función de la celularidad a evaluar. Para ello se han tenido en cuenta métodos colorimétricos y morfométricos.

Análisis de capas musculares

Del mismo modo que en la evaluación manual, se ha considerado el número de núcleos por campo de observación como la aproximación más adecuada y factible, considerando cada núcleo como una célula muscular lisa. Los resultados se han expresado como densidad celular como la relación entre número de núcleos por área observada.

El programa ImageJ ofrece una serie de posibilidades para optimizar los detalles de las imágenes y en consecuencia el recuento de estructuras musculares. Las imágenes de la capa de músculo liso se analizaron mediante tres procedimientos: recuento manual, imagen sin ninguna herramienta, recuento automático, mediante una herramienta diseñada para esta aplicación (PlugIn para software ImageJ) y recuento semiautomático por la misma herramienta con procesamiento en paralelo de 5 regiones de intereses del mismo tejido seguido de resultados promedio para aumentar la precisión. Una vez acabado el procesamiento de las imágenes se obtienen como

resultado un número de unidades celulares y se establece la densidad celular dada a un tamaño de campo conocido.

Los pasos que se han seguido para esta determinación son los siguientes:

- **Cambio de tamaño:** El primer paso consiste en el procesamiento automático de cambio de tamaño, reducción del 50% del original con el fin de acelerar el procesamiento.
- **División de las canales de color:** Las imágenes musculares circulares y longitudinales tiene un mejor contraste para el canal rojo.
- **Suavizado:** Este método permite un mejor control de los límites celulares y la determinación de células interrumpidas, parcialmente visualizadas. Los mejores resultados se obtuvieron por medio del filtrado de la mediana.
- **Umbral:** Después de suavizar la imagen, se segmenta mediante una técnica de determinación de umbrales. El umbral establece los límites celulares definitivos mediante el método del triángulo.
- **Esqueletización:** Después de digitalizar la imagen, se establece una alta simplificación de la imagen a esqueletos celulares, como resultado se obtiene una imagen binaria.
- **Contaje:** Se establece el número de esqueletos que equivalen a cada una de las unidades celulares.
- **Supervisión:** Revisión manual del resultado anterior. En este proceso se pueden establecer dos tipos de errores. La no detección, en este caso una célula no es detectada por el método automático y se debe añadir manualmente, y la falsa

detección, se detecta un posible esqueleto sin que éste corresponda a una célula, por lo que se debe quitar manualmente.

En siguiente figura se muestran los pasos seguidos para la elaboración de este método de procesamiento de imágenes.

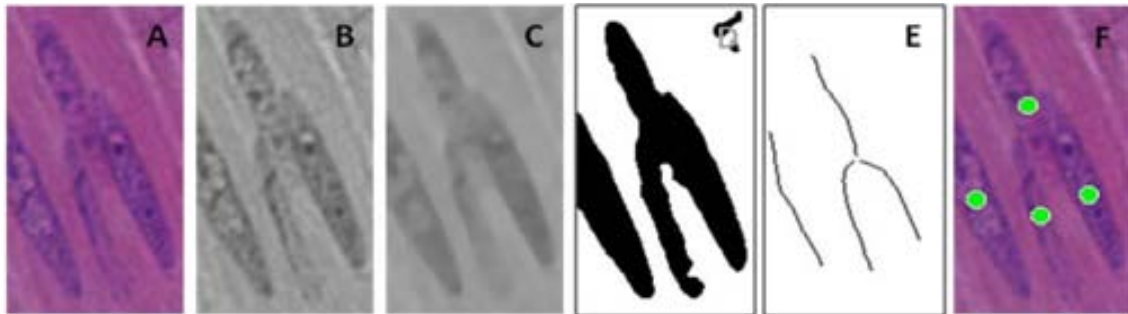


Figura 8. *Procesado de imagen de capa muscular circular. Esquematización de los pasos para la elaboración de la herramienta para el procesamiento de imágenes. a) detalle de imagen original, b) división en canales de color, canal rojo c) canal rojo después de suavizado y filtrado, d) imagen segmentada, e) esqueletización de estructuras, f) resultado final con marcaje en cada unidad celular.*

Análisis del plexo mientérico (Neuronas y glía).

Para ello se ha elaborado una segunda herramienta diseñada con objeto de determinar el contaje de motoneuronas y de células gliales. El algoritmo utilizado consiste en dos pasos principales, identificación de los ganglios de plexo mientérico, mediante el cual el programa obtiene y delimita la región de interés para el cálculo del área ganglionar (definir tamaño de imagen, división por canales de color, optimización exposición, operaciones binarias, supervisión manual de contornos y cálculo del áreas), y al recuento de neuronas/células gliales en cada ganglio con la consiguiente supervisión de falsas detecciones y ausencia de detecciones. Finalmente se obtiene la densidad de neuronas y células gliales para su evaluación y comparación entre grupos. Para la evaluación morfológica mediante el sistema informatizado, se utilizó un algoritmo semiautomático que consta de los siguientes pasos:

- **Cambio de tamaño:** División de canales de color, suavizado y determinación de umbral, al igual que en el método para el recuento celular.
- **División manual de núcleos superpuestos.**
- **Determinación de elipses:** A cada estructura celular se la delimita con una elipse para la evaluación de las dimensiones.

En la siguiente figura se muestra esquematizado el procesamiento de la imagen.

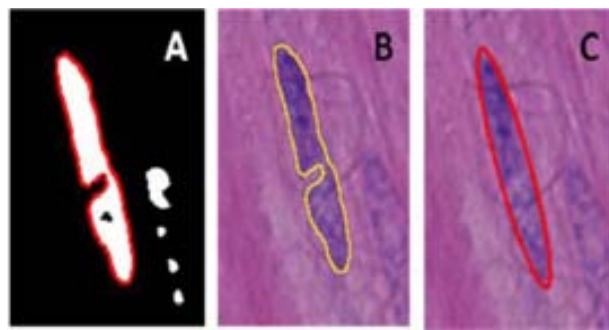


Figura 9. Evaluación de forma y densidad celular mediante elipses para células nucleadas. A) selección del límite celular de un objeto aislado. B) Ajuste de delimitación en la imagen original. C) elipse ajustada a la delimitación de células nucleadas.

Una vez establecido el límite celular, se dispone de las dimensiones celulares en dos ejes, longitudinal y transversal, lo que permite calcular las diferentes áreas celulares.

El número de células se evaluó mediante tres métodos: 1) recuento manual, 2) recuento automático y supervisión de resultados, 3) recuento automático en 5 regiones del mismo tejido con el promedio de los resultados y supervisión directa.

A continuación se muestra a modo de ejemplo la mejoría en el rendimiento del recuento de núcleos en capa muscular tanto circular como longitudinal en grupo control y diverticular. Figura 10.

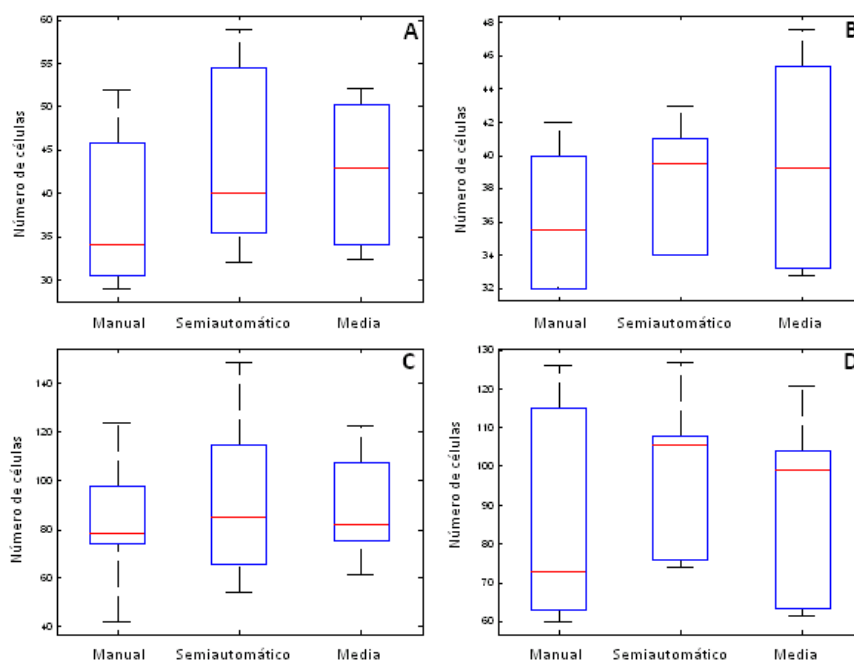


Figura 10. Box-plot que muestra el aumento en rendimiento de conteo de células en la evaluación de capas musculares. A: Capa circular grupo control, B: capa circular grupo diverticulosis, C: Capa longitudinal grupo control, D: capa longitudinal grupo diverticulosis.

9. Estudio comparativo del tiempo de procesamiento manual y el automático.

Si bien el recuento celular automático precisa de supervisión manual, se ha establecido el tiempo estimado de recuento para este método en comparación con el manual.

Hemos podido determinar que el tiempo de recuento se acorta un 75% respecto al tiempo manual incluyendo 20 segundos adicionales para la supervisión de cada imagen aislada. De esta manera el tiempo de recuento de 13 grupos de 5 imágenes pasa de 6,5 horas a 52 minutos mediante el método semiautomático. En la tabla 1 se muestran las diferencias en tiempo de recuento para capas musculares.

	Procesado Manual	Procesado automático seguido de supervisión manual
Tiempo de procesado de una imagen	3 minutos	4 seg. + 20 seg. de supervisión
Tiempo de procesado de 26 imágenes	78 minutos	10,4 minutos
Tiempo de procesado de 13 grupos de 5 imágenes	390 minutos	52 minutos

Tabla 1. Comparación aproximada del tiempo necesario para el cálculo manual y el procesamiento automático para el cálculo de núcleos de capas musculares. Imágenes a 800x600 con 65 células, CPU Intel Core i3 350M 2.26GHz, 4GB RAM, Windows XP Prof.

10. Conclusiones.

La elaboración de este método semiautomático permite la detección de los principales tipos celulares implicados en el control de la motilidad intestinal (ICC y neuronas), y de las células musculares lisas del colon humano, mejorando el tiempo de recuento global, pasando por ejemplo, de 180 a 24 segundos para el análisis del número de núcleos de la capa muscular por campo/imagen. Esto permite el estudio de un mayor número de campos que los métodos manuales y la obtención de datos cuantitativos procedentes de un mayor número de observaciones y por tanto sujetos a una menor variabilidad. A pesar de que éste método precisa de supervisión manual para descartar falsos positivos o negativos, es necesario para determinar las áreas de estudio y por lo tanto elemental para el cálculo de la densidad celular.

Teniendo en consideración la normativa actualmente aceptada y fácilmente estandarizable del *International Working Group* (Knowles *et al.*, 2009), con su aplicación se mejoraría la extrapolación y la comparación de datos entre estudios realizados en diferentes laboratorios. Hecho éste que aporta mayor verosimilitud al estudio histológico de muestras del tracto gastrointestinal en especial aquellas en las que se pretende valorar el plexo mientérico y determinar cambios diferentes poblaciones celulares que participan en el control de la motilidad intestinal.

Referencias

Anuras S, Mitros FA, Soper RT, Pringle KC, Maves BV, Younoszai MK, et al. Chronic intestinal pseudoobstruction in young children. *Gastroenterology* 1986; **91**:62-70.

Blair PJ, Bayguinov Y, Sanders KM, Ward SM. Relationship between enteric neurons and interstitial cells in the primate gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 Sep;**24**(9):e437-49.

Dzienis-Koronkiewicz E, Debek W, Sulkowska M, et al. Suitability of selected markers for identification of elements of the intestinal nervous system (INS). *Eur J Pediatr Surg* 2002;**12**:397-401.

Gomez-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. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Jun;**296**(6):G1370-81.

Lake BD, Malone MT, Risdon RA. Letter to the editor on the use of cetylcholinesterase (AChE) in the diagnosis of Hirschsprung's disease and intestinal neuronal dysplasia. *Pediatr Pathol* 1989; **9**:351-4.

Lindberg G, Törnblom H, Iwarzon M, Nyberg B, Martin JE, Veress B. Full-thickness biopsy findings in chronic intestinal pseudo-obstruction and enteric dysmotility. *Gut* 2009; **58**:1084-90.

Martin JE, Hester TW, Aslam H, et al. Discordant practice and limited histopathological assessment in gastrointestinal neuromuscular disease. *Gut* 2009; **58**:1703e5.

Schuffler MD, Jonak Z. Chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction caused by a degenerative disorder of the myenteric plexus: the use of Smith's method to define the neuropathology. *Gastroenterology* 1982; **82**:476-86.

Smith VV, Eng C, Milla PJ. Intestinal ganglioneuromatosis and multiple endocrine neoplasia type 2B: implications for treatment. *Gut* 1999;**45**:143e6.

Knowles CH, Martin JE. Slow transit constipation: a model of human gut dysmotility. Review of possible aetiologies. *Neurogastroenterol Motil* 2000;**12**:181e96.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, et al. Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* 2009;**118**:271e301.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, Lindberg G, Martin JE, Meier-Ruge WA, Milla PJ, Smith VV, Vandervinden JM, Veress B, Wedel T. The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Gut*. 2010 Jul; **59**(7):882-7.

Ward SM, Sanders KM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cell of Cajal: from bench to bedside. I. Functional development and plasticity of interstitial cells of Cajal networks. *Am J Physiol* 2001; **281**:G602–11.

Wedel T, Roblick UJ, Ott V, Eggers R, Schiedeck THK, Krammer HJ, Bruch HP. Oligoneuronal hypoganglionosis in patients with idiopathic slow transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2002; **45**: 54-62.

Zárate N, Mearin F, Wang XY, Hewlett B, Huizinga JD, Malagelada JR. Severe idiopathic gastroparesis due to neuronal and interstitial cells of Cajal degeneration: pathological findings and management. *Gut* 2003; **52**:966-70.

Capítulo 2.

Nitrgergic neuromuscular transmission is up-regulated in patients with diverticulosis.

1. ABSTRACT.

BACKGROUND: Neurotransmission impairment could be associated to motility changes observed in patients with diverticular disease. Therefore the objective was to characterize the inhibitory neuro-muscular transmission and gene expression changes of the enteric inhibitory pathways in patients with diverticulosis (DS). **METHODS:** Circular muscle strips from sigmoid colon of patients with DS and controls were studied using the organ bath technique to evaluate spontaneous contractility and enteric motor neurons stimulated by electrical field and qRT-PCR to assess the expression of n-NOS, i-NOS, P2Y₁R and PGP9.5. **RESULTS:** Patients with DS presented decreased spontaneous rhythmic contractions (SRC) that were significantly enhanced after incubation with L-NNA (1mM) and TTX (1μM), and unaffected by the P2Y₁ antagonist MRS2500 (1μM). Stimulation on enteric motor neurons caused an increased duration of the latency of OFF contractions in DS group (P<0.001), antagonized by L-NNA and slightly affected by MRS2500 (1μM). No differences in the IC₅₀ between controls and DS patients were observed on inhibition of SRC for the NO donor sodium nitroprusside (SNP) and the preferential P2Y agonist ADPβS. Moreover, n-NOS relative expression was also up regulated 2.3-fold in the DS group (P<0.05) whereas there was no significant difference in relative expression of i-NOS, P2Y₁R and the neuronal marker PGP9.5 between groups. **CONCLUSIONS:** Patients with diverticulosis presented an overexpression of n-NOS with increased endogenously NO-mediated responses suggesting enhanced NO-release. Up-regulation in the nitrgergic pathway in early stages of the disease might play a role in colonic motor disorders associated to diverticular disease.

2. INTRODUCTION.

Diverticulosis (DS) is a prevalent condition in western populations. An increasing prevalence with age has been reported from 5% in persons 40 to 50 years to 65% in persons above 65 (Comparato *et al.*, 2007). Most (75-90%) of these patients will remain asymptomatic (Humes *et al.*, 2007). However 10 to 25% of them will develop chronic and recurrent abdominal symptoms, mainly lower abdominal pain, bloating and disturbances in bowel habits, a condition known as uncomplicated diverticular disease (Humes *et al.*, 2007). Finally, 5% of these patients with diverticular disease will develop complications such as inflammation, perforation, bleeding, obstruction, abscesses or fistulae becoming complicated diverticular disease (Humes *et al.*, 2007). Morbidity and mortality related to symptomatic and complicated patients make diverticular disease a serious concern and one of the gastrointestinal diseases with greater impact on healthcare costs (Jeyarajah & Papagrigoriadis, 2011;Kang *et al.*, 2004;Simpson & Spiller, 2003;Morris *et al.*, 2003).

The pathophysiology of diverticulosis is poorly understood and has been attributed to multiple factors, among them fibre deficient diet, high intraluminal pressure and spasticity in the left colon (Bassotti *et al.*, 2001;Trotman & Misiewicz, 1988) or structural changes in the muscularis propia such as elastosis (Golder *et al.*, 2007;Whiteway & Morson, 1985) and collagen fibre alterations (Mimura *et al.*, 2004).

It has been found recently that patients with complicated diverticular disease present alterations in the enteric nervous system and in the serotonergic pathway which might account for the colonic motor abnormalities described in these patients. This suggests that inflammatory episodes contribute to the enteric neuro-myopathy and

serotonergic system impairment, which could be a factor in the progression of this disease ((Bottner *et al.*, 2012;Wedel *et al.*, 2010).

In vitro motor patterns in the human left and sigmoid colon of controls were previously studied by our group. Circular strips developed spontaneous rhythmic contractions (SRCs), non-neural in origin, and responded to neural stimulation by EFS with OFF-contractions, phasic contractions preceded by a latency period, or with ON-contractions, phasic contractions at the onset of EFS. The latency observed in OFF-contractions was caused by stimulation of inhibitory enteric motorneurons and blocked by the sequential addition of an nNOS inhibitor and P2Y₁-antagonist, indicating the release of ATP or a related purine acting through P2Y₁ receptors and NO (Gallego *et al.*, 2006;Auli *et al.*, 2008;Gallego *et al.*, 2008).

We have also observed altered, in vitro, contractility patterns in patients with diverticulosis that suggest an increased release or greater sensitivity for inhibitory neurotransmitters (ATP and/or nitric oxide) although other inhibitory neurotransmitters and/or neuromodulators could also be involved. Moreover resting membrane potential of circular smooth muscle cells was more hyperpolarized, and inhibitory junction potential (IJP) caused by release of inhibitory neurotransmitters was greater (Gallego *et al.*, 2013).

In the present study, we aimed to assess and characterize these neuro-muscular, physiological and gene expression changes of the inhibitory neuromuscular transmission in patients at the early stage of this disease (diverticulosis). These findings could help explain the pathophysiology and the progression of diverticulosis to diverticular disease. Preliminary data of the present work were presented at the 19th United European Gastroenterology week (Stockholm 2011).

3. MATERIAL AND METHODS.

3.1. Patients and tissue samples.

Tissue specimens of human sigmoid colon were obtained from patients undergoing surgery for rectal neoplasm and who did not have symptoms of clinical motility disorders or previous episodes of symptomatic complicated or uncomplicated diverticular disease. All preoperative studies were reviewed to determine colon distribution and density scores of diverticular disease as described by Golder et al 2011 (18). The pathologist reports were also revised to confirm the absence/presence of colonic diverticula and to discard samples with other histological abnormalities or inflammation. Patients reporting symptoms of irritable bowel syndrome or episodes of abdominal pain, fever or erratic bowel habit including frequent diarrhoea or constipation were excluded from the study. Study groups and patient characteristics are described in Tables 1 and 2.

All the experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Hospital de Mataró, Barcelona, Spain (Code: CEIC26/08).

Group	Gender	Age, yrs (range)	LPS Approach (%)	Smoking Habit (%)	Preoperative staging (%)
Control (n=22)	20M/2F	66.28 (36-83)	86.36	45.45	I-II- 54.7 III - 40.9
Diverticulosis (n=25)	19M/6F	72.95 (44-89)	72.00	44.00	I-II - 32 III - 64

Table 1. Table showing the age, gender, surgical approach and staging (according to the American Joint Committee on Cancer 7th edition) of the patients included in the study. LPS indicates laparoscopy.

Diverticular location	Only Sigmoid colon (48%)	Sigmoid and left colon (48%)	Sigmoid and right colon (4%)
Density of colon diverticula	All high	32% low 12% low in sigmoid and high in left colon 4% high in sigmoid and low in left colon	All high in sigmoid and low in right colon*

Table 2. Table showing the diverticula location and density. High density was considered more than 16 diverticula per colon segment (see Golder et al.2011¹⁸). * Three or less diverticula were observed in the right colon.

3.2. Organ Bath technique.

Preparation of sigmoid colon circular muscle strips and isometric tension recording:

The colon segment was cut open longitudinally along the mesenteric border, the mucosal layer was removed and transmural muscle strips (4 mm wide by 10 mm long) were cut in the direction of the circular muscular fibers. A silk thread was attached to either end of the strips and they were placed in 10 mL organ baths filled with Krebs solution (pH 7.4, 37°C) bubbled with 5% CO₂ in O₂ between two parallel platinum wire electrodes. Strips were stretched up to 4g and equilibrated for 1 hour. Changes in tension of the strips were measured using isometric force transducers (model 03 Force Transducer and model 7 Series Polygraph, respectively, Grass Instruments Co, Quincy,

MA), and recorded on a computer using the data acquisition software AcqKnowledge® (MP100, Biopac Systems, Inc, Goleta, CA, USA). Electrical field stimulation (EFS) pulses of 0.4 ms duration, frequency 1–40 Hz, 10s trains at 26V were delivered by an electrical stimulator Model S88X (Grass Instruments Co) and a power booster (Stimu-Splitter II, Med-Lab Instruments, Loveland, CO) in order to obtain six identical and undistorted stimuli. These electrical stimuli were simultaneously recorded with tension tracings through a synchronized Transistor-Transistor logic signal between the electrical stimulator Grass S88 and the computerized Biopac System in order to assess whether the mechanical responses occurred after (“off responses”) the electrical stimulus and to measure the latency of these contractions. The present study focusses on inhibitory neurotransmission so only tissue responding with OFF-contractions was selected (the latency duration is determined by the release of inhibitory neurotransmitters by the enteric motor neurons) (Auli *et al.*, 2008).

3.3. Solutions and Drugs.

The composition of the physiological saline solution was (in mM) glucose 10.10; NaCl 115.48; NaHCO₃ 21.90; KCl 4.61; NaH₂PO₄ 1.14; CaCl₂ 2.50 and MgSO₄ 1.16 (pH 7.3–7.4). The following drugs were used: tetrodotoxin (Latoxan, Valence, France), N ω -nitro-L-arginine (L-NNA), sodium nitroprusside (SNP), adenosine 5'- β -2-thiodiphosphate (ADP β S) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). (1R,2S,4S,5S)-4-[2-Iodo-6-(methylamino)-9H-purin-9-yl]-2 (phosphonoxy) bicyclo[3.1.0]hexane-1-methanol dihydrogen phosphate ester diammonium salt (MRS2500), (Tocris, Bristol, UK). Stock solutions were made by dissolving drugs in distilled water except for L-NNA which was dissolved in physiological saline solution by sonication.

3.4. Gene expression by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Samples were collected during surgery, put in RNA-later solution (Ambion Inc, Austin, TX, USA) and stored 12-24h at 4°C. They were then dissected (the mucosal layer was removed) and stored at -25°C until the extraction. Total RNA was extracted with the Trizol® Method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following manufacturer's instructions. After extraction, all samples were treated with DNase (1 U/μg RNA at 37°C for 20 min) to eliminate genomic DNA traces. To ensure against protein contamination, RNA quality was assessed by spectrophotometry and those samples presenting an A_{260}/A_{280} ratio below 1.8 were excluded. Reverse transcription was performed with 1 μg of RNA for 10 min at 25°C, 30 min at 55°C and 2 min at 95°C, using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (10 U) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and random hexamer primers (60 μM). Finally, an RT-PCR was performed using a LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) to determine the mRNA expression levels of nNOS, iNOS, P2Y₁-R and PGP9.5 as neural markers, in control and DS samples. β-actin was used as reference gene. An intron spanning assay was designed to avoid the amplification of genomic DNA. The PCR reactions were performed in a final volume of 20 μL, using 2 μL of the cDNA obtained in the previous step, the LightCycler TaqMan Master reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and the hydrolysis probe (100 nM) and the pair of primers (200 nM) specific for each experiment as described in Table 3.

Gene	Left Primer	Right Primer	TaqMan probe
β -actin	5'-ccaaccgcgagaagatga	5'-tccatcacgatgccagtg	5'-cagcctgg
PGP9.5	5'-cctgaagacagagcaaaatgc	5'-aaatggaaattcaccttgtcatct	5'-caggcagc
nNOS	5'-cagagccctaaatccagtcg	5'-gttgccagggaagacacc	5'-cagcctgg
iNOS	5'-ctggaacgcacaagctg	5'-ccatgatggtcacatttgct	5'-cagcctgg
P2Y ₁	5'-atgttctgtgtccccttggt	5'-aaatcaaagctctcacaattaatcc	5'-ctgggctg

Table 3. Pair of specific primers (200 nM) for m-RNA encoding the reference gene (β -actin) and the interest genes (PGP9.5, n-NOS, i-NOS and P2Y₁R) and taqMan probes.

The conditions of the reaction were: 10 min 95°C, 45 cycles: 95°C 10 s, 65°C (nNOS, iNOS, PGP9.5) or 64°C (β -actin, P2Y₁-R) 30 s, 72°C 10s. The efficiency of each amplification was assessed performing a standard curve. The relative expression of each gene was normalized to that of β -actin in each sample.

3.5. Data analysis and statistics.

Differences in spontaneous contractility were evaluated between groups, measuring the area under the curve (AUC), amplitude, basal tone, and frequency. The effects of drugs were evaluated using the percentage of AUC before and after drug addition and assessed by an unpaired Student's t test.

Only OFF-contractions were selected and included in the study. Latency of OFF-contractions was measured in seconds and amplitude in grams, as previously described (15). The effects of drugs on OFF-contractions were described as percentages of the control response at each frequency. Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test were used to compare the control and DS groups and the effects of the drugs (L-NNA and MRS2500) on EFS-induced latency and contractions.

The effect of exogenous agonists was calculated measuring the AUC in control conditions and after the addition of cumulative doses. IC_{50} values were calculated using a conventional sigmoid concentration-response curve with variable slope, $Y=100/(1+10^{(\text{LogEC50}-X)*\text{Hill slope}})$, where X is the logarithm of concentration and Y is the response. Differences between groups were assessed with a two-way ANOVA.

Data are expressed as mean \pm SEM. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. “n” values indicate the total number of samples. Statistical analysis and curve fit were performed with GraphPad Prism version 4.00, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTS.

4.1. Spontaneous contractility.

After the equilibration period, all circular smooth muscle strips from the control group (n=22) and the DS group (n=25) developed spontaneous rhythmic contractions (SRC). The amplitude of SRC was lower in patients from the DS group (2.00 ± 0.24 g compared with 3.94 ± 0.37 g for the control group, $p<0.0001$). The SRC AUC was also reduced in DS patients, (27.66 ± 3.94 g min^{-1} compared with 80.03 ± 8.86 g min^{-1} in the control group, $p<0.0001$). In contrast, no differences were found in the frequency of these SRC (2.86 ± 0.14 contractions min^{-1} for the DS group and 3.19 ± 0.11 contractions min^{-1} for the control group; ns) nor in the resting tone of the preparation (1.42 ± 0.14 g for the DS group and 1.25 ± 0.11 g for the control group; ns).

4.2. Inhibitory neural tone.

The lower spontaneous contractility suggests an increase in the spontaneous (or tonic) release of inhibitory neurotransmitters or inhibitory neural tone, therefore the neural

blocker tetrodotoxin (TTX) ($1\mu\text{M}$), the nitric oxide synthase blocker L-NNA (1mM) and the P2Y_1 receptor antagonist MRS2500 ($1\mu\text{M}$) were tested to evaluate their effect on the SRCs. In the control group, the AUC of SRCs was slightly reduced after incubation with TTX ($86.15\pm 5.67\%$ of basal values) and L-NNA ($96.01\pm 5.09\%$); in contrast, the AUC was increased in the DS group after TTX ($118.9\pm 10\%$) and L-NNA ($153.7\pm 16.75\%$) incubation ($n=10$; $p<0.01$).

No differences between groups were observed after incubation with MRS2500 (a P2Y_1 antagonist) ($81.85\pm 14.02\%$ $n=8$ for DS group and $87.31\pm 15.01\%$ for the control group $n=3$; ns) (Figure 1).

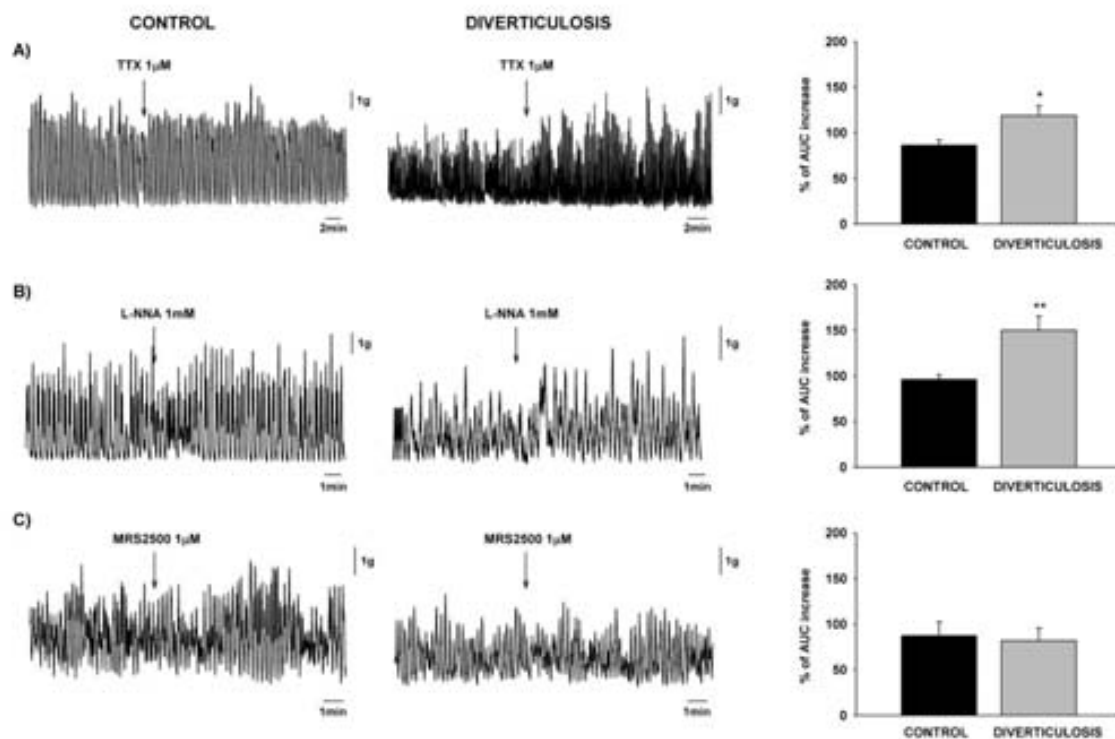


Figure 1 Representative contractility tracings from the control group (left), from the diverticulosis (DS) group and histograms comparing the percentage of increase in area under the curve (AUC) after incubation with A) TTX $1\mu\text{M}$, B) L-NNA 1mM and C) MRS2500 $1\mu\text{M}$. Data are expressed as mean \pm sem. * $P<0.05$, ** $P<0.001$.

4.3. Pharmacological effect of an NO-donor, Sodium Nitroprusside (SNP), and ADP β S on spontaneous contractility.

The effect of SNP and the P2Y preferential agonist, ADP β S, on SRCs was tested with a cumulative concentration response curve, and the IC₅₀ for each group was calculated. No differences were found in the IC₅₀ for SNP (LogIC₅₀=-7.43±0.23 DS group vs. LogIC₅₀=-7.48±0.20 n=6 control; n=6, ns) nor for ADP β S (LogIC₅₀=-8.37±0.33 DS group n=7 vs. LogIC₅₀=-8.10±0.30 n=8, ns) suggesting similar sensitivity of smooth muscle cells to these pharmacological agonists for the nitrenergic and purinergic pathways DS patients and controls (Figure 2).

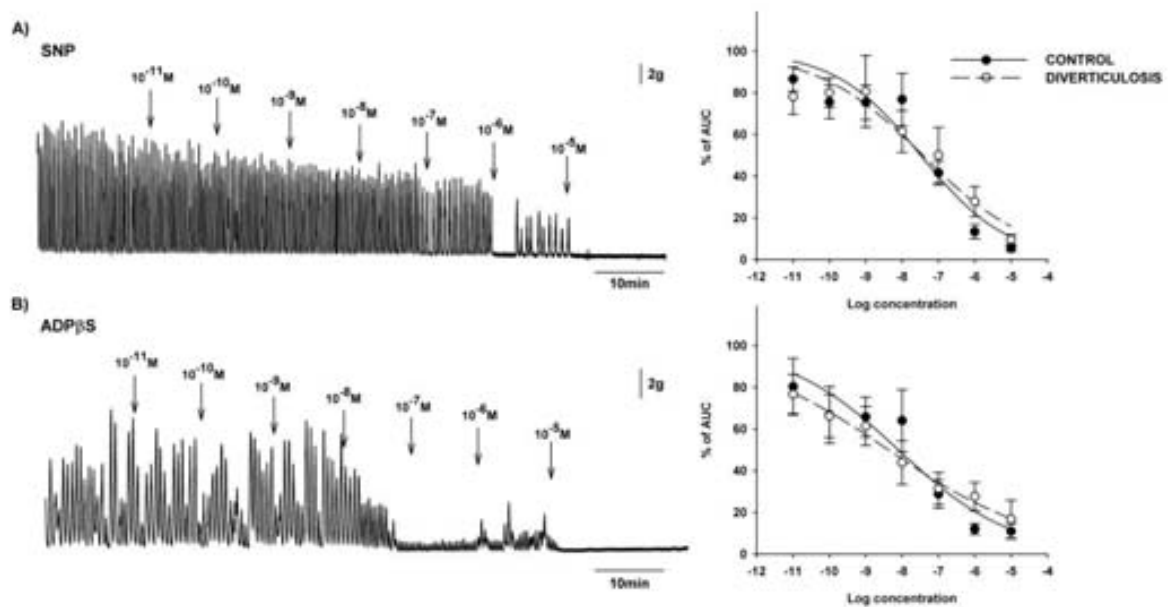


Figure 2. Representative contractility tracings showing the effect of cumulative increasing concentrations of **A)** sodium nitroprusside (SNP) and **B)** ADP β S (left) and concentration-response curves for these agonists.

4.4. Endogenous EFS-induced release of inhibitory neurotransmitters.

The latency of the OFF-contractions was longer in patients with DS compared with controls (n=13 vs. n=11, Two way ANOVA $p<0.0001$) and significant differences were observed at the 10, 20, 30 and 40Hz frequencies of stimulation (Bonferroni post-hoc test). Latency duration increased with frequency and the greater latencies were observed at 40Hz (15.20 ± 0.56 s DS group and 11.37 ± 0.47 s control group; $p<0.0001$). To assess the relative contribution of endogenous-released NO and ATP (or a related purine acting on P2Y₁ receptors) on increased latency in the DS group compared with controls, two protocols were performed: a) one group of samples from both DS and control groups was sequentially incubated with L-NNA (1mM) and MRS2500 (1 μ M); and b) the other group was sequentially incubated with MRS2500 (1 μ M) and L-NNA (1mM). After incubation starting with L-NNA (1mM), latency was strongly reduced in both controls and DS patients and no differences were observed between groups (n=6 DS group and n=6 control group; two-way ANOVA ns) (Figure 3). In contrast, in sequential experiments starting with MRS2500, latency was only slightly affected in both groups (n=6 DS group and n=4 control group; ANOVA $P<0.001$) (Figure 4). The differences between the two experiments could be caused by increased NO release in the diverticulosis group. In both experiments, the simultaneous addition of nitrenergic and purinergic antagonists was necessary to practically block latency at all frequencies of stimulation (Figures 3 and 4). Moreover, the amplitude of OFF-contractions was lower in the DS group (n=11 DS group and n=10 control group; Two-way ANOVA $P<0.0001$), significant differences were observed at the 10, 20, 30 and 40Hz frequencies of stimulation (Bonferroni post-hoc test) (Figure 3). The greatest differences were observed at 40Hz (8.30 ± 1.63 s n=13 DS group and 20.76 ± 2.51 n=11

control group; ANOVA $p < 0.0001$). After incubation starting with L-NNA, there was an increase in the amplitude of OFF-contraction that was higher in the DS group compared with the control group (at 40Hz: $178.44 \pm 33.71\%$ DS group $n=6$ vs. $110.33 \pm 9.71\%$ control group $n=6$; ANOVA $p < 0.05$. Figure 3C). In contrast, after the addition of MRS2500, there was only a slight reduction in the OFF-contraction, similar in both groups (at 40Hz: $90.36 \pm 9.33\%$ $n=6$ vs. $87.08 \pm 6.92\%$ $n=4$, respectively; ANOVA ns. Figure 4C).

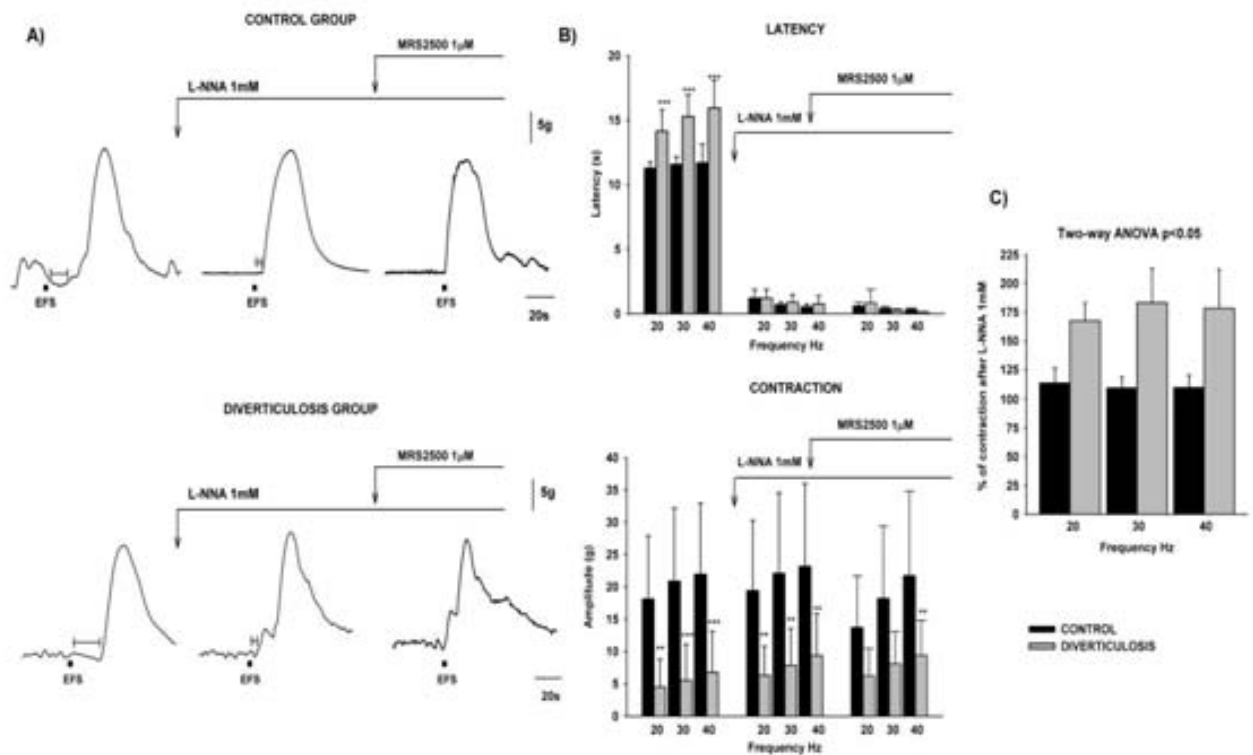


Figure 3. **A)** Representative mechanical tracings showing the latency and the OFF contraction at 40 Hz of stimulation in the control group (top) and in the diverticulosis (DS) group before and after incubation with L-NNA (1mM) and MRS2500 (1μM) (bottom) **B)** Histograms showing latency (top) and amplitude (bottom) of OFF-contractions before and after sequential incubation with L-NNA (1mM) and MRS2500 (1μM) in the control group and in the DS group **C)** Histograms showing the percentage of increase of OFF-contractions after L-NNA (1mM) incubation in the control group and in the DS group. Data are expressed as mean±sem; ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ bars depict the latency period and black dots the point where EFS is applied.

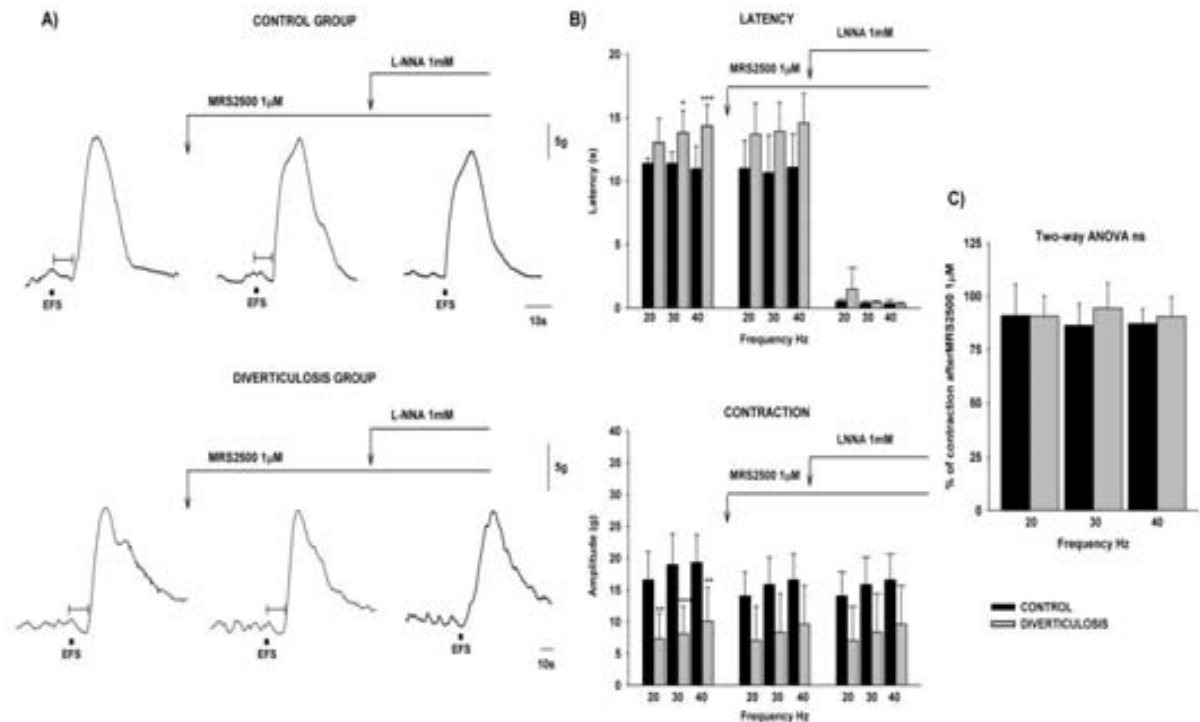


Figure 4. A) Representative mechanical tracings showing the latency and the OFF contraction at 40 Hz of stimulation in the control group (top) and in the diverticulosis (DS) group before and after the incubation with MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM) (bottom) B) Histograms showing latency (top) and amplitude (bottom) of OFF-contractions before and after sequential incubation with MRS2500 (1 μM) and L-NNA (1 mM) in the control group and in the DS group C) Histograms showing the percentage of increase of OFF-contractions after MRS2500 (1 μM) incubation in the control group and in the DS group. Data are expressed as mean ± sem; *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001 bars depict the latency period and black dots the point where EFS is applied.

4.5. Changes in m-RNA expression.

There were no differences observed in the expression of the neural marker PGP9.5 between DS patients (n=9) and controls (n=7); $p=0.46$. However, a significant increase of nNOS mRNA was detected in DS group, showing a 2.3-fold up regulation (n=10 DS group, n=9 control group, $p=0.049$). In contrast, no changes in the iNOS (n=9 DS group, n=7 control group) and P2Y₁ (n=10 DS group, n=8 control group) transcript levels were detected among the populations studied ($p=0.40$ for iNOS and $p=0.85$ for P2Y₁) (Figure 5).

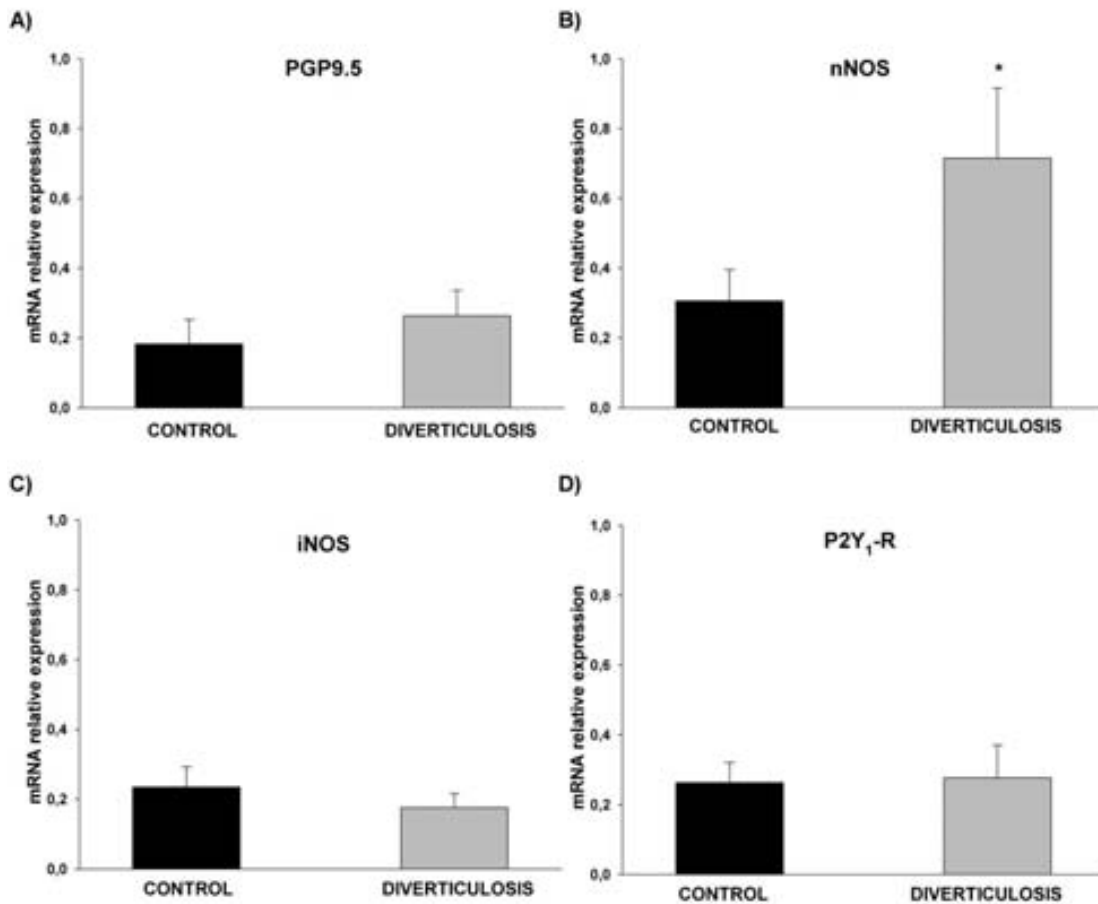


Figure 5. Relative expression of mRNA of PGP9.5 (top-left), nNOS (top-right), iNOS (bottom-left) and P2Y₁ (bottom-right) in colonic samples of control patients and patients with diverticulosis. Data are expressed as mean±sem, and were normalized to expression of β -actin in each sample; *P<0.05.

5. DISCUSSION.

This study, performed on colonic tissue from patients with asymptomatic colonic diverticula, revealed two important findings: a) Patients presented an over-expression of nNOS in the sigmoid colon; b) This over-expression was associated to increased, endogenously NO-mediated, contractility responses and caused changes in the in vitro motor patterns of sigmoid contractility, particularly decreasing spontaneous contractility and increasing inhibitory neural mediated responses measured as the

OFF-contractions latency, caused by stimulation of the motorneurons of the myenteric plexus. Patients with DS, however, did not present any major change in the sensitivity of the circular smooth muscle cells to nitrergic agonists. This suggests that the up-regulation of the nitrergic pathway is an early event and can be involved in the origin and progression of colonic motor alterations associated with diverticular disease.

In the present study, we found that n-NOS relative expression was up-regulated in patients with diverticulosis whereas the relative expression of iNOS and the neuronal marker PGP9.5 were not affected. We assume that changes observed in the expression of nNOS, iNOS and PGP9.5 correlate to translational changes and that changes in nNOS are mainly due to the increase of nNOS in inhibitory motor neurons as its expression in smooth muscle cells is marginal (Teng *et al.*, 1998). In addition, under our experimental conditions, isolation of the myenteric plexus that has been performed in some studies was not possible (12). The up-regulation of the nitrergic pathway at early stages of the disease might explain the impaired contractility patterns and electrophysiological responses associated with diverticular disease previously observed by our group (Gallego *et al.*, 2013).

In our previous study (Gallego *et al.*, 2013) we observed 1- a reduction in spontaneous contractility and 2- more hyperpolarized resting membrane potential (RMP) in sigmoid smooth muscle of patients with diverticulosis; those findings were indicative of an enhanced inhibitory neural tone (spontaneous release of inhibitory neurotransmitters in these patients), greater sensitivity to these inhibitory neurotransmitters or a reduced myogenic response. In the present study we explored these possibilities and

found that a large part of this reduced contractility might be due to an increase in nitrenergic neural tone. We found that L-NNA (a NOS inhibitor) induced a large increase in AUC (+50%) in diverticulosis patients whereas it did not cause major changes in spontaneous contractility in the control group. Nitrenergic neural tone is due to ongoing release of NO from inhibitory motor neurons, as observed in our previous studies both in the colon (Auli *et al.*, 2008) and ileum (Gallego *et al.*, 2014) in strips from control patients. At present, we do not have a clear explanation for the differences between the present and our previously published results in controls. However, regional differences in tissue samples, or individual differences between patients or other differences in the tissue samples might affect the presence of an inhibitory neural tone in colonic strips (Brehmer *et al.*, 2006;Hwang *et al.*, 2014). The present study was performed with clear identification of the location of the sample by the surgeon and we are therefore confident that all samples were sigmoid colon, no major differences between groups (age, gender, surgical approach or even preoperative stage) were appreciated and handling methodologies were identical between groups. Moreover, the mild increase in AUC observed after incubation with L-NNA (<20% of increase in AUC) (Auli *et al.*, 2008) in previous studies is not comparable with the huge increase observed in our patients with diverticulosis (53% of increase in AUC). It is also important to notice that spontaneous contractility was already reduced in DS group and therefore the increase in AUC observed could not be caused by a putative muscular overcontractility. MRS2500 did not increase the AUC in either group, which is consistent with a different physiological role for ATP or a related purine (i.e. NO causes tonic inhibition whereas purinergic relaxation is phasic (Gallego *et al.*, 2008;Gil *et al.*, 2012;Gil *et al.*, 2010)).

Our previous study also revealed an increased latency in OFF-contractions and higher inhibitory junction potential in patients with diverticulosis (Gallego *et al.*, 2013). These findings suggested either an increased release or a greater sensitivity to inhibitory neurotransmitters. In the present study we pre-selected strips showing the OFF-contractions and found that these changes are attributable to a NO over-expression and enhanced NO release from inhibitory motor neurons. Both the latency duration and the purinergic component were lower than we expected compared to prior studies (Auli *et al.*, 2008). However, the latency of the diverticulosis group was 3-4s greater than the control group which is consistent in both studies (Gallego *et al.*, 2013). In the present study we hardly observed a purinergic component for latency, despite using a more potent P2Y₁ antagonist, MRS2500 (Gallego *et al.*, 2011), suggesting that latency is not the best parameter to evaluate purinergic neurotransmission because of the rundown previously observed (Gallego *et al.*, 2008). This rundown or decay in the purinergic response is lower at low frequencies and high voltages of stimulation (Gallego *et al.*, 2008; Mane *et al.*, 2014). In the present study at the lower frequencies (1-10 Hz), we were unable to find major differences between groups, and the differences were higher at high frequencies of stimulation; future studies should discover the optimal stimulation to elicit inhibitory neurotransmitter release in the human colon (Mane *et al.*, 2014).

The present data contrast with previous studies reporting opposite results in uncomplicated and complicated diverticular disease, such as decreased immunoreactivity for NOS1 in longitudinal smooth muscle and decreased EFS-induced release (Tomita *et al.*, 2000; Golder *et al.*, 2007). These discrepancies could be explained by the progression of the disease and could be directly related to

inflammation. Post-inflammatory changes in the chemical coding of the enteric nervous system have been reported in diverticular disease patients (Spiller, 2006; Simpson *et al.*, 2009) however there is little data on changes in the enteric nervous system (ENS) of these patients (Bottner *et al.*, 2012; Wedel *et al.*, 2010). We can suggest two possible explanations for these contradictory findings; Firstly, a myenteric nerve cell loss (oligoneural hypoganglionosis) has been reported in the ENS in patients with diverticular disease who have faced at least one episode of diverticulitis (Wedel *et al.*, 2010). This neural loss could explain the decrease in nNOS and NO-mediated responses. Secondly, iNOS up-regulation as a result of an inflammatory response has been reported to cause a stable nNOS down-regulation decreasing the intestinal inhibitory tone in an animal model for IBD (30). This i-NOS-induced n-NOS down-regulation could also explain the decreased levels of nNOS immunoreactivity and lower nitrergic-mediated responses. To rule out changes caused by inflammation, the present study was performed only in patients without any symptom or previous episode of diverticulitis, and no changes in the expression of iNOS (inflammation marker) or PGP9.5 (neural marker) were observed. Future physiological studies are needed to explore the changes in these nitrergic responses in advanced phases of the disease and especially in post-inflammatory conditions.

Despite the fact that we found increased NO spontaneous release (increased tone) and EFS-induced release by inhibitory enteric motor neurons (latency), we did not find major differences in the sensitivity of the smooth muscle to the exogenous addition of an NO-donor. This can be explained by considering that the overexpression of nNOS and enhanced endogenous release were below the threshold to induce NO

desensitization. A reduced response of longitudinal smooth muscle cells to exogenous NO was reported by Golder et al 2007 (Golder *et al.*, 2007). This lower responsiveness could also be related to the progression of the disease.

Although it is always difficult to translate the in vitro contractility patterns to in vivo motility responses, the reduced amplitude of spontaneous contractility (SRC) and increased latency observed in the present study could be responsible for reduced mixing and propulsion movements that patients with DD present in vivo (Auli *et al.*, 2008). It may also account for the delayed transit time reported in patients with diverticular disease, although conflicting data has been reported regarding this issue (Jeyarajah & Papagrigoriadis, 2011). Similar findings, nNOS up-regulation and increased NO-generation, have been recently reported in a model for irritable bowel syndrome (IBS) in the rat distal colon (Tjong *et al.*, 2011). Diverticular disease symptoms have recently been related to IBS (Jung *et al.*, 2010;Spiller, 2012) and a link between both pathologies has been suggested although it must be confirmed that n-NOS over-expression is a common event in both pathologies.

The incidence of diverticulosis or colonic diverticula and complications increase with age; it is interesting to note that a recent study on the human colon by Bernard and colleagues (Bernard *et al.*, 2009) revealed that there is a neural loss in the colonic enteric nervous system with ageing that mainly affects cholinergic neurons whereas nitrenergic are barely affected. This increased ratio of nitrenergic neurons could, according to the present findings, also predispose to the development of colonic motor disorders associated to diverticulosis.

To sum up, the present data indicates over-expression of nNOS and NO-mediated in vitro motor-responses in the colon of patients with diverticulosis or asymptomatic colonic diverticula. It is an issue for future research to find out how modulation of nNOS or NO-intracellular pathway affects the progression of the disease and development of symptoms.

References

- Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M, & Clave P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.
- Bassotti G, Battaglia E, Spinozzi F, Pelli MA, & Tonini M (2001). Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity. *Dis Colon Rectum* **44**, 1814-1820.
- Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, Linden D, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Camilleri M, Zinsmeister AR, Pozo MJ, Hicks GA, & Farrugia G (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 746-e46.
- Bottner M, Barrenschee M, Hellwig I, Harde J, Egberts JH, Becker T, Zorenkov D, & Wedel T (2012). The enteric serotonergic system is altered in patients with diverticular disease. *Gut*.
- Brehmer A, Schrodل F, & Neuhuber W (2006). Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochem Cell Biol* **125**, 557-565.
- Comparato G, Pilotto A, Franze A, Franceschi M, & Di MF (2007). Diverticular disease in the elderly. *Dig Dis* **25**, 151-159.
- Gallego D, Espin F, Mikulka J, Smirg O, Gil V, Faundez-Zanuy M, Jimenez M, & Clave P (2013). In vitro motor patterns and electrophysiological changes in patients with colonic diverticular disease. *Int J Colorectal Dis* **28**, 1413-1422.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P, & Jimenez M (2008). Purinergic and nitrenergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G522-G533.
- Gallego D, Gil V, Aleu J, Martinez-Cutillas M, Clave P, & Jimenez M (2011). Pharmacological characterization of purinergic inhibitory neuromuscular transmission in the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 792-e338.
- Gallego D, Hernandez P, Clave P, & Jimenez M (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G584-G594.
- Gallego D, Malagelada C, Accarino A, De GR, Malagelada JR, Azpiroz F, & Jimenez M (2014). Nitrenergic and purinergic mechanisms evoke inhibitory neuromuscular transmission in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil* **26**, 419-429.

Gil V, Gallego D, Grasa L, Martin MT, & Jimenez M (2010). Purinergic and nitrergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G158-G169.

Gil V, Gallego D, Moha Ou MH, Peyronnet R, Martinez-Cutillas M, Heurteaux C, Borsotto M, & Jimenez M (2012). Relative contribution of SKCa and TREK1 channels in purinergic and nitrergic neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**, G412-G423.

Golder M, Burleigh DE, Ghali L, Feakins RM, Lunniss PJ, Williams NS, & Navsaria HA (2007). Longitudinal muscle shows abnormal relaxation responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease. *Colorectal Dis* **9**, 218-228.

Golder M, Ster IC, Babu P, Sharma A, Bayat M, & Farah A (2011). Demographic determinants of risk, colon distribution and density scores of diverticular disease. *World J Gastroenterol* **17**, 1009-1017.

Humes D, Simpson J, & Spiller RC (2007). Colonic diverticular disease. *Clin Evid (Online)* **2007**.

Hwang SE, Hieda K, Kim JH, Murakami G, Abe S, Matsubara A, & Cho BH (2014). Region-specific differences in the human myenteric plexus: an immunohistochemical study using donated elderly cadavers. *Int J Colorectal Dis*.

Jeyarajah S & Papagrigoriadis S (2011). Review article: the pathogenesis of diverticular disease - current perspectives on motility and neurotransmitters. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 789-800.

Jung HK, Choung RS, Locke GR, III, Schleck CD, Zinsmeister AR, & Talley NJ (2010). Diarrhea-predominant irritable bowel syndrome is associated with diverticular disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol* **105**, 652-661.

Kang JY, Melville D, & Maxwell JD (2004). Epidemiology and management of diverticular disease of the colon. *Drugs Aging* **21**, 211-228.

Mane N, Gil V, Martinez-Cutillas M, Martin MT, Gallego D, & Jimenez M (2014). Dynamics of inhibitory co-transmission, membrane potential and pacemaker activity determine neuromyogenic function in the rat colon. *Pflugers Arch*.

Mimura T, Bateman AC, Lee RL, Johnson PA, McDonald PJ, Talbot IC, Kamm MA, MacDonald TT, & Pender SL (2004). Up-regulation of collagen and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase in colonic diverticular disease. *Dis Colon Rectum* **47**, 371-378.

Morris CR, Harvey IM, Stebbings WS, Speakman CT, Kennedy HJ, & Hart AR (2003). Do calcium channel blockers and antimuscarinics protect against perforated colonic diverticular disease? A case control study 1. *Gut* **52**, 1734-1737.

Porras M, Martin MT, Torres R, & Vergara P (2006). Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G423-G430.

Simpson J & Spiller R (2003). Colonic diverticular disease. *Clin Evid* 478-487.

Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Scholefield JH, & Spiller RC (2009). Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 847-e58.

Spiller R (2006). How inflammation changes neuromuscular function and its relevance to symptoms in diverticular disease. *J Clin Gastroenterol* **40**, S117-S120.

Spiller R (2012). Is it diverticular disease or is it irritable bowel syndrome?. *Dig Dis* **30**, 64-69.

Teng B, Murthy KS, Kummerle JF, Grider JR, Sase K, Michel T, & Makhlof GM (1998). Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* **275**, G342-G351.

Tjong YW, Ip SP, Lao L, Wu J, Fong HH, Sung JJ, Berman B, & Che CT (2011). Role of neuronal nitric oxide synthase in colonic distension-induced hyperalgesia in distal colon of neonatal maternal separated male rats. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 666-e278.

Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K, & Fukuzawa M (2000). Role of nitric oxide in the left-sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatogastroenterology* **47**, 692-696.

Trotman IF & Misiewicz JJ (1988). Sigmoid motility in diverticular disease and the irritable bowel syndrome. *Gut* **29**, 218-222.

Wedel T, Busing V, Heinrichs G, Nohroudi K, Bruch HP, Roblick UJ, & Bottner M (2010). Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 407-4.

Whiteway J & Morson BC (1985). Elastosis in diverticular disease of the sigmoid colon. *Gut* **26**, 258-266.

Anexo 2.

Evaluación de diferentes estrategias farmacológicas para tratar las alteraciones motoras que presentan los pacientes con enfermedad diverticular.

1. RESUMEN.

Objetivo: Evaluar el efecto fármacológico in vitro de dos espasmolíticos de uso frecuente en en la práctica clínica habitual para tratar la sintomatología/alteraciones motoras que presentan los pacientes con enfermedad diverticular, **Spasmocetyl® (Bromuro de otilonio) y Buscapina® (N-butil-hioscina)**. También se ha evaluado el efecto de un bloqueador puro de canales de calcio de tipo L, Nifedipina, utilizado como antihipertensivo para comparar su efecto con Bromuro de otilonio (OB). **Métodos:** Técnica de baño de órganos, con tiras de músculo liso circular colónico, procedentes de pacientes con y sin divertículos. Se estudiaron mediante estimulación de campo eléctrico, seleccionando aquellas que presentaban contracciones en ON (neurotransmisión excitatoria). El efecto farmacológico se evaluó mediante curvas concentración-respuesta (perfil farmacodinámico) de estos dos espasmolíticos y de Nifedipina. Se calculó la potencia IC_{50} (concentración inhibitoria del 50% de la contracción) y la eficacia E_{max} (máximo porcentaje de inhibición) de cada fármaco. **Resultados:** Tanto Bromuro de otilonio, como **N-butil-hioscina inhibieron de forma concentración dependiente la amplitud de las contracciones en controles y pacientes con divertículos**. Tanto Spasmocetyl® como Buscapina®, en muestras de pacientes con diverticulosis, presentan una menor eficacia y una potencia ligeramente menor en algunas de las frecuencias de estimulación testadas. En el caso de Nifedipina sólo la

eficacia fue menor. Los resultados con la máxima frecuencia de estimulación (40Hz) son los siguientes: Bromuro de Otilonio ($\text{Log IC}_{50}=-7.01\pm 0.36$, $E_{\text{max}}=46.93\pm 5.88$ vs. $\text{Log IC}_{50}=-6.88\pm 0.62$, $E_{\text{max}}=24.64\pm 5.52$; $p=0.0058$) y N-butil-hioscina ($\text{Log IC}_{50}=-6.56\pm 0.16$, $E_{\text{max}}=73.52\pm 4.62$ vs. $\text{Log IC}_{50}=-6.20\pm 0.28$, $E_{\text{max}}=71.10\pm 5.86$; $p=0.3560$), pacientes control y con diverticulosis respectivamente. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que aunque ambos espasmolíticos son de utilidad en estos pacientes, ambos presentan una menor eficacia y una potencia ligeramente menor en pacientes con diverticulosis.

2. INTRODUCCIÓN.

Alteraciones motoras en la enfermedad diverticular y posibles estrategias farmacológicas.

Los resultados experimentales obtenidos en esta tesis doctoral (Capítulo 1) muestran que los pacientes con enfermedad diverticular no sintomática presentan unas contracciones en ON mayores que el grupo control. Estos datos sugieren una mayor respuesta endógena superior para los neurotransmisores excitatorios ya sea debido a una mayor liberación por parte de las motoneuronas excitatorias o debido a una mayor sensibilidad del músculo liso (sobre-expresión de receptores, mayor abertura de canales de calcio de tipo L, etc.).

Esta mayor respuesta podría traducirse in Vivo en una mayor espasticidad por lo tanto el objetivo de este estudio fue el de comparar el efecto farmacológico (curvas concentración-respuesta) de dos espasmolíticos utilizados habitualmente en la práctica clínica, Spasmoctyl® (Bromuro de otilonio) y Buscapina® (N-butil-hioscina). Con especial interés en Bromuro de otilonio, ya que en el sigma humano se ha descrito que su principal acción farmacológica es a través de canales de calcio de tipo L (Gallego

et al., 2010). Este efecto como antagonista de los canales de calcio es especialmente interesante ya que se ha descrito que el uso crónico de estos antagonistas (Verapamilo y Nifedipina) utilizados como antihipertensivos en estos pacientes podrían prevenir las complicaciones como la perforación en pacientes con enfermedad diverticular (Morris *et al.*, 2003) y por tanto podría ser una buena elección en el manejo de pacientes con enfermedad diverticular no complicada. También se comparará el efecto Bromuro de otilonio con el de Nifedipina, ya que un estudio reciente llevado cabo en células musculares lisas del colon sugiere que Bromuro de otilonio podría tener también acciones anticolinérgicas y antitaquiquinérgicas como se había propuesto previamente en modelos animales (Evangelista *et al.*, 1998; Santicoli *et al.*, 1999; Martínez-Cutillas *et al.*, 2013).

También tiene interés el hecho de evaluar un fármaco como Buscapina® dado su acción anticolinérgica, puesto que en pacientes con enfermedad diverticular no complicada se ha descrito una sobre-expresión de receptores muscarínicos (M_3) como consecuencia de denervación colinérgica y la menor presencia de neuronas ChAT positivas (Golder *et al.*, 2003).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es evaluar mediante la técnica de baño de órganos el efecto farmacológico (curvas concentración-respuesta, perfil farmacodinámico) de estos dos espasmolíticos de uso frecuente en la práctica clínica, Spasmocetyl® (Bromuro de otilonio) y la Buscapina® (N-butil-hioscina). Así como, evaluar el efecto de un bloqueador puro de canales de calcio de tipo L, Nifedipina, utilizado como antihipertensivo y comparar su efecto con el Bromuro de otilonio.

3. Material y Métodos.

3.1. Pacientes y Muestras.

Las muestras de este estudio fueron obtenidas de pacientes operados por neoplasia de recto e igual que se especifica en el capítulo 2, los pacientes seleccionados no presentaban signos clínicos previos de alteraciones motoras ni de episodios de enfermedad diverticular complicada o no complicada. Se revisaron todos los estudios preoperatorios para valorar la distribución y la densidad, ya descritos previamente en el Capítulo 2. Además se revisaron los informes patológicos para descartar otras alteraciones histológicas como la inflamación.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital de Mataró (Códigos del CEIC: CEIC26/08 y CEIC22/12). A continuación se detallan las características epidemiológicas basales de los pacientes incluidos en cada grupo de estudio, diverticular y control, así como se detalla la localización y densidad de los divertículos del grupo con diverticulosis asintomática (Tablas 1 y 2, respectivamente).

Grupo	Relación H/M	Edad, años (rango)	LPS (%)	Fumadores (%)	IMC Kg/m ²	pTNM (%)	RDT (%)
Control (n=10)	6H / 4M	64.1 (38-79)	86.36	20	26.72	I - 50 II - 10 III - 20 IV - 20	20
Diverticulosis (n=14)	10H / 4M	71.8 (51-90)	82.00	35.7	27.31	I - 35.7 II - 21.4 III - 35.7 IV - 7.2	28.6

Tabla 1. Características de los pacientes incluidos en este estudio. LPS, abordaje por laparoscopia; IMC, índice de masa corporal; pTNM siguiendo the American Joint Committee on Cancer, 7ª edición y RDT, radioterapia neoadyuvante.

Localización diverticulosis	Aislada en sigma n=12 (85.8%)	Sigma y colon izquierdo n=1 (7.1%)	Sigma, colon izquierdo y derecho n=1 (7.1%)
Densidad de la diverticulosis	Baja densidad n=11 (78.7%) Alta densidad n=1 (7.1%)	Alta densidad en sigma y baja en colon izquierdo	Alta densidad en sigma , baja densidad en colon izquierdo y ≤ 3 divertículos en colon derecho.

Tabla 2. Alta densidad de diverticulosis se considera con más de 16 divertículos por segmento colónico. Golder et al., 2011.

3.2. Baño de Órganos.

Las muestras procedentes del colon de estos pacientes se estudiaron en el baño de órganos la técnica se describe en estudios previos del grupo (Auli et al., 2008) y en el capítulo 1.

Las tiras de músculo liso circular colónico (4 mm x10 mm) fueron estimuladas mediante un campo eléctrico y se seleccionaron aquellas que presentaban contracciones en ON (contracciones que tienen lugar como resultado de la estimulación de motoneuronas que liberan neurotransmisores excitatorios) se seleccionaron las frecuencias de estimulación (EFS) de 20, 30 y 40Hz a 26V en base a los resultados obtenidos en el Capítulo 1.

3.3. Fármacos.

Bromuro de otilonio se obtuvo de Laboratorios Menarini S.A. (Badalona, España), N-butyl-hioscina 20mg/ml de Boehringer Ingelheim España S.A. (Barcelona, España) y Nifedipina de Sigma-Aldrich (St Louise, MO USA). Las disoluciones de los fármacos se hicieron en agua destilada excepto Nifedipina que fue disuelta en etanol (0.01%).

3.4. Diseño experimental y estadística.

Evaluamos el efecto de Bromuro de otilonio (10^{-9} M a 10^{-4} M), N-butil-hioscina (10^{-9} M a 10^{-4} M) y de Nifedipina (10^{-11} M a 10^{-4} M) sobre las contracciones en ON (consecuencia de la estimulación de las motoneuronas excitatorias) a las frecuencias de estimulación de 20, 30 y 40Hz.

Las diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con diverticulosis fueron evaluadas mediante un ANOVA de dos vías comparando el efecto de las diferentes dosis de los fármacos. Las IC_{50} ($\text{Log } IC_{50}$) se calcularon mediante curvas concentración-respuesta convencionales con pendiente variable ($Y=100/ (1+10^{((\text{Log}EC50-X)*\text{Hill slope}))}$) donde X es el logaritmo de la concentración e Y es la respuesta, porcentaje de inhibición de la contracción en ON. Emax representa el máximo porcentaje de inhibición de cada fármaco de la amplitud de la contracción en ON.

Los datos se han expresado como media \pm SEM. Se consideró como significativo que un valor de $p < 0.05$. Los valores de N indican el número de muestras de pacientes diferentes. El análisis estadístico y las curvas concentración-respuesta se hicieron utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.00, (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS.

En la tabla 3 se detallan los resultados obtenidos sobre las contracciones en ON obtenidas mediante estimulaciones de 20, 30 y 40 Hz con los fármacos testados: Otilonio Bromuro (Figura 1), Nifedipina (Figura 2) y N-butil-hioscina (Figura 3).

Fármaco y EFS (Frecuencia)	Control	Diverticulosis	P
Bromuro de Otilonio (20Hz)	Log IC ₅₀ =-6.93±0.29 E _{max} =50.32±5.19 N=6	Log IC ₅₀ =-7.01±0.42 E _{max} =37.53±5.48 N=4	0.146
Bromuro de Otilonio (30Hz)	Log IC ₅₀ =-7.07±0.30 E _{max} =52.34±5.71 N=6	Log IC ₅₀ =-6.14±0.49 E _{max} =31.33±6.55 N=4	0.0003
Bromuro de Otilonio (40Hz)	Log IC ₅₀ =-7.01±0.36 E _{max} =46.93±5.88 N=6	Log IC ₅₀ =-6.88±0.62 E _{max} =24.64±5.52 N=4	0.0058
Nifedipina (20Hz)	Log IC ₅₀ =-8.97±0.34 E _{max} =72.97±0.68 N=6	Log IC ₅₀ =-9.17±0.35 E _{max} =54.35±4.90 N=5	0.0484
Nifedipina (30Hz)	Log IC ₅₀ =-8.44±0.30 E _{max} =69.67±5.91 N=6	Log IC ₅₀ =-8.69±0.33 E _{max} =53.14±4.98 N=6	0.0932
Nifedipina (40Hz)	Log IC ₅₀ =-7.87±0.30 E _{max} =62.98±6.05 N=6	Log IC ₅₀ =-7.90±0.29 E _{max} =54.66±5.13 N=6	0.5585
N-Butil-Hioscina (20Hz)	Log IC ₅₀ =-7.00±0.16 E _{max} =74.49±4.29 N=8	Log IC ₅₀ =-6.50±0.31 E _{max} =61.73±7.26 N=6	0.0048
N-Butil-Hioscina (30Hz)	Log IC ₅₀ =-6.78±0.15 E _{max} =77.05±4.31 N=8	Log IC ₅₀ =-6.31±0.24 E _{max} =69.80±6.57 N=6	0.0151
N-Butil-Hioscina (40Hz)	Log IC ₅₀ =-6.56±0.16 E _{max} =73.52±4.62 N=8	Log IC ₅₀ =-6.20±0.28 E _{max} =71.10±5.86 N=6	0.3560

Tabla 3. Tabla donde se muestran los resultados obtenidos mediante cada fármaco en el grupo control y el grupo con diverticulosis (el valor de p se ha obtenido comparando mediante un ANOVA de dos vías los grupos de estudio) los datos se expresan como media ± SEM.

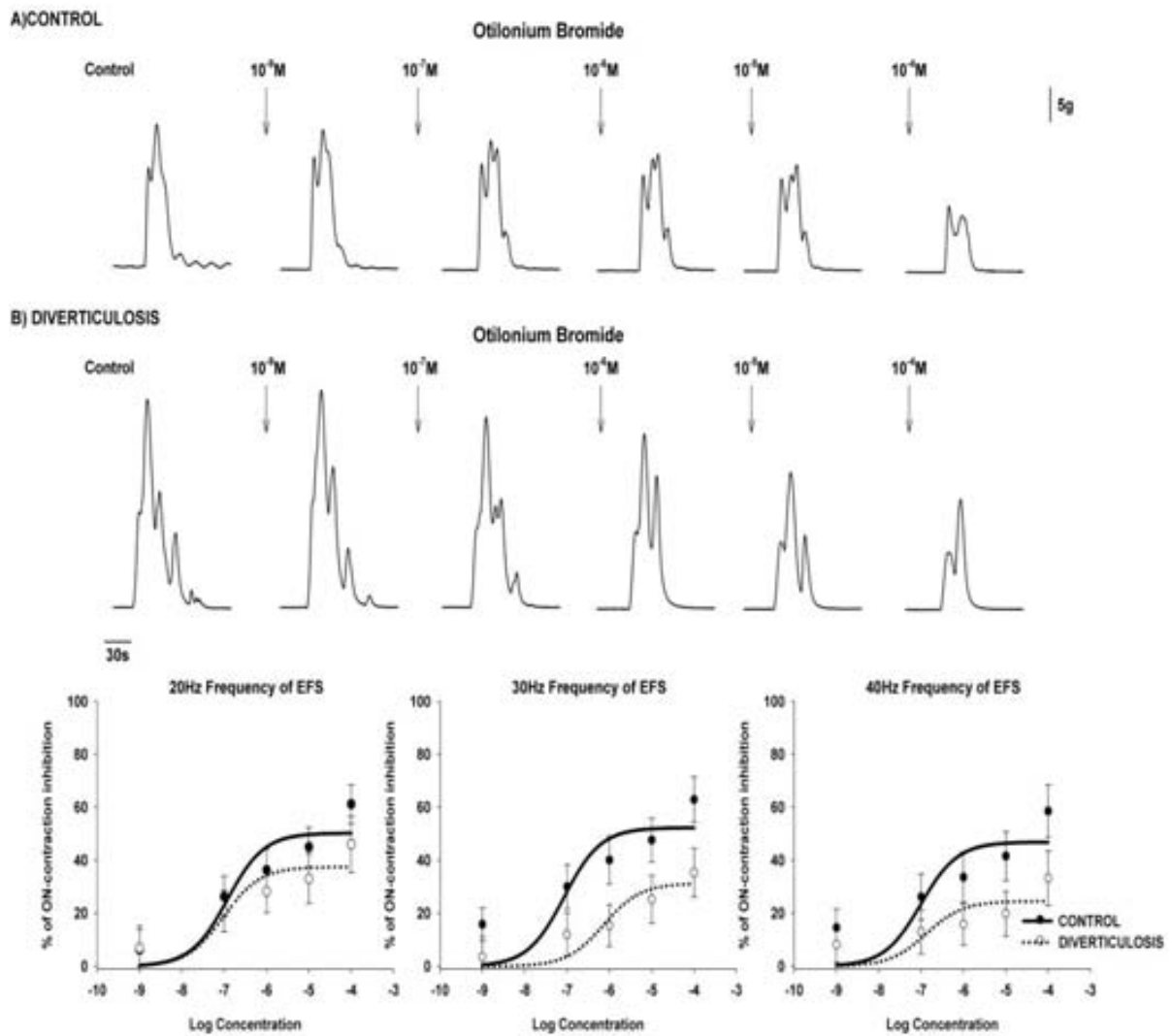


Figura 1. Registros mecánicos donde se muestra el efecto del Bromuro de Otilonio sobre las contracciones en ON (frecuencia de 30Hz) en pacientes control A) y en pacientes con diverticulosis B) (arriba) y curvas concentración-respuesta a 20, 30 y 40 Hz.

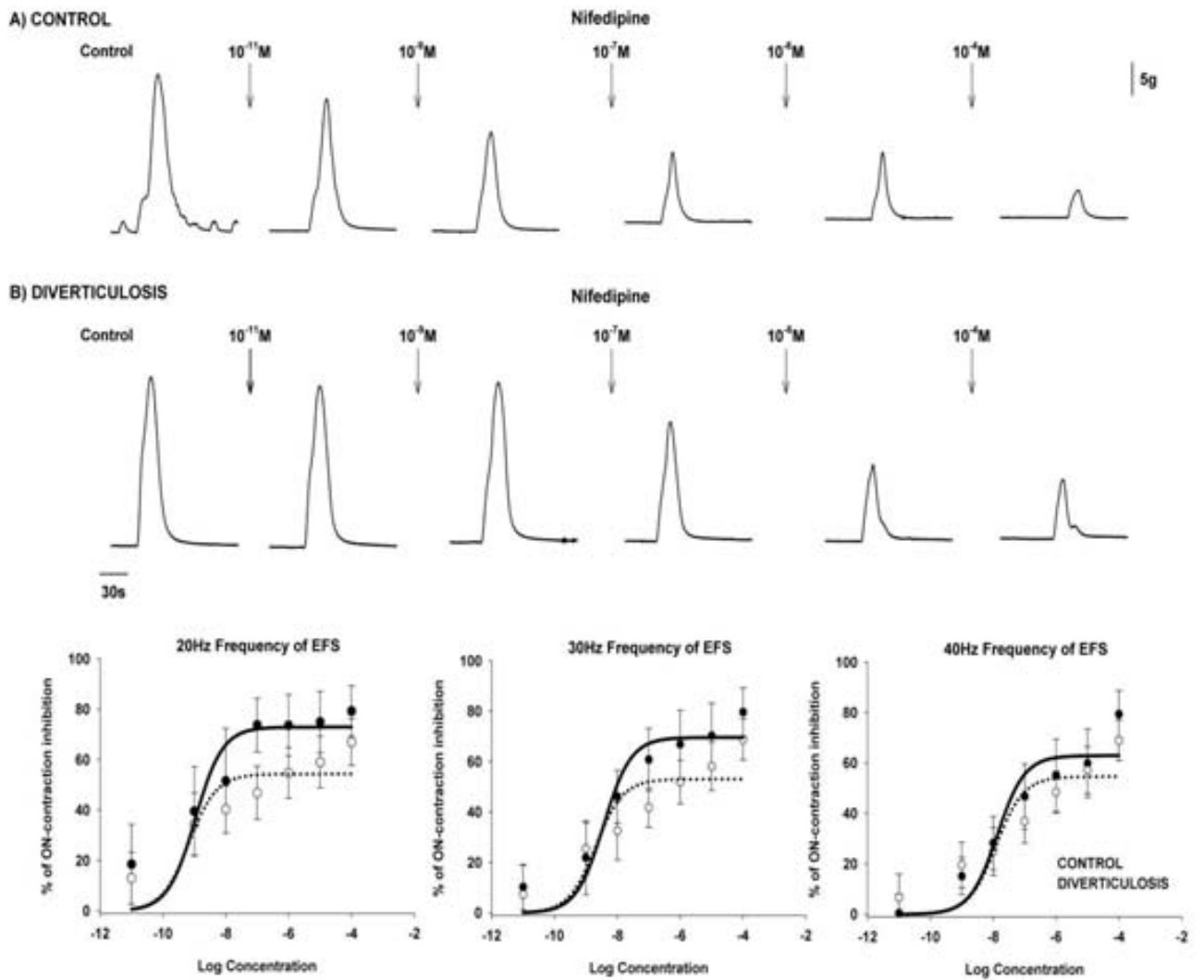


Figura 2. Registros mecánicos donde se muestra el efecto de la Nifedipina sobre las contracciones en ON (frecuencia de 30Hz) en pacientes control A) y en pacientes con diverticulosis B) (arriba) y curvas concentración-respuesta a 20, 30 y 40 Hz.

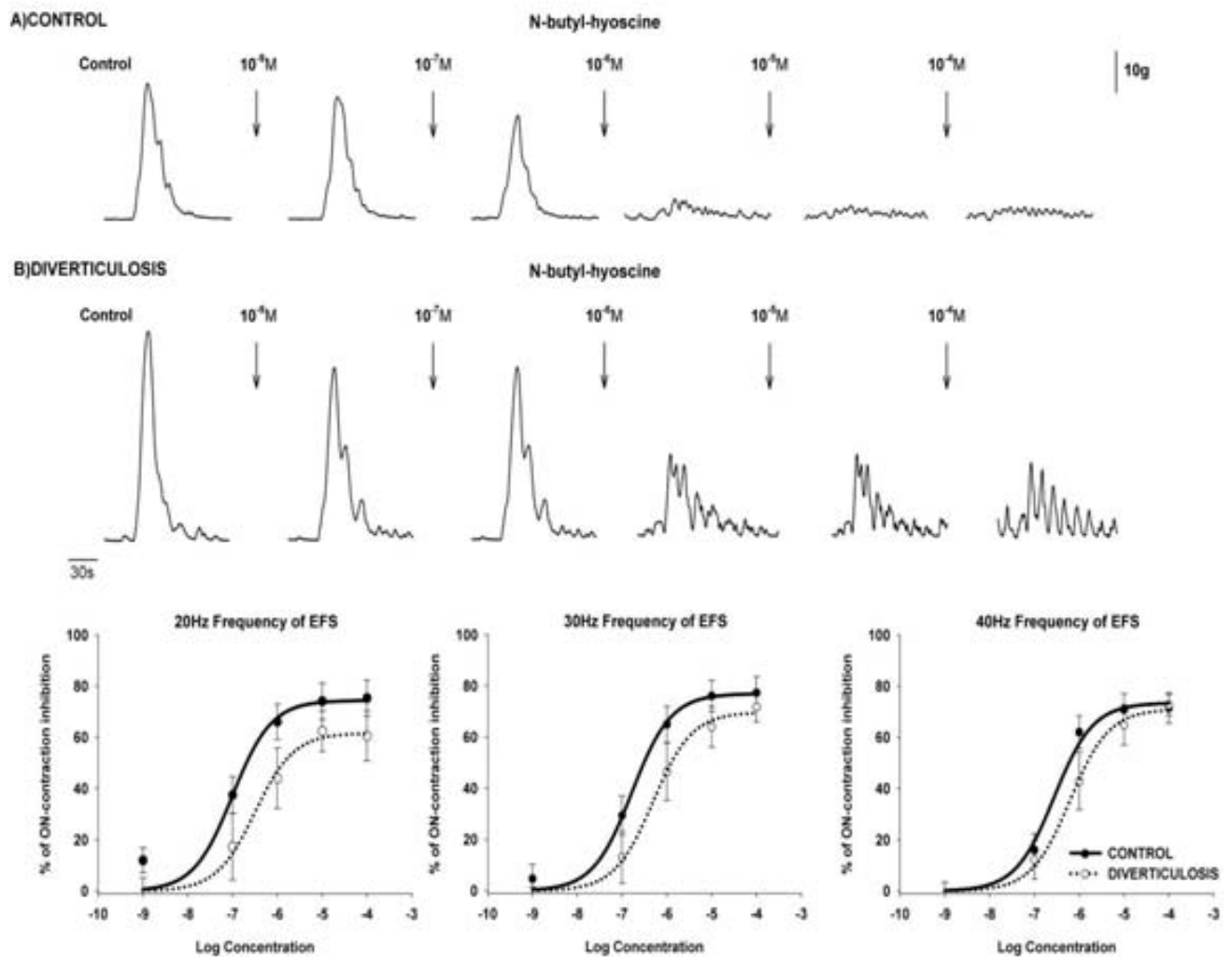


Figura 3. Registros mecánicos donde se muestra el efecto de N-butil-hioscina sobre las contracciones en ON (frecuencia de 30Hz) en pacientes control A) y en pacientes con diverticulosis B) (arriba) y curvas concentración-respuesta a 20, 30 y 40 Hz.

5. DISCUSIÓN.

Los datos experimentales obtenidos sugieren que tanto Spasmoclyl® (Bromuro de otilonio) como Buscapina® (N-butil-hioscina) tienen tanto una eficacia como una potencia menor en pacientes con diverticulosis respecto a pacientes sin divertículos.

Estos resultados podrían tener implicaciones terapéuticas, ya que habría que

incrementar las dosis de espasmolíticos administradas a estos pacientes. Estudios previos llevados a cabo in Vitro por nuestro grupo de investigación en el colon humano sugieren que Bromuro de otilonio tiene un efecto similar a Nifedipina actuando sobre canales de calcio de tipo L, aunque con menor potencia, reduciendo los principales patrones contráctiles: contracciones rítmicas espontáneas, contracciones inducidas por estiramiento, contracciones inducidas por campo eléctrico tanto en ON y en OFF, sin afectar a otros parámetros como la latencia de las contracciones en OFF (Gallego *et al.*, 2010). La ausencia de efecto del OB sobre la latencia y por lo tanto sobre la liberación de neurotransmisores inhibitorios (Auli *et al.*, 2008), es especialmente interesante ya que hemos observado una mayor latencia debido probablemente a un incremento de la liberación de óxido nítrico (NO) por parte de las neuronas inhibitorias en el tejido con diverticulosis (Capítulo 2). La sobre-expresión de la nNOS (enzima de síntesis del NO en neuronas) y el incremento de la liberación de forma tónica o constante y de forma inducida, como indican la presencia de tono inhibitorio y una mayor latencia, podrían participar en la progresión de la enfermedad ya que el efecto motor in vivo del aumento de la latencia in vitro participaría en el incremento en el tiempo de tránsito colónico descrito en estos pacientes (Taylor & Duthie, 1976;Tursi *et al.*, 2006;Jeyarajah & Papagrigoriadis, 2011). Estudios tanto en animales como en humanos han demostrado las propiedades farmacocinéticas singulares del bromuro de otilonio ya que después de su administración oral el fármaco no se absorbe (y por tanto las concentraciones plasmáticas son mínimas y en cambio alcanza concentraciones de rango micromolar en el tejido muscular colónico (Evangelista, 1998). Cabe destacar que las las IC₅₀ que hemos obtenido del OB en pacientes con diverticulosis en este estudio están también en el rango micromolar por lo que el OB

debe considerarse potencialmente útil como espasmolítico en estos pacientes (potencia farmacológica adecuada) aunque su efecto máximo (eficacia) es inferior al de los otros espasmolíticos evaluados en nuestro estudio (N-butil-hioscina).

La comparativa entre Nifedipina, un antihipertensivo con acción sobre canales de calcio de tipo L y Bromuro de otilonio, también con acción principal sobre estos canales, en el colon sigma humano (Gallego *et al.*, 2010) sugiere que otros receptores (muscarínicos o taquiquinérgicos) podrían también mediar las propiedades espasmolíticas de este fármaco, como indican estudios recientes llevados a cabo en células aisladas y cultivadas del colon humano (Martinez-Cutillas *et al.*, 2013), aunque estos datos deben ser interpretados con cautela ya que los cambios en las curvas dosis respuesta son similares para ambos a la frecuencia de 20Hz donde sólo hay una disminución de la eficacia (lo que sugiere un posible cambio en el número de receptores) y no en la potencia (que indicaría cambios en la afinidad de estos receptores por el fármaco).

Las diferencias entre el grupo control y el grupo diverticulosis obtenidos con N-butil-hioscina son menores que los obtenidos con los otros dos fármacos y en la frecuencia más alta que se ha testado no hay diferencias entre grupos. En estos pacientes en fases más avanzadas de la enfermedad se ha descrito una disminución de la innervación colinérgica (neuronas ChAT positivas) y una mayor respuesta a la acetilcolina administrada exógenamente ya que hay una sobre-expresión de receptores M₃ como consecuencia de esta denervación (Golder *et al.*, 2003). Estos resultados explicarían el porqué del incremento de la espasticidad a nivel postprandial que se ha observado en estos pacientes (Bassotti *et al.*, 2001; Cortesini & Pantalone, 1991) ya que en este estado se incrementa la liberación de acetilcolina. Está por

confirmarse si esta denervación colinérgica tiene lugar como consecuencia de esta patología o como resultado de posibles episodios de inflamación, ya que se ha descrito que hay pérdida de neuronas y cambios a nivel de sistema nervioso entérico como consecuencia de la inflamación (Moynes *et al.*, 2013).

También existe la opción de tratar a estos pacientes con espasmolíticos que actúen a sobre los receptores taquiquinérgicos, ya que se ha descrito que la NKA es el neurotransmisor excitatorio que junto con la acetilcolina provoca la contracción del colon sigma humano a través de receptores NK2a (Cao 2000), hay datos controvertidos respecto a los cambios en la vía taquiquinérgica en estos pacientes y no está claro si hay cambios de afinidad de estos agonistas-antagonistas o del número de receptores de esta vía (Maselli *et al.*, 2004;Liu *et al.*, 2002;Liu *et al.*, 2011;Burcher *et al.*, 2008).

Los espasmolíticos son una opción a considerar para el control de síntomas como el dolor abdominal secundario a espasticidad y mejoría del hábito intestinal en pacientes con enfermedad diverticular no complicada. Algunos espasmolíticos podrían tener incluso un efecto preventivo sobre algunas de las complicaciones (como es el caso de los antagonistas de calcio de tipo L). Aunque sería necesario llevar a cabo futuros estudios a nivel de neurotransmisores, receptores y vías excitatorias, en los diferentes estadios de la enfermedad nuestros resultados sugieren la utilidad de estos espasmolíticos en el tratamiento de los pacientes con enfermedad diverticular. Todo ello para valorar cuales son las mejores estrategias terapéuticas y si es necesario revisar la posología de espasmolíticos que se administra con esta indicación concreta.

Referencias

Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M, & Clave P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.

Bassotti G, Battaglia E, Spinozzi F, Pelli MA, & Tonini M (2001). Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity. *Dis Colon Rectum* **44**, 1814-1820.

Burcher E, Shang F, Warner FJ, Du Q, Lubowski DZ, King DW, & Liu L (2008). Tachykinin NK2 receptor and functional mechanisms in human colon: changes with indomethacin and in diverticular disease and ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 170-178.

Cortesini C & Pantalone D (1991). Usefulness of colonic motility study in identifying patients at risk for complicated diverticular disease. *Dis Colon Rectum* **34**, 339-342.

Evangelista S, Giachetti A, Chapelain B, Neliat G, & Maggi CA (1998). Receptor binding profile of Otilonium bromide. *Pharmacol Res* **38**, 111-117.

Gallego D, Auli M, Aleu J, Martinez E, Rofes L, Marti-Rague J, Jimenez M, & Clave P (2010). Effect of otilonium bromide on contractile patterns in the human sigmoid colon. *Neurogastroenterol Motil* **22**, e180-e191.

Golder M, Burleigh DE, Belai A, Ghali L, Ashby D, Lunniss PJ, Navsaria HA, & Williams NS (2003). Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *Lancet* **361**, 1945-1951.

Jeyarajah S & Papagrigoriadis S (2011). Review article: the pathogenesis of diverticular disease - current perspectives on motility and neurotransmitters. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 789-800.

Liu L, Markus I, Saghire HE, Perera DS, King DW, & Burcher E (2011). Distinct differences in tachykinin gene expression in ulcerative colitis, Crohn's disease and diverticular disease: a role for hemokinin-1? *Neurogastroenterol Motil*.

Liu L, Shang F, Markus I, & Burcher E (2002). Roles of substance P receptors in human colon circular muscle: alterations in diverticular disease 4. *J Pharmacol Exp Ther* **302**, 627-635.

Martinez-Cutillas M, Gil V, Gallego D, Mane N, Martin MT, & Jimenez M (2013). Mechanisms of action of otilonium bromide (OB) in human cultured smooth muscle cells and rat colonic strips. *Neurogastroenterol Motil* **25**, e803-e812.

Maselli MA, Piepoli AL, Guerra V, Caruso ML, Pezzolla F, Lorusso D, Demma I, & De PF (2004). Colonic smooth muscle responses in patients with diverticular disease of the colon: effect of the NK2 receptor antagonist SR48968. *Dig Liver Dis* **36**, 348-354.

Morris CR, Harvey IM, Stebbings WS, Speakman CT, Kennedy HJ, & Hart AR (2003). Do calcium channel blockers and antimuscarinics protect against perforated colonic diverticular disease? A case control study. *Gut* **52**, 1734-1737.

Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, & Lomax AE (2013). Effects of Inflammation on the Innervation of the Colon. *Toxicol Pathol*.

Santicioli P, Zagorodnyuk V, Renzetti AR, & Maggi CA (1999). Antimuscarinic, calcium channel blocker and tachykinin NK2 receptor antagonist actions of otilonium bromide in the circular muscle of guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**, 420-427.

Taylor I & Duthie HL (1976). Bran tablets and diverticular disease. *Br Med J* **1**, 988-990.

Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM, & Elisei W (2006). Transient lactose malabsorption in patients affected by symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon. *Dig Dis Sci* **51**, 461-465.

Discusión general

En cada uno de los capítulos anteriores se han discutido los principales resultados obtenidos específicamente en cada estudio y por tanto, el objetivo principal de esta discusión general es integrar y ordenar los datos obtenidos en los estudios realizados y ofrecer una discusión de conjunto.

1. Caracterización de las principales alteraciones motoras y electrofisiológicas in Vitro en pacientes con enfermedad diverticular asintomática.

El primer objetivo de esta tesis doctoral ha sido caracterizar los cambios a nivel de motilidad in Vitro y a nivel electrofisiológico (potencial de membrana y potencial post-unión inhibitorio, IJP) en el colon sigma de pacientes con diverticulosis.

Previamente, nuestro grupo de investigación describió los principales patrones de motilidad in Vitro en sigma humano (Auli *et al.*, 2008), estableciendo básicamente dos tipos de patrón motor in vitro:

Contracciones rítmicas espontáneas con origen miogénico, es decir, que no desaparecen en presencia de bloqueadores neurales como la TTX y por tanto están generadas por ICCs y moduladas por la liberación tónica de diferentes neurotransmisores, su amplitud aumenta después de bloquear la síntesis de óxido nítrico y se reduce después de bloquear los receptores muscarínicos y NK₂ (Gallego *et al.*, 2010).

-Contracciones inducidas por estimulación de las motoneuronas del SNE (plexo mientérico), dentro de este grupo podemos diferenciar entre dos tipos de contracciones:

-Contracciones ON que se dan por la estimulación de motoneuronas excitatorias que liberan principalmente acetilcolina (ACh) y neurokinina A (NKA) (Auli *et al.*, 2008;Cao *et al.*, 2000).

-Contracciones OFF donde además se estimulan motoneuronas inhibitorias que liberan básicamente Óxido Nítrico (NO) y ATP o una purina relacionada (Auli *et al.*, 2008;Auli *et al.*, 2005;Auli *et al.*, 2008;Gallego *et al.*, 2006).

En la **tabla 1** se resumen las diferencias en los principales patrones motores in Vitro observados en esta tesis en los pacientes con diverticulosis respecto al grupo control. Entre los datos aportados por los estudios de esta tesis, destaca una disminución en la amplitud y área bajo la curva de las contracciones rítmicas espontáneas en pacientes con enfermedad diverticular asintomática y un incremento tanto de la latencia de las contracciones en OFF como de la amplitud de las contracciones en ON de estos pacientes en respuesta a la estimulación eléctrica de las motoneuronas del plexo mientérico.

Patrón Motor	Parámetros evaluados	Cambios(Incremento/Disminución) en pacientes con E.diverticular asintomática (diverticulosis)
Contracciones rítmicas espontáneas	Amplitud (gramos)	Disminución
	AUC (área bajo la curva g/min.)	Disminución
	Frecuencia (contracciones/min.)	Sin Cambios
	Tono basal (gramos)	Sin Cambios
Contracciones - ON	Amplitud (gramos)	Incremento
Contracciones – OFF	Latencia (segundos)	Incremento
	Amplitud (gramos)	Sin cambios*

*Observaciones obtenidas en el primer estudio Capítulo 1.

Tabla 1. Sumario de las alteraciones motoras in Vitro observadas en pacientes con enfermedad diverticular asintomática.

Además de estos cambios a nivel electrofisiológico observamos que estos pacientes presentaban un potencial de membrana más hiperpolarizado (más alejado del umbral de apertura de los canales de calcio de tipo L) que los controles e IJPs (potenciales post-unión inhibitorios) más grandes. Todos estos cambios sugieren por lo tanto, una mayor liberación tanto de neurotransmisores inhibitorios como excitatorios por parte de las motoneuronas del SNE, ya que estos pacientes no presentaban cambios histológicos remarcables ni a nivel de las capas musculares ni a nivel de los diferentes elementos de control del plexo mientérico. Por tanto nuestra aportación en esta fase

es la descripción de un trastorno de la función previo a cualquier cambio estructural en los elementos de control de la motilidad del sigma humano en pacientes con diverticulosis.

2. Caracterización de los cambios a nivel de neurotransmisión inhibitoria.

Teniendo en cuenta los cambios fisiológicos observados en el primer estudio, el siguiente objetivo fue caracterizar los cambios en la neurotransmisión que se dan en estos pacientes y que tienen como consecuencia los cambios en los patrones motores y cambios electrofisiológicos. Comenzamos el estudio por la caracterización de la vía inhibitoria. En el segundo grupo de pacientes con diverticulosis, no sólo valoramos los datos epidemiológicos, sino que además se tuvieron en cuenta más variables clínicas que pudieran interferir con nuestros datos experimentales como son la técnica quirúrgica utilizada o el estadio de la neoplasia. Además de datos epidemiológicos y clínicos, se tuvieron en cuenta otros factores como la distribución y la densidad de los divertículos, se tomó como referencia la clasificación y los porcentajes propuestos por Golder y colaboradores (Golder *et al.*, 2011). En este estudio confirmamos que, tal y como indicaron los datos previos la motilidad espontánea es menor en el grupo de pacientes con diverticulosis, debido básicamente a una menor amplitud de las contracciones rítmicas espontáneas y que la latencia de las contracciones en OFF es mayor en estos pacientes. En la **tabla 2** se presenta un sumario de las alteraciones motoras observadas en el primer estudio, las hipótesis de las alteraciones que nosotros nos planteamos que podrían producir estos cambios y la aproximación experimental que se siguió para verificar nuestras hipótesis causales.

Patrón Motor	Hallazgo en diverticulosis	Aproximación experimental	Hipótesis causal
Contracciones rítmicas espontáneas	Disminución de AUC y amplitud	Incubación con: TTX, L-NNA y MRS2500 Curvas dosis respuesta para SNP y ADPβS Estudio de expresión qRT-PCR nNOS/P2Y ₁ R qRT-PCR iNOS	Existencia de un tono inhibitorio básicamente nitrérgico o bien una menor respuesta miogénica Incremento de liberación de NO de parte de las neuronas del SNE o mayor sensibilidad por parte del músculo liso a NO. Cambios no causados por la inflamación (iNOS)
Contracciones - OFF	Aumento latencia	Incubación con: L-NNA y MRS2500 qRT-PCR nNOS/P2Y ₁ R	Incremento de producción y liberación de NO por parte de las neuronas del SNE o mayor sensibilidad por parte del músculo liso a NO.
Contracciones –ON	Aumento amplitud	*Efecto de agonistas y antagonistas específicos de los receptores excitatorios *qRT-PCR para valorar diferencias de expresión de estos receptores	*Incremento de liberación (ACh-NKA) *Sobreexpresión de receptores NK ₂ y M ₂ /M ₃

*Estas hipótesis no han sido verificadas y están pendientes de futuras investigaciones.

Tabla 2. Esquema de los hallazgos observados en pacientes con diverticulosis así como la aproximación experimental propuesta basada en su hipótesis causal.

Respecto al origen de la reducción de las contracciones rítmicas espontáneas, los datos preliminares sugieren que o bien hay un tono inhibitorio o bien una menor respuesta miogénica, también podría deberse a una mayor sensibilidad a NO por parte del músculo liso. Por lo tanto nuestra principal hipótesis de trabajo se basa en la existencia de un tono inhibitorio de origen básicamente nitrérgico, originado por la liberación tónica y espontánea de NO por parte de las motoneuronas inhibitorias del plexo mientérico. Nuestra hipótesis inicial es que este tono inhibitorio debía ser básicamente nitrérgico puesto que en estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, tal y como se comenta en la introducción, hemos podido observar que la función de los dos principales neurotransmisores inhibitorios en el colon humano (Gallego *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2010; Gil *et al.*, 2012) tendrían funciones complementarias, el ATP o una purina relacionada sería el responsable de las relajaciones fásicas (por ejemplo el inicio de la fase descendente del reflejo peristáltico) mientras que el NO sería responsable de las relajaciones tónicas o más sostenidas (como por ejemplo la relajación de esfínteres o la acomodación gástrica) (Gallego *et al.*, 2008). Estos datos se han confirmado también en modelos animales como la rata (Gil *et al.*, 2010). Nuestros datos experimentales confirman que hay un intenso tono inhibitorio nitrérgico en estos pacientes con diverticulosis, ya que tras la incubación con L-NNA y TTX, que bloquean la síntesis de NO y la liberación de neurotransmisores respectivamente, se pone de manifiesto un intenso aumento en la amplitud y AUC en estos pacientes; por lo tanto nuestros datos experimentales confirman nuestra hipótesis inicial. Nuestra hipótesis alternativa era que hubiera una mayor sensibilidad por parte del músculo liso a los neurotransmisores inhibitorios, esta hipótesis queda descartada, ya que no se observaron diferencias entre grupos en las

curvas concentración-respuesta mediante la adición exógena con un donador de NO (SNP) y un agonista purinérgico (ADP β S).

Como era de esperar, el tono inhibitorio no se vio afectado por la adición del antagonista P2Y₁, MRS2500, en todo caso se confirman datos previos que sugerían que este antagonista reduce de forma moderada (\approx 20%) la motilidad espontánea (Auli *et al.*, 2008; Gil *et al.*, 2010) aunque no hemos observado diferencias entre grupos. Estos datos se ven reforzados por el hecho de que mediante RT-PCR se constata un incremento de la expresión de NOS neural (nNOS) sin cambios en la expresión de NOS inducible (iNOS), el hecho de que la iNOS no se vea incrementada refuerza la teoría de que hay un incremento de liberación de NO por parte de las motoneuronas inhibitorias, ya que un incremento de la iNOS, por ejemplo, como resultado de una inflamación podría producir efectos similares sobre la motilidad espontánea (Porras *et al.*, 2006). Estos datos respaldarían también nuestras observaciones del primer estudio que demostraron que los pacientes con enfermedad diverticular presentaban un potencial de membrana (RMP) de células musculares lisas del colon sigma más hiperpolarizado, ya que la liberación tónica de NO en estos pacientes mantendría más hiperpolarizado el potencial de membrana (Gil *et al.*, 2010). La ausencia de diferencias en la expresión de iNOS confirma la ausencia de fenómenos inflamatorios en estas fases iniciales de diverticulosis.

Las contracciones inducidas por campo eléctrico (EFS) se deben a la estimulación de motoneuronas del plexo mientérico. La latencia de estas contracciones se debe a la estimulación de motoneuronas inhibitorias y liberación de neurotransmisores inhibitorios, principalmente el NO y el ATP (Auli *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2008). Nuestra hipótesis causal era que del mismo modo que la

liberación tónica de NO, la liberación inducida por EFS por parte de las motoneuronas inhibitorias también podría estar incrementada. El hecho de que después de la incubación con L-NNA se inhiba la mayor parte de la latencia en ambos grupos y que después de esta incubación no haya diferencias entre grupos confirma que hay una mayor liberación de NO por parte de las motoneuronas inhibitorias en los pacientes con diverticulosis. En nuestro caso, este hecho también queda respaldado por la sobre-expresión de la nNOS observada en los estudios de biología molecular y descartada una mayor sensibilidad del músculo liso a NO en los estudios de sensibilidad a un donador de NO.

En el segundo estudio en el que se caracterizó la neurotransmisión inhibitoria, la latencia que observamos fue menor respecto al primer estudio, no obstante las diferencias de latencia entre grupos se han mantenido en ambos estudios. Esta latencia también fue mucho menor comparado con estudios anteriores (Auli *et al.*, 2008; Gallego *et al.*, 2010), y la proporción del componente purinérgico en nuestro segundo estudio también se vio muy reducida (Auli *et al.*, 2008). Las diferencias observadas entre estos estudios pueden ser de diverso origen puesto que los equipos utilizados e incluso el lugar físico de realización de estos estudios no ha sido el mismo, el primer estudio se realizó en la Universidad y el segundo en el Hospital. Esta gran reducción del componente purinérgico no nos ha permitido confirmar si hay un incremento de la neurotransmisión purinérgica como se observa en el primer estudio en que se ve un incremento de la amplitud del potencial post unión inhibitorio (IJP). Es probable que el estudio de la potencial alteración del componente purinérgico en los pacientes con enfermedad diverticular requiera de nuevo el uso de técnicas de electrofisiología como las utilizadas en el primer estudio.

3. Comparativa con otros estudios en pacientes con enfermedad diverticular.

A la hora de comparar los datos obtenidos en esta tesis doctoral con otros estudios de la literatura nos encontramos con el inconveniente de que en la mayoría de publicaciones no se especifica claramente en que estadio de la enfermedad están los pacientes estudiados. Muchas de las discrepancias que aparecen en la bibliografía se deben probablemente, al hecho de que se incluyen pacientes en diferentes estadios de la enfermedad. En muchos estudios se habla de enfermedad diverticular sin especificar si estos pacientes son sintomáticos o asintomáticos y tampoco se especifica si han tenido episodios de diverticulitis previa o la muestra se ha obtenido en un episodio agudo.

Se ha descrito en diversos estudios que la inflamación produce una pérdida de neuronas entéricas que se mantiene después de la recuperación de los episodios de inflamación (Linden *et al.*, 2005) . Además de la pérdida de neuronas se ha descrito que la inflamación podría cambiar la codificación de las neuronas del SNE, por ejemplo se ha descrito que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) disminuye la cantidad de VIP mientras que incrementa la cantidad de sustancia P presente en las neuronas (Neunlist *et al.*, 2003). También se han descrito cambios a nivel de NO sintasa y otros péptidos en pacientes con Crohn (Belai *et al.*, 1997). Ya que la inflamación aguda o crónica puede producir cambios a nivel histológico y en la neurotransmisión (Moynes *et al.*, 2013), que no necesariamente están ligados a la enfermedad diverticular sino a las complicaciones que ésta produce, y las observaciones pueden variar según el estadio en el que se encuentren los pacientes. De hecho, se han descrito cambios a nivel del SNE en biopsias de pacientes con

diverticulitis, donde se ha observado un incremento de neuropéptidos como el VIP y la sustancia P (Simpson *et al.*, 2009;Spiller, 2006).

La nomenclatura para definir cada una de los estadios de la enfermedad diverticular no es estándar a pesar de que actualmente es bastante aceptada la clasificación propuesta en 2011 por Humes y colaboradores (Humes *et al.*, 2011) . Es importante establecer o tener presente una clasificación y unos criterios que permitan homogeneizar y mejorar el diseño experimental de futuros estudios (Humes *et al.*, 2011). Nosotros hemos centrado nuestro estudio en el estadio más inicial de la enfermedad para descartar posibles cambios causados por episodios de inflamación y para intentar establecer un punto de partida en el conocimiento de la evolución y progresión del trastorno motor colónico asociado a esta enfermedad. Las muestras incluidas en nuestro estudio han sido seleccionadas y proceden de pacientes operados por neoplasia de recto con presencia de divertículos en el sigma que no presentan ni han presentado sintomatología, pacientes con diverticulosis según lo propuesto por Humes y colaboradores (Humes *et al.*, 2011) en los que el hallazgo de los divertículos es incidental. Estamos pues delante de una muestra muy homogénea de pacientes con mayor o menor densidad y extensión de la enfermedad, pero todos ellos con presencia de diverticulosis asintomática de localización en sigma. En el segundo estudio de esta tesis se ha mejorado la descripción de la muestra de estudio siguiendo los criterios de localización y densidad de divertículos propuestos por Golder (Golder *et al.*, 2011). Hemos considerado estos aspectos en la descripción anatómica y clínica de los grupos como fundamental de cara a poder establecer resultados sólidos y comparables, así como para entender la progresión de esta enfermedad (Golder *et al.*, 2011). Por lo tanto un mejor detalle en la descripción muestral de la mayoría de estudios publicados

ayudaría a establecer conclusiones con mayor poder de inferencia y mejorar el conocimiento global de la evolución de la enfermedad.

4. Factores experimentales que pueden influir a la hora de comparar resultados experimentales.

Existen otras variables que habría también que tomar en cuenta a la hora de valorar los resultados experimentales y comparar estudios. Variables como la edad, en la que se ha visto una pérdida de neuronas, principalmente colinérgicas con preservación de nitrérgicas (Bernard *et al.*, 2009). La presencia de pacientes fumadores, ya que se ha podido observar en estudios previos, tal y como se explica en la introducción general, que la nicotina administrada exógenamente provoca la liberación de neurotransmisores por parte de las motoneuronas inhibitorias (NO y ATP) (Auli *et al.*, 2008; Lecea *et al.*, 2009; Opazo *et al.*, 2011). El uso de antagonistas del calcio como parte de la medicación habitual con la consiguiente inhibición de la motilidad. Se ha demostrado que tanto Verapamilo como Bromuro de Otilonio disminuyen los principales patrones motores en el sigma humano (Gallego *et al.*, 2010). Se ha descrito también que otros fármacos como los anestésicos también podrían causar alteraciones en la contractibilidad in Vitro (Sanger *et al.*, 2013).

En nuestro caso hemos intentado monitorizar todas las variables y evitar en la medida de lo posible las diferencias entre grupos, no relativas a la presencia de divertículos. Otro factor a tener en cuenta, debido a que las muestras de nuestros estudios proceden de pacientes intervenidos por neoplasia de recto, un aspecto de especial relevancia es el tratamiento previo con quimioterápicos o posible exposición a radioterapia (Sanger *et al.*, 2013). Si bien la zona expuesta a radiación y a la potencial

enteritis secundaria está alejada y por lo tanto no afecta al estudio, de hecho no se han observado cambios a nivel histológico, pueden suponer factores de sesgo importantes para la detección de diferencias entre el grupo control y el grupo de pacientes con diverticulosis. En nuestros estudios, la proporción de pacientes irradiados y que recibió quimioterapia fue similar al comparar los grupos con/sin divertículos.

5. Alteraciones motoras en pacientes con enfermedad diverticular. Motilidad in Vivo (motilidad) e in Vitro (contractibilidad).

La mayoría de estudios relaciona la enfermedad diverticular con un trastorno en la motilidad del colon sigma, en concreto con un aumento de presión intraluminal y/o a un incremento de espasticidad observada en estudios de motilidad colónica in vivo. Se ha propuesto también que la deficiencia de fibra jugaría un papel en el desarrollo de esta alteración de la motilidad, ya que heces con un volumen pequeño requieren presiones intraluminales más altas para ser propulsada, podría provocar segmentación y obstrucción funcional en estos pacientes (Fozard *et al.*, 2011).

Estudios in Vivo llevados a cabo a pacientes con enfermedad diverticular con técnicas manométricas o registrando el potencial de membrana con electrodos extraluminales sugieren que estos pacientes presentan una cierta espasticidad, tal y como se comenta en el primer capítulo (Parks & Connell, 1969; Trotman & Misiewicz, 1988; Huizinga *et al.*, 1999; Cortesini & Pantalone, 1991; Bassotti *et al.*, 2001). En estos estudios se sugiere que hay un incremento de la actividad motora en el sigma. Hecho que se ha comprobado en pacientes con enfermedad diverticular complicada y no complicada en los que encuentran un incremento de actividad motora segmentaria y propulsiva, especialmente en fase postprandial (Cortesini & Pantalone, 1991).

En nuestro primer estudio observamos que los pacientes con diverticulosis presentaron una mayor amplitud en la respuesta a estímulo eléctrico en las contracciones en ON que se dan como consecuencia de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Auli *et al.*, 2008). Otros estudios in Vitro confirmarían estos datos en estadios más avanzados de la enfermedad (enfermedad diverticular no complicada) donde se ha podido observar que el tono activo (contractilidad) es superior en pacientes con enfermedad diverticular aunque en este estudio se observa también un incremento en el estiramiento pasivo (tono) que nosotros no observamos (Maselli *et al.*, 2004). También se ha sugerido que en este estadio los pacientes presentan un incremento de sensibilidad a la adición exógena de acetilcolina en la capa muscular longitudinal (tenia), en este estudio además se sugiere que hay un incremento de receptores M₃, aunque observan una menor presencia del enzima de síntesis de Acetilcolina (Chat) y proponen como explicación al incremento de receptores M₃ como consecuencia de una sobre-expresión por denervación (Golder *et al.*, 2003). También se han descrito por parte de Tomita y colaboradores hallazgos que están en la línea de lo descrito ya que observan un incremento de respuestas colinérgicas post estimulación eléctrica en el colon izquierdo de pacientes con enfermedad diverticular sin especificar la presencia o no de síntomas (Tomita *et al.*, 2000). Sin embargo hay otros estudios que proponen que no hay diferencias en la amplitud de las contracciones inducidas por campo eléctrico ni en ON, ni en OFF (Snape, Jr. *et al.*, 1991). Incluso se ha visto una menor respuesta contráctil en pacientes con diverticulitis (y por tanto inflamación) (Guagnini *et al.*, 2006).

En contraposición, nuestros hallazgos respecto la vía inhibitoria contrastan con los datos publicados en estadios más avanzados de la enfermedad. Se ha observado en

pacientes con enfermedad diverticular una disminución de respuestas nitrérgicas en respuesta a campo eléctrico (Tomita *et al.*, 2000). Además se ha podido observar en pacientes con enfermedad diverticular no complicada una disminución la presencia del enzima de síntesis nNOS (NOS1) y una menor sensibilidad en respuesta a sodio nitroprusiato (un donador de NO) por parte de la capa muscular longitudinal en estos pacientes (Golder *et al.*, 2007).

Como se ha comentado anteriormente es difícil establecer una comparativa con nuestros datos experimentales o trazar una progresión de la enfermedad ya hay que tomar en cuenta que algunos de los estudios anteriores están llevados a cabo en pacientes en los que no se especifica el estadio o si han experimentado episodios de diverticulitis, es incluso posible que en el mismo estudio se hayan agrupado pacientes en diferentes estadios. Esta tesis es el primer eslabón de la cadena de estudios que nuestro grupo está desarrollando para contribuir al conocimiento de la progresión de la historia natural de esta enfermedad.

6. Traslación entre los patrones motores in Vitro y las alteraciones motoras in Vivo en pacientes.

Los estudios in Vitro ofrecen la importante ventaja de que proporcionan un sistema experimental donde testar fármacos y estrategias terapéuticas sin afectar al paciente además de poder aislar factores experimentales que pudieran interferir en los resultados. Sin embargo, la interacción con algunos de los elementos implicados en el control de la motilidad colónica están ausentes, como el control por parte del sistema nervioso autónomo y el central o bien el efecto de las hormonas gastrointestinales, con efecto sobre la motilidad especialmente en la fase postprandial. Por lo tanto, pese a

que en este apartado se hace una translación de los datos obtenidos en la presente tesis doctoral, esta translación deber interpretarse con cautela. Previamente nuestro grupo ya ha publicado el posible significado in vivo de los patrones de contractilidad in vitro observados en el colon normal en ausencia de enfermedad diverticular (Aulí, 2008). Nuestros datos actuales reflejan fundamentalmente una menor amplitud de la motilidad espontánea y una mayor latencia de las contracciones en OFF. Este incremento en la liberación de NO por parte de las motoneuronas inhibitorias de forma tanto espontánea (tono inhibitorio responsable de la inhibición de la actividad espontánea) como inducida (latencia), podría reflejarse en una menor velocidad de tránsito colónico en pacientes con diverticulosis. En los pacientes con enfermedad diverticular (sin especificar el estadio) se ha descrito tanto un incremento en el tiempo de tránsito intestinal como de estreñimiento (Commane *et al.*, 2009; Fisher *et al.*, 1985; Kiguli-Malwadde & Kasozi, 2002; Calder, 1979; PAINTER & Burkitt, 1971). Aunque también se podría hipotetizar que este incremento de la liberación de NO podría ser un mecanismo compensatorio para intentar contrarrestar esta disminución del tránsito que se ha observado en estos pacientes, ya que se ha descrito que una disminución de nNOS provocaría una menor velocidad de tránsito colónico, ya que el NO participaría en la fase descendente del reflejo peristáltico (Mizuta *et al.*, 1999). Estos datos cuadrarían también con el hecho de que se haya descrito una menor cantidad de nNOS en pacientes con estreñimiento crónico (Faussone-Pellegrini *et al.*, 1999). Aunque hay cierta controversia respecto a este tema ya que actualmente está en discusión si los pacientes con enfermedad diverticular realmente tienen reducido su tránsito colónico y hay estudios que incluso discrepan al respecto (Hall *et al.*, 2010; Jeyarajah & Papagrigoriadis, 2011; Peery *et al.*, 2013; Peery & Sandler, 2013).

Nuestros datos reflejan además un incremento de la amplitud de las contracciones en ON que se dan como consecuencia de la liberación de neurotransmisores excitatorios (Auli *et al.*, 2008). Este incremento de amplitud de las contracciones en ON podría correlacionarse con la espasticidad descrita en estos pacientes, en este respecto hay un mayor consenso, aunque es posible que en pacientes asintomáticos este exceso de contractilidad sea menor, como se ha visto en algunos estudios in Vivo en los que subdividen los pacientes según los estadios (Cortesini & Pantalone, 1991). Es posible que en estadios iniciales esta espasticidad quede parcialmente compensada por el incremento de la vía inhibitoria observado en el presente estudio.

7. Alteraciones histológicas asociadas a la enfermedad diverticular.

Debemos tener presente que la enfermedad diverticular es una entidad compleja, en la que diversos factores podrían jugar un papel en su aparición y evolución. Como se ha comentado anteriormente, las alteraciones motoras comentadas anteriormente sería uno de ellos, otro factor que se ha propuesto que participaría en la aparición y evolución de esta enfermedad son los cambios histológicas y estructurales en la pared del colon.

En los estudios morfológicos realizados en el capítulo 1 no se han detectado diferencias estructurales significativas en los principales elementos celulares de la pared del colon en estos pacientes con diverticulosis. Esto sugiere que los cambios funcionales preceden a los cambios histológicos y estructurales en esta fase inicial de la enfermedad. Estos estudios histológicos han sido realizados mediante técnicas histológicas convencionales (hematoxilina eosina) y de inmunohistoquímica. Nuestros estudios no muestran cambios en las poblaciones de ICCs, ni en las neuronas del plexo

mientérico, ni en la densidad de células musculares lisas de las capas longitudinal y circular. Si bien las muestras no han sido procesadas según las recomendaciones establecidas por la guía del International Working Group (“The London Classification of gastrointestinal neuromuscular pathology: report on behalf of the Gastro 2009 International Working Group”) para el estudio histológico de muestras del tracto gastrointestinal (Knowles *et al.*, 2009) ya que estas aparecieron cuando ya habíamos iniciado nuestro estudio. Como se comenta en el anexo I, en esta guía se establecen una serie de recomendaciones como el número de cortes que se deben estudiar de un mismo paciente para un mismo marcador, las micras de separación de los cortes para no valorar cortes de un mismo ganglio y consideraciones metodológicas que permiten estandarizar resultados y poder establecer comparativas entre estudios, aunque no establecen rangos de normalidad de los diferentes tipos celulares. Además nuestro estudio ha sido llevado a cabo en un grupo reducido de pacientes. A pesar de ello los números de nuestros contajes de neuronas del plexo mientérico e ICCs coinciden con los datos publicados por otros estudios (Bernard *et al.*, 2009; Gomez-Pinilla *et al.*, 2011), por lo que pensamos que en el estadio inicial de la enfermedad (diverticulosis), los cambios estructurales son mínimos; tal y como se detalla en los estudios histológicos realizados en el capítulo 1 y anexo I.

En la introducción general la tabla 1 resume algunas de las alteraciones histológicas que se han descrito en pacientes con enfermedad diverticular. Además de las dificultades metodológicas para establecer comparativas entre estudios puestas de manifiesto por el “International Working Group” (Knowles *et al.*, 2009), también hemos de tener en cuenta como se ha comentado previamente en esta discusión, que la mayoría de los estudios se han realizado en grupos en diferentes estadios de la

enfermedad. Algunos de ellos han sido llevados a cabo en pacientes con enfermedad diverticular no complicada, pero que pueden haber sufrido algún episodio de diverticulitis, y en otros casos en pacientes que han sido operados como consecuencia de inflamación aguda.

Uno de los pocos estudios histológicos donde se siguen tanto las recomendaciones metodológicas publicadas en la guía del “International Working Group” y además se especifica el estadio de la enfermedad, en el que se encuentran los pacientes, que al menos han padecido dos episodios de inflamación aguda o diverticulitis, es el publicado por Wedel y colaboradores (Wedel *et al.*, 2010). En este estudio se muestra como en la enfermedad diverticular hay una pérdida de neuronas tanto en el plexo submucoso como en el mientérico. Esta pérdida de neuronas podría estar directamente relacionado con la inflamación ya que como se ha comentado previamente en esta discusión general la inflamación per se puede provocar cambios en la codificación de estas neuronas (Belai *et al.*, 1997; Neunlist *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2009; Moynes *et al.*, 2013). Además se ha descrito que la inflamación produce una pérdida de neuronas que no se recupera después de la remisión del episodio inflamatorio (Linden *et al.*, 2005). Por lo tanto en estadios más avanzados de la enfermedad diverticular es difícil discernir si los cambios histológicos se pueden atribuir al origen y progresión de la enfermedad o bien se dan como resultado de la inflamación, especialmente si el paciente ha sufrido episodios recurrentes. Este ha sido uno de los principales motivos por los que se ha seleccionado un grupo de pacientes con diverticulosis, todavía asintomáticos y sin episodios de inflamación previos u otras alteraciones gastrointestinales.

8. Posibles líneas de tratamiento/prevenición atendiendo a los hallazgos descritos.

Actualmente no existe una pauta clínica clara para tratar a los pacientes con enfermedad diverticular ni las alteraciones motoras asociada ni evitar la progresión de la enfermedad. De hecho la mayoría de pacientes con diverticulosis permanecen asintomáticos durante toda su vida y es en los casos en los que estos pacientes pasan a presentar síntomas o en el caso de la enfermedad diverticular no complicada en el que se establecen diversos tratamientos para paliar los síntomas que varían entre el dolor abdominal, la hinchazón y las alteraciones en el ritmo deposicional (Simpson *et al.*, 2003). El tratamiento es totalmente sintomático, suele limitarse a los episodios agudos y es muy heterogéneo en cuanto a medidas dietéticas, espasmolíticos, etc.

Es en estos casos donde se suele prescribir fibra en diferentes formatos ya sea soluble o insoluble para tratar a estos pacientes, partiendo de la base de que la falta de fibra en la dieta es uno de los factores que generan esta enfermedad y que agravan el cuadro clínico ya que heces más pequeñas serían más difícilmente propulsadas y se necesitarían mayores presiones intraluminales para propulsarlas (Commane *et al.*, 2009; Fisher *et al.*, 1985; Painter & Burkitt, 1971). Aunque actualmente el incremento en la ingesta de fibra como parte del tratamiento de la enfermedad diverticular no complicada está en entredicho (Smith *et al.*, 2011; Humes & West, 2011), ya que a pesar de que podrían mejorar el tránsito intestinal, se ha visto que aumentan la formación de gas y desencadenan episodios de dolor cólico abdominal (Smith *et al.*, 2011). Actualmente se barajan diferentes opciones terapéuticas como son el uso de prebióticos (Smith *et al.*, 2011) antibióticos e inmunomoduladores locales como la Mesalazina (Di Mario *et al.*, 2005; Di Mario *et al.*, 2006; Di Stefano *et al.*, 2000).

En esta tesis doctoral hemos observado que hay un incremento de las contracciones en ON, que podría correlacionarse con la espasticidad observada en fases más avanzadas. Es por ello que en el anexo II hemos explorado el efecto de dos tipos de espasmolíticos utilizados actualmente en la práctica clínica como son la N-butilhioscina y el bromuro de otilonio en muestras de pacientes con diverticulosis. Nuestros resultados revelan que es posible que haya que incrementar la dosis terapéutica de estos espasmolíticos en pacientes con enfermedad diverticular para obtener un efecto terapéutico adecuado. Además, en este sentido comparando las acciones farmacológicas observadas in Vitro, el fármaco de elección en estos pacientes sería el Bromuro de Otilonio, tal y como se comenta en el anexo II, ya que estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo se ha visto que disminuye la amplitud de las contracciones en ON (incrementada en estos pacientes), sin que afecte la neurotransmisión inhibitoria ni incremente la latencia de las contracciones en OFF (Gallego *et al.*, 2010) que como hemos visto son mayores en pacientes con diverticulosis. Estos hallazgos sugieren que el Bromuro de Otilonio sería capaz de reducir la amplitud de las contracciones del sigma sin afectar su velocidad de propagación, una combinación de efectos muy interesante para los pacientes con diverticulosis. Por otro lado se ha observado que el tratamiento crónico con antagonistas de canales de calcio como Nifedipina y Verapamilo administrados durante años en pacientes con patología cardiovascular, podrían prevenir las complicaciones en pacientes con diverticulitis como la perforación (Morris *et al.*, 2003) lo cual sería otro argumento a favor de este espasmolítico ya que el Bromuro de Otilonio también actúa como un antagonista selectivo de los canales de Calcio tipo L de las células musculares lisas del colon sigma.

Otra posibilidad que abre esta tesis doctoral a nivel de posibles dianas terapéuticas es la nNOS. Diversos estudios han demostrado que inhibidores de la NOS, NO-scavengers e inhibidores de la guanilato-ciclasa soluble (GC) han demostrado eficacia en modelos experimentales de colitis y un incremento en el umbral de sensibilidad al dolor en pacientes con síndrome del intestino irritable (IBS) (Perner & Rask-Madsen, 1999; Kolios *et al.*, 2004; Kuiken *et al.*, 2006). En estos casos los inhibidores de la producción, biodisponibilidad o de la vía intracelular tienen como objetivo reducir el NO procedente de la iNOS, la sintasa de óxido nítrico inducible, y esta inducción tiene lugar principalmente como resultado de la inflamación. Sin embargo, es necesario desarrollar inhibidores específicos de la NOS dirigidos a la inhibición de la iNOS en el caso de enfermedades como la colitis ulcerosa y el íleo postoperatorio (Kolios *et al.*, 2004) para el tratamiento de la hipersensibilidad en pacientes con SII (Kuiken *et al.*, 2006) o inhibidores de la nNOS para el hipotético caso de tratar mediante estos compuestos las alteraciones de la vía inhibitoria asociadas a la enfermedad diverticular.

En cualquier caso cualquier iniciativa de interaccionar con la vía nitrérgica debería ser emprendida con cautela por los posibles efectos secundarios que podría tener una inhibición sobre la nNOS (o su vía intracelular). Por ejemplo en el estudio de Kuiken y colaboradores (Kuiken *et al.*, 2006) en que administraron un inhibidor de la NOS para tratar de paliar los efectos del incremento de la iNOS en pacientes con síndrome del intestino irritable y observaron efectos secundarios derivados de la inhibición de la nNOS sobre el músculo liso vascular (incremento de la tensión arterial). Estos efectos sobre otros sistemas deberían tenerse en cuenta (a parte de la baja especificidad de los inhibidores de las diferentes NOS); pero además deberían tomarse en

consideración otros posibles efectos sobre el propio tracto gastrointestinal ya que el NO producido por la nNOS es vital para funciones como la acomodación gástrica y la relajación de los esfínteres no sólo esofágico sino también el anal interno (IAS) (Gonzalez *et al.*, 2004; Lecea *et al.*, 2011; Andrews *et al.*, 2007; O'Kelly *et al.*, 1993). Por lo tanto cualquier estrategia farmacológica de cara a interactuar con este incremento de la síntesis y liberación de NO pasaría por restringir su biodisponibilidad al colon e incrementar su especificidad, aún así habría que tener en cuenta que cierto tono nitrérgico y liberación de NO son necesarias, ya que como se ha comentado este neurotransmisor participaría en la fase descendente del reflejo peristáltico (Mizuta *et al.*, 1999).

En cualquier caso la traslación de los resultados experimentales de nuestros estudios *in vitro* al campo clínico debe considerarse siempre con cautela ya que son muchos los factores que interactúan en esta enfermedad y el origen de sus principales síntomas asociados.

9. Futuras líneas de investigación.

Como se ha comentado en esta discusión es crucial establecer una separación entre los diferentes estadios de esta enfermedad para poder evaluar los cambios que se dan en su progresión e identificar los factores implicados en la aparición de los divertículos y también los factores que determinan que entre un 10-25% de los pacientes con diverticulosis desarrollen síntomas debido a la progresión de la enfermedad diverticular (Humes *et al.*, 2011; Spiller *et al.*, 2010). También es importante evaluar los cambios que se dan como consecuencia de la inflamación que se da en los episodios de diverticulitis. Por lo tanto futuros estudios podrían estar encaminados a subdividir

grupos en función de la densidad de divertículos y el área en la que se encuentran los divertículos, así como hacer subgrupos según sintomatología y/o episodios previos de inflamación.

Nuestro estudio actual se limita al primer estadio de la enfermedad diverticular, la diverticulosis por tanto en el futuro, habría que ampliar este estudio para confirmar que estos cambios observados son también extrapolables a los estadios más avanzados.

Quedan también pendientes de estudio la vía excitatoria, ya que habría que confirmar en un grupo más amplio de pacientes que las contracciones en ON están incrementadas y evaluar si, tal y como se ha descrito en estudios en pacientes con enfermedad diverticular no complicada este incremento se debe a una sobreexpresión de receptores muscarínicos M_3 como consecuencia de una denervación colinérgica (Golder *et al.*, 2003). También están por confirmarse las alteraciones descritas en estadios más avanzados en la vía taquiquinérgica. Alguno de estos estudios ya está en fase experimental con resultados preliminares que confirman esta hipótesis. Queda pendiente de estudio evaluar si los cambios propuestos en las vías pre-sinápticas que se dan en pacientes con diverticulitis (a nivel de receptores serotoninérgicos (Bottner *et al.*, 2012) y receptores de cannabinoides (Guagnini *et al.*, 2006) se dan también en los estadios iniciales o bien son el resultado, como se ha comentado previamente de la inflamación, ya que estos receptores son interesantes dianas farmacológicas para desarrollar posibles tratamientos para estos pacientes.

Sería también interesante en futuros estudios confirmar o desestimar si la enfermedad diverticular y el IBS están relacionadas. Ya que como se comenta en el capítulo 2, se ha

observado en un modelo animal de IBS que la nNOS se sobreexpresa, de forma similar a nuestras observaciones en enfermedad diverticular

Desde el inicio del estudio de la diverticulosis y la enfermedad diverticular, se ha relacionado la escasa ingesta de fibra como debido a este bajo volumen del bolo fecal se incrementaría el tiempo de tránsito intestinal y para propulsarlo habría un incremento de presión intraluminal y de espasticidad e incremento de presión intraluminal descritos en diferentes estudios (Hall *et al.*, 2010;Jeyarajah & Papagrigoriadis, 2011) aunque actualmente estas premisas que eran comúnmente aceptadas se están poniendo en entredicho, así como el uso de fibra para el tratamiento de la enfermedad diverticular no complicada (Smith *et al.*, 2011;Humes & West, 2011). Probablemente las bases sobre las que se trabajaba cuando se trataba con esta enfermedad deban ser replanteadas.

En este trabajo se describe como la presencia de diverticulosis comporta cambios motores in Vitro en la fase asintomática de la enfermedad con ausencia de alteraciones histológicas. Se ha constatado una sobreexpresión de nNOS y de respuestas in Vitro mediadas por NO en pacientes con diverticulosis. Este hecho establece el inicio de futuros estudios para el control y modulación de la nNOS o de las vías que median la relajación nitrérgica con intención de evitar el progreso de la enfermedad y/o el mejor control de los síntomas. Por lo tanto, nuestro grupo proseguirá el estudio de estos cambios fisiológicos en diferentes estadios de la enfermedad, de su fisiopatología y de las posibles dianas terapéuticas más eficaces para los trastornos motores más prevalentes en cada estadio.

Referencias

Andrews CN, Bharucha AE, Camilleri M, Low PA, Seide B, Burton D, Baxter K, & Zinsmeister AR (2007). Nitrergic contribution to gastric relaxation induced by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in healthy adults. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1359-G1365.

Auli M, Farre R, Hernandez P, Gallego D, Martinez E, Marti-Rague J, Sunol X, Jimenez M, & Clave P (2005). Nitrergic and purinergic co-neurotransmission in human sigmoid colon. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 27.

Auli M, Martinez E, Gallego D, Opazo A, Espin F, Marti-Gallostra M, Jimenez M, & Clave P (2008). Effects of excitatory and inhibitory neurotransmission on motor patterns of human sigmoid colon in vitro. *Br J Pharmacol* **155**, 1043-1055.

Bassotti G, Battaglia E, Spinozzi F, Pelli MA, & Tonini M (2001). Twenty-four hour recordings of colonic motility in patients with diverticular disease: evidence for abnormal motility and propulsive activity. *Dis Colon Rectum* **44**, 1814-1820.

Belai A, Boulos PB, Robson T, & Burnstock G (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* **40**, 767-774.

Bernard CE, Gibbons SJ, Gomez-Pinilla PJ, Lurken MS, Schmalz PF, Roeder JL, Linden D, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Camilleri M, Zinsmeister AR, Pozo MJ, Hicks GA, & Farrugia G (2009). Effect of age on the enteric nervous system of the human colon. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 746-e46.

Bottner M, Barrenschee M, Hellwig I, Harde J, Egberts JH, Becker T, Zorenkov D, & Wedel T (2012). The enteric serotonergic system is altered in patients with diverticular disease. *Gut*.

Calder JF (1979). Diverticular disease of the colon in Africans. *Br Med J* **1**, 1465-1466.

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.

Commane DM, Arasaradnam RP, Mills S, Mathers JC, & Bradburn M (2009). Diet, ageing and genetic factors in the pathogenesis of diverticular disease. *World J Gastroenterol* **15**, 2479-2488.

Cortesini C & Pantalone D (1991). Usefulness of colonic motility study in identifying patients at risk for complicated diverticular disease. *Dis Colon Rectum* **34**, 339-342.

Di Mario F, Aragona G, Leandro G, Comparato G, Fanigliulo L, Cavallaro LG, Cavestro GM, Iori V, Maino M, Moussa AM, Gnocchi A, Mazzocchi G, & Franze A (2005). Efficacy of mesalazine in the treatment of symptomatic diverticular disease. *Dig Dis Sci* **50**, 581-586.

Di Mario F, Comparato G, Fanigliulo L, Aragona G, Cavallaro LG, Cavestro GM, & Franze A (2006). Use of mesalazine in diverticular disease. *J Clin Gastroenterol* **40**, S155-S159.

Di Stefano M, Strocchi A, Malservisi S, Veneto G, Ferrieri A, & Corazza GR (2000). Non-absorbable antibiotics for managing intestinal gas production and gas-related symptoms. *Aliment Pharmacol Ther* **14**, 1001-1008.

Faussone-Pellegrini MS, Infantino A, Matini P, Masin A, Mayer B, & Lise M (1999). Neuronal anomalies and normal muscle morphology at the hypomotile ileoceocolonic region of patients affected by idiopathic chronic constipation. *Histol Histopathol* **14**, 1119-1134.

Fisher N, Berry CS, Fearn T, Gregory JA, & Hardy J (1985). Cereal dietary fiber consumption and diverticular disease: a lifespan study in rats. *Am J Clin Nutr* **42**, 788-804.

Fozard JB, Armitage NC, Schofield JB, & Jones OM (2011). ACPGBI position statement on elective resection for diverticulitis. *Colorectal Dis* **13 Suppl 3**, 1-11.

Gallego D, Auli M, Aleu J, Martinez E, Rofes L, Marti-Rague J, Jimenez M, & Clave P (2010). Effect of otilonium bromide on contractile patterns in the human sigmoid colon. *Neurogastroenterol Motil* **22**, e180-e191.

Gallego D, Gil V, Aleu J, Auli M, Clave P, & Jimenez M (2008). Purinergic and nitrergic junction potential in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G522-G533.

Gallego D, Hernandez P, Clave P, & Jimenez M (2006). P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G584-G594.

Gil V, Gallego D, Grasa L, Martin MT, & Jimenez M (2010). Purinergic and nitrergic neuromuscular transmission mediates spontaneous neuronal activity in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G158-G169.

Gil V, Gallego D, Moha Ou MH, Peyronnet R, Martinez-Cutillas M, Heurteaux C, Borsotto M, & Jimenez M (2012). Relative contribution of SKCa and TREK1 channels in purinergic and nitrergic neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303**, G412-G423.

Golder M, Burleigh DE, Belai A, Ghali L, Ashby D, Lunniss PJ, Navsaria HA, & Williams NS (2003). Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *Lancet* **361**, 1945-1951.

Golder M, Burleigh DE, Ghali L, Feakins RM, Lunniss PJ, Williams NS, & Navsaria HA (2007). Longitudinal muscle shows abnormal relaxation responses to nitric oxide and contains altered levels of NOS1 and elastin in uncomplicated diverticular disease. *Colorectal Dis* **9**, 218-228.

Golder M, Ster IC, Babu P, Sharma A, Bayat M, & Farah A (2011). Demographic determinants of risk, colon distribution and density scores of diverticular disease. *World J Gastroenterol* **17**, 1009-1017.

Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Sarr MG, Kendrick ML, Shen KR, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordog T, Pozo MJ, & Farrugia G (2011). Changes in interstitial cells of cajal with age in the human stomach and colon. *Neurogastroenterol Motil* **23**, 36-44.

Gonzalez AA, Farre R, & Clave P (2004). Different responsiveness of excitatory and inhibitory enteric motor neurons in the human esophagus to electrical field stimulation and to nicotine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G299-G306.

Guagnini F, Valenti M, Mukenge S, Matias I, Bianchetti A, Di Paolo S, Ferla G, Di Marzo V, & Croci T (2006). Neural contractions in colonic strips from patients with diverticular disease: role of endocannabinoids and substance P 3. *Gut* **55**, 946-953.

Hall J, Hammerich K, & Roberts P (2010). New paradigms in the management of diverticular disease. *Curr Probl Surg* **47**, 680-735.

Huizinga JD, Waterfall WE, & Stern HS (1999). Abnormal response to cholinergic stimulation in the circular muscle layer of the human colon in diverticular disease. *Scand J Gastroenterol* **34**, 683-688.

Humes D, Smith JK, & Spiller RC (2011). Colonic diverticular disease. *Am Fam Physician* **84**, 1163-1164.

Humes DJ & West J (2011). Diet and risk of diverticular disease. *BMJ* **343**, d4115.

Jeyarajah S & Papagrigroriadis S (2011). Review article: the pathogenesis of diverticular disease-current perspectives on motility and neurotransmitters. *Aliment Pharmacol Ther* **33**, 789-800.

Kiguli-Malwadde E & Kasozi H (2002). Diverticular disease of the colon in Kampala, Uganda. *Afr Health Sci* **2**, 29-32.

Knowles CH, De Giorgio R, Kapur RP, Bruder E, Farrugia G, Geboes K, Gershon MD, Hutson J, Lindberg G, Martin JE, Meier-Ruge WA, Milla PJ, Smith VV, Vandervinden JM, Veress B, & Wedel T (2009). Gastrointestinal neuromuscular pathology: guidelines for histological techniques and reporting on behalf of the Gastro 2009 International Working Group. *Acta Neuropathol* **118**, 271-301.

Kolios G, Valatas V, & Ward SG (2004). Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology* **113**, 427-437.

Kuiken SD, Klooker TK, Tytgat GN, Lei A, & Boeckxstaens GE (2006). Possible role of nitric oxide in visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* **18**, 115-122.

Lecea B, Gallego D, Farre R, Opazo A, Auli M, Jimenez M, & Clave P (2011). Regional functional specialization and inhibitory nitrergic and nonnitrergic coneurotransmission in the human esophagus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G782-G794.

Lecea B, Martinez E, Auli M, Opazo A, & Clave P (2009). Selective stimulation of intrinsic excitatory and inhibitory motor pathways in porcine lower oesophageal sphincter. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 1342-e130.

Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, & Mawe GM (2005). Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 751-760.

Maselli MA, Piepoli AL, Guerra V, Caruso ML, Pezzolla F, Lorusso D, Demma I, & De PF (2004). Colonic smooth muscle responses in patients with diverticular disease of the colon: effect of the NK2 receptor antagonist SR48968. *Dig Liver Dis* **36**, 348-354.

Mizuta Y, Takahashi T, & Owyang C (1999). Nitrergic regulation of colonic transit in rats. *Am J Physiol* **277**, G275-G279.

Morris CR, Harvey IM, Stebbings WS, Speakman CT, Kennedy HJ, & Hart AR (2003). Do calcium channel blockers and antimuscarinics protect against perforated colonic diverticular disease? A case control study 1. *Gut* **52**, 1734-1737.

Moynes DM, Lucas GH, Beyak MJ, & Lomax AE (2013). Effects of Inflammation on the Innervation of the Colon. *Toxicol Pathol*.

Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, & Galmiche JP (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84-90.

O'Kelly T, Brading A, & Mortensen N (1993). Nerve mediated relaxation of the human internal anal sphincter: the role of nitric oxide. *Gut* **34**, 689-693.

Opazo A, Lecea B, Gil V, Jimenez M, Clave 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-e25.

Painter NS & Burkitt DP (1971). Diverticular disease of the colon: a deficiency disease of Western civilization. *Br Med J* **2**, 450-454.

Parks TG & Connell AM (1969). Motility Studies in Diverticular Disease of Colon .2. Effect of Colonic and Rectal Distension. *Gut* **10**, 538-&.

Peery AF & Sandler RS (2013). Diverticular disease: reconsidering conventional wisdom. *Clin Gastroenterol Hepatol* **11**, 1532-1537.

Peery AF, Sandler RS, Ahnen DJ, Galanko JA, Holm AN, Shaukat A, Mott LA, Barry EL, Fried DA, & Baron JA (2013). Constipation and a low-fiber diet are not associated with diverticulosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* **11**, 1622-1627.

Perner A & Rask-Madsen J (1999). Review article: the potential role of nitric oxide in chronic inflammatory bowel disorders. *Aliment Pharmacol Ther* **13**, 135-144.

Porras M, Martin MT, Torres R, & Vergara P (2006). Cyclical upregulated iNOS and long-term downregulated nNOS are the bases for relapse and quiescent phases in a rat model of IBD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G423-G430.

Sanger GJ, Broad J, Kung V, & Knowles CH (2013). Translational neuropharmacology: the use of human isolated gastrointestinal tissues. *Br J Pharmacol* **168**, 28-43.

Simpson J, Scholefield JH, & Spiller RC (2003). Origin of symptoms in diverticular disease. *Br J Surg* **90**, 899-908.

Simpson J, Sundler F, Humes DJ, Jenkins D, Scholefield JH, & Spiller RC (2009). Post inflammatory damage to the enteric nervous system in diverticular disease and its relationship to symptoms. *Neurogastroenterol Motil* **21**, 847-e58.

Smith J, Humes DJ, & Spiller RC (2011). Should we treat uncomplicated symptomatic diverticular disease with fibre? *BMJ* **342**, d2951.

Snape WJ, Jr., Williams R, & Hyman PE (1991). Defect in colonic smooth muscle contraction in patients with ulcerative colitis. *Am J Physiol* **261**, G987-G991.

Spiller R (2006). How inflammation changes neuromuscular function and its relevance to symptoms in diverticular disease. *J Clin Gastroenterol* **40**, S117-S120.

Spiller RC, Humes DJ, Campbell E, Hastings M, Neal KR, Dukes GE, & Whorwell PJ (2010). The Patient Health Questionnaire 12 Somatic Symptom scale as a predictor of symptom severity and consulting behaviour in patients with irritable bowel syndrome and symptomatic diverticular disease. *Aliment Pharmacol Ther* **32**, 811-820.

Tomita R, Fujisaki S, Tanjoh K, & Fukuzawa M (2000). Role of nitric oxide in the left-sided colon of patients with diverticular disease. *Hepatogastroenterology* **47**, 692-696.

Trotman IF & Misiewicz JJ (1988). Sigmoid motility in diverticular disease and the irritable bowel syndrome. *Gut* **29**, 218-222.

Wedel T, Busing V, Heinrichs G, Nohroudi K, Bruch HP, Roblick UJ, & Bottner M (2010). Diverticular disease is associated with an enteric neuropathy as revealed by morphometric analysis. *Neurogastroenterol Motil* **22**, 407-4.

Conclusiones.

1. Los pacientes con diverticulosis presentan una clara alteración de la contractilidad en el colon sigmoide en esta fase inicial de la enfermedad, evidenciada en el estudio fisiológico in Vitro y caracterizada por:
 - a. Una disminución del área bajo la curva en la actividad rítmica espontánea básicamente debido a una menor amplitud de estas contracciones espontáneas sin cambios en la frecuencia ni en el tono basal.
 - b. Un incremento de la latencia de las contracciones OFF, debido al estímulo de MNEs inhibitorias.
 - c. Un incremento de la amplitud de las contracciones ON, debidas al estímulo de las MNEs excitatorias.
 - d. Una mayor hiperpolarización (potencial de membrana en reposo) de las células musculares circulares lisas, y una mayor amplitud en el potencial post-uni6n inhibitorio (IJP) en estos pacientes, causada por la estimulaci6n de MNEs inhibitorias (que liberan ATP o una purina relacionada que actúa a trav6s del receptor P2Y₁).
2. No hemos encontrado cambios significativos en el estudio histol6gico del colon sigmoide en las capas musculares, ni en el plexo mient6rico, ni en las ICCs en muestras de pacientes con diverticulosis.

3. En las muestras de estos pacientes se dan cambios a nivel de neurotransmisión inhibitoria, especialmente en la vía nitrérgica, consistentes en:
 - a) un incremento del tono inhibitorio (liberación tónica de NO), que produce una reducción de la actividad rítmica espontánea sólo en los pacientes con diverticulosis.
 - b) un incremento de respuestas inducidas por campo eléctrico o latencia de las contracciones OFF como consecuencia de la liberación por parte de las MNEs inhibitorias de NO en los pacientes con diverticulosis
4. Los estudios de biología moleculares muestran que los pacientes con diverticulosis presentan una mayor expresión de nNOS, sin cambios en la expresión relativa de iNOS, el receptor P2Y₁ o el marcador neuronal PGP9.5. La sobreexpresión de la vía nitrérgica en estadios iniciales de la enfermedad podría jugar un papel importante en la fisiopatología de los trastornos motores.
5. Finalmente, los datos experimentales obtenidos sugieren que tanto el Spasmoclyl® (Bromuro de otilonio) como la Buscapina® (N-butil-hioscina) presentan una menor eficacia y en algunas de las frecuencias estudiadas, una potencia ligeramente menor en pacientes con diverticulosis respecto a pacientes control. Estos resultados implicarían incrementar las dosis de espasmolíticos administradas a estos pacientes para conseguir un efecto terapéutico apropiado.



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Cirurgia



Hospital de Mataró
Consorci Sanitari del Maresme
Servei de Cirurgia General i Ap. Digestiu.
Unitat de Probes funcionals i Digestives