



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA

TESIS

**ALTERACIONES DE LA SEÑALIZACIÓN PURINÉRGICA DURANTE
LA INFLAMACIÓN INTESTINAL DE BAJO GRADO ASOCIADA A
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

PRESENTA

José Raymundo Cruz Muñoz

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES

Dra. Raquel Guerrero Alba

Dra. Andrómeda Liñán Rico

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino

Aguascalientes, Ags 7 de junio del 2024

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente, como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **JOSÉ RAYMUNDO CRUZ MUÑOZ** con ID *125847* quien realizó la tesis titulado: **ALTERACIONES DE LA SEÑALIZACION PURINERGICA DURANTE LA INFLAMACION INTESTINAL DE BAJO GRADO ASOCIADA A DIABETES MELLITUS TIPO 2**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 07 de junio de 2024.

 Dra. Raquel Guerrero Alba Tutor de tesis	 Dra. Andrómeda Liñán Rico Co-Tutor de tesis
 Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino Asesor de tesis	

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 12/06/2024

NOMBRE: José Raymundo Cruz Muñoz

ID 125847

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional **LGAC (del posgrado):** Biotecnología y Bioquímica Vegetal y Animal

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Alteraciones de la señalización purinérgica durante la inflamación intestinal de bajo grado asociada a diabetes mellitus tipo 2

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Este trabajo generó conocimiento nuevo que podría tener un impacto en el área de salud, ya que se encontraron alteraciones en la expresión génica de elementos purinérgicos y en la motilidad intestinal en ratones con diabetes tipo 2, contribuyendo al entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados				
				Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
				El estudiante es el primer autor
				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí
 No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico:..... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 28/04/20



Gene expression alterations of purinergic signaling components in obesity-associated intestinal low-grade inflammation in type 2 diabetes

José R. Cruz-Muñoz¹ · Eduardo E. Valdez-Morales¹ · Alma Barajas-Espinosa² · Tonatiuh Barrios-García¹ · Andromeda Liñán-Rico³ · Raquel Guerrero-Alba¹

Received: 17 August 2023 / Accepted: 26 March 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

Intestinal low-grade inflammation induced by a high-fat diet has been found to detonate chronic systemic inflammation, which is a hallmark of obesity, and precede the apparition of insulin resistance, a key factor for developing type 2 diabetes (T2D). Aberrant purinergic signaling pathways have been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and other gastrointestinal diseases. However, their role in the gut inflammation associated with obesity and T2D remains unexplored. C57BL/6 J mice were fed a cafeteria diet for 21 weeks and received one injection of streptozotocin in their sixth week into the diet. The gene expression profile of purinergic signaling components in colon tissue was assessed by RT-qPCR. Compared to control mice, the treated group had a significant reduction in colonic length and mucosal and muscular layer thickness accompanied by increased NF- κ B and IL-1 β mRNA expression. Furthermore, colonic P2X2, P2X7, and A3R gene expression levels were lower, while the P2Y2, NT5E, and ADA expression levels increased. In conclusion, these data suggest that these purinergic signaling components possibly play a role in intestinal low-grade inflammation associated with obesity and T2D and thus could represent a novel therapeutic target for the treatment of the metabolic complications related to these diseases.

Keywords Cafeteria diet · Obesity · Type 2 diabetes · Intestinal low-grade inflammation · Ectonucleotidases · Purinergic receptors

Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic metabolic disease with increasing prevalence in the last few decades that is estimated to affect more than 400 million people worldwide [1]. It is characterized by elevated blood glucose concentration, pancreatic beta cells' inadequate insulin secretion, and

insulin resistance in peripheral tissues, including skeletal muscle, liver, and adipose [2]. Obesity is the most important risk factor for T2D and has been associated with metabolic disorders resulting in insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia, and hypertension [3].

The exact mechanism by which obesity induces insulin resistance and T2D remains unclear. Numerous factors play a significant role in the development of this pathological process, resulting in lipid metabolic alterations in adipose tissue [4], adipokine dysregulation [5], over-nutrition-triggered low-grade inflammation in the liver, pancreas, muscle, and adipose tissue [6], and macrophage recruitment as a potential source of inflammation [7]. Low-grade systemic inflammation probably involves a complex network of signals interconnecting several organs. Evidence in support of this suggests that disturbances in gut microbiota composition and alterations in levels of gut peptides following the ingestion of a high-fat diet (HFD) contribute to low-grade systemic inflammation. This inflammation could lead to the breakdown of the intestinal epithelial barrier, activating the

✉ Andromeda Liñán-Rico
andromeda_linan@ucol.mx

✉ Raquel Guerrero-Alba
raquel.guerrero@edu.uaa.mx

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, Ags, México

² Escuela Superior de Huejutla, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Huejutla de Reyes, Hidalgo, México

³ Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas. Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), Universidad de Colima, Colima, México

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al sistema de becas de posgrado CONAHCYT (Número de beca: 806361) así como a los recursos otorgados por medio de Ciencia Frontera (CF-2019/21854) que me proporcionaron los recursos necesarios para llevar a cabo este trabajo de tesis.

También mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, quienes me proporcionaron las instalaciones y equipos necesarios para la realización de esta investigación. Su colaboración fue crucial para el desarrollo y la finalización de este trabajo.

Con toda sinceridad, agradezco a cada una de las personas que han contribuido a la realización de la presente tesis.

En primer lugar, agradezco a mi comité tutorial, a la Dra. Raquel Guerrero Alba, la Dra. Andrómeda Liñán Rico y al Dr. Bruno Antonio Marichal Cancino, por su invaluable guía, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Su experiencia e instrucción fueron fundamentales para la culminación de este trabajo.

A mis profesores el Dr. Eduardo Valdez Morales, el Dr. Tonatiuh Barrios García, Dra. María Consolación Martínez Saldaña, Sonia S. Cruz Muñoz y el Dr. Manuel Enrique Ávila Blanco por su invaluable enseñanza en las técnicas experimentales.

Asimismo, quiero agradecer a compañeros del Laboratorio de electrofisiología la Dra. Carely, Memo, Chuy, Ana, Renata, Sam, Mau y Emilio quienes me brindaron su confianza y conocimientos durante mi formación académica. Sus enseñanzas y consejos han sido esenciales para mi crecimiento profesional y personal.

Agradezco a mi familia, especialmente a mis padres, Cristina Muñoz y José Tabares, por su amor incondicional, apoyo total, y por creer en mí en todo momento.

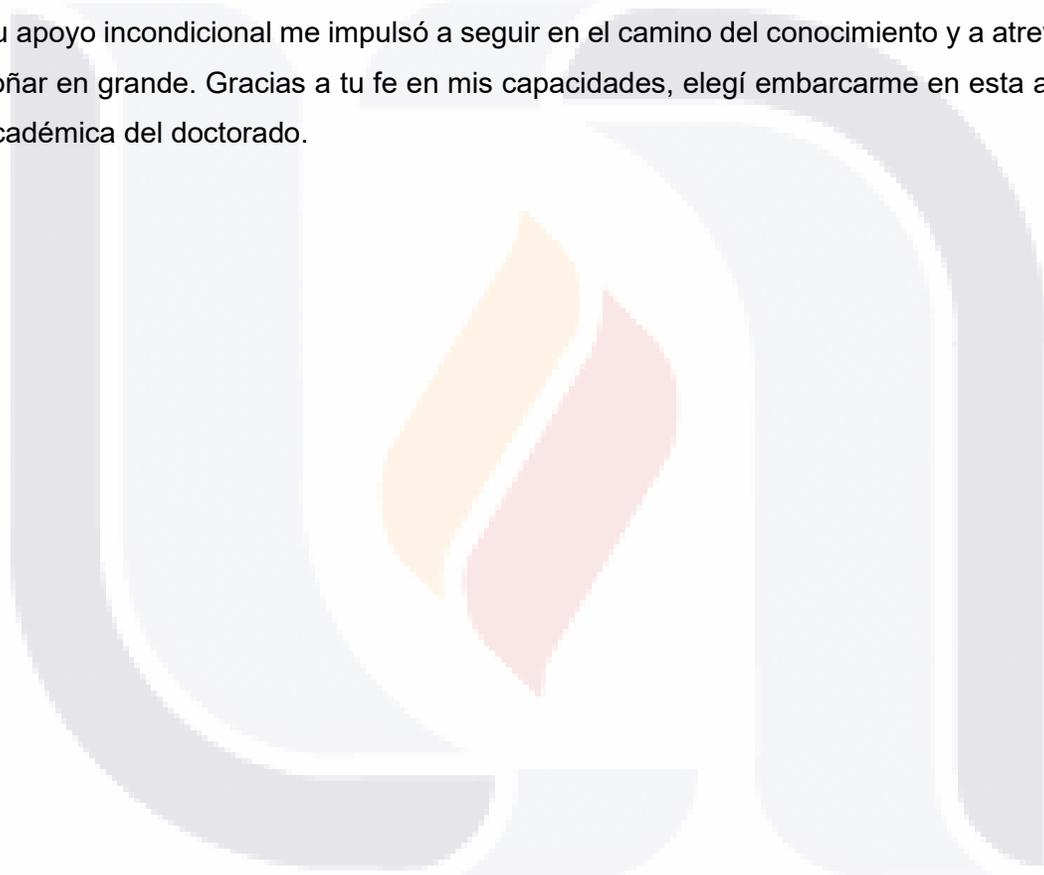
A mis amigos, que me acompañaron en los momentos de alegría y de estrés. Sus palabras de aliento y su compañía hicieron de este recorrido una experiencia más llevadera y gratificante.

Finalmente, expreso mi gratitud a todas las personas que, incluso de manera indirecta, colaboraron para que esta tesis se pudiera lograr. A todos ustedes, muchas gracias.

DEDICATORIA

A la memoria del Dr. Raymundo Muñoz Saldívar.

Tu apoyo incondicional me impulsó a seguir en el camino del conocimiento y a atreverme a soñar en grande. Gracias a tu fe en mis capacidades, elegí embarcarme en esta aventura académica del doctorado.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	1
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ACRÓNIMOS.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Anatomía y fisiología de tracto gastrointestinal.....	12
2.2 Epidemiología de la obesidad y diabetes tipo 2 (DT2).....	16
2.3 Modelos preclínicos de DT2.....	17
2.4 Relación de la obesidad con la resistencia a la insulina y el desarrollo de la DT2	19
2.5 La inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta alta en grasas como un evento temprano de la obesidad y el desarrollo de la DT2.....	21
2.6 Papel de la microbiota intestinal en la inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta alta en grasas como un evento temprano de la obesidad y el desarrollo de la DT2.....	23
2.7 Alteraciones en las funciones gastrointestinales durante la obesidad y DT2.	26
2.8 Sistema purinérgico.....	28
2.9 Funciones conocidas del sistema purinérgico en el intestino.....	31
<i>2.9.1 Participación del sistema purinérgico en el control de la motilidad intestinal.....</i>	<i>31</i>
<i>2.9.2 Participación del sistema purinérgico en el control de la secreción y absorción epitelial intestinal.....</i>	<i>34</i>
<i>2.9.3 Participación del sistema purinérgico en la modulación de la respuesta inmune.....</i>	<i>37</i>

2.10	El sistema purinérgico en el contexto de la inflamación intestinal.....	39
3.	ANTECEDENTES	44
4.	JUSTIFICACIÓN	45
5.	HIPÓTESIS	45
6.	OBJETIVOS.....	46
	6.1 Objetivo General.....	46
	6.2 Objetivos específicos	46
7.	METODOLOGÍA	46
	7.1 Animales y modelo experimental de DT2.....	46
	7.2 Mediciones de insulina, triglicérido y colesterol en plasma.....	47
	7.3 Mediciones de glucosa sanguínea en ayuno (FBG), prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y prueba de tolerancia a la insulina (ITT).....	48
	7.4 Disección del tejido adiposo blanco y colon.....	49
	7.5 Evaluación histopatológica de la inflamación mediante la técnica histológica de hematoxilina y eosina (H & E)	49
	7.6 Medición de la concentración de ATP luminal en el colon	50
	7.7 Análisis de expresión génica por RT-qPCR.....	50
	7.8 Análisis de expresión del receptor P2X7 por inmunofluorescencia.....	51
	7.9 Ensayo de motilidad del colon en baño de órgano aislado	51
	7.10 Análisis estadístico.....	52
8.	RESULTADOS	54
	8.1 Los ratones CAF-STZ exhibieron un fenotipo de obesidad.....	54
	8.2 Los ratones CAF-STZ desarrollaron DT2	55
	8.3 Los ratones CAF-STZ exhibieron alteraciones en la morfología del colon	56
	8.4 Los ratones CAF-STZ desarrollaron una inflamación intestinal de bajo grado	59
	8.5 El colon de ratones CAF-STZ mostraron alteraciones en la expresión de los componentes de la señalización purinérgica.	60
	8.6 La expresión de ARNm de las subunidades P2X2, P2X7, P2Y2 y NT5E se correlaciona con la inflamación intestinal de bajo grado y la homeostasis alterada de la glucosa.....	63
	8.7 Alteraciones en la motilidad intestinal de ratones CAF-STZ	64
9.	DISCUSIÓN	68
10.	CONCLUSIONES	76

BIBLIOGRAFÍA 78



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Potencia y selectividades de los agonistas endógenos de los receptores P2Y31

Tabla 2. Lista de oligos usados en los experimentos de RT-qPCR..... 53



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El sistema nervioso entérico.....	12
Figura 2. Dietas altas en grasas induce alteraciones en la microbiota intestinal y barrera epitelial.....	23
Figura 3. Esquema general del sistema purinérgico.	29
Figura 4. Masa corporal y consumo energético de ratones C57BL6J.....	54
Figura 5. Los ratones CAF-STZ exhibieron adiposidad localizada.	55
Figura 6. Los ratones CAF-STZ mostraron el metabolismo de la glucosa alterado. ...	57
Figura 7. Los ratones CAF-STZ mostraron una disminución significativa en la longitud del colon.	58
Figura 8. Los ratones del grupo CAF-STZ mostraron alteraciones en las capas histológicas del colon.	59
Figura 9. Efectos de CAF-STZ sobre la expresión del ARNm de mediadores inflamatorios.....	60
Figura 10. Variación en la expresión génica de los componentes del sistema purinérgico en el tejido colónico de ratones CAF-STZ. Se cuantificó el ARNm de varios componentes de señalización purinérgica: receptores P2X.....	61
Figura 11. Inmunoreactividad del receptor P2X7 en el colon de ratones CTRL y CAF-STZ.	62
Figura 12. Correlación entre la expresión de transcritos purinérgicos y el desarrollo de la enfermedad en los ratones CAF-STZ.....	63
Figura 13. Número de heces producidas por ratón en una hora.	64
Figura 14. Alteraciones de las contracciones espontáneas rítmicas del músculo liso del colon en los ratones CAF-STZ.....	65
Figura 15. La tensión de la contracción del colon distal inducida por ACh fue menor en el grupo CAF-STZ que en el grupo CTRL.	66
Figura 16. Curva concentración-respuesta de ATP sobre las contracciones inducidas por ACh (10 μ M).	66
Figura 17. Efecto del antagonista del receptor P2X7, A804598 (0.1 μ M), sobre la actividad contráctil del colon aislado de ratones CTRL y CAF-STZ mantenido en solución de Ringer.....	67

ACRÓNIMOS

5-HT: Serotonina

ACh: Acetilcolina

ADP: Adenosina difosfato

AGE: Productos finales de glicación avanzada

AMP: Adenosina monofosfato

AMPc: Adenosina monofosfato cíclico

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

CAF: Dieta de cafetería

CCL2: Ligando 2 de quimiocina (motivo C-C)

CGRP: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina

ChAT: Colina acetiltransferasa

CRP: Proteína C reactiva

CXCL2: Ligando 2 de quimiocina (motivo CXC)

DAMP: Patrones moleculares asociados a daños

DT1: Diabetes tipo 1

DT2: DT2

EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

ENTPD1: Ectonucleosido trifosfato difosfohidrolasa 1

EPSP: Potenciales postsinápticos excitatorios rápidos

FBG: Glucosa sanguínea en ayunas

FFA: Ácidos grasos libres

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GFAP: Proteína ácida fibrilar Glial

HbA1c: Hemoglobina A1C

HFD: Dieta alta en grasas

HIF1 α : Factor 1 α inducible por hipoxia

HOMA: Evaluación del modelo homeostático

ICC: Células intersticiales de Cajal

IJP: Potenciales de unión inhibitorios

IL: Interleucina

IL-1RA: Antagonista del receptor de IL-1

IMC: Índice de masa corporal
I.P: Intraperitoneal
IP3: Inositol trifosfato
IP-10: Proteína-10 inducible por interferón γ
IPANs: neuronas aferentes primarias intrínsecas
IPGTT: Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa
IRS: Sustrato del receptor de insulina
ITT: Prueba de tolerancia a la insulina
JNK: Quinasa c-Jun N-terminal
LPS: Lipopolisacárido
MCP-1: Proteína quimio atrayente de monocitos – 1
MMC: Complejo motor migratorio
NANC: No adrenérgicas no colinérgicas
NFAT: Factor nuclear de células T activadas
NF- κ B: Factor nuclear Kappa B
NLRP3: Proteína con Dominio Pirina 3 de la familia NLR
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintetasa
NT5E: ecto-5'-nucleotidasa
OMS: Organización Mundial de la Salud
PGF: Grasa subcutánea perigonadal
PKA: Proteína cinasa A
PLC: Fosfolipasa C
PRF: Grasa Subcutánea perirrenal
PTOG: Prueba oral de tolerancia a la glucosa
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROS: Especies reactivas de oxígeno
SCF: Grasa subcutánea abdominal
SCFA: Ácidos grasos de cadena corta
SNC: Sistema nervioso central
SNE: Sistema nervioso entérico
SOM: Somatostatina
STZ: Estreptozotocina

TAB: Tejido adiposo blanco

TLR: Receptores tipo Toll

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

UTP: Uridina trifosfato

VIP: Péptido intestinal vasoactivo



RESUMEN

Se ha reportado que la inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta rica en grasas detona la inflamación sistémica crónica, que es un sello distintivo de la obesidad, y precede a la aparición de la resistencia a la insulina, un factor clave para desarrollar DT2. Se han implicado vías de señalización purinérgica aberrantes en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades gastrointestinales. Sin embargo, su papel en la inflamación intestinal asociada con la obesidad y la DT2 sigue sin explorarse. Los ratones C57BL/6J fueron alimentados con una dieta de cafetería durante 21 semanas y recibieron una inyección de estreptozotocina (STZ) en la sexta semana después de comenzar la dieta. El perfil de expresión génica de los diversos componentes de señalización purinérgica en el tejido del colon se evaluó mediante RT-qPCR. Los ratones alimentados con una dieta de cafetería e inyectados con estreptozotocina mostraron una hiperglicemia, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, así como, una reducción significativa en la longitud del colon y el grosor de la capa mucosa y muscular acompañada de un aumento de la expresión de ARNm de NF- κ B e IL-1 β . Además, los niveles de expresión de los genes P2X2, P2X7 y A3R en el colon, fueron más bajos, mientras que los niveles de expresión de P2Y2, NT5E y ADA fueron más altos. Asimismo, una disminución en las tensión y frecuencia de las contracciones espontaneas rítmicas y la tensión de las contracciones inducidas por ACh. En conclusión, estos datos ponen en evidencia que los ratones alimentados con una dieta de cafetería e inyectados con una dosis de STZ desarrollaron DT2, una inflamación de bajo grado en el colon y mostraron alteraciones en la expresión génica de P2X2, P2X7, P2Y2, A3, NT5E y ADA, así como alteraciones en la estructura y motilidad colónica.

ABSTRACT

Alterations in intestinal homeostasis by a high-fat diet have been reported to denote chronic systemic inflammation that may precede insulin resistance, a critical factor in developing T2D. Abnormal purinergic signaling pathways have been implicated in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and other gastrointestinal diseases. However, it is unknown whether purinergic elements are altered in the intestinal inflammation associated with obesity and T2D. Therefore, this work aimed to analyze the gene expression of purinergic receptors during intestinal inflammation related to T2D and to evaluate the impact of intestinal inflammation on motility and the involvement of purinergic elements. Twenty male C57BL/6J mice were divided into two groups: a CTRL group, fed with a standard diet, and a CAF-STZ group fed a cafeteria diet for 21 weeks and received an injection of streptozotocin (STZ) in the sixth week after starting the diet. Fasting blood glucose, insulin and glucose tolerance tests were measured. Mice were sacrificed at week 21, and the colon was obtained to analyze inflammatory markers and gene expression of purinergic receptors by RT-qPCR. The results demonstrated that mice fed a cafeteria diet and injected with STZ developed diabetes, showing elevated fasting blood glucose levels, glucose tolerance, and insulin resistance. These mice showed a significant reduction in the length and weight of the colon and in the thickness of the external mucosa and muscle, accompanied by an increase of NF- κ B and IL-1 β mRNA expression. Furthermore, the expression levels of P2X2, P2X7 and A3R genes in the colon were lower, while the expression levels of P2Y2, NT5E and ADA were higher. Likewise, a decrease in the tension and frequency of rhythmic spontaneous contractions and the tension of ACh-induced contractions. In conclusion, these data show that mice fed a cafeteria diet and injected with a dose of STZ developed T2D, a low-grade inflammation in the colon, and showed alterations in the gene expression of P2X2, P2X7, P2Y2, A3, NT5E and ADA, as well as alterations in colonic structure and motility.

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación sistémica de bajo grado relacionada con la obesidad promueve la resistencia a la insulina, siendo el detonante para el desarrollo de la DT2 (Ding & Lund, 2011). Varios estudios han encontrado que la inflamación sistémica de bajo grado puede aparecer antes de que se desarrolle la obesidad (Ding & Lund, 2011), por lo que todavía no está claro donde la inflamación comienza. Algunos estudios han propuesto que las alteraciones en la homeostasis intestinal por una dieta alta en grasa puede ser el detonante de la inflamación sistémica de bajo grado (Blue et al. 2015, Cuevas-Sierra et al. 2019; Caër & Wick, 2020).

Se está prestando cada vez más atención al papel del sistema purinérgico en la inflamación intestinal debido a que es un regulador clave en los reflejos motores entéricos, la secreción y absorción de la mucosa, la sensación visceral y la función de las células inmunitarias entéricas (Burnstock, 2014). Este sistema comprende receptores purinérgicos, ectonucleotidasas, ATP (adenosina 5'-trifosfato) extracelular y sus derivados. La liberación de ATP al medio extracelular puede ser a través de exocitosis, panexinas, uniones comunicantes, hemicanales o muerte celular (Homolya et al., 2000; De Ita et al., 2016; Lazarowki, 2012). El ATP extracelular y sus derivados pueden unirse a receptores de membrana celular, los cuales se clasifican en P1 que son receptores acoplados a proteína G activados por adenosina, de los que se han descrito cuatro subtipos (A1, A2A, A2B y A3), y P2 que se dividen en dos clases: receptores P2X que son canales catiónicos activados por ATP con siete subtipos (P2X1-P2X7) y receptores P2Y acoplados a proteína G y consta de ocho miembros (P2Y2,4,6,11-14) (Vuerich, et al.,2020).

Alteraciones en la señalización purinérgica han sido implicadas en la disfunción de la motilidad intestinal y en las lesiones entéricas de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Eltzschig et al., 2012). Además, se ha demostrado que durante la EII hay cambios marcados en la liberación de ATP, modulando así la expresión y señalización de los receptores purinérgicos (Roberts et al., 2012; Longhi et al., 2017). Sin embargo, los cambios en los componentes de señalización purinérgica en la inflamación intestinal relacionada con la DT2 permanecen desconocidos. Por tal motivo, en el presente estudio se determinó si la expresión de los componentes del sistema purinérgico están alterados durante la inflamación intestinal de bajo grado asociada a DT2.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Anatomía y fisiología de tracto gastrointestinal

El sistema gastrointestinal está compuesto por el tracto gastrointestinal y órganos accesorios (hígado, vesícula biliar y páncreas). El tracto gastrointestinal incluye la boca, el esófago, el estómago, el intestino delgado e intestino grueso o colon. La pared del tracto gastrointestinal está conformada por cuatro capas histológicas principales: mucosa, submucosa, muscular externa y serosa (Figura 1a).

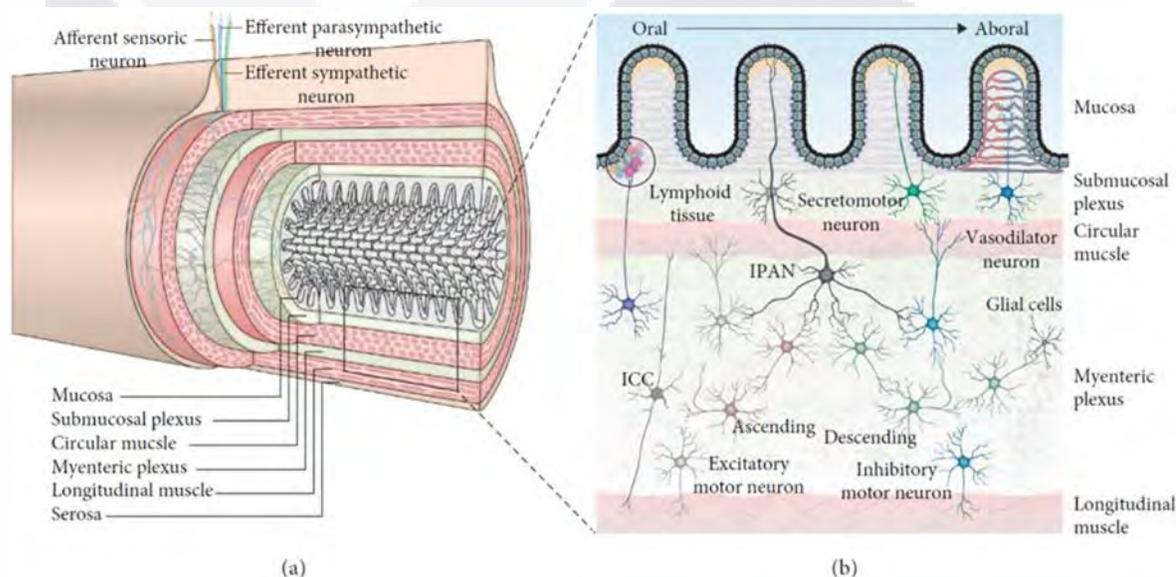


Figura 1. El sistema nervioso entérico. (a) Vista transversal del intestino donde se pueden ver las capas de la pared intestinal, la inervación autónoma simpática y parasimpática y los nervios sensoriales aferentes extrínsecos. (b) Vista longitudinal de la pared intestinal donde se puede observar el plexo mioentérico y submucoso con una selección de subtipos de neuronas (Imagen obtenida de Meldgaard et al., 2018).

La mucosa es la zona más variable y está formada por una capa unicelular epitelial sostenida por una lámina propia de tejido conectivo, que contiene microvasculatura y nervios, y por una fina capa de músculo liso, la *muscularis mucosae*. En la mayoría de las áreas, el epitelio está muy plegado para aumentar su superficie (p. ej., para la absorción) y con frecuencia se invagina para formar las glándulas tubulares exocrinas. Las secreciones exocrinas incluyen moco, electrolitos, agua y enzimas digestivas. Numerosas células endocrinas también se encuentran dispersas entre las células epiteliales. Las células endocrinas liberan hormonas gastrointestinales a la sangre en respuesta a cambios en el entorno luminal; por ejemplo, la hormona colecistoquinina se libera en respuesta a las grasas y proteínas en el lumen (Kibble & Halsey, 2014).

La submucosa es una capa de tejido conectivo que contiene los principales vasos sanguíneos y linfáticos que irrigan al tracto gastrointestinal. Esta capa contiene numerosas células ganglionares organizadas para formar un plexo nervioso denominada plexo submucoso o de Meissner (Kibble & Halsey, 2014).

La muscular externa contiene dos capas principales de músculo liso responsables de mezclar y mover los alimentos a lo largo del tracto gastrointestinal: la capa circular interna y la capa longitudinal externa. Entre estas dos capas de músculo liso se encuentra un plexo nervioso denominado plexo mientérico o de Auerbach (Kibble & Halsey, 2014).

La serosa es una fina capa de tejido conectivo que se continúa con el mesenterio peritoneal en la mayoría del tracto gastrointestinal. Varias estructuras importantes ingresan a través de la serosa, incluidos los vasos sanguíneos, los nervios extrínsecos y los conductos de las glándulas exocrinas accesorias (Kibble & Halsey, 2014).

Las principales funciones del sistema gastrointestinal son la digestión de alimento, la asimilación de nutrientes y la excreción de productos de desecho. El proceso de estas funciones requiere la coordinación integral de múltiples órganos y se logra mediante una serie de controles superpuestos complejos que se aplican a través de mecanismos neurales, hormonales y paracrinos. Los principales procesos regulados que permiten la digestión de macromoléculas y la asimilación de los nutrientes son la motilidad intestinal, la secreción epitelial y el flujo sanguíneo. Cada uno de estos procesos se controla y regula a través de una red neuronal intrínseca denominada sistema nervioso entérico (SNE) en conjunto con el sistema nervioso autónomo (SNA) y factores endocrinos (Kibble & Halsey, 2014).

El SNE regula la respuesta inmune, la detección de nutrientes, la motilidad, la circulación microvascular, la función de la barrera intestinal y la secreción epitelial de fluidos, iones y péptidos bioactivos a través de una red compleja de ganglios conteniendo neuronas y glía entérica. Estas células están localizadas en dos plexos nerviosos: el plexo mientérico o de Auerbach, situado entre la capa del músculo liso circular y longitudinal, desde el esófago hasta el recto, y regula la tonicidad y el peristaltismo intestinal mediante la contracción y relajación del músculo liso intestinal; y el plexo submucoso o de Meissner, ubicado en la submucosa del intestino delgado y grueso, controla las funciones de absorción y secreción de la mucosa y el flujo sanguíneo local. Además, en el plexo mientérico se encuentran las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células intersticiales de Cajal (ICC) que, aunque no son estrictamente neuronas, generan y transmiten impulsos eléctricos a las células del músculo liso, lo que facilita el movimiento peristáltico de onda lenta del estómago e intestino delgado y grueso (Figura 1b) (Meldgaard et al., 2018).

Las células gliales entéricas se consideran una red de células que establecen el entorno homeostático dentro de los ganglios entéricos y funciona para proporcionar estructura y apoyo nutricional a las neuronas entéricas. Se encuentran principalmente en los plexos submucoso y mientérico, pero también están presentes fuera del SNE en la capa muscular externa y en la lámina propia de la mucosa. Las células gliales entéricas median las interacciones entre las neuronas entéricas y otros tipos de células, como las células inmunes, células enteroendocrinas, células epiteliales y vasos sanguíneos, formando un "circuito" que se especializa en el control y la integración de señales bidireccionales de las células gliales a otras células (Ochoa-Cortes et al., 2016). Las células gliales entéricas modulan la inflamación, ya que es un importante mediador de las interacciones neuroinmunes, por ejemplo, ejercen efectos inmunosupresores y antiinflamatorios que protegen al SNE contra antígenos extraños intraluminales (Chow & Gulbransen, 2017).

Los dos plexos del SNE están conectados entre sí y contienen neuronas motoras que inervan tanto al músculo liso como a las células secretoras de la mucosa, así como neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs) que detectan la distensión, la tonicidad y las señales químicas específicas del lumen intestinal. Al mismo tiempo, las fibras eferentes tanto simpático como parasimpático, entran al SNE para producir una respuesta integrada y contribuir a la regulación y coordinación de las funciones gastrointestinales. Además, una gran cantidad de fibras nerviosas aferentes extrínsecas que siguen rutas vágales o espinales hacia el sistema nervioso central (SNC) monitorean la homeostasis gastrointestinal (Meldgaard et al., 2018).

El SNE es responsable de la génesis de los patrones motores que aseguran un correcto tránsito intestinal y también está implicado en las funciones secretoras de la mucosa y la interacción con las células inmunes a través de múltiples mecanismos de neurotransmisión de una gran variedad de tipos de neuronas. El SNE alberga 100 millones de neuronas que se clasifican según su función como neuronas aferentes, interneuronas y motoneuronas (Gallego et al., 2016).

Las IPANs tienen sus cuerpos celulares en los ganglios entéricos del plexo mientérico y submucoso y sus fibras nerviosas se proyectan hacia la mucosa intestinal. Las IPANs responden al estiramiento radial, a la tensión muscular y a estímulos químicos, como la serotonina (5-HT) y el ATP, liberados por las células enterocromafines del epitelio de la mucosa. Además, pueden ser excitadas directamente por mediadores inflamatorios, como histamina, prostaglandinas e interleucinas lo que induce la liberación de sus neurotransmisores que actúan sobre células inmunes intestinales y modular la respuesta inflamatoria. La activación de estas células es el primer paso para poner en marcha los reflejos motores, ya que transforman los estímulos procedentes del lumen intestinal en impulsos nerviosos que se transmiten a las interneuronas y motoneuronas. Los principales neurotransmisores de las IPANs son la acetilcolina (ACh), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y taquininas (Populin et al., 2021).

Las interneuronas forman cadenas en dirección oral y aboral formando circuitos localizados en el plexo mientérico. Por lo tanto, se pueden diferenciar en interneuronas ascendentes que proyectan sus fibras nerviosas en sentido oral y descendentes que proyectan en sentido anal. El principal neurotransmisor que liberan las interneuronas ascendentes es la ACh y están implicadas en reflejos motores locales. Existen tres tipos diferentes de interneuronas descendentes de acuerdo con su código químico: las interneuronas colina acetiltransferasa (ChAT)/ óxido nítrico sintasa (NOS)/ péptido intestinal vasoactivo (VIP), involucradas en reflejos motores locales; las interneuronas ChAT/somatostatina (SOM) involucradas en la conducción del complejo motor migratorio (MMC) en el intestino delgado; y las interneuronas ChAT/5-HT involucradas en los reflejos secreto-motores, pero no directamente en los reflejos de motilidad. Se han encontrado vías descendentes no colinérgicas, mediadas por ATP que al parecer no participan en el reflejo motor local, por lo que se piensa que podría ser un neurotransmisor de las interneuronas ChAT/SOM o ChAT/5-HT o de un subgrupo de neuronas aferentes primarias que proyectan sus axones largos analmente dirigidos (Furness, 2000).

Las neuronas motoras del SNE inervan las células musculares lisas de las capas circular y longitudinal, las arteriolas intrínsecas y el epitelio. Se pueden subclasificar en neuronas motoras excitatorias e inhibitorias según los neurotransmisores que secretan. Las neuronas motoras excitatorias liberan mayoritariamente ACh y taquininas (sustancia P y neuroquinina A) y estimulan la contracción del músculo liso. Las neuronas motoras inhibitorias utilizan

principalmente óxido nítrico (NO) y ATP, aunque también pueden liberar otros neurotransmisores, como VIP y monóxido de carbono (CO). Se ha demostrado que los efectos de las neuronas motoras excitadoras e inhibitoras están mediados en parte por las células ICC. Además, en el plexo submucoso se encuentra un subgrupo de neuronas motoras, denominadas neuronas secreto-motoras y vasomotoras que trabajan en conjunto para regular la secreción epitelial y el flujo sanguíneo local (Fleming et al., 2020).

2.2 Epidemiología de la obesidad y diabetes tipo 2 (DT2)

Se define a la obesidad como una enfermedad crónica caracterizada por una acumulación excesiva de grasa y es considerada una epidemia creciente en la mayoría de los países del mundo (Mushref and Srinivasan, 2013). Se diagnóstica cuando se tiene un índice de masa corporal (IMC) mayor a 30 kg/m² y se asocia con mayor riesgo de desarrollar DT2, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del hígado graso no alcohólica y cáncer (Medina et al., 2017).

La principal causa de la obesidad es un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico y un estilo de vida sedentario que dan lugar a un IMC elevado. A pesar de que se relaciona a la obesidad con un desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, los mecanismos perjudiciales subyacentes son más complicados (Murphy, Velazquez, & Herbert, 2015), ya que la propensión a la obesidad puede depender de factores genéticos y ambientales (Singh, Kumar, & Mahalingam, 2017). En la mayoría de los casos, ninguno de estos factores es exclusivamente responsable del desarrollo de la obesidad, sino más bien es el resultado de la interacción de éstos y pueden variar con el tiempo y entre individuos (Suárez-Carmona et al., 2017).

Desde 1975, la incidencia de la obesidad a nivel mundial se ha triplicado. En el 2016, más de 1,900 millones de personas con edad superior a los 18 años tenían sobrepeso (39%) y obesidad (13%) (OMS, 2021). En México, los resultados muestran una incidencia acumulada del 30.1% en mujeres y del 23.3% en hombres durante el periodo 2012 al 2021 (Campos-Nonato, Hernández, Oviedo, & Barquera, 2022).

No es de sorprenderse que, como resultado de la epidemia de la obesidad, también haya una incidencia cada vez mayor de DT2 en las últimas décadas (He, et al., 2022). La DT2 es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre

(hiperglicemia) debido a defectos en la secreción de insulina por las células β de los islotes pancreáticos y a la resistencia a la insulina en el músculo esquelético, tejido adiposo e hígado (Ekakitie, et al. 2021). La hiperglicemia prolongada, tanto en ayunas como posprandial, conduce a productos finales de glicación avanzada (AGE), estrés oxidativo e inflamación de bajo grado, y da como resultado daños en los vasos sanguíneos, el corazón, los riñones, los ojos, nervios y tracto gastrointestinal (Veronese et al., 2019). Al no ser tratada adecuadamente puede ocasionar complicaciones graves de salud desde infarto al miocardio, ceguera, falla renal, amputación de las extremidades inferiores e incluso la muerte (DeFronzo, 2004). Se ha estimado que la esperanza de vida en individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Hernández-Ávila, et al. 2013).

De acuerdo con la OMS, la DT2 es la novena causa principal de muerte afectando 537 millones de personas en el 2021 y se prevé que esta cifra alcance los 643 millones en el 2030 y 783 millones en 2045 (Magliano & Boyko, 2022). En México, de 2006 a 2022, la prevalencia de la diabetes ha aumentado paulatinamente de 14.4 a 18.3% (Basto-Abreu et al., 2023). Se estima que para el 2030, en México habrá alrededor de 12.8 millones de personas con diabetes (Saeedi, et al. 2019), una cifra preocupante, por lo que se requiere una intervención inmediata para reducir la incidencia de la diabetes y sus complicaciones.

2.3 Modelos preclínicos de DT2

Se han desarrollado una amplia gama de modelos de DT2 en roedores, los cuales se dividen en dos categorías principales: los modelos genéticos y los modelos no genéticos o inducidos experimentalmente. Los modelos genéticos por lo general son derivados de mutaciones monogénicas, los más usados son los ratones ob/ob o Lep^{ob} en el que un cambio fortuito en su genética causa que no se produzca la hormona leptina, y los ratones db/db deficientes del receptor de leptina (King, 2012); no obstante, estos modelos suelen ser costosos. Los modelos no genéticos tienen un precio mucho más bajo y son accesibles. Estos modelos no genéticos pueden ser inducidos por medios químicos, manipulación dietética o por su combinación (Srinivasan & Ramarao, 2007).

Ningún modelo presenta por sí solo la fisiopatología completa de la DT2. Hasta cierto punto, hay modelos no genéticos de roedores disponibles que presentan una o ambas de las dos características patogénicas principales de la enfermedad, que son la resistencia a la insulina y, posteriormente, el desarrollo de la disfunción de las células β pancreáticas. Al

respecto, se han utilizado varios enfoques para inducir estas dos características, incluidas la pancreatectomía parcial, inyección neonatal de estreptozotocina (STZ) o aloxano, una dosis única de STZ con aloxano, alimentación con una HFD o fructosa a largo plazo, combinación de inyecciones de nicotinamina y STZ, inyección de glutamato monosódico o una combinación de alimentación con HFD o fructosa con inyección de STZ (Joost et al., 2012). Sin embargo, muchos de estos protocolos no pueden inducir con éxito la patogénesis completa de la DT2. Por ejemplo, varias investigaciones han informado que los roedores alimentados con una HFD presentan resistencia a la insulina sin fallo de las células β pancreáticas; de hecho, se ha demostrado que hay una marcada proliferación de estas células como resultado de un mecanismo compensatorio de la resistencia a la insulina en la cepa C57BL/6J (Islam & Wilson, 2012). Debido a la marcada proliferación de las células β pancreáticas, no siempre se desarrolla hiperglucemia o diabetes en la cepa C57BL/6J, lo que complica la reproducibilidad de los datos; no obstante, esta observación sugiere que la HFD es un modelo más adecuado para estudiar el inicio de la resistencia a la insulina.

En relación con la composición de las dietas utilizadas a largo plazo para desarrollar el modelo DT2, la mayoría de los estudios utilizan HFD comerciales con 60% de grasa en calorías para volver a los roedores obesos más rápido. Esto es ventajoso porque reduce el tiempo que los animales necesitan estar alojados, reduciendo así los costos del mantenimiento de los animales (Speakman, 2019). Sin embargo, la dieta occidental típica en humanos contiene entre un 33% y un 40% de grasa en forma de energía y está conformada principalmente por alimentos con poca cantidad de los nutrientes y un alto contenido de azúcar y sal (Rakhra et al., 2020). Por lo que los estudios con roedores con un contenido de grasa del 60% potencialmente podrían no ser tan relevantes para el estudio fisiopatológico de la DT2. Bajo este contexto, el modelo de la dieta de cafetería (CAF) es un protocolo dietético interesante que parece encontrarse en la población humana ya que consiste en los mismos productos alimenticios sabrosos, pero poco saludables que come la gente, como son galletas, chocolate, embutidos cárnicos y papás fritas, y por lo tanto podría reflejar mejor la fisiopatología humana de la obesidad y la DT2 (Lalanza & Snoeren, 2021).

Por otro parte, la STZ [2-desoxi-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-d-glucopiranososa)] se ha utilizado ampliamente para inducir diabetes de forma reproducible puesto que induce la muerte de las células β pancreáticas a través de la alquilación del ADN (Szkudelski, 2001). Las dosis altas de STZ alteran gravemente la secreción de insulina, imitando mucho la

diabetes tipo 1 (DT1), aunque en dosis bajas, se sabe que STZ induce un deterioro leve de la secreción de insulina, similar al que se presenta en la etapa posterior de la DT2, pero no siempre se genera resistencia a la insulina (Wu & Yan, 2015).

Dadas las desventajas de los modelos anteriores, se ha desarrollado un modelo de DT2 mediante la alimentación con una HFD, para inducir resistencia a la insulina, en combinación con una inyección de STZ en dosis bajas, para provocar una disfunción leve en las células β sin comprometer por completo la secreción de insulina. Este modelo imita estrechamente el desarrollo natural de la DT2, desde la resistencia a la insulina hasta la disfunción de las células β , así como sus características metabólicas, y ha sido un modelo comúnmente utilizado en la literatura (Reed et al., 2000; Yu et al., 2017).

2.4 Relación de la obesidad con la resistencia a la insulina y el desarrollo de la DT2

La insulina es una hormona secretada por las células β pancreáticas que reduce la glucosa sanguínea al inducir la absorción de glucosa en los tejidos y al inhibir la producción de glucosa en el hígado. La resistencia a la insulina es la condición en la que el cuerpo no puede responder adecuadamente a la insulina circulante, lo que lleva a la alteración del aclaramiento y captación sistémica de glucosa en varios tejidos incluyendo el tejido adiposo, el hígado y el músculo lo que conduce a hiperglicemia (Ye, 2013).

Actualmente, se reconoce ampliamente que la obesidad está asociada con un estado inflamatorio sistémico crónico de bajo grado que promueve el desarrollo de la resistencia a la insulina, lo que conduce a trastornos metabólicos como son enfermedades cardiovasculares, esteatosis hepática y DT2 (de Heredia, et al. 2012). Algunos estudios han determinado que los pacientes con DT2 pueden presentar concentraciones séricas elevadas de biomarcadores inflamatorios, como son, proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), recuento de glóbulos blancos, interleucina-1 β (IL-1 β), antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA), IL-6, IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), proteína-10 inducible por interferón γ (IP-10), haptoglobina y fibrinógeno que apuntan a un grado de inflamación crónica subclínica (Vozarova et al., 2002; Grossmann et al., 2015). El perfil de estos biomarcadores inflamatorios varía con el desarrollo y la progresión de la enfermedad permitiendo diferenciar entre las fases preclínicas y clínicas de la DT2 y también se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina y las características

de los trastornos metabólicos (Vozarova et al., 2002; Natali et al., 2006; Phillips and Perry, 2013).

Diversos factores han demostrado tener un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina relacionada con la obesidad, los cuales implican la acumulación ectópica de ácidos grasos debido al exceso de calorías no gastadas, causando una hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo blanco (TAB), hipoxia del propio tejido, alteraciones en el metabolismo de lípidos, liberación aberrante de ácidos grasos libres (FFA) (Longo et al., 2019) y una desregulación de la producción de adipocinas, como son niveles elevados de las adipocinas proinflamatorias leptina, resistina, quemerina, progranulina y MCP-1, y niveles reducidos de adipocinas antiinflamatorias, como la adiponectina e IL-10 (Ren et al., 2022). Asimismo, la gran cantidad de ácidos grasos almacenados en los adipocitos hipóxicos exacerbaban algunos procesos oxidativos, como la lipoperoxidación, aumentando considerablemente las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), que en consecuencia inicia un proceso inflamatorio localizado que es caracterizado por el aumento de leptina y TNF- α , y la disminución de adiponectina e IL-10 (Murano, et al. 2008). Además, los cambios en el tejido adiposo promueven el reclutamiento de macrófagos M1 en el propio tejido que secretan factores inflamatorios, incluyendo TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 y óxido nítrico (Sell & Eckel, 2010). El estado de activación y señalización de estos macrófagos son modulados aún más por el nivel elevado de citocinas proinflamatorias y el exceso de FFA iniciándose un círculo vicioso inflamatorio crónico de bajo grado a nivel local y que a su vez estos factores inflamatorios se vierten a circulación viajando a otros órganos, generando inflamación y estrés del retículo endoplásmico en los mismos dando lugar a una condición inflamatoria sistémica de bajo grado (Suárez-Carmona et al., 2017).

En conjunto, los procesos inflamatorios mencionados anteriormente comprometen la adecuada señalización de la insulina. Normalmente, en la señalización de la insulina, la activación del receptor de insulina promueve la autofosforilación de varios residuos de tirosina localizados en la región citosólica de la subunidad β del receptor. Los residuos de tirosina autofosforilados son entonces reconocidos por diferentes proteínas adaptadoras, entre las que se incluyen miembros de la familia del sustrato del receptor de insulina 1 y 2 (IRS-1/2), las cuales actúan como una molécula adaptadora que coordina la formación de complejos moleculares y desencadena la cascada de señalización de la insulina para la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

captación de glucosa (Olivares-Reyes & Arellano-Plancarte, 2008). En cambio, durante la inflamación sistémica de bajo grado característica de la obesidad, las citocinas circundantes TNF- α , IL-6 e IL-1 β se unen a sus receptores en la membrana celular de los adipocitos y tejidos sensibles a insulina (hígado, páncreas y músculo esquelético) provocando un incremento en la fosforilación de residuos de serina y treonina en IRS-1/2 a través de las vías NF- κ B/IKK β y quinasa c-Jun N-terminal lo que evita la activación apropiada de la vía de señalización del receptor de insulina provocando la resistencia a la insulina en los tejidos sensibles a ésta (Tanti & Jager, 2009; Yung & Giacca, 2020). Además, las alteraciones en el metabolismo de lípidos en el TAB inducen niveles elevados de triglicéridos y FFA en el plasma que se acumulan en los tejidos sensibles a la insulina contribuyendo también a su resistencia en el músculo esquelético (Li et al., 2015). A esta acumulación de lípidos puede contribuir el deterioro de la oxidación de las grasas, debido a la disfunción mitocondrial. La sobrecarga de ácidos grasos en las mitocondrias genera productos de oxidación, que incluyen a las ROS, causando la activación de quinasas inflamatorias y daño mitocondrial que también se ha asociado con la resistencia a la insulina en el músculo esquelético (Koves et al., 2008).

La resistencia periférica a la insulina causa que las células β pancreáticas secreten más insulina, un proceso conocido como hiperinsulinemia compensatoria. A largo plazo esta hiperinsulinemia junto con el pérdida de la sensibilidad a la insulina pueden causar la atrofia de las células β provocando defectos en la secreción de la insulina, lo que da lugar a una hiperglicemia sostenida y a DT2 (Gutiérrez-Rodelo, et al., 2017).

2.5 La inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta alta en grasas como un evento temprano de la obesidad y el desarrollo de la DT2

Los acontecimientos iniciales del proceso inflamatorio sistémico gradual no han sido completamente entendidos. Se ha puesto de relieve que las alteraciones en la homeostasis de la barrera intestinal inducidas por una dieta alta en grasas (HFD) induce inflamación intestinal que puede representar un factor causal temprano de la inflamación sistémica de bajo grado, que incluso puede preceder a la inflamación del tejido adiposo en la obesidad y predisponer a la DT2 (Ding & Lund, 2011; Bleau et al., 2015). Esta propuesta resulta interesante ya que, tras la ingestión, el tracto gastrointestinal se expone primero a los nutrientes y, por lo tanto, su desregulación puede representar el primer eslabón en la

cadena de eventos que conducen a la inflamación sistémica de bajo grado asociada a la obesidad.

Los mecanismos subyacentes aún están bajo investigación, pero observaciones recientes indican que, previo a la obesidad, la ingesta de una HFD promueve alteraciones en la microbiota intestinal (disbiosis), disminución de la expresión de péptidos antimicrobianos y reducción de uniones estrechas en el epitelio de la mucosa intestinal desencadenando un proceso inflamatorio intestinal, lo que aumenta la permeabilidad intestinal de componentes bacterianos, como los lipopolisacáridos (LPS), promoviendo así la translocación de LPS a la circulación (Araújo et al., 2017). Además, mayores cantidades de FFA presentes en la HFD estimula una mayor secreción de ácidos biliares en el intestino lo que induce estrés oxidativo y apoptosis de los enterocitos, lo que reduce aún más la barrera epitelial intestinal (Rohr et al., 2020).

La liberación elevada de LPS y el aumento de los niveles de FFA conducen a la activación de células inmunes entéricas que producen niveles elevados de citocinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el intestino (Fujiyama et al., 2007; Antonioli et al., 2019a; Xie et al., 2020). La translocación de LPS, citocinas proinflamatorias y FFA hacia la circulación portal hepática y sistémica pueden regular positivamente los receptores tipo Toll (TLR) en los macrófagos circulantes permitiendo que se activen a fenotipo M1 que a su vez producen aún más citocinas proinflamatorias. Antes de la aparición de la obesidad, estos mediadores proinflamatorios en el sistema circulatorio desencadenan vías inflamatorias en otros tejidos incluidos el hígado, el páncreas, el músculo esquelético y cerebro contribuyendo así a la inflamación sistémica de bajo grado y creando las complicaciones metabólicas de la DT2 (Figura 2) (Duan et al., 2018).

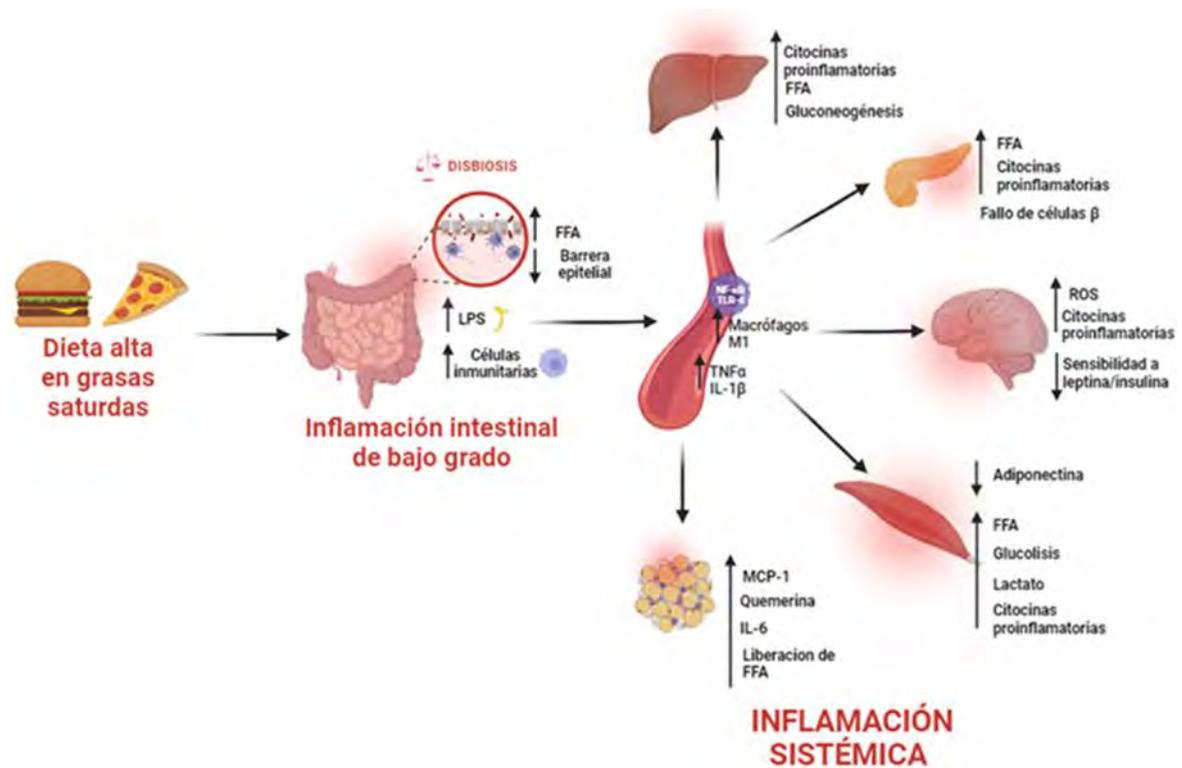


Figura 2. Dietas altas en grasas induce alteraciones en la microbiota intestinal y barrera epitelial provocando que las bacterias y sus productos como los lipopolisacáridos (LPS) se transloquen. El LPS y ácidos grasos libres (FFA) pasan a circulación resultando en una inflamación sistémica de bajo grado y alteraciones en la homeostasis de muchos órganos. Creado con BioRender.

2.6 Papel de la microbiota intestinal en la inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta alta en grasas como un evento temprano de la obesidad y el desarrollo de la DT2.

El papel de la microbiota intestinal en la obesidad fue demostrado por primera vez en experimentos con roedores, donde ratones libres de gérmenes colonizados con la microbiota intestinal de ratones genéticamente obesos ob/ob ganaron más peso que sus homólogos colonizados con microbiota de animales delgados concluyendo que la microbiota de los ratones ob/ob podían transferir la obesidad (Turnbaugh et al., 2006). Más tarde, el mismo grupo de investigadores observaron que la ingesta a largo plazo de una HFD en ratones normales alteró la composición bacteriana intestinal, aumentando la abundancia de Firmicutes con una reducción proporcional en el Filo Bacteroidetes, así como una menor diversidad bacteriana. También se observó un cambio similar en la proporción Firmicutes/Bacteroidetes en los ratones ob/ob (Turnbaugh et al., 2008). Por otra

parte, Ding y colaboradores (2011) observaron que los ratones libres de gérmenes alimentados con una HFD durante 2 a 16 semanas no desarrollaron obesidad y no mostraron niveles elevados de TNF- α en el intestino en comparación con los ratones normales indicando que una combinación de HFD y microbiota intestinal son esenciales para inducir inflamación intestinal y aumento de peso. Además, la HFD induce un ambiente inflamatorio específico en el intestino correlacionado con la disbiosis de la mucosa intestinal, caracterizada por un crecimiento excesivo de proteobacterias proinflamatorias como *Escherichia coli*, una disminución de las bacterias protectoras y una reducción de las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Agus et al., 2016).

Se ha encontrado que posterior a las 14 semanas de alimentación con una HFD, el colon proximal mostró aumento en la expresión de algunas citocinas inflamatorias como IL-1 β e IL-12p40, pero no de IL-6 o TNF- α (Li, et al.2008). Por el contrario, algunos estudios han encontrado un aumento significativo en la expresión del TNF- α en el colon proximal entre 8 y 12 semanas de alimentación con HFD (Winer, et al. 2016). Un estudio reciente también demostró que los ratones macho C57BL/6J alimentados con HFD durante 10 o 20 semanas mostraron una proporción del Filo Actinobacteria elevada que se asoció positivamente con el aumento del peso corporal y la expresión génica de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 en el colon (Kim et al., 2019). Estos estudios en conjunto sugieren que la expresión de citocinas proinflamatorias puede depender del curso temporal de la inflamación.

Es importante destacar que una HFD aumentó la proporción de microorganismos que contiene LPS en el intestino y cuando se indujo endotoxemia metabólica durante 4 semanas en ratones mediante infusión subcutánea continua de LPS, la glucemia y la insulinemia en ayunas, el peso corporal, el hígado y el tejido adiposo aumentaron en un grado similar al de los ratones alimentados con HFD demostrándose que la endotoxemia metabólica desencadena aumento de peso y diabetes (Cani et al., 2007).

Resultados similares a las alteraciones en la microbiota encontrados en los roedores alimentados con HFD se han encontrado en humanos con obesidad. En un estudio se mostró que la proporción relativa de Bacteroidetes disminuye en personas con obesidad en comparación con las personas delgadas, y que esta proporción aumenta con la pérdida de peso corporal con la ingesta de dietas bajas en calorías (Ley et al., 2006). En humanos, el aumento del filo Firmicutes sobre Bacteroidetes sigue siendo un tema controversial, ya que

algunos estudios no han detectado diferencias entre personas con obesidad y delgadas en la proporción de Bacteroidetes medida en muestras fecales, ni cambios significativos en el porcentaje de Bacteroidetes en las heces de personas con obesidad sometidas a dietas bajas en calorías, pero si se detectaron reducciones significativas dependientes de la dieta en un grupo de Firmicutes productoras de butirato en muestras fecales de sujetos con obesidad que seguían dietas de pérdida de peso (Duncan et al., 2008).

Un estudio encontró que las personas con una riqueza bacteriana baja se caracterizan por una adiposidad general, resistencia a la insulina y dislipidemia más marcada y un fenotipo inflamatorio más pronunciado en comparación con las personas con una riqueza bacteriana alta. Además, las personas con obesidad con menor riqueza bacteriana también ganaron más peso con el tiempo teniendo mayor riesgo de progresar a comorbilidades asociadas a la obesidad, como la DT2 (Le Chatelier et al., 2013).

Muchos estudios clínicos han descubierto que los pacientes con DT2 padecen trastornos metabólicos y estados inflamatorios crónicos acompañados de alteraciones en la microbiota intestinal (Yang et al., 2021). Un estudio realizado en China descubrió que las bacterias enriquecidas en pacientes con DT2 son principalmente patógenos, como *Escherichia coli*, algunas especies de *Clostridium*, *Bacteroides caccae* y *Eggerthella lenta* (Qin et al., 2012). Otro estudio confirmó que las mujeres europeas con DT2 mostraron una mayor abundancia de cuatro especies de *Lactobacillus* y menor abundancia de cinco especies de *Clostridium* en comparación con los individuos con tolerancia normal a la glucosa (Karlsson et al., 2013). Cabe mencionar que las especies de *Lactobacillus* fueron correlacionadas positivamente con la glucosa en ayunas y hemoglobina glicosilada (HbA1c), mientras que las especies de *Clostridium* fueron negativamente correlacionadas con la glucosa en ayunas, HbA1c y triglicéridos plasmáticos, lo que sugiere que estos taxones bacterianos podrían estar relacionados con el desarrollo de DT2. De manera similar, los niveles de *Lactobacillus* aumentaron significativamente, mientras que los niveles de *Clostridium coccooides* y *Clostridium leptum* disminuyeron significativamente en pacientes con DT2 recién diagnosticados (Chen et al., 2019). En conjunto estos estudios sugieren que las alteraciones en la microbiota intestinal son un factor clave en el desarrollo y la progresión de la DT2.

2.7 Alteraciones en las funciones gastrointestinales durante la obesidad y DT2.

Varias investigaciones han reportado que la obesidad predispone al desarrollo de trastornos gastrointestinales (Rajindrajith et al., 2014). De hecho, hay evidencia clínica que respalda una alta incidencia de trastornos digestivos funcionales en pacientes con obesidad, como son gastroparesias, reflujo gastroesofágico, dispepsia, estreñimiento y/o diarrea (Fysekidis et al., 2012; Le Pluart et al., 2015). Los pacientes con diabetes también a menudo sufren trastornos gastrointestinales, que recientemente se ha reconocido como una de las complicaciones más comunes de la diabetes (Zhao et al., 2017). Todo el tracto gastrointestinal puede ser afectado y las quejas comunes incluyen diarrea, estreñimiento e incontinencia fecal (Bharucha et al., 2013; Taba Taba Vakili et al., 2015). Los síntomas suelen ser inespecíficos, pero ocasionalmente pueden ser lo suficientemente graves como para disminuir la calidad de vida. Los mecanismos subyacentes a la aparición y el desarrollo de tales trastornos gastrointestinales son complejos y permanecen poco entendidos.

Algunos estudios han sugerido que la neuropatía autonómica es un factor importante (Dooley et al., 1988; Jung et al., 2003), pero otros estudios han observado una nula correlación entre los síntomas gastrointestinales y la neuropatía autonómica. Además, los pacientes con diabetes que no muestran neuropatía también experimentan síntomas gastrointestinales (Bytzer et al., 2001). Algunos estudios utilizando ratones alimentados con una HFD sugieren que el retraso del tránsito colónico es causado por una pérdida de neuronas entéricas positivas a la NOS y VIP del SNE (Beraldi et al., 2015; Anitha et al., 2016). Esta pérdida neuronal puede ocurrir independientemente de los cambios en la microbiota (GalicBeraldi et al., 2020), aunque un estudio sugiere lo contrario (Anitha et al., 2016). Por otra parte, en personas adultas con diabetes, se ha observado una reducción en la cantidad de neuronas del SNE colónico en comparación con personas sanas. En particular, se ha demostrado la pérdida selectiva de neuronas nitrérgicas y neuronas inhibitoras que expresan el neuropéptido Y, pero no se afecta el número de neuronas colinérgicas en el colon diabético humano (Chandrasekharan, et al 2011). Además, se ha informado de degeneración y/o pérdida de ICC en todo el tracto gastrointestinal tanto en modelos animales como en pacientes con DT2 lo que provoca una reducción de la frecuencia de las contracciones musculares espontáneas (Iwasaki et al., 2006).

Por otro parte, alteraciones estructurales y biomecánicas en el intestino han sido estrechamente relacionadas con anomalías sensoriales-motoras que se asocian con los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

síntomas que se encuentran frecuentemente en pacientes con diabetes como son la diarrea y/o estreñimiento (Zhao et al., 2017). Con relación a los cambios histomorfológicos, varios estudios han revelado que una HFD reduce significativamente la longitud intestinal, la profundidad de las criptas, el grosor de la mucosa y la capa muscular externa en comparación con el grupo control (Xie, et al., 2020; Kim et al., 2022). En otro estudio, utilizando un modelo animal de DT2 inducido por la combinación de una HFD y una dosis de STZ observaron un aumento en el peso húmedo del colon por unidad de longitud y un incremento en el espesor de la capa muscular y mucosa en comparación con el grupo de control (Chen et al., 2017). Muchos estudios tanto en humanos como en modelos animales de diabetes han encontrado que la hiperglicemia induce un incremento en la proliferación de diferentes capas del íleon y colon. Por ejemplo, se ha asociado la hiperglicemia crónica con incremento en las vellosidades del intestino delgado y un incremento de la pérdida de enterocitos, lo cual podría explicar la mayor capacidad intestinal para absorber glucosa como se observa en la DT2 (Verdam et al., 2011). En el colon, también se ha observado un incremento de la capa de la mucosa, la submucosa y la muscular externa asociado a la hiperglicemia (Zhao, et al., 2017).

Antonioli y colaboradores (2019b) sugieren que la glía entérica desempeña un papel importante en la aparición de las alteraciones motoras entéricas debido a que en un modelo de obesidad inducido por una dieta HFD mostró una mayor actividad de la glía entérica que se relacionó con un aumento de la actividad neural taquiquinérgica (Substancia P) y una marcada liberación de IL-1 β . Esta citocina proinflamatoria, más allá de desempeñar un papel clave en la diferenciación y funciones de las células linfoides innatas y adaptativas polarizadas (Garlanda et al., 2013), ejerce acciones notables, tanto sobre la estructura (Gougeon et al., 2013), como en la actividad del compartimento neuromuscular mientérico ya que se ha encontrado que afecta la amplitud y duración de las corrientes de Ca²⁺ intracelular provocadas por estimulación eléctrica, contribuyendo así a los procesos de remodelación del SNE y las alteraciones motoras relacionadas que ocurren en el escenario de inflamación intestinal (Kindt et al., 2010). Además, otro estudio sugiere que la pérdida del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) durante la diabetes puede ser el factor detonante de la apoptosis de las neuronas entéricas y las subsecuentes complicaciones gastrointestinales (Anitha et al., 2006)

En conjunto, estos resultados indican que la HFD y la diabetes inducen una marcada remodelación estructural de la pared del tracto gastrointestinal y nervioso, lo que conduce a una función alterada del tracto gastrointestinal. Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a todas estas alteraciones son poco entendidos.

2.8 Sistema purinérgico.

En las últimas décadas, el sistema purinérgico ha cobrado mucha atención debido a que regula una amplia gama de procesos fisiológicos incluyendo el metabolismo energético, la neurotransmisión, la integridad vascular y las respuestas inmunológicas (Burnstock, 2007; Giuliani, et al. 2019; Reichert, et al. 2021). Este sistema comprende nucleótidos de purina y nucleósidos extracelulares, receptores, enzimas catabólicas y transportadores de nucleósidos.

La señalización purinérgica se inicia mediante la liberación de ATP en el espacio extracelular. En condiciones fisiológicas, el ATP se libera de manera regulada a través de exocitosis, canales aniónicos, maxi-canales, transportadores, conexinas y panexinas en concentraciones extracelulares que van de nanomolar a decenas de micromolar (Antonoli et al., 2019a). En condiciones patológicas, se liberan niveles mucho más altos de ATP, encontrarse niveles hasta en el rango de milimolar, y se ha asociado con inflamación, hipoxia y muerte celular (Bodin & Burnstock, 1995; Di Virgilio, 2015; Dosch et al., 2018). Recientemente, se ha demostrado que las bacterias comensales del intestino también son productoras y liberadoras de ATP (Inami et al., 2018).

En el espacio extracelular, el ATP y adenosina difosfato (ADP) se metabolizan rápidamente a adenosina monofosfato (AMP) y a su vez a adenosina. Este proceso de fosfohidrolisis de nucleótidos se encuentra regulado por ectoenzimas (Eltzschig, et al. 2012; Reichert, et al. 2021). Primero, tanto el ATP, como el ADP, son convertidos a AMP a través de la enzima ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1 (ENTPD1), también conocida como CD39. En segundo lugar, la ecto-5'-nucleotidasa (NT5E) o también denominada CD73 convierte el AMP extracelular en adenosina (Eltzschig, et al. 2012). Por último, la enzima adenosina monofosfato deaminasa-3 (AMPD3) cataliza la desaminación hidrolítica del AMP a monofosfato de inosina y la adenosina desaminasa (ADA) cataliza irreversiblemente la adenosina convirtiéndola en inosina (Burnstock, 2018) (Figura 3).

El ATP extracelular y sus derivados se unen a receptores purinérgicos transmembranales, los cuales son clasificados en receptores P1 o receptores de adenosina y P2, estos últimos se dividen en dos clases, los receptores ionotrópicos P2X y los receptores metabotrópicos P2Y.

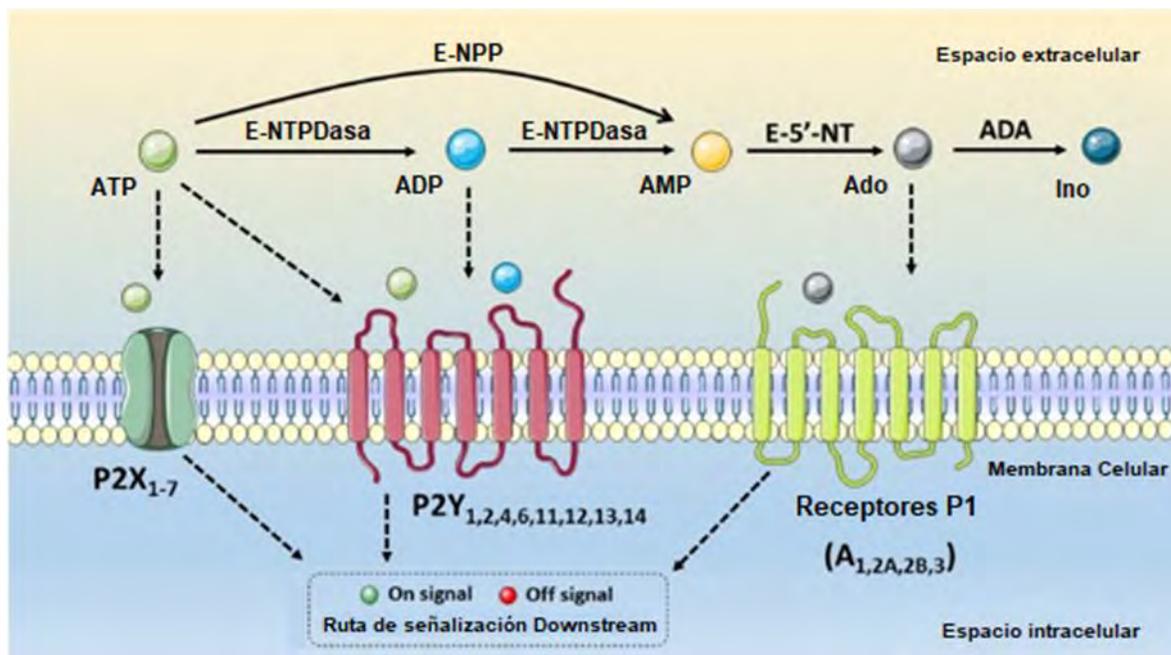


Figura 3. Esquema general del sistema purinérgico. El ATP extracelular y sus derivados generados por la fosfohidrolisis de las ectoenzimas se unen a sus receptores específicos activando o desactivando cascadas de señalización purinérgica que conducen a diferentes resultados celulares. (Obtenido de Reichert, et al., 2021).

A la fecha se han descrito cuatro subtipos de receptores de adenosina acoplados a proteínas G (A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃). Específicamente, los receptores A₁ y A₃ están acoplados a proteínas G_{ai/o} que disminuye la actividad de la adenilato ciclasa inhibiendo la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que a su vez disminuye la actividad de la proteína cinasa A (PKA). Mientras que los receptores A_{2A} y A_{2B} están unidos principalmente a proteínas G_{as/olf} que aumenta la producción de AMPc, lo que resulta en la activación de la PKA y la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (CREB). En algunos casos, el receptor A₁ y A_{2B} aumentan la actividad de la fosfolipasa C (PLC) a través de una proteína G_{aq} (Sheth et al., 2014). La afinidad por la adenosina varía entre los receptores, por ejemplo, los receptores A₁ y A_{2A} tienen una mayor afinidad que va en el rango de 10 - 30 nM, mientras que el receptor A₃ tiene una afinidad de 100 nM, y el

receptor A2B tiene menor afinidad ya que requiere concentraciones superiores a 1 μM , las cuales pueden encontrarse en condiciones de inflamación o de hipoxia (Borea et al., 2018).

Los receptores P2X son canales catiónicos de la membrana celular activados únicamente por ATP extracelular, que permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ y la salida de K^+ . Se han clonado siete subunidades, P2X1-P2X7. La estructura molecular de cada subunidad P2X es muy similar, caracterizada por tener dos dominios transmembranales (TM1 y TM2) unidos por una asa larga extracelular donde se encuentra el sitio de unión al ATP y un amino (NH_2) y carboxilo (COOH) terminal intracelular. La estructura funcional de un receptor P2X es probablemente como trímero, los cuales pueden estar compuestos por un mismo tipo de subunidad para formar un receptor homomérico o por combinaciones específicas de dos subunidades diferentes para formar un receptor heteromérico, como son los receptores P2X1/2, P2X1/4, P2X2/3, P2X2/6, P2X4/6 y P2X4/7 descritos en sistema heterólogos de expresión (Saul et al., 2013). Aunque el ATP activa cada subtipo de receptor P2X, su afinidad varía significativamente, desde nanomolar (P2X1, P2X3) hasta decenas de micromolar (P2X2, P2X4) y cientos de micromolar (P2X7; $\text{EC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). Además, los subtipos de receptores tienen diferentes tasas de desensibilización, que van desde rápida (milisegundos en P2X1, P2X3) pasando por lenta (segundos en P2X2, P2X4) hasta una falta total de desensibilización (P2X7). La afinidad significativamente menor por el ATP y la falta total de desensibilización distinguen al receptor P2X7 de cualquier otro miembro de la familia de receptores P2X. Además, P2X7 es el único subtipo que actúa como receptor citotóxico en múltiples vías de señalización (McCarthy et al., 2019).

Los receptores P2Y son receptores acoplados a proteínas G activados por nucleótidos extracelulares. Se han descrito 8 subtipos en mamíferos (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14). Los receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 y P2Y11 se acoplan a proteínas $\text{G}_{\alpha q}$ que estimula a la PLC, seguido de un incremento en el inositol trifosfato (IP_3) y la movilización de Ca^{2+} de las reservas intracelulares. Los receptores P2Y11 se acoplan además a las proteínas G_s , seguido de un aumento de la actividad de la adenilato ciclasa. Por el contrario, los receptores P2Y12, P2Y13 y P2Y14 envía señales principalmente a través de la activación de proteínas G_i y la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa (Von Kügelgen, 2019). Los receptores P2Y tienen diferentes afinidades por los nucleótidos de purinas endógenos y su activación va en el rango de nanomolar a micromolar (Jacobson et al., 2020) (Tabla 1)

Tabla 1. Potencia y selectividades de los agonistas endógenos de los receptores P2Y en roedores.

Subtipo	Afinidad del agonista	pEC50 del principal agonista	EC50
P2Y1	ADP \geq ATP	5.09	8.12 μ M
P2Y2	UTP>ATP	8.10	7.94 nM
P2Y4	UTP (human) UTP=ATP (rata y ratón)	5.06	8.71 μ M
P2Y6	UDP>UTP>>ATP	6.52	0.302 μ M
P2Y11	ATP	4.77	16.9 μ M
P2Y12	ADP>ATP	7.22	60.3 nM
P2Y13	ADP	7.94	11.5 nM
P2Y14	UDP	6.45	0.355 μ M

2.9 Funciones conocidas del sistema purinérgico en el intestino

2.9.1 Participación del sistema purinérgico en el control de la motilidad intestinal

El control básico de la motilidad intestinal depende de la actividad del SNE, aunque también está modulado por el SNA y factores hormonales, cada patrón motor está programado dentro del circuito neuronal entérico. El ATP y sus derivados pueden influir en la motilidad de diversas formas directas o indirectas. Las purinas pueden liberarse de los nervios entéricos intrínsecos o los nervios simpáticos y actuar sobre los receptores purinérgicos del músculo liso que median la motilidad. También pueden actuar sobre las terminales nerviosas entéricas y modificar la liberación del neurotransmisor desde las vías del control neural motor. Además, el ATP participa en la transmisión sináptica entre neuronas del plexo mientérico y submucoso que participan en el control de la motilidad gastrointestinal o actuar sobre las ICC y modular indirectamente los patrones de motilidad (Burnstock 2014).

La adenosina puede inhibir la motilidad intestinal a través de la activación de los receptores A1 ubicados en el músculo liso o indirectamente inhibiendo la transmisión colinérgica o taquiquinérgica de las neuronas entéricas. Los receptores A2A ejercen su función inhibitoria a través de la síntesis de NO (Zizzo et al., 2011). Las funciones de los

receptores A2B y A3 en el control de las funciones motoras en el intestino permanecen poco estudiadas. Se ha demostrado que los receptores A2B están ubicados en las neuronas motoras inhibitorias entéricas que liberan NO en el colon distal de ratón y podrían estar mediando la relajación intestinal (Chandrasekharan *et al.*, 2009), mientras que los receptores A3 se expresan en los ganglios mientéricos del colon distal de rata, pero su función no está clara en la regulación de la motilidad intestinal (Antonioli *et al.*, 2010 b).

El principal efecto del ATP sobre el músculo liso del tracto gastrointestinal es la relajación. Los resultados obtenidos en el colon e intestino de humano y otras especies de mamífero, muestran que el ATP genera potenciales de unión inhibitorios (IJP) en el músculo liso (Bornstein, 2008). Es muy probable que el receptor P2Y1 expresado en el musculo liso circular y longitudinal es el principal receptor que media estas respuestas inhibitorias no adrenérgicas no colinérgicas (NANC), puesto que en los ratones knockout para P2Y1 se pierden los IJP en el intestino con una pérdida concomitante de la actividad inhibidora por parte del agonista selectivo de P2Y1, MRS2365 (Gallego *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012). Por el contrario, los IJP todavía están presentes en los ratones knockout para NOS y se inhiben por el antagonista selectivo de P2Y1, MRS2179 (Zhang *et al.*, 2010). Es importante señalar que la señalización purinérgica no es la única forma de transmisión NANC en el tracto gastrointestinal, sino que también incluye la transmisión por motoneuronas inhibitorias intrínsecas que liberan NO, VIP, CO y sulfuro de hidrógeno, a la fecha no se sabe cómo estos factores inhibidores interactúan completamente a nivel molecular en los tejidos neuro-efectores (King, 2015).

Los receptores P2X median EPSP rápidos en las neuronas mientéricas, las cuales expresan receptores P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 y P2X7 (Guerrero-Alba *et al.*, 2010; Valdez-Morales *et al.*, 2011; Nieto-Pescador *et al.*, 2013). Alrededor del 25% de las neuronas entéricas son fuertemente inmunorreactivas positivas para el receptor P2X2, específicamente se expresan en las motoneuronas inhibitorias positivas para NOS y las IPANs, así como en las neuronas secretomotoras de la mucosa positivas para VIP del intestino. La subunidad P2X3 también se encontró en las motoneuronas inhibidoras NOS positivas y en interneuronas positivas para calretinina. La subunidad P2X5 está presente en las neuronas entéricas inmunorreactivas positivas para NOS, calbindina y VIP (Ruan y Burnstock, 2005). Se ha demostrado que las neuronas mientéricas cultivadas son fuertemente inmunopositivas para la subunidad P2X4 (Nieto-Pescador *et al.*, 2013). Las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

neuronas entéricas AH/tipo II en ganglios intactos fueron fuertemente inmunopositivas para la subunidad P2X6 que estaba colocalizada con calbindina y calretinina (King, 2015). También se ha encontrado inmunoreactividad del receptor P2X1 y P2X2 en el músculo liso longitudinal y circular del colon, pero no en otras regiones del intestino (Giaroni et al., 2002). Ha sido demostrado que las vías sinápticas rápidas purinérgicas están involucradas en la transmisión neuro-neural tanto ascendente como descendente en las vías nerviosas excitatorias hacia los músculos liso longitudinal y circular (Spencer et al., 2000).

La delección del gen que codifica para el receptor P2X2 en ratones elimina los EPSP rápidos inducidas por ATP en las motoneuronas inhibitorias, mientras que la respuestas de las neuronas IPANs no cambiaron en estos ratones. Además, este mismo estudio demostró que la peristalsis estaba alterada en el íleon de los ratones knockout para P2X2 (Ren et al., 2003), indicando que el receptor P2X2 participa en la neurotransmisión del plexo mientérico para el control correcto de la peristalsis. Este mismo grupo encontró que los receptores P2X3 estaban localizados principalmente en las neuronas IPANs y que la delección del gen que codifica para el receptor P2X3 también afecta la peristalsis en el intestino de ratones (Bian et al., 2003). Las neuronas IPANs que expresan los receptores P2X3 se proyectan a la submucosa y se conectan con interneuronas y neuronas motoras en los plexos mientéricos y submucoso. La aplicación de ATP y el agonista selectivo para los receptores P2X1, P2X3 y P2X2/3, α , β -meATP, activa las terminales submucosas de las IPANs, apoyando la hipótesis de que el ATP liberado por las células epiteliales de la mucosa tiene una acción sobre los receptores P2X3 y P2X2/3 en las neuronas IPANs del plexo submucoso que contribuye a la detección de la distensión o aumentos de la presión intraluminal que inicia el reflejo peristáltico (Burnstock, 2012).

Los receptores P2X no solo participan en la neurotransmisión en el plexo mientérico, sino también en la neuromodulación pre- y postsináptica de la unión neuromuscular. Por ejemplo, se ha demostrado que el α , β -meATP libera ACh de las terminales nerviosas que inervan el músculo liso longitudinal en el íleon, indicando que los receptores P2X1, P2X3 y/o P2X2/3 están involucrados en la modulación presináptica de la neurotransmisión colinérgica entre las neuronas mientéricas y el músculo liso longitudinal del intestino delgado. Esto es interesante porque el ATP activa transitoriamente los receptores presinápticos P2X para aumentar la liberación de ACh de las neuronas motoras mientéricas, mientras que después de la descomposición del ATP por las ectoenzimas a

adenosina, ésta actúa presinápticamente a través de los receptores A1 para disminuir la liberación de ACh (Burnstock, 2012). No obstante, la aplicación de α , β -meATP en músculo liso aislado provoca la relajación del músculo liso intestinal, imitando los resultados que se observan activando el receptor P2Y1, el cual ha sido ampliamente demostrado que causa relajación, pero nunca se ha demostrado que este agonista active tales receptores, por lo que se piensa que el α , β -meATP a través de los receptores P2X1 o P2X3 libera ATP localmente, que luego actúa sobre los receptores P2Y1 para producir relajación en el músculo liso (De Man et al., 2003).

La participación del receptor P2X7 en la motilidad intestinal no está clara. Inmunoreactividad del receptor P2X7 ha sido observada en la glía entérica y en los ganglios mientéricos y submucosos del estómago, el intestino delgado y el colon, mientras que las ICC y las células del músculo liso fueron negativas para P2X7 (Vanderwinden et al., 2003). Un estudio, proporciono evidencias de que en condiciones normales, los receptores P2X7, expresados en los ganglios mientéricos, participan marginalmente en la modulación de la motilidad del músculo longitudinal del colon de rata, pero en presencia de inflamación intestinal severa, se observó un marcado incremento en la distribución del receptor P2X7, particularmente a nivel de los ganglios mientéricos, que se produjo en concomitancia con la aparición de inmunopositividad del receptor también en el músculo liso longitudinal. Además, este mismo trabajo demostró que, en presencia de inflamación intestinal, los receptores P2X7 desempeñan un papel destacado en el control inhibitorio de la motilidad del colon, modulando las vías excitadoras colinérgicas mediante la activación de neuronas nitrérgicas inhibitoras (Antonioli et al., 2014). La importancia funcional de la regulación positiva de los receptores P2X7 en las capas del músculo liso del colon sigue siendo indeterminada.

2.9.2 Participación del sistema purinérgico en el control de la secreción y absorción epitelial intestinal

Las secreciones gastrointestinales en coordinación con la motilidad son importantes en la digestión de las partículas de los alimentos, la lubricación, la absorción de nutrientes, la regulación del pH y la eliminación de productos de desecho. La activación mecánica o química de la mucosa puede provocar un reflejo secretor donde se involucran células

enterocromafines, IPANs, interneuronas, neuronas secretomotoras y células epiteliales mucosales (Furness, 2000).

Con técnicas mejoradas, ha sido posible cuantificar la concentración de ATP en las células epiteliales mucosales encontrándose a concentraciones micromolares, que es el rango de sensibilidad de los receptores purinérgicos. Además del ATP, las células también liberan pequeñas cantidades de UTP y adenosina. Debido a su función y posición, las células epiteliales mucosales intestinales pueden ser células expuestas a la más amplia variedad de estímulos potenciales de liberación de ATP, como son estímulos mecánicos, osmóticos e hipóxicos, estrés metabólico, liberación de nucleótidos relacionados con patógenos y lisis y, por supuesto, hormonas y estímulos neuronales. De hecho, algunos de estos estímulos pueden ser parte de la liberación basal de ATP. También los nervios simpáticos y parasimpáticos que irrigan los epitelios pueden liberar ATP. Otra posibilidad es que la estimulación neuronal pueda provocar la liberación de ATP directamente de los epitelios (Novak et al., 2011). Las bacterias comensales del intestino también son productoras y liberadoras de ATP (Inami et al., 2018).

La estimulación luminal por nutrientes, cambios en el pH, fuerzas mecánicas, cambios en la concentración de solutos, irritantes o microorganismos enteropatógenos invasores activan a las células enterocromafines que secretan principalmente 5-HT. La 5-HT liberada actúa sobre las terminaciones nerviosas de las IPANs activando potenciales de acción que inducen la liberación de neurotransmisor en las sinapsis con interneuronas o neuronas secretomotoras que conduce al reflejo secretor. Se ha demostrado que la adenosina endógena inhibe la liberación de 5-HT en las células enterocromafines del intestino a través de la activación de receptores A1 y A3 (Christofi, 2008). Este mismo grupo, también demostró que hay una inhibición autocrina de la secreción de 5-HT por la liberación de ATP en una minoría de células enterocromafines humanas en la mucosa intacta (menos del 20%) a través de la activación probable de receptores P2X1 o P2X3 (Liñán-Rico et al., 2013). Estudios farmacológicos y moleculares del mismo grupo sugieren que la liberación de 5-HT también está modulada por los receptores P2Y. Al respecto, UTP estimuló la liberación de 5-HT en células enterocromafines humanas posiblemente a través de la activación de receptores P2Y4 y P2Y6. El receptor P2Y1 también conduce a la liberación de 5-HT a través de una vía de señalización Gq/PLC/IP3, mientras que los receptores

P2Y₁₂ inhiben la secreción de 5-HT mediante la inhibición de adenilato ciclasa por proteínas G_i (Liñán-Rico et al., 2016).

El flujo de iones hacia la luz intestinal es el equilibrio entre la secreción y absorción. La secreción basal o “tono secretor” es también el flujo neto de iones y líquido hacia la luz intestinal que depende de la liberación espontánea de mediadores endógenos paracrinos, autocrinos o neurocrinos. El tono secretor se evalúa a partir de los cambios en la secreción de cloruro. La secreción intestinal de cloruro proporciona una fuerza impulsora para el movimiento de líquido y obliga el transporte de agua hacia el lumen. En condiciones normales la secreción de cloruro es baja, pero en presencia de enterotoxinas se aumenta considerablemente la tasa de secreción (Christofi, 2008). En la década de los 90s, Strohmeier y colaboradores demostraron que la activación del receptor A_{2B} en la membrana apical de las células epiteliales humanas estimula la secreción de Cl⁻ hacia la luz intestinal (Strohmeier et al., 1995). Mientras que la activación del receptor A₁ en las neuronas submucosas suprime la secreción de cloruro (Cooke et al., 1999). Años más tarde, este mismo grupo demostró que la estimulación mecánica libera nucleótidos que activan los receptores P_{2Y1} que desencadenan la secreción de cloruro del reflejo neural en el colon distal de cobayos (Cooke et al., 2004). Por otra parte, Ghanem y colaboradores mostraron que la secreción de Cl⁻ en el intestino delgado y grueso disminuyó un 40% en los ratones knockout para P_{2Y2} y un 60% en los ratones knockout para P_{2Y4}, concluyendo que la activación de los receptores P_{2Y2} y P_{2Y4} estimula la secreción de Cl⁻ luminal en el intestino delgado (Ghanem et al., 2005). Además, la estimulación de los receptores luminales P_{2Y2} y P_{2Y4} conduce a la secreción de K⁺ en la mucosa del colon distal del ratón (Matos et al., 2005), mientras que la absorción de Na⁺ es inhibida por la activación de los receptores P_{2Y2} de las membranas apicales, pero no por los receptores P_{2Y4} (Matos et al., 2007). Por el contrario, la activación de los receptores basolaterales P_{2Y6} en los enterocitos del colon de rata induce la secreción de NaCl mediante un aumento sinérgico de Ca²⁺ intracelular y AMPc (Köttgen et al., 2003). Además, la activación de los receptores P_{2Y2} induce la secreción de bicarbonato de la mucosa duodenal a través de la liberación de Ca²⁺ intracelular y la entrada de Ca²⁺ extracelular (Dong, et al., 2009)

Un artículo reciente examinó la distribución de los receptores P_{2X} en las células epiteliales del intestino y determinaron que, en el intestino delgado, el receptor P_{2X4} fue el único receptor P_{2X} presente en células epiteliales, enterocitos proximales, células

caliciformes y células de Paneth. Mientras que, en el colon revelaron una fuerte expresión del receptor P2X4 en todas los tipos de células epiteliales incluidas células indiferenciadas, enterocitos distales, células caliciformes, células de Paneth y células enteroendocrinas, pero también observaron una alta expresión del receptor P2X6 en células enteroendocrinas y una expresión muy baja de los receptores P2X1 y P2X5 en las célula epiteliales y de los P2X7 en enterocitos distales (Engevik et al., 2024). Sin embargo, la participación de los receptores P2X4, P2X5 y P2X7 en el control de las funciones de secreción y absorción epitelial del intestino delgado y grueso han sido poco estudiadas. Un estudio informó que la activación del receptor P2X7 modula la absorción de glucosa al regular negativamente la expresión del transportador de glucosa, GLUT2, en la superficie celular de los enterocitos, resultando en una disminución de la glucosa sanguínea (Bourzac et al., 2013). Los hallazgos de Arguin et al., (2017) confirmaron estos hallazgos ya que demostraron que en los ratones knockout para el receptor P2X7 aumento significativamente la expresión de GLUT2 en las membrana de los enterocitos y se correlacionó con el aumento de peso corporal y niveles elevados de glucosa sanguínea, triglicéridos, colesterol e insulina sérica. Además, un estudio reciente demostró que la activación de los receptores P2X4 y P2X7 epiteliales y del ganglio submucoso participan en la regulación del transporte de iones en el colon de rata (Ballout et al., 2022).

2.9.3 Participación del sistema purinérgico en la modulación de la respuesta inmune

Tanto el sistema inmunológico gastrointestinal como el sistema nervioso han desarrollado mecanismos para detectar y responder rápidamente al entorno intestinal dinámico. Las neuronas entéricas establecen conexiones con las células inmunitarias locales en la mucosa gastrointestinal. Cada vez está más claro que las interacciones neuro-inmunes regulan la función de la barrera gastrointestinal, la inmunidad y la protección del huésped. A pesar de este progreso, los circuitos celulares y los mecanismos moleculares que median tales interacciones apenas están comenzando a comprenderse y requieren más investigación (Jacobson et al., 2021).

El ATP y la adenosina son moduladores clave de la respuesta inmune. El ATP liberado por células lesionadas, apoptóticas o necróticas promueve una inflamación rápida al unirse a los receptores P2X y P2Y. Mientras que la adenosina tiene principalmente un efecto inmunosupresor al activar receptores P1, por lo que el equilibrio entre los dos es crucial para el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Los receptores P2 y P1 están

presentes en todo tipo de células inmunes, por lo que la señalización purinérgica afecta todos los aspectos de la inmunidad y la inflamación (Cekic & Linden, 2016).

Los receptores de adenosina P1 se expresan ampliamente en las células inmunitarias del linaje mielóide (neutrófilos, monocitos y macrófagos) y linfóide (células B, T y asesinas naturales (NK)). El papel de los receptores A1 no se comprende bien, pero existen pruebas sólidas de un papel crucial inmunosupresor de los receptores A2A, A2B y A3 en el control de la inflamación (Di Virgilio & Vuerich, 2015). Además, la adenosina demostró ser un modulador fisiológico que inhibe la generación de anión superóxido en los neutrófilos, la desgranulación, la fagocitosis y la función bactericida de los neutrófilos a través de la activación de los receptores A2A (Sun et al., 2008). La activación de los receptores A2A también inhibió la expresión y la liberación de citocinas y quimiocinas después de la estimulación con LPS (McColl et al., 2006). Otros estudios también demostraron que tanto los receptores A2B como las A3 también tienen acciones inmunosupresoras (van der Hoeven et al., 2011; van der Hoeven et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la adenosina estimula la migración de neutrófilos y amplifica la acción de las señales quimiotácticas a través de receptores A3 (Butler et al., 2012).

Se ha reconocido ampliamente el papel importante de los receptores P2X en la regulación inmunitaria y se está prestando cada vez más atención a su expresión y función. Los monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, linfocitos T y B y las células NK expresan los receptores P2X1, P2X4 y P2X7 (Idzko et al., 2014; Vargas-Martínez et al., 2020). En las células B también se ha demostrado la expresión del receptor P2X2 (Sluyter et al., 2001), y la expresión del receptor P2X5 solo se ha informado en linfocitos T (Abramowski et al., 2014). Los receptores P2X2 y P2X5 han sido objeto de poca atención en el sistema inmunológico, por lo tanto, no hay mucha información disponible sobre su función. Varios estudios han encontrado que los receptores P2X1 y P2X4 participan en la activación de células T y mastocitos (Cekic & Linden, 2016). Contrario a los otros receptores P2X, el receptor P2X7 ha sido ampliamente estudiado en el sistema inmunológico y se han demostrado muchas funciones en la regulación de la respuesta inmunológica. Por ejemplo, el receptor P2X7 puede promover respuestas inmunes proinflamatorias y exacerbar enfermedades inflamatorias de varias maneras: 1) al activar factores de transcripción que incluyen el NF- κ B, el factor nuclear de células T activadas (NFAT) y el factor 1 α inducible por hipoxia (HIF1 α), 2) al aumentar la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF- α y

IL-6 y de las quimiocinas CCL2 y CXCL2 en diferentes células inmunes, y 3) al incrementar el reclutamiento de neutrófilos (Gong et al., 2020). El receptor P2X7 también es uno de los activadores más potentes del inflamasoma NLRP3, lo que induce la liberación de 1L-1 β en macrófagos y neutrófilos (Karmakar et al., 2016). Además, el receptor P2X7 regula la supervivencia, diferenciación y activación de los linfocitos T y se asociado a la disfunción de la barrera epitelial intestinal (Jiang et al., 2022). Por último, la activación del receptor P2X7 puede inducir a la muerte celular, lo que aumenta la liberación de patrones moleculares asociados a daños (DAMP) y amplifica la inflamación (Di Virgilio et al., 2017).

Los receptores P2Y también se expresan ampliamente en células inmunes y se han caracterizado minuciosamente en granulocitos (neutrófilos y eosinófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (DC) y linfocitos T y B. También se han identificado algunos subtipos de P2Y en las células NK (Di Virgilio & Vuerich, 2015). El receptor P2Y2 es activado por ATP y UTP y actúa como una señal quimiotáctica para macrófagos y neutrófilos, promoviendo la eliminación fagocítica de células apoptóticas y bacterias. Además, la señalización del receptor P2Y2 promueve la migración y la activación de diversas células inmunes incluidos los neutrófilos, eosinófilos, DC y macrófagos. Aunque la activación del receptor P2Y2 facilita la defensa del huésped contra infecciones, la inapropiada activación del receptor P2Y2 está asociada con una inflamación incontrolada y la promoción de enfermedades inflamatorias crónicas (Gong et al., 2020). El ATP, UTP, UDP y UDP-glucosa liberados de los tejidos lesionados son quimiotácticos al activar los receptores P2Y2, P2Y6, P2Y11 y P2Y14 en los neutrófilos (Burnstock & Boeynaems, 2014). Hay pruebas de que el UTP y el UDP que activan el receptor P2Y6 desencadenan la liberación de la MCP-1, la IL-8 y una serie de quimiocinas adicionales, propagando así la inflamación y apoyando la quimiotaxis (Eltzschig et al., 2012). El receptor P2Y12 directamente regula la diferenciación de las células Th17 y promueve la patogénesis de la colitis ulcerosa y DT1 (Qin et al., 2017). Otro estudio demostró que la UDP-glucosa que actúa a través de los receptores P2Y14 es un mediador de la desgranulación de los mastocitos (Gao et al., 2010).

2.10 El sistema purinérgico en el contexto de la inflamación intestinal.

El ATP extracelular generalmente desempeña un papel proinflamatorio mediante la activación de los receptores purinérgicos P2 (P2X y P2Y), mientras que la degradación del

ATP a adenosina suele representar una señal de parada para el proceso de inflamación a través de la activación de los receptores P1. Luego, la adenosina se elimina del entorno extracelular mediante transportadores de nucleósidos y/o enzimas (Antonioli et al., 2019c).

A lo largo de los años, cada vez hay más evidencias que señalan una participación importante del sistema purinérgico en la fisiopatología de la EII, que es una inflamación grave del tracto gastrointestinal. El desequilibrio extracelular de ATP y adenosina es un factor determinante clave en la desregulación del sistema inmune asociada a la EII. Estudios *in vitro* y preclínicos indican un papel clave de los receptores P1 y P2 en el inicio y gravedad de esta enfermedad, y las ectoenzimas ENTPD1 (CD39) y NT5E (CD73) son moduladores fundamentales de la inflamación intestinal (Vuerich et al., 2020).

Se ha estudiado ampliamente la implicación de las ectoenzimas CD39 y CD73 en la modulación de la inflamación intestinal. Al respecto, en ratones, la eliminación genética de estas enzimas provoca una mayor susceptibilidad a estados inflamatorios o una progresión más grave de la inflamación intestinal en modelos experimentales de EII (Idzko et al., 2014; Longhi et al., 2017). Por el contrario, el bloqueo de los transportadores de nucleósidos conduce a un aumento de los niveles de adenosina extracelular con la consiguiente mejora del curso de la inflamación intestinal en modelos de EII (Ye & Rajendran, 2009). En humanos, la presencia de un polimorfismo de nucleótido único asociados con niveles más bajos de expresión de CD39 se correlacionó con una mayor susceptibilidad a la EII (Friedman et al., 2009), mientras que los niveles elevados de CD39 en las células T reguladoras de sangre periférica se asocian con la remisión clínica y endoscópica de la EII (Gibson et al., 2015). CD39 tiene efectos inmunosupresores sobre las células supresoras Th17 (supTh17), las cuales muestran una alta expresión de CD39 y contribuyen activamente a la producción de adenosina. Además, las células supTh17 muestran una mayor expresión de la enzima ADA y una menor expresión del receptor A2A por lo que las hacen refractarias a los efectos inhibidores de la adenosina (Longhi et al., 2014).

Existe evidencia de que en pacientes con EII en fase activa, la expresión de CD73 en las células T CD4⁺ se asocia con un fenotipo de células Th17 proinflamatorias por lo que se sugiere usar a CD73 como marcador para monitorear la actividad de la enfermedad durante el tratamiento (Doherty et al., 2012). Además, el bloqueo de CD73 alivia las respuestas inflamatorias intestinales al regular la diferenciación de macrófagos en la colitis ulcerosa (Wang et al., 2023).

Los niveles extracelulares de adenosina también están regulados por la actividad de enzimas como ADA (Cristalli et al., 2001). El bloqueo de esta enzima mejora la inflamación intestinal en un modelo murino de EII, con reducción del daño inflamatorio del colon y disminución de los niveles tisulares de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ y ligando 10 del motivo CXC de quimiocina (CXCL10), así como una reducción de la infiltración de neutrófilos y la producción de ROS. La atenuación de la lesión colónica, después del bloqueo de ADA, estuvo mediada principalmente por la activación del receptor A2A y, en menor medida, el receptor A3 (Antonioli et al., 2010a).

Existen múltiples estudios demostrando que la activación del receptor A2A se asocia con la mejora de la inflamación intestinal en varios modelos experimentales de EII al reducir la inflamación de la mucosa intestinal, la infiltración de leucocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias (Dal Ben et al., 2018). Algunos estudios reportan que este receptor se reduce con el envejecimiento y puede predisponer a las alteraciones gastrointestinales típicas observadas en las personas de la tercera edad (Rémond et al., 2015; Laflamme et al., 2017). Además, se ha demostrado que la reducción del receptor A2A en el tracto gastrointestinal de ratones de edad avanzada contribuye al aumento de la inflamación intestinal y una menor capacidad para contrarrestar la infección intestinal con efectos nocivos en la senectud (Rodrigues et al., 2016).

Contrario al efecto antiinflamatorio del receptor A2A, existen múltiples evidencias que respaldan un papel proinflamatorio del receptor A2B en el contexto de la inflamación intestinal. Los experimentos realizados en modelos murinos de colitis mostraron que el antagonismo del receptor A2B reduce significativamente la gravedad de la colitis mediante la disminución de los niveles de citocinas proinflamatorias. Así que, el uso de antagonistas de este receptor da como resultado la protección de la estructura epitelial intestinal y disminución de la colitis experimental (Vuerich et al., 2020).

El receptor A3 también ha sido implicado en la modulación de la inflamación intestinal, pero su participación todavía no está clara, ya que existen resultados contradictorios. Algunos estudios han demostrado que la activación del receptor A3 contrarresta la inflamación intestinal mediante la inhibición de la producción de varios mediadores proinflamatorio (Guzman et al., 2006; Ren et al., 2015). Mientras que otros estudios han sugerido que la activación del receptor A3 contribuye al desarrollo de la colitis (Ren et al., 2011). Además, se encontró una sobreexpresión del receptor A3 en células mononucleares

de sangre periférica en pacientes con enfermedades autoinmunes, incluida la EII por lo que se sugiere que podría tener efectos proinflamatorios (Ochaion et al., 2009).

Múltiples evidencias también respaldan la participación de los receptores P2X en la inflamación intestinal. Específicamente el receptor P2X7 ha sido ampliamente investigado. Varios estudios han demostrado que la expresión proteica y ARNm del receptor P2X7 se encuentra elevada en modelos animales de colitis en el epitelio y lámina propia de la mucosa intestinal, donde se colocaliza con células dendríticas y macrófagos (Antonioli et al., 2014; Neves et al., 2014; Gulbransen et al., 2012). Además, Neves y colaboradores demostraron que los ratones knockout para P2X7 y sometidos a un químico para inducir colitis no desarrollaron inflamación intestinal u otros síntomas asociados con la enfermedad (Neves et al., 2014). Asimismo, la administración de un antagonista del receptor P2X7 (A740003) en un modelo de colitis redujo la infiltración de células T y macrófagos en la lámina propia de la mucosa colónica, seguida de una reducción en las concentraciones tisulares colónicas de TNF- α e IL-1 β con una consiguiente mejora de la inflamación intestinal (Marques et al., 2014). La activación de mastocitos mediada por los receptores P2X7 también desencadena la liberación de citocinas, quimiocinas y leucotrienos proinflamatorios en el colon de pacientes con enfermedad de Crohn y en modelos murinos experimentales de colitis (Kurashima et al., 2012). Además, la activación del receptor P2X7 se ha relacionado con la muerte y la retención de células T reguladoras en los ganglios linfáticos mesentéricos afectando la tolerancia inmune intestinal que contribuye también al desarrollo de la inflamación intestinal (Figliuolo, et al., 2017). Todos estos estudios indican que el receptor P2X7 promueve la inflamación intestinal en la patogénesis de la EII.

La activación del receptor P2X7 también se ha asociado con la muerte de neuronas entéricas que conducen a una alteración de la motilidad del colon (Gulbransen et al; 2012). La estimulación del receptor P2X7 desencadena la apertura de los canales de pannexina-1 (Panx1) y la activación del inflammasoma, incluida la proteína adaptadora Asc y la escisión de caspasa, lo que provoca la muerte neuronal. En consecuencia, en modelos murinos de colitis, la inhibición selectiva de cada componente del eje inflammasoma del receptor P2X7 amortigua significativamente la inflamación, mientras que la inhibición de Panx1 reduce la disfunción colónica *in vivo* (Gulbransen et al; 2012), que podría explicar en parte la participación del receptor P2X7 en la disfunción motora del colon asociada con la inflamación intestinal en un modelo de colitis en ratas (Antonioli et al., 2014).

Existen evidencias que demuestran que los receptores P2Y también participan en la inflamación intestinal, sobre todo los receptores P2Y2 y P2Y6. El tejido colónico de pacientes con EII o de ratones con colitis experimental muestran una mayor expresión del receptor P2Y2 en comparación con controles sanos (Vuerich et al., 2020). El incremento de la expresión del receptor P2Y2 depende de la actividad de los factores de transcripción NF- κ B (Degagné et al., 2009) y C/EBP β (Degagné et al., 2012) en células epiteliales intestinales de modelos murinos de colitis. Ambos factores de transcripción regulan la transcripción de genes implicados en las respuestas inflamatorias. Además, la activación del receptor P2Y2 aumenta la expresión de proteínas quimioatrayentes como la ICAM-1 en las células epiteliales intestinales, lo que promueve la migración y adhesión transepitelial de monocitos sugiriendo que el receptor P2Y2 podría promover la inflamación y daño de la mucosa intestinal (Langlois & Gendron, 2009). No obstante, otro estudio encontró resultados opuestos ya que la activación del receptor P2Y2 con el agonista 2-tioUTP en un modelo murino de colitis redujo el índice de la actividad de la enfermedad y el daño tisular de la mucosa intestinal, así como una disminución en la translocación bacteriana en comparación con ratones no tratados, destacando así un papel protector del receptor P2Y2 en la colitis (Degagné et al., 2013).

El receptor P2Y6 contribuye al reclutamiento de neutrófilos en mucosa intestinal inflamada incrementando la expresión del ligando 8 quimiocina CXC (CXCL8) en las células epiteliales de la mucosa (Grbic et al., 2012). Por el contrario, otro estudio encontró que la ausencia del receptor P2Y6 indujo un aumento en la inflamación intestinal en un modelo murino de colitis y correlacionó con un incremento en el reclutamiento de linfocitos Th1 y Th17 sugiriendo un papel protector del receptor P2Y6 expresado en leucocitos en la inflamación intestinal (Salem et al., 2019).

Se encontraron hallazgos sobre la participación del receptor P2Y1 en la regulación de la actividad neuromuscular del colon en un modelo de colitis en cobayos, donde se demostró que la motilidad propulsiva del colon inflamado está atenuada. Esta alteración se asoció con una disminución de la transmisión purinérgica de la rama inhibitoria descendente del reflejo peristáltico probablemente por una disminución del receptor P2Y1 (Strong et al., 2010).

Se puede resumir que la señalización purinérgica ha sido implicada ampliamente en la regulación de las respuestas inmunes inflamatorias, la dismotilidad intestinal y las lesiones

de las neuronas entéricas en la EII. Asimismo, la inflamación del tracto gastrointestinal en la EII provoca cambios marcados en la liberación y el catabolismo de las purinas, modulando así la expresión y señalización de los receptores purinérgicos (Roberts et al., 2012; Longhi et al., 2017). Sin embargo, no se ha investigado a fondo el impacto de los cambios en los componentes de señalización purinérgica en la inflamación intestinal de bajo grado asociada con obesidad y DT2.

3. ANTECEDENTES

Pocos estudios han identificado alteraciones en la expresión de componentes del sistema purinérgico en el intestino utilizando modelos experimentales de obesidad, pero a la fecha no se han explorado en modelos experimentales de DT2.

Mizuno y colaboradores fueron los primeros en demostrar aumentos en la expresión del receptor P2X2 en neuronas mientéricas de íleon de ratones hembra ob/ob en comparación con ratones hembra tipo silvestre (Mizuno et al., 2012). No obstante, más tarde este mismo grupo encontró que la expresión del receptor P2X2 disminuyó en las neuronas mientéricas nitrérgicas y colinérgicas del íleon de ratones macho ob/ob (Mizuno et al., 2014), sugiriendo que el receptor P2X2 tiene una expresión diferencial en animales machos y hembras ob/ob.

Por otro lado, Antonioli y colaboradores observaron un incremento de la expresión del receptor A2B en la capa neuromuscular del colon de ratones obesos alimentados con una HFD (60% kcal de grasa) y este incremento lo relacionaron con una respuesta anormal taquiquinérgica que provocaba una disfunción motora del colon (Antonioli et al., 2017). Luego este mismo grupo demostró que los receptores A2B en la glía entérica modula la respuesta taquiquinérgica anormal y previene la inflamación entérica asociada con la obesidad inducida por una HFD, proponiendo a este receptor como un objetivo terapéutico potencial en el manejo de las disfunciones motoras intestinales y la inflamación asociada con la obesidad (D'Antongiovanni et al., 2020).

4. JUSTIFICACIÓN

En México, la obesidad y la DT2 son un grave problema de salud pública con un número elevado de casos y con múltiples consecuencias adversas en la calidad de vida. La obesidad se caracteriza por la presencia de una inflamación crónica sistémica de bajo grado, que se relaciona con el desarrollo de resistencia a la insulina, y la consecuente aparición de trastornos metabólicos, como la DT2. Debido a que se ha documentado que la inflamación intestinal de bajo grado inducida por una dieta alta en grasas ocurre antes del aumento de peso, se ha propuesto que alteraciones en la homeostasis intestinal por este tipo de dietas puede ser el detonante de la inflamación sistémica de bajo grado, la resistencia a la insulina y el desarrollo de DT2, y dado que las alteraciones en la señalización purinérgica han sido implicadas en la modulación de la inflamación intestinal, se considera importante una evaluación de los perfiles de expresión de los genes purinérgicos y de las funciones de motilidad intestinal en una condición de DT2 inducida por una dieta de cafetería en combinación con STZ para reflejar mejor la fisiopatología de la enfermedad, de tal manera que el conocimiento nuevo generado podría tener relevancia terapéutica, diagnóstica y funcional.

5. HIPÓTESIS

El perfil de expresión de genes purinérgicos se encuentra alterado durante la inflamación intestinal de bajo grado en un modelo murino de DT2, lo que a su vez genera alteraciones en la motilidad intestinal

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Determinar si los elementos de la señalización purinérgica están alterados durante la inflamación intestinal de bajo grado asociado a DT2.

6.2 Objetivos específicos

- Establecer y validar un modelo experimental de DT2 inducida por una dieta de cafetería en combinación con una dosis de estreptozotocina en ratones C57BL/6J.
- Caracterizar la inflamación intestinal de bajo grado asociada a la DT2.
- Determinar el efecto de la inflamación intestinal asociada con la DT2 sobre la expresión génica de los elementos implicados en la señalización purinérgica.
- Evaluar el impacto de la inflamación intestinal asociada con la DT2 sobre la motilidad y la implicación de los elementos purinérgicos.

7. METODOLOGÍA

7.1 Animales y modelo experimental de DT2.

En este estudio se utilizaron ratones macho C57BL/6J de 8 semanas de edad obtenidos de los bioterios UPEAL de la Universidad Autónoma Metropolitana y Universidad Autónoma de Aguascalientes. Los protocolos animales fueron aprobados por el comité de ética en animales en docencia e investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA INV 010/2023) y manejados de acuerdo con los lineamientos de la norma mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Los ratones se mantuvieron a una temperatura ambiente de 23-25°C. Con agua y comida disponibles *ad libitum*. Los animales fueron aclimatados siete días antes de la exposición a la dieta y se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo control (CTRL) que se alimentó con una dieta estándar (Nutricubo, Purina®) que contenía una densidad calórica de 2.46 kcal/g distribuida en 49% carbohidratos, 3% lípidos, 23% proteínas y 6% fibra y grupo cafetería (CAF), alimentado con una dieta de cafetería compuesta por una dieta estándar más chocolate líquido, galletas, tocino, papas fritas y paté de cerdo en una proporción de

1:1:1:1:1:2, respectivamente, con una densidad calórica de 3.72 kcal/g en 39% carbohidratos, 49% lípidos, 12% proteínas y 513.53 mg de sodio, como se describió anteriormente (Cardenas-Perez et al., 2018). Tanto el grupo CTRL como el CAF se alimentaron durante 21 semanas.

Para inducir la DT2, utilizamos una combinación de una dieta de cafetería y una única inyección de estreptozotocina (STZ) (Reed et al., 2000). Al grupo CAF, después de seis semanas de iniciar la dieta, se le inyectó por vía intraperitoneal (i.p.) 100 mg/kg de STZ (CAF-STZ) disuelta en un buffer de citrato 0.1 M (pH 4.5), mientras que al grupo CTRL se le inyectó vía i.p. el vehículo buffer de citrato (0.25 ml/kg).

El peso corporal y el número de heces producidas en una hora se midieron individualmente una vez por semana. Para medir el número de heces por hora, los ratones se sacaron individualmente de su jaula, se pesaron y se colocaron en una jaula limpia y vacía que contenía solo una fuente de agua durante 1 h, y luego se volvieron a colocar en su jaula normal, después se registró el número de heces producidos por ese ratón durante el lapso de 1 h.

La ingesta de alimentos se midió diariamente, esto se convirtió en una ingesta calórica diaria multiplicando los gramos de alimentos consumidos por las calorías conocidas/g de alimento y se expresaron en un gráfica como ingesta promedio semanal. Al final del período de alimentación de 21 semanas, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 h, se anestesiaron con isoflurano inhalado, se recogió sangre mediante punción cardíaca y, por lo tanto, los animales fueron sacrificados mediante desangrado. Después de la eutanasia, se recolectaron muestras de TAB y de colon para su posterior procesamiento.

A partir del día cero del protocolo experimental, se realizaron curvas IPGTT e ITT cada cuatro semanas para monitorear el progreso de la resistencia a la insulina y el desarrollo de DT2. La resistencia a la insulina se observó a las 20 semanas de iniciada la dieta; por tanto, se decidió sacrificar los ratones en la semana 21.

7.2 Mediciones de insulina, triglicérido y colesterol en plasma.

Después de las veintiún semanas de alimentación, los ratones se dejaron en ayuno durante 6 h, luego fueron anestesiados con isoflurano inhalado y se extrajo sangre mediante

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

punción cardíaca después de la inducción de la anestesia. El plasma se separó mediante centrifugación a 3500 x g durante 10 minutos y se almacenó a -80 °C para su posterior análisis. La insulina plasmática se analizó mediante un kit ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Ratón Ins1/Insulin ELISA Kit; número de catalogo RAB0817; Millipore; EE. UU.). Los triglicéridos plasmáticos y el colesterol total se midieron utilizando un kit colorimétrico disponible comercialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante Sigma-Aldrich (kit de cuantificación de triglicéridos, número de catalogo MAK266 y kit cuantitativo de colesterol, número de catalogo MAK043). Se utilizó el espectrofotómetro de microplacas Multiskan Sky (Thermo Scientific™) para medir los cambios de absorbancia.

7.3 Mediciones de glucosa sanguínea en ayuno (FBG), prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y prueba de tolerancia a la insulina (ITT).

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante 6 h para realizar los análisis FBG, IPGTT e ITT. Los niveles de FBG se midieron semanalmente mediante un corte muy pequeño en la punta de la cola de cada ratón, descartando la primer gota de sangre y recuperando la siguiente gota en tiras reactivas que se colocaron en un glucómetro Freestyle Optimum (Abbott, Chicago, IL; EE. UU.).

Para la curva de la IPGTT, a los animales se les inyectó vía i.p. D-glucosa (2 g/kg de peso corporal; Sigma-Aldrich). Los niveles de glucosa se midieron mediante sangrado de la punta de la cola con un glucómetro antes de la inyección de glucosa y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de glucosa. Se calculó el área bajo la curva de la IPGTT restando la glucosa basal para estimar la tolerancia a la glucosa (Virtue & Vidal-Puig, 2021).

Para ITT, a los animales se les inyectó vía i.p. insulina (0.75 UI/kg de peso corporal; insulina humana, Registro No. 398M94 SSA IV, Laboratorios AMSA, Jalisco, México). Luego se midieron los niveles de glucosa en sangre antes y 15, 30, 45, 60 y 90 minutos después de la inyección de insulina. La tasa de desaparición de glucosa se calculó como la pendiente de la línea decreciente de los niveles de glucosa en sangre (K_{ITT}) durante un ITT dentro de los 30 minutos para identificar la resistencia a la insulina. K_{ITT} se calculó con la siguiente fórmula: $K_{ITT} = 0.693/t^{1/2} \times 100$, donde $t^{1/2}$ representa el tiempo necesario para que

la concentración de glucosa plasmática disminuya en un 50% después de la inyección de insulina. La K_{ITT} normal es $\geq 2.0\%/minuto$ y los valores ≤ 1.5 se consideran anormales. Este método proporciona una estimación indirecta de la sensibilidad general a la insulina (Monzillo & Hamdy, 2003).

7.4 Disección del tejido adiposo blanco y colon

Una vez que los ratones fueron sacrificados, se abrió la cavidad peritoneal para obtener el TAB de la grasa subcutánea abdominal (SCF), la grasa perirrenal (PRF) y la grasa perigonadal (PGF) se obtuvo como se describió anteriormente (Tan et al., 2018), se pesó, se fotografió y se almacenó a -80°C para su posterior análisis.

También se colectó el colon completo, se fotografió, se lavó la materia fecal realizando lavados con PBS IX frío (NaCl 137 mM; KCl 2.7 mM; Na_2HPO_4 8 mM; KH_2PO_4 2 mM), se secó sobre una toalla de papel y se pesó. El colon distal se dividió en tres segmentos de aprox. 1-2 cm. El primer segmento se utilizó para el análisis histológico con hematoxilina y eosina (H & E), el segundo segmento se utilizó para medir los niveles de ATP luminal y el tercer segmento del colon se utilizó para la extracción de ARN total y la posterior determinación de los niveles de expresión génica de los mediadores inflamatorios y componentes del sistema purinérgico por RT-qPCR.

7.5 Evaluación histopatológica de la inflamación mediante la técnica histológica de hematoxilina y eosina (H & E)

El primer segmento de colon distal (aprox. 1 cm) se diseccionó y se fijó en formalina al 10% durante 24 h. Después el tejido se deshidrató en alcoholes de manera gradual de menor a mayor, se aclaró en xileno y se embebió en parafina. Después se realizaron cortes de $7\ \mu\text{m}$ de grosor y se recogieron en portaobjetos recubiertos y se tiñeron con H & E. Las secciones teñidas se observaron utilizando un microscopio óptico convencional (Axioscope 40, Carl Zeiss, Alemania) con un aumento de 10X y se fotografiaron para su posterior análisis. Dos observadores independientes llevaron a cabo mediciones específicas de la profundidad de las criptas, la mucosa y la capa externa muscular en 3 secciones para cada ratón utilizando el software Image J (National Institutes of Health, EE. UU.). El espesor de la capa mucosa

del colon se midió desde la base hasta la parte superior del epitelio, y la profundidad de la cripta se midió entre la unión cripta-vellosidad y la base de la cripta.

7.6 Medición de la concentración de ATP luminal en el colon

El segundo segmento de colon distal (1-2 cm) se lavó con PBS 1X frío y se le aplicó 100 μ l de buffer de ensayo de ATP con una micropipeta. El líquido luminal se recuperó en un tubo de microcentrifuga de 0.5 ml y los niveles de ATP se determinaron con un kit de ensayo colorimétrico/fluorométrico de ATP (número de catálogo MAK190, Sigma-Aldrich) según las instrucciones del fabricante. Al medir el ATP luminal del colon, pudimos medir el ATP producido y el liberado por bacterias comensales y células epiteliales del colon; por tanto, el ATP luminal es una medida acumulativa del ATP extracelular.

7.7 Análisis de expresión génica por RT-qPCR

El ARN total se extrajo de 100 mg de TAB o del colon distal utilizando el método TRIzol-Cloroformo (TRI reagent®; Número de catálogo: T9424; Sigma-Aldrich) según el protocolo del fabricante. El ARN total obtenido se cuantificó con un BioDrop™ μ LITE (Denville, Scientific Inc.) y su calidad se calculó con base en las relaciones de absorbancia nm A260/A280 y A260/A230; el rango de relación aceptado fue 1.9-2.0. Para la síntesis de ADNc, se utilizaron 0.5 μ g de ARN total junto con el kit de transcripción reversa (número de catálogo: K1612; Thermo Fisher Scientific) y el oligo(dT)₁₈ en un termociclador T100 (Bio-Rad; EE. UU.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Una vez que se obtuvo el ADNc, la expresión génica de los mediadores inflamatorios y los componentes de señalización purinérgica se determinó cuantitativamente mediante PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad) utilizando el kit SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Master Supermix (número de catálogo: 172-5270; Bio-Rad) según el protocolo del fabricante. Las secuencias de los oligos utilizados se enlistan en la Tabla 2. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, seguida por 45 ciclos de desnaturalización 15 s a 95 °C y alineamiento 30 s a la temperatura de hibridación. La curva de fusión fue de 65 °C a 95 °C. Los niveles de expresión se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

determinaron en tres a cinco experimentos independientes realizados por duplicado, con el método 2- $\Delta\Delta$ Ct utilizando gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como transcripción de control de expresión constitutiva.

7.8 Análisis de expresión del receptor P2X7 por inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia los cortes histológicos de colon se desparafinaron, rehidrataron y, posteriormente se lavaron en buffer de citratos (10 mM; pH 6.0) previamente calentado para desenmascarar los antígenos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario rabbit Anti-P2X7 en una dilución 1:400 (#PA5-280201, Invitrogen) durante toda la noche a 4° C. Finalmente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor-488 anti-rabbit en una dilución 1:1000 (#Ab150109) a temperatura ambiente por 2 horas. Las fotomicrografías se capturaron con un microscopio confocal Olympus Fluo Wiew 1200 a una magnitud de 40X.

7.9 Ensayo de motilidad del colon en baño de órgano aislado

Se disecciono el colon y se lavó con solución de Ringer-Tyrode (composición en mM: 136 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgSO₄.7H₂O, 12 NaHCO₃, 0.5 NaH₂PO₄, 5.5 glucosa, pH 7.4). Un segmento de colon distal de entre 3-4 cm se montó verticalmente en un baño de órgano que contenía 50 ml de solución Ringer-Tyrode a 37°C y se burbujeo con aire. La tensión inicial de los tejidos se fijó a 1 g y se dejó 30 min para su estabilización. Las contracciones espontáneas cíclicas (actividad fásica en ausencia de estímulos externos) y la contracción inducida por ACh (10 μ M) fueron registradas en ausencia o presencia de un antagonista selectivo para los receptores P2X7, A804598 (0.1 μ M) para evaluar la participación purinérgica en condiciones isométricas utilizando el transductor de tensión del sistema MP150 y el software Acknowledge 4.1. Se obtuvieron curvas dosis-respuesta utilizando dosis incrementadas de ATP (1-1000 μ M). Se analizó la amplitud, la frecuencia y la duración de las contracciones registradas antes y después de agregar el ATP, BzATP o A804598 para evaluar los efectos de éstos sobre la motilidad colónica.

7.10 Análisis estadístico

Todos los datos numéricos se presentan como la media \pm error estándar de la media (SEM). El número de experimentos realizados se designa como "n". El peso corporal, la ingesta calórica, la producción de heces y la curva de FBG se analizaron utilizando ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Bonferroni. Para comparar dos grupos, se utilizó la prueba t-student no pareada. Los datos analizados con el software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.) se consideraron estadísticamente diferentes cuando $P < 0.05$. Se realizó una prueba de correlación de Pearson para determinar la correlación entre los transcritos purinérgicos expresados diferencialmente y los parámetros morfológicos y los mediadores inflamatorios que resultaron alterados.

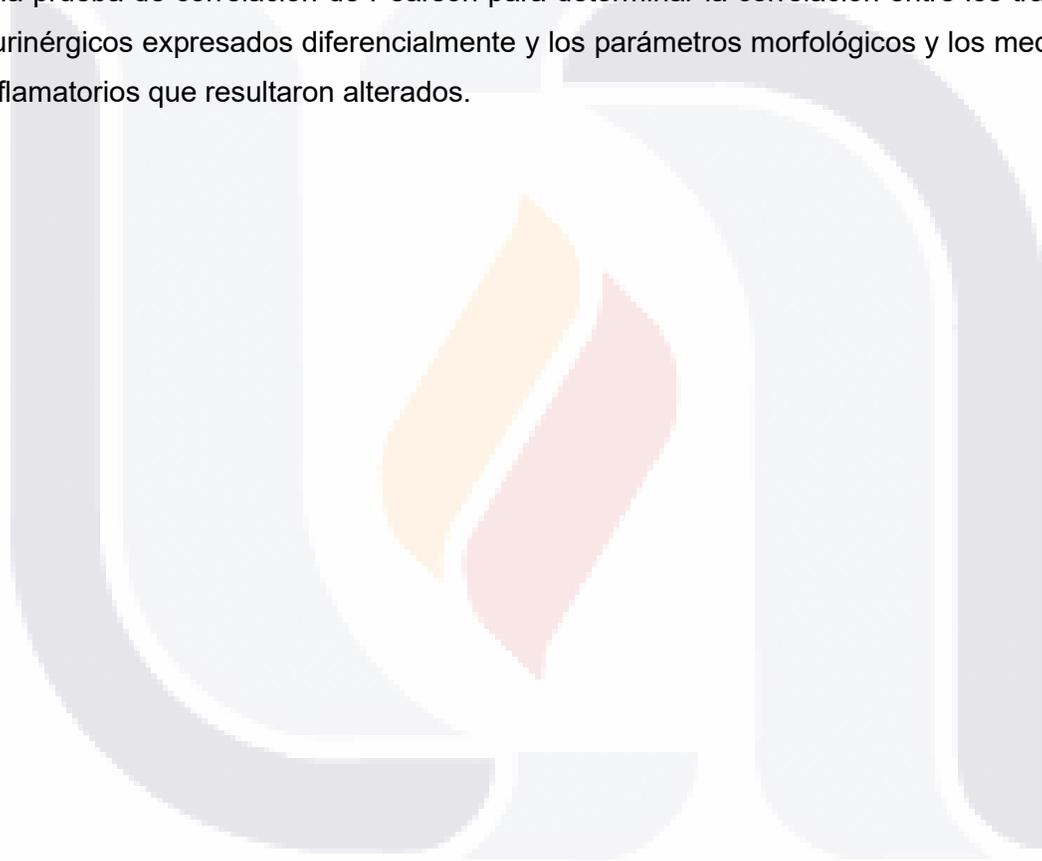


Tabla 2. Lista de oligos usados en los experimentos de RT-qPCR.

Gen	No. de acceso	Oligo Sentido (5'-3')	Oligo antisentido (5'-3')	Tm (°C)
GAPDH	NM_001289726.1	AGTCTACTGGCGTCTTCACC	CCACGATGCCAAAGTTGTCA	59
COX-2	NM_011198.4	TGGAAGTGTACCCTGCCCTG	CTTCGCCTCCAAAGGTGCTC	61
NF-κB	NM_008689.2	AGAGGATTTGCTGAGGGTTGGG	GTGGATGGCATTAGACCTTCCC	62
TNF-α	NM_013693.3	TAGCCACGTCGTAGCAAACC	TTTGAGATCCATGCCGTTGGC	62
IL-1β	NM_008361.4	GGCAGCTACCTGTGTCTTTCC	GCCTGTAGTGACAGTTGTCTAATGG	60
IL-6	NM_031168.2	CCTTCCTACCCCAATTTCCAATGC	TGGTCCTTAGCCACTCCTTCTG	62
IL-10	NM_010548.2	GCAGTGTGTATTGAGTCTGCTGG	TCGGAGAGAGGTACAAACGAGG	60
IL-22	NM_016971.2	AGCTCAGCTCCTGTACACATCA	TCCAGTTCCCAATCGCCTT	60
P2X1	NM_008771.3	ATTGCTCCACATCCTGCCTAAG	GTCACGTTACCCTCCCCAG	61
P2X2	NM_153400	GTTCTGGGACTACGAGACGC	CGATGAAGACGTACCACACGA	60
P2X3	NM_145526.2	CTCCTACTTTGTGGGGTGGGTT	CTCTGTTGGCATAGCGTCCG	61
P2X4	NM_011026.3	TCATCCGCAGCCGTAAGTG	ACGAACACCCACCCAATGAC	60
P2X7	NM_011027.4	AGACGCTGTGCTGAGTATCC	C111TGTCTGTGGGTCCATCC	61
P2Y1	NM_008772.5	AAGAGGATGACCGAGGTGCC	ACTGTTTCCCCAAAGCGAGC	61
P2Y2	NM_008773.4	CACTTGCCATGACACCTCGG	TCCTGTGGTCCCATAAGCCG	61
P2Y4	NM_020621.4	GAAC1AAGATGGTGC1CCTTACCC	AGGGAGGCAGTCAATGGTGTTC	61
P2Y6	NM_183168.2	TCAAGCGACTGCTGCTAACC	CAGGCATACATCAGGTCCGC	60
P2Y13	NM_028808.3	AGCTCCGAGGATTTGTGTGC	CCTGTCGAAAGCGATGAGGC	61
P2Y14	NM_133200.4	GCCTTACCACATTGCCAGAATCC	ATGGGGTCCAGACACACATTGG	62
A1R	NM_001039510.2	GGTGCTCATTGCC1TGGTCTC	TCAGCTACCGCCAGGGATAC	61
A2AR	NM_009630.3	ATCATCGTGGGGCTCTTTGCC	CCTGTAGCGTAGATGAAGGG	60
A2BR	NM_007413.4	CGCGTCCCCTCAGGTATAAA	GAGACATGTCACAGGACAGCA	60
A3R	NM_009631.4	GCATGGAAGCCGACAACACC	CAGCTTGACCACCCAGATGAC	60
AMPD3	NM_009667.4	GCCAGCACCC1ATGCTATGC	AGGCAAGCCGTGCATACTTC	61
ENTPD1	NM_001304721.1	ATCACCTTCGTGCC1CCAAAAC	TCCTCGCCATAGAGACGG1AATTG	61
NT5E	NM_011851.4	GTTCTGCAAGTGGGTGGAATC	GGCTCATAGATGGGCACTCG	61
MCP-1	NM_011333.3	TGATCCCAATGAGTAGGCTGGAG	ATGTCTGGACCCATTCCTTCTTG	55
Quemerina	NM_001347167.1	GAACCATAGGACTGAGGTGA	CATAGGGCTAGGGAGATCAG	55
ADA	NM_019655	AGAACAGCATATTTGAGCTTGCC	ATTCTCCACCTTGGTGC1AAG	60
Adiponectina	NM_009605.5	AGAATCATTATGACGGCAGC	TACACCGTATGTGGTAAGA	55

8. RESULTADOS

8.1 Los ratones CAF-STZ exhibieron un fenotipo de obesidad

La Figura 4A muestra una imagen representativa de un ratón CAF-STZ en comparación con un ratón CTRL. Después de 9 semanas de alimentación, los ratones del grupo CAF-STZ tenían un peso corporal significativamente mayor en comparación con el grupo CTRL ($P < 0,05$; Figura 4B), siendo el peso corporal final del grupo CAF-STZ de 41.89 ± 2.41 g, mientras que el grupo CTRL fue de 27.59 ± 1.19 g, lo que corresponde a un aumento del 33 % de masa corporal en los ratones CAF-STZ. Además, el grupo CAF-STZ tuvo una ingesta energética significativamente mayor (17.05 ± 1.15 kcal/g) que el grupo CTRL (8.50 ± 0.62 kcal/g) (Figura 4C). Después de la inyección de STZ, la ingesta calórica disminuyó ligeramente, pero permaneció significativa en comparación con el grupo CTRL.

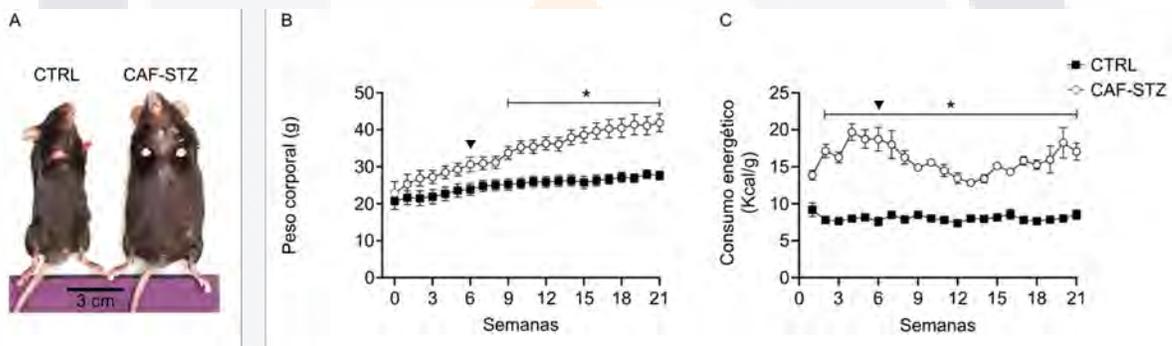


Figura 4. Peso corporal y consumo energético de ratones C57BL6J. **A)** Imagen representativa de la apariencia de un ratón CTRL y un ratón CAF-STZ. **B)** Peso corporal en gramos determinado semanalmente. **C)** Ingesta energética media semanal (kcal/g). La cabeza de flecha negra indica el inicio de semana donde fue inyectada la STZ. Los datos se expresan como medias \pm SEM. $n = 10$ por grupo CTRL y $n = 9$ por grupo CAF-STZ. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con * $P < 0.05$ mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba post hoc de Bonferroni.

La relación entre peso del TAB y la masa corporal de los ratones se evaluó después del sacrificio de los animales para la detección de la obesidad. La grasa SCF y PRF de los ratones CAF-STZ fueron 5.7 y 6.5 veces mayores que la del grupo CTRL, respectivamente ($P < 0,05$; Figuras 5A y 5B). No se observaron cambios significativos en el peso de la PGF. Además, se evaluó la expresión génica de adipocinas como marcadores de obesidad y lipotoxicidad en el TAB. Se encontró que los niveles de los transcritos MCP-1 y quemerina fueron significativamente más altos en la grasa SCF del grupo CAF-STZ ($P < 0.05$; Figura 5C y 5D) que la del grupo control, aunque no hubo diferencias en los niveles de ARNm de

MCP-1 y quemerina de las grasas PRF y PGF. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de adiponectina en ninguno de los tejidos adiposos analizados (Figura 5E).

Con respecto a los lípidos plasmáticos, hubo niveles de colesterol total significativamente más altos en el grupo CAF-STZ (19.81 ± 1.24 mg/dL vs. 10.42 ± 0.69 mg/dL; CTRL) ($P = 0.0006$; Fig. 5G) pero ningún efecto significativo en los niveles de triglicéridos plasmáticos (Figura 5F) en comparación con el grupo CTRL. En conjunto, todos estos resultados indican que los ratones CAF-STZ presentaban características indicativas de obesidad.

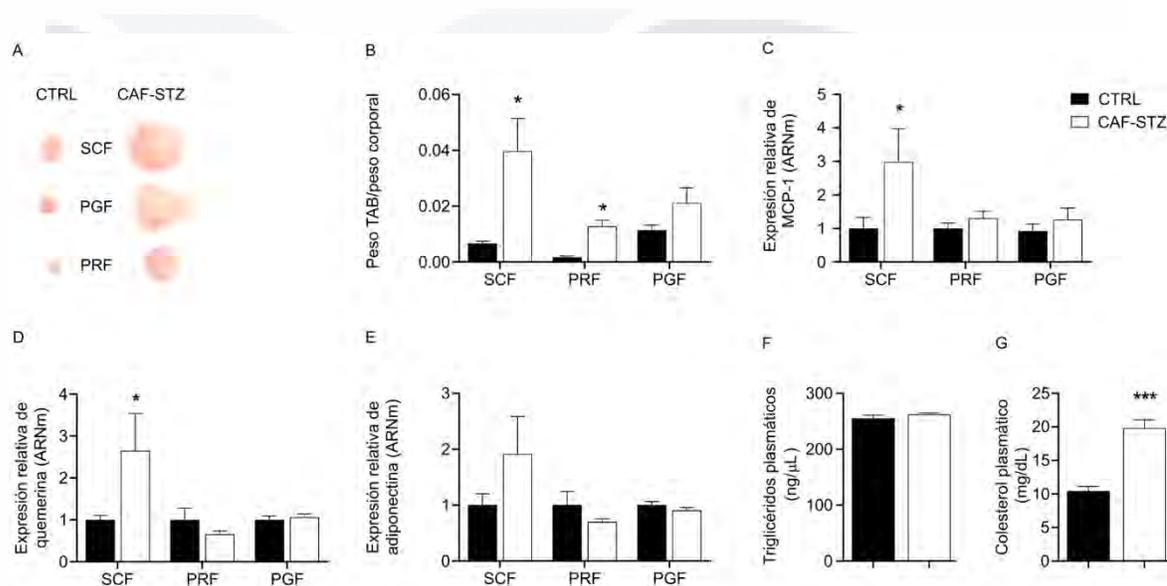


Figura 5. Los ratones CAF-STZ exhibieron adiposidad localizada. **(A)** Imagen representativa de la grasa subcutánea abdominal (SCF), la grasa perirrenal (PRF) y la grasa perigonadal (PGF). **(B)** Peso del TAB de SCF, PRF y PGF en proporción al peso corporal. Niveles de expresión de ARNm de genes asociados a la inflamación por adiposidad: MCP-1 **(C)**, quemerina **(D)** y adiponectina **(E)** en SCF, PRF y PGF. **(F)** Triglicéridos y **(G)** colesterol plasmáticos totales. Los datos se expresan como medias \pm SEM. $n = 10$ por grupo CTRL y $n = 9$ por grupo CAF-STZ. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ mediante la prueba t-student no pareada.

8.2 Los ratones CAF-STZ desarrollaron DT2

Se utilizaron las curvas FBG, IPGTT e ITT para examinar la homeostasis de la glucosa. Los ratones CAF-STZ mostraron un aumento significativo de la FBG a partir de la segunda semana de iniciar la dieta. Al final del protocolo de alimentación (21 semanas), los ratones CAF-STZ mostraron un aumento significativo en la FBG del 61.2 % (178.80 ± 13.73 mg/dL) en comparación con los ratones CTRL (110.90 ± 6.2 mg/dL) (Figura 6A). También hubo un aumento significativo en el nivel de insulina plasmática, siendo 1.5 veces mayor en el grupo

CAF-STZ ($250.10 \pm 71.62 \mu\text{UI/mL}$) que en el grupo CTRL ($60.9 \pm 24.18 \mu\text{UI/mL}$) ($P = 0.03$; Figura 6B).

Los resultados obtenidos de la curva IPGTT mostraron que los niveles elevados de glucosa en sangre a los 15 minutos después de la inyección de glucosa exógena son similares en los grupos CAF-STZ y CTRL. Sin embargo, 120 minutos después de la inyección, la glucosa en sangre permaneció elevada en los ratones CAF-STZ, pero no en el grupo CTRL (Figura 6C). A pesar de los altos niveles de insulina en plasma se vieron aumentados demostrándose que existe una falta de actividad de la insulina endógena. Se analizaron las áreas bajo las curvas (AUC) de la IPGTT para determinar la tolerancia a la glucosa. Se encontró que el AUC fue significativamente mayor en el grupo CAF-STZ ($25,114 \pm 5,905$) en comparación con el grupo CTRL ($11,263 \pm 1,984$) ($P = 0.03$; Figura 6D) indicando que los ratones del grupo CAF-STZ desarrollaron tolerancia a la glucosa.

También se realizaron curvas de las ITT después de 21 semanas del protocolo de alimentación para investigar las diferencias en la sensibilidad a la insulina. Se determinó que, después de la administración de insulina exógena en el grupo CTRL, la concentración de glucosa en sangre disminuyó rápidamente, pero en el grupo CAF-STZ, la concentración de glucosa en sangre disminuyó lentamente en los primeros 30 minutos (Figura 6E). La pendiente de estas curvas se calculó para determinar el índice K_{ITT} , encontrándose que el grupo CAF-STZ tuvo un índice K_{ITT} menor ($1.3 \pm 0.05 \%/min$) que el grupo CTRL ($1.93 \pm 0.03 \%/min$) ($P < 0,0001$; Figura 6F), lo que indicó que la sensibilidad a la insulina disminuyó notablemente en el grupo CAF-STZ. En conjunto, todos estos resultados mostraron que los ratones alimentados con una dieta de cafetería e inyectados con una dosis de STZ desarrollaron características típicas de la DT2.

8.3 Los ratones CAF-STZ exhibieron alteraciones en la morfología del colon

Para demostrar el efecto del tratamiento con CAF-STZ sobre la morfología intestinal, se evaluó el aspecto macroscópico del colon. Los ratones CAF-STZ presentaron adelgazamiento de la pared intestinal y una reducción de la longitud del colon (Figura 7A), la cual se redujo significativamente en un 12.8 % en los ratones CAF-STZ ($7.30 \pm 0.26 \text{ cm}$) en comparación con los ratones CTRL ($8.38 \pm 0.34 \text{ cm}$) ($P = 0.02$; Figura 7B).

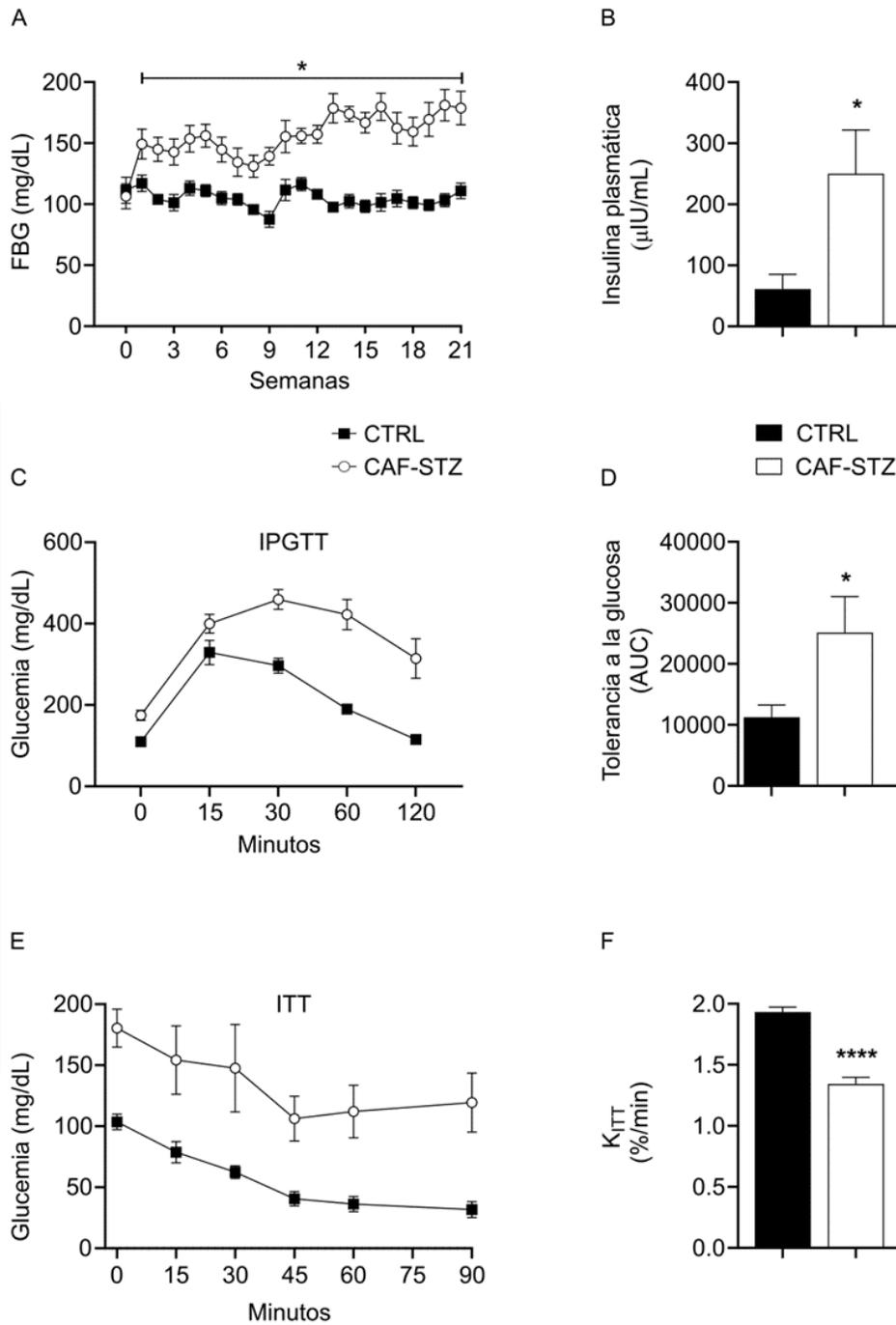


Figura 6. Los ratones CAF-STZ mostraron el metabolismo de la glucosa alterado. **(A)** Glicemia en ayuno (FBG) en mg/dL evaluada semanalmente. **(B)** Niveles de insulina en plasma después de 21 semanas con la dieta. **(C)** Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). **(D)** El área bajo las curvas (AUC) para IPGTT. **(E)** Prueba de tolerancia a la insulina (ITT). **(F)** Tasa de desaparición de glucosa (K_{ITT}) en %/min. Los datos se expresan en medias ± SEM de 10 ratones CTRL y 9 ratones CAF-STZ. *P < 0.05 y ****P < 0.0001 al comparar CAF-STZ versus CTRL mediante la prueba t de Student no pareada en los incisos B, D y F y ANOVA de dos vías seguido de una prueba post hoc de Bonferroni en el inciso A.

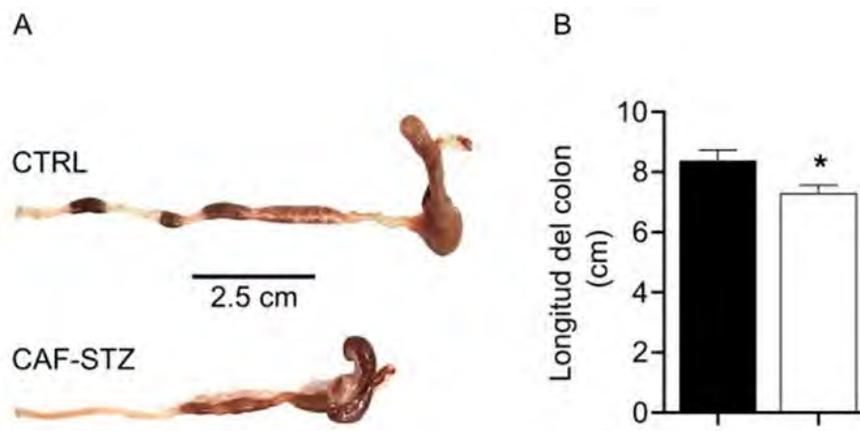


Figura 7. Los ratones CAF-STZ mostraron una disminución significativa en la longitud del colon. **(A)** Imagen representativa del colon diseccionado de ambos grupos. **(B)** La longitud del colon fue medida de la unión ileocecal hasta el recto. Los datos son expresados como la media \pm SEM de 10 ratones CTRL y 9 ratones CAF-STZ. * $P < 0.05$ al comparar CAF-STZ versus CTRL mediante la prueba t de Student no pareada.

Tras el examen histológico del colon distal, el grupo CTRL mostró una arquitectura de la capa mucosa y muscular completa, sin pérdida epitelial superficial, ni infiltración de células inflamatorias. Por el contrario, el grupo CAF-STZ mostró adelgazamiento de la capa muscular y mucosa, erosión epitelial superficial e infiltración leve de células inflamatorias (Figura 8A). Para cuantificar los cambios se midió la longitud de la capa de la mucosa y la muscular. Los resultados revelaron que el grosor de la mucosa del colon en los ratones CAF-STZ fue significativamente más corta en comparación con los ratones CTRL ($309.8 \pm 20.24 \mu\text{m}$ versus CAF-STZ = $253.2 \pm 16.03 \mu\text{m}$; $P = 0.007$; Figura 8B). El grosor de la capa muscular externa también se redujo significativamente en el grupo CAF-STZ en comparación con el grupo CTRL ($139.4 \pm 8.85 \mu\text{m}$ versus CAF-STZ = $106.1 \pm 7.95 \mu\text{m}$; $P = 0.03$; Figura 8C), aunque la profundidad de la cripta no fue evidentemente alterada (Figura 8D). Estos resultados indican que los ratones alimentados con la dieta de cafetería y una inyección de STZ mostraron señales de inflamación del colon.

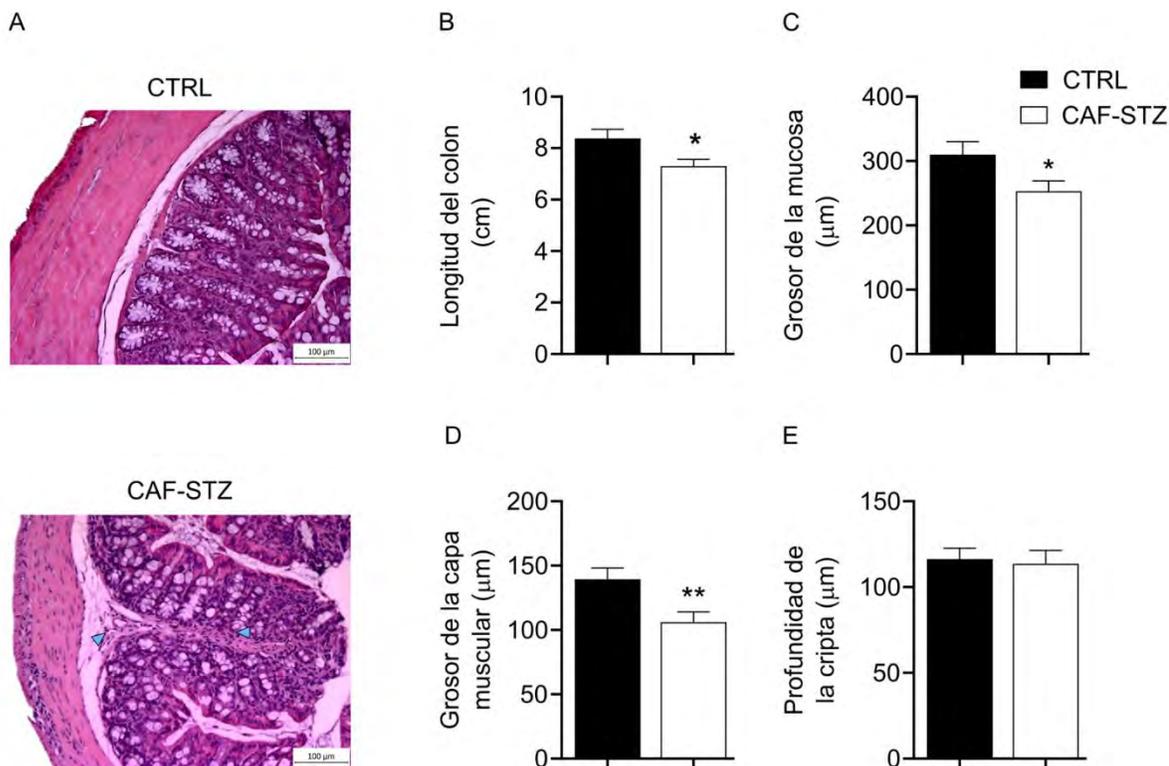


Figura 8. Los ratones del grupo CAF-STZ mostraron alteraciones en las capas histológicas del colon. **(A)** Secciones transversales representativas del colon teñidas con H & E (la punta de flecha azul indica infiltración celular; la barra de escala es 100 μm ; aumento X 10; **(B)** Grosor promedio de la capa mucosa; **(C)** Grosor promedio de la capa muscular externa y **(D)** Profundidad de las criptas colónicas. Seis secciones histológicas de 7 μm de grosor de al menos 5 ratones por grupo fueron utilizadas para las mediciones cuantitativas. Los datos se expresan como la media \pm SEM. Diferencia estadística * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ en comparación con el grupo CTRL mediante la prueba t de Student no pareada.

8.4 Los ratones CAF-STZ desarrollaron una inflamación intestinal de bajo grado

Las citocinas son señales críticas en el sistema inmunológico intestinal y se sabe que participan en el proceso de inflamación. Se evaluó el perfil de citocinas inflamatorias del colon en ratones CTRL y CAF-STZ en la semana 21. Se demostró que los niveles de ARNm de NF- κB e IL-1 β en el colon aumentaron 3.8 y 7.8 veces, respectivamente, en los ratones CAF-STZ en comparación con los ratones CTRL. Por el contrario, los niveles de ARNm de IL-6 e IL-10 en el colon disminuyeron significativamente en 0.65 y 0.66 veces, respectivamente, en ratones CAF-STZ en comparación con ratones CTRL. No hubo cambios en los niveles de expresión de ARNm de TNF- α , COX-2 e IL-22 en el colon al comparar los grupos CAF-STZ y CTRL (Figura 9A).

Debido a que la liberación de ATP se ha asociado con la inflamación y varias células inmunes responden al ATP extracelular como una señal de peligro a través de receptores purinérgicos, analizamos la concentración de ATP en el contenido luminal del colon. Los niveles de ATP aumentaron 2.4 veces en los ratones CAF-STZ (20.95 ± 2.4 ng/ μ l) en comparación con el grupo CTRL (8.67 ± 2.7 ng/ μ l) ($P = 0.006$; Figura 9B).

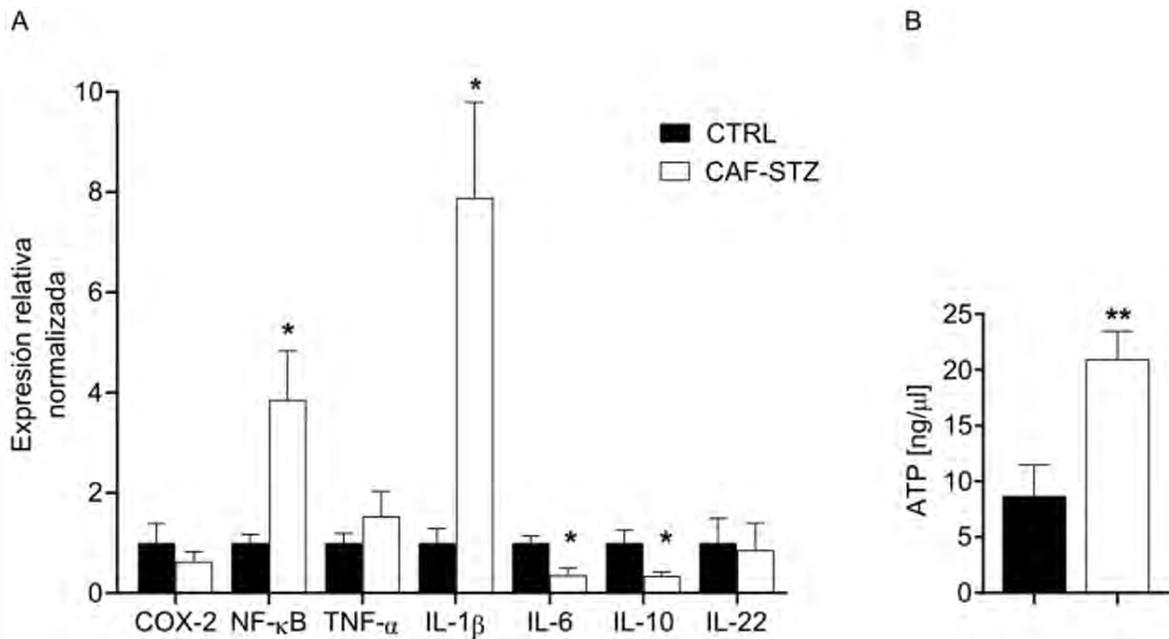


Figura 9. Efectos de CAF-STZ sobre la expresión del ARNm de mediadores inflamatorios. **(A)** Los niveles de expresión de ARNm de mediadores inflamatorios en el tejido colónico fueron medidos por PCR en tiempo real. **(B)** La concentración de ATP luminal fue medida con un ensayo colorimétrico; $n = 8$ grupo CTRL y $n = 7$ grupo CAF-STZ por duplicado. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ indican diferencias estadísticas en comparación con el grupo de control mediante la prueba t de Student no pareada.

8.5 El colon de ratones CAF-STZ mostraron alteraciones en la expresión de los componentes de la señalización purinérgica.

El aumento de los niveles de ATP luminal en el colon de ratones CAF-STZ sugieren que la señalización purinérgica esta desregulada durante la inflamación intestinal de bajo grado en DT2, por lo que se examinó la expresión de los componentes de la señalización purinérgica en el tejido colónico mediante RT-qPCR. Los resultados revelaron que el ARNm de P2X2 y P2X7 disminuyo significativamente en aprox. 30% en los ratones del grupo CAF-STZ en comparación con los ratones CTRL (P2X2: $P = 0.0009$ y P2X7: $P = 0.0141$);

mientras que los niveles de expresión de ARNm de P2X1, P2X3 y P2X4 no se alteraron significativamente (Fig. 10A). Por el contrario, la expresión del receptor P2Y2 aumento significativamente en los ratones CAF-STZ ($P \leq 0.001$; Fig. 10B), mientras que los otros miembros de la familia P2Y no mostraron cambios significativos. También se examinó la expresión de la transcritos de los receptores de adenosina (A1, A2A, A2B y A3) en el tejido colónico y solo los niveles de ARNm de A3 se alteraron significativamente, disminuyendo en un 54% en el grupo CAF-STZ en comparación con el grupo CTRL ($P = 0.049$; Fig. 10C). Finalmente, se evaluó la expresión génica de ectonucleotidasas, encontrando que la expresión de ENTPD1 (CD39) y AMPD3 en el colon de ratones CAF-STZ fueron comparables similares a la del grupo CTRL, mientras que la expresión de NT5E (CD73) y ADA aumentaron significativamente en los ratones CAF-STZ ($P < 0.05$; Fig. 10D).

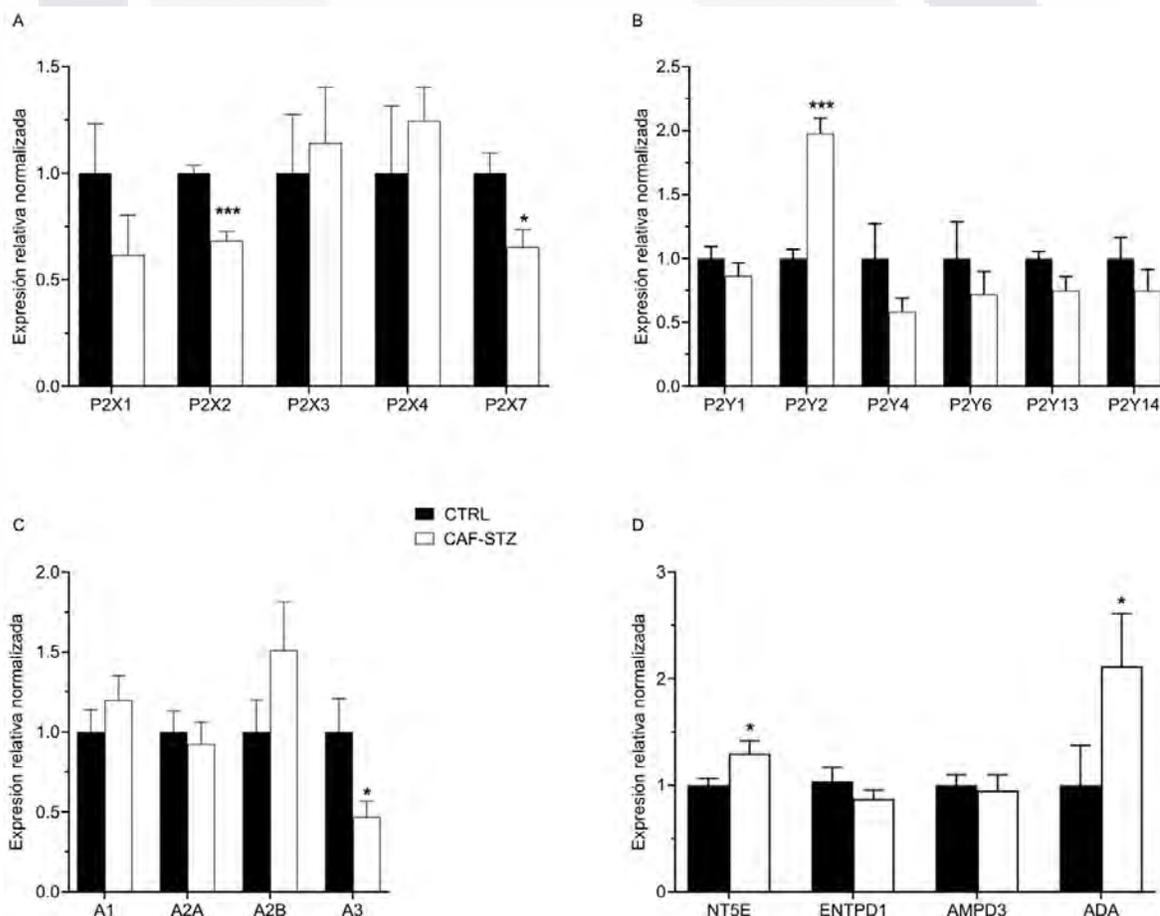


Figura 10. Variación en la expresión génica de los componentes del sistema purinérgico en el tejido colónico de ratones CAF-STZ. Se cuantificó el ARNm de varios componentes de señalización purinérgica: receptores P2X (A), receptores P2Y (B), receptores de adenosina (C) y ectonucleotidasas (D). Las transcripciones se cuantificaron mediante RT-qPCR y se normalizaron a

GAPDH como control de expresión constitutiva. Se utilizaron de tres a cinco ratones por grupo para preparar el ARN total y los análisis de qPCR se analizaron por duplicado para cada muestra. Los datos se expresan como la media \pm SEM. El * indica $p < 0.05$ y ***P < 0.001 en comparación con el grupo CTRL mediante la prueba t de Student no pareada.

Se observó una reducción en los niveles de ARNm del receptor P2X7, lo cual fue inesperado debido a que múltiples estudios han demostrado su sobreexpresión en condiciones de inflamación. Por tal motivo, se llevaron a cabo inmunohistoquímicas con anticuerpo P2X7 en cortes transversales del colon distal de ratones CTRL y CAF-STZ para determinar la expresión proteica del receptor. Los resultados de la inmunofluorescencia revelaron que la inmunoreactividad del receptor P2X7 disminuyó en la capa muscular y mucosa del colon de ratones CAF-STZ en comparación con las secciones transversales de los ratones CTRL (Fig. 11).

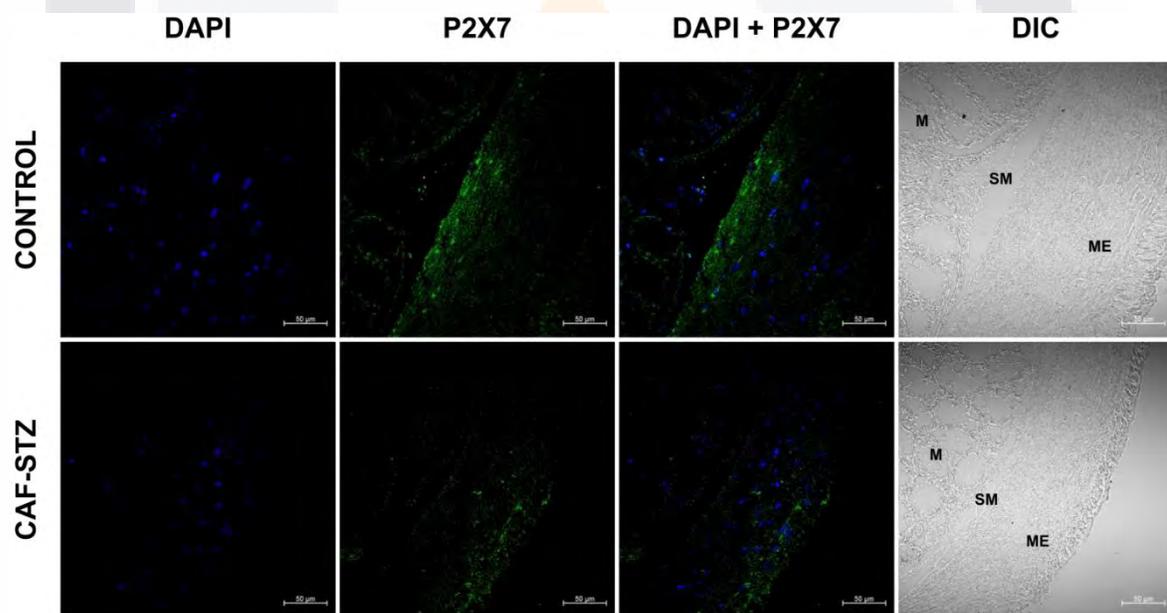


Figura 11. Inmunoreactividad del receptor P2X7 en el colon de ratones CTRL y CAF-STZ. Imágenes representativas de los cortes histológicos transversales del colon distal de ratones CTRL y CAF-STZ incubados con anticuerpo primario P2X7 en verde y teñidos con DAPI para observar los núcleos a un aumento de 40X. La escala de medida es 50 μ m.

8.6 La expresión de ARNm de las subunidades P2X2, P2X7, P2Y2 y NT5E se correlaciona con la inflamación intestinal de bajo grado y la homeostasis alterada de la glucosa.

Se examinó la correlación entre la expresión alterada de P2X2, P2X7, P2Y2, A3R, NT5E y ADA en el tejido colónico y todos los parámetros medidos de la determinación de la DT2, alteraciones morfológicas del colon y mediadores inflamatorios para obtener más información sobre la relevancia funcional de las alteraciones en la expresión del gen purinérgico durante la DT2. La Figura 12 muestra únicamente los datos que resultaron con una correlación significativa ($P < 0.05$). Los resultados mostraron que la expresión de los genes P2X2, P2X7 y P2Y2 se correlacionaba positivamente con el adelgazamiento de la capa muscular, la expresión del ARNm de IL-6 y NF- κ B, respectivamente, en ratones CAF-STZ (Fig. 12 A-C), lo que sugiere un papel de estos genes en la inflamación intestinal de bajo grado relacionada con la DT2. Por otro lado, la expresión de ARNm de P2Y2 y NT5E se correlacionó negativamente con las curvas FBG e IPGTT/ITT, respectivamente (Fig. 12 D-F), lo que sugiere que las proteínas correspondientes pueden desempeñar un papel en la homeostasis de la glucosa. No se encontró una correlación significativa entre la expresión de A3R y ADA con los parámetros medidos.

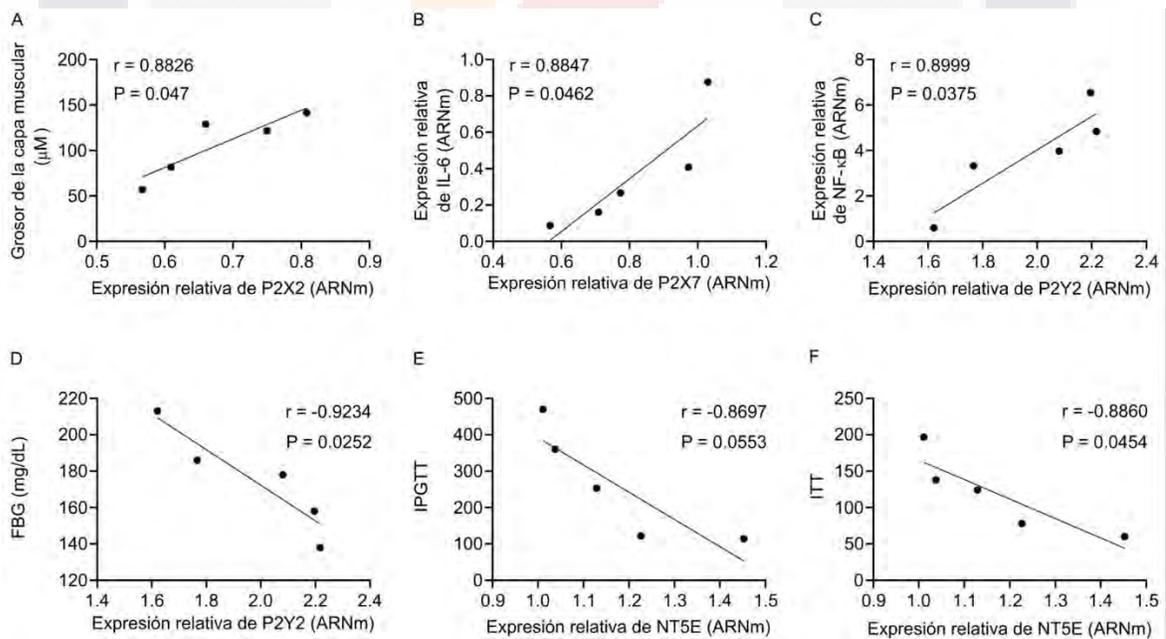


Figura 12. Correlación entre la expresión de transcritos purinérgicos y el desarrollo de la enfermedad en los ratones CAF-STZ. **(A)** Correlación entre la expresión del ARNm de P2X2 y el grosor de la capa muscular en el colon inflamado; **(B)** Correlación entre la expresión de ARNm de P2X7 y la

expresión de IL-6; **(C)** Correlación entre la expresión de ARNm del P2Y2 y la expresión de NF-κB; **(D)** Correlación entre la expresión de ARNm del P2Y2 y FBG; Correlación entre la expresión del ARNm de NT5E e IPGTT **(E)** y ITT **(F)**. El análisis se realizó mediante la correlación de Pearson, considerándose correlación real aquellos con resultados $p < 0.05$.)

8.7 Alteraciones en la motilidad intestinal de ratones CAF-STZ

Se investigó si hay afectaciones en la motilidad debido al desarrollo de la inflamación de bajo grado observado en el colon de ratones CAF-STZ. Para ello, se midió el número de heces por hora por ratón de ambos grupos experimentales durante todo el protocolo de alimentación. Los resultados mostraron que el número de heces por hora no fue estadísticamente diferente entre los ratones CAF-STZ y CTRL (Figura 13).

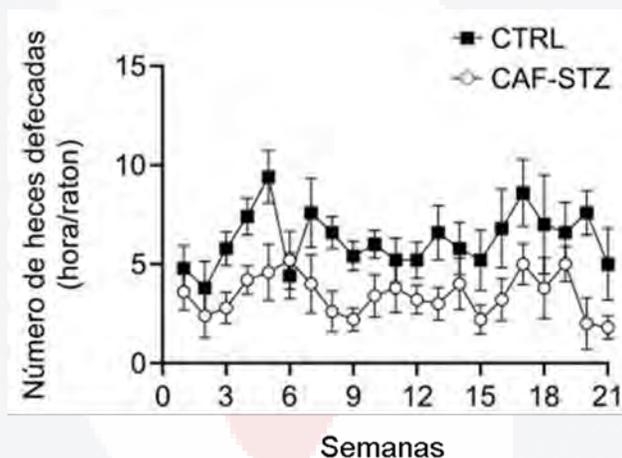


Figura 13. Número de heces producidas por ratón en una hora. Los datos se expresan como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA de dos vías seguido de una prueba de múltiples comparaciones con Bonferroni

Como no se observaron cambios significativos en el tránsito colónico de heces. Se investigó si ocurrían alteraciones en las contracciones espontáneas rítmicas del músculo liso en preparaciones de colon en los ratones CAF-STZ mediante registros en baño de órgano aislado. Los resultados mostraron que las contracciones espontáneas rítmicas en los ratones CAF-STZ fueron significativamente menores en tensión y frecuencia en comparación con las observadas en los ratones CTRL (Fig. 14A). El promedio de la tensión de las contracciones espontáneas en los ratones control fue de 0.74 ± 0.11 g, mientras que en los ratones CAF-STZ fue de 0.15 ± 0.01 g ($P < 0.0001$; Fig. 14B). La frecuencia de estas

contracciones también fue afectada, en los ratones control fue de 2.60 ± 0.29 ciclos/min, mientras que en los ratones CAF-STZ fue de 1.57 ± 0.25 ciclos/min ($P = 0.02$; Fig. 14C). Además, se midió la duración de la relajación de las contracciones espontáneas rítmicas y se encontró que fue significativamente mayor en el grupo CAF-STZ (8.68 ± 0.60 s) que en el grupo CTRL (5.66 ± 0.25 s; Fig. 14D). Estos resultados sugieren que hay una disminución en la motilidad del colon de los ratones CAF-STZ.

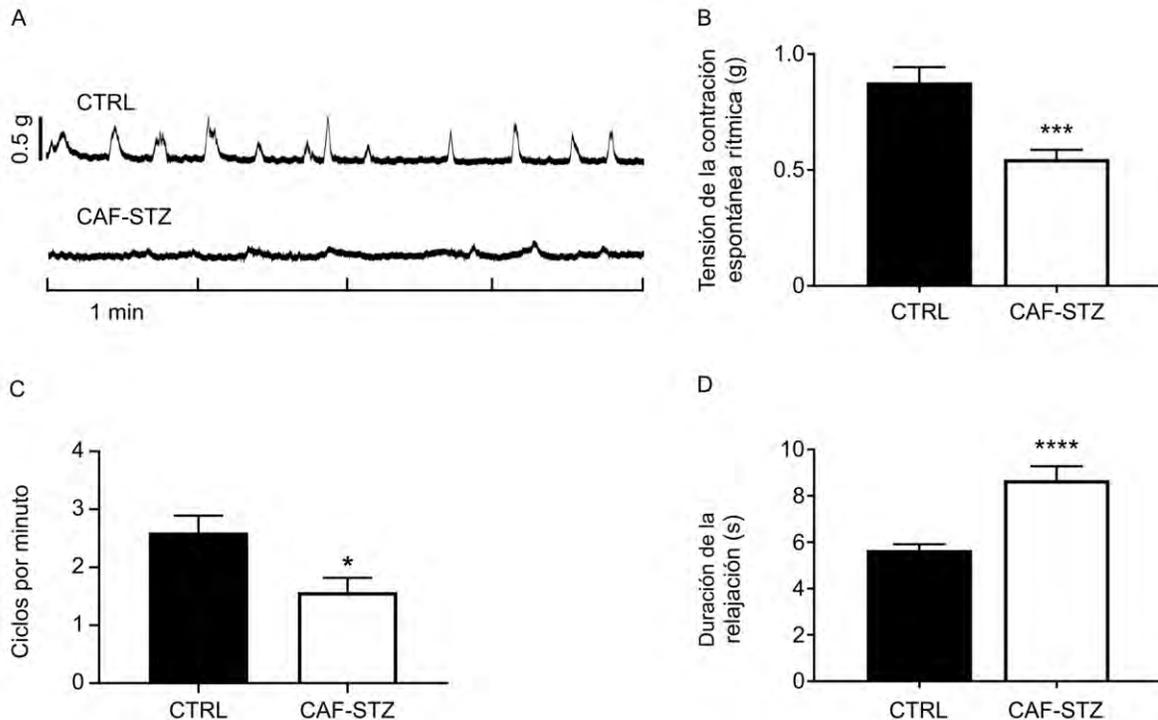


Figura 14. Alteraciones de las contracciones espontáneas rítmicas del músculo liso del colon en los ratones CAF-STZ. **(A)** Registros representativos de las contracciones espontáneas rítmicas en el colon de un ratón CTRL y un CAF-STZ en baño de órgano aislados. **(B)** Tensión promedio de las contracciones espontáneas rítmicas; **(C)** Promedio de frecuencias de las contracciones espontáneas rítmicas; **(D)** Duración de la relajación de las contracciones espontáneas rítmicas. Los datos se expresan como la media \pm SEM de $n = 3$ por cada grupo experimental. El * indica $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ en comparación con el grupo CTRL mediante la prueba t de Student no pareada.

Por otro lado, se examinó si la contracción del colon inducida por ACh ($10 \mu\text{M}$) está también afectada en los ratones CAF-STZ. Los resultados demostraron que la tensión de la contracción inducida por ACh es significativamente menor en el colon de ratones del grupo CAF-STZ (1.08 ± 0.18 g) que en el grupo CTRL (2.02 ± 0.32 g) (Fig. 15 A-B). Además, se evaluó los efectos del ATP (1 - $1000 \mu\text{M}$) sobre las contracciones inducidas por ACh. Los

resultados demostraron que no hay diferencias en la respuesta inhibitoria del ATP sobre la tensión de la contracción inducida por ACh obteniendo un IC50 del ATP para el grupo CTRL de 13.4 μM y el grupo CAF-STZ de 10.9 μM (Fig. 16), indicando que la disminución de la tensión en la contracción inducida por ACh en el colon no es debida a receptores purinérgicos que responden a ATP.

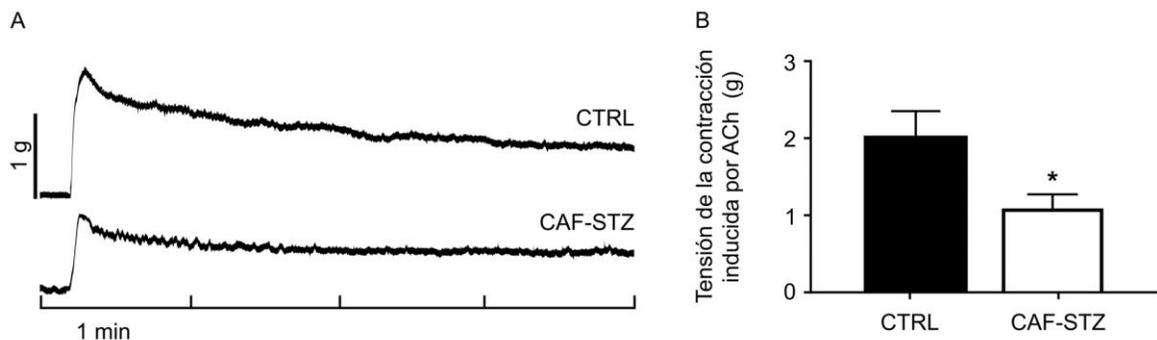


Figura 15. La tensión de la contracción del colon distal inducida por ACh fue menor en el grupo CAF-STZ que en el grupo CTRL. **(A)** Registros representativos de la contracción inducida por ACh en un ratón CTRL y un CAF-STZ. **(B)** Datos resumidos que muestran la tensión en g inducida por 10 μM de ACh. Los datos se expresan como la media \pm SEM de una n = 3 por cada grupo experimental. El * indica $p < 0.05$ en comparación con el grupo CTRL mediante la prueba t de Student no pareada.

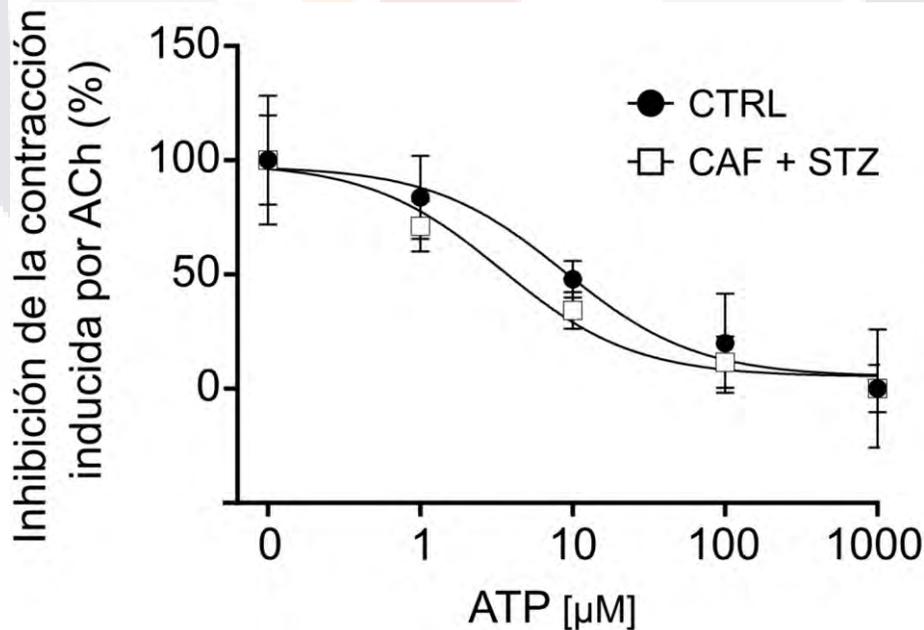


Figura 16. Curva concentración-respuesta de ATP sobre las contracciones inducidas por ACh (10 μ M). Las diferentes concentraciones de ATP se aplicaron de forma ascendente durante 10 min cada 5 min. La respuesta inhibitoria del ATP se normalizo con respecto a la contracción inducida por ACh sin ATP, la cual se estableció como el 100%. Las curvas sigmoides representan el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros. Los datos se expresan como la media \pm SEM de una n = 3 por cada grupo experimental.

Para evaluar si la disminución de la expresión proteica del receptor P2X7 observada en la inmunofluorescencia podría explicar en parte las alteraciones en la motilidad intestinal, se aplicó un antagonista selectivo del receptor P2X7, A804598 (0.1 μ M), en las preparaciones de colon montadas en el baño de órgano aislado. Los resultados demostraron que el antagonista del receptor P2X7 A804598 no afecto la actividad contráctil espontánea rítmica de preparaciones de colon CTRL y CAF-STZ (Fig. 17A).

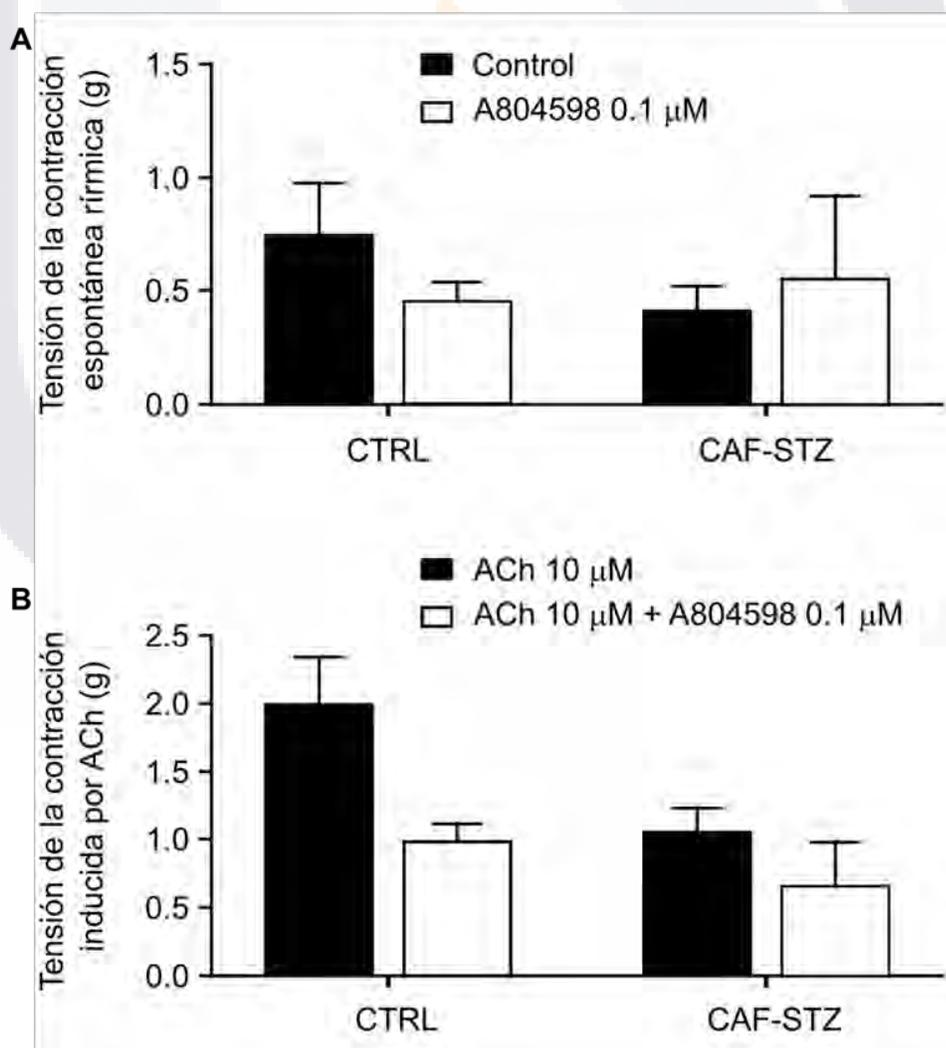


Figura 17. Efecto del antagonista del receptor P2X7, A804598 (0.1 μ M), sobre la actividad contráctil del colon aislado de ratones CTRL y CAF-STZ mantenido en solución de Ringer. **(A)** Gráfica de columnas mostrando los efectos del A804598 sobre las contracciones espontáneas rítmicas. **(B)** Gráfica de columnas mostrando los efectos del A804598 sobre las contracciones inducidas por ACh (10 μ M). Cada columna representa la media \pm SEM obtenido de 3 experimentos por cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de dos vía y una prueba de post hoc de Bonferroni.

En otra serie de experimentos, se probaron los efectos del bloqueo del receptor P2X7 en las contracciones inducidas por la activación directa de los receptores muscarínicos en el musculo liso. Para ello, se evaluó el efecto de A804598 sobre las contracciones inducidas por ACh (10 μ M). Los resultados evidenciaron que las contracciones colónicas inducidas por ACh no se vieron afectadas significativamente por A804598 en el grupo CTRL y CAF-STZ (Fig. 17B).

9. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que explora la expresión de genes purinérgicos en el colon con inflamación de bajo grado asociada a la DT2. Para llevar a cabo este estudio, utilizamos un modelo murino de DT2 inducida mediante una dieta rica en grasas y una dosis baja de STZ inyectada i.p., que es un modelo ampliamente aceptado en la investigación de la diabetes (Reed et al., 2000; Yu et al., 2017). Los resultados del presente estudio muestran que los ratones alimentados con una dieta de cafetería durante 21 semanas y a los que se les inyectó una dosis de 100 mg/kg de STZ exhibieron rasgos fenotípicos de obesidad, incluyendo aumento de peso, aumento de la ingesta de energía, alto peso de tejido adiposo blanco y niveles elevados de colesterol plasmático (Kanasaki & Koya, 2011).

El tejido adiposo blanco secreta varias citocinas inflamatorias, denominadas, adipocinas, asociadas con la resistencia a la insulina, el metabolismo de la glucosa y los lípidos y el proceso inflamatorio (Kawai et al., 2021). El vínculo fisiopatológico entre la obesidad y la DT2 no se comprende del todo, pero se sabe que las adipocinas desempeñan un papel esencial. En este trabajo se encontró una mayor expresión de los genes MCP-1 y quemerina en el tejido adiposo subcutáneo abdominal en ratones CAF-STZ en comparación con los ratones control, una observación también encontrada en trabajos previos con diferentes modelos de obesidad (Moraes, et al., 2003; Bozaoglu et al., 2007). MCP-1 es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una quimiocina crítica que regula la migración e infiltración de monocitos/macrófagos y se encuentra en mayor cantidad en el tejido adiposo visceral y subcutáneo de pacientes con obesidad (Huber et al., 2008) y DT2 (Zietz et al., 2005). Aunque no se ha confirmado el papel etiológico de MCP-1 en estas enfermedades, se sabe que la infiltración de macrófagos es un sello distintivo de la inflamación del tejido adiposo relacionada con la obesidad que está estrechamente relacionada con la resistencia a la insulina (Lee & Lam, 2019). Por otro lado, niveles elevados de quemerina en suero y grasa subcutánea abdominal se han correlacionado con la obesidad, el grado de inflamación y la resistencia a la insulina (Rourke et al., 2013). Además, se han encontrado niveles elevados de quemerina en sujetos con obesidad, en estado prediabético y en pacientes con DT2 con sobrepeso y obesidad (Neuparth et al., 2013; Ernst et al., 2010), lo que sugiere que esta adipocina tiene un papel en la enfermedad metabólica.

En el tejido adiposo blanco, también medimos la expresión del ARNm de adiponectina, que es una adipocina que tiene un papel protector contra la resistencia a la insulina y la actividad antiinflamatoria y parece proteger contra enfermedades metabólicas (Coimbra et al., 2014). Se han informado niveles más bajos de adiponectina en varias condiciones de resistencia a la insulina en humanos y animales, incluida la obesidad y la DT2 (Arita et al., 1999; Statnick et al., 2000). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión de adiponectina entre los grupos CAF-STZ y CTRL. En este sentido, existen hallazgos controvertidos en la literatura. Por ejemplo, un estudio encontró que los niveles séricos de adiponectina total eran significativamente más altos en octogenarios con normoglucemia o DT2 que en el correspondiente grupo de control de mediana edad (Graessler et al., 2011). Por el contrario, otro estudio encontró que los pacientes mayores de 65 años mostraban niveles de adiponectina significativamente más bajos que los pacientes de mediana edad y los controles (Coimbra et al., 2014). Aun así, después de ajustes estadísticos por la duración de la enfermedad, no hubo diferencias significativas en los niveles de adiponectina entre los pacientes con DT2, lo que sugiere que los niveles de adiponectina parecen estar estrechamente relacionados con la duración de la enfermedad y la edad.

Además de las características fenotípicas de la obesidad mostradas en el modelo utilizado en este estudio, también demostramos que la combinación de una dosis baja de STZ y una dieta de cafetería demostró ser un modelo eficaz para simular las características

metabólicas de la DT2, ya que los ratones CAF-STZ exhibieron niveles de glucosa en sangre en ayunas significativamente más altos, un aumento del AUC de la curva IPGTT y un índice K_{ITT} más bajo que el grupo CTRL, indicando que los ratones CAF-STZ desarrollaron hiperglucemia, tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, respectivamente. Según otros estudios, combinar una dieta hipercalórica y una dosis baja de STZ es eficaz para provocar resistencia a la insulina y eficaz para simular los efectos de la DT2 (Srinivasan et al., 2005; Ruiyang et al., 2020). También medimos el nivel de insulina en ayunas al final del protocolo de alimentación y encontramos un aumento significativo en el nivel de insulina plasmática en el grupo CAF-STZ con respecto al grupo de control. Esta observación indica que una única dosis baja de STZ posiblemente indujo un deterioro leve, en lugar de una disfunción completa, en las células β pancreáticas, como se ha demostrado en otros estudios (Ruiyang et al., 2020).

Recientemente, varios estudios han revelado los efectos de una dieta hipercalórica sobre la composición de la microbiota, la inflamación intestinal y la alterada morfología del colon (Malesza et al., 2021). Según los hallazgos previos, una HFD comprometió las funciones de la barrera epitelial del colon y redujo significativamente la longitud intestinal, la profundidad de las criptas, el espesor de la mucosa y los músculos en comparación con el grupo control (Kim et al., 2019; Xie et al., 2020). En nuestro estudio, la dieta de cafetería, en combinación con una única inyección i.p. de STZ, produjo alteraciones morfológicas como las observadas en los trabajos anteriores, ya que observamos una marcada disminución en la longitud del colon, y en el grosor de la mucosa y la capa muscular. Aun así, no observamos una diferencia en la profundidad de la cripta, tal vez debido a diferencias en la composición de la dieta puesto que en los estudios previos utilizaron una formulación estándar de grasa (> 60 % kcal de grasa) para inducir la obesidad. Sin embargo, se observaron resultados contrarios en otro trabajo previo utilizando un HFD con una inyección más baja de STZ (30 mg/kg) en ratas, ya que observaron un aumento en el peso húmedo del colon por unidad de longitud y en el espesor de la capa muscular y mucosa en el grupo diabético en comparación con el grupo de control (Chen et al., 2017). Aunque aún no se ha determinado la relación entre la profundidad de las criptas y la dieta, la microbiota y/o la inflamación localizada, la diferencia observada entre nuestros resultados y los publicados previamente sugieren nuevamente que el modelo CAF-STZ da como resultado un nivel más bajo de inflamación de colon, en comparación con el modelo de HFD, un punto importante que lo destaca como un modelo mejor equipado para estudiar mecanismos inflamatorios

subclínicos. Además, los cambios morfológicos macroscópicos parecen estar estrechamente asociados con la dosis de STZ y dependen de la especie.

Algunos estudios han evaluado la expresión de múltiples citocinas proinflamatorias en el intestino delgado y el colon de ratones expuestos a una HFD (Ding et al., 2010; de La Serre et al., 2010) y respaldan la idea de que la dieta promueve cambios inflamatorios tempranos en el intestino que contribuyen a la susceptibilidad a la obesidad y la resistencia a la insulina (Ding & Lund, 2011). En este contexto, evaluamos los niveles de expresión de ARNm de mediadores inflamatorios en tejido de colon de ratones CAF-STZ. Nuestros resultados demostraron un aumento de los niveles de ARNm de NF- κ B e IL-1 β en ratones CAF-STZ en comparación con los ratones control, lo que sugiere un proceso inflamatorio en el colon. Se han encontrado resultados similares en trabajos anteriores, donde hubo un aumento significativo en TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como la activación de NF- κ B en el colon proximal de ratones alimentados con una HFD (Kim et al., 2012). A diferencia de ellos, no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm de TNF- α . Otro estudio analizó muchas citocinas, pero solo el TNF α fue regulado positivamente por la HFD, y esto ocurrió específicamente en el íleon y dentro de las 2 a 6 semanas posteriores a la HFD, pero no se observaron cambios en el colon antes del aumento de peso inducido por la dieta y el aumento de la masa grasa (Ding et al., 2010), lo que sugiere que la expresión de TNF- α es local y se produjo en las primeras etapas de la intervención dietética. A diferencia del trabajo anterior (Kim et al., 2012), nuestros resultados mostraron que los niveles de ARNm de IL-6 eran significativamente más bajos en ratones CAF-STZ que en ratones control. En este sentido, se ha informado que la IL-6 es compleja y a menudo tiene actividades contradictorias porque varios estudios proporcionan pruebas sólidas que respaldan que la IL-6 puede actuar como una citoquina pro o antiinflamatoria en la inflamación y las enfermedades metabólicas (Fuster & Walsh, 2014). En el presente estudio, también medimos los niveles de ARNm de IL-10 en tejido colónico inflamado y encontramos niveles significativamente más bajos de esta citocina en ratones CAF-STZ en comparación con los ratones de control. IL-10 es un factor crítico en el mantenimiento de la tolerancia inmune de la mucosa intestinal; cuando se altera la IL-10, se genera inflamación del colon (Zigmond et al., 2014; Shouval et al., 2014), lo que sugiere que la regulación negativa de la IL-10 observada en nuestro estudio posiblemente contribuyó a la inflamación de bajo grado del colon.

En el intestino, bajo condiciones inflamatorias, el ATP extracelular se libera a partir de células inmunitarias activadas, células epiteliales lesionadas o dañadas y algunas bacterias comensales a través de diferentes mecanismos (secreción, desgranulación, liberación dependiente de hemicanales o muerte celular) (Inami et al., 2018), lo que lleva a un aumento del ATP extracelular en el microambiente inflamatorio (Di Virgilio & Vuerich, 2015). En este estudio también observamos una concentración significativamente mayor de ATP extracelular en la luz del colon de ratones CAF-STZ que en ratones control, lo que sugiere su posible papel como molécula de señalización en el entorno inflamatorio intestinal asociado a la DT2 y que puede haber una desregulación de la señalización purinérgica porque se sabe que la respuesta celular neta a la estimulación purinérgica depende de la disponibilidad de ATP en el entorno extracelular (Antonioli et al., 2013a).

Los niveles luminales de ATP pueden verse afectados por la actividad enzimática de las ectonucleotidasas. En este estudio, encontramos que la expresión del ARNm de NT5E (CD73) y ADA aumentaron significativamente. Los altos niveles de ATP en el lumen del colon de ratones CAF-STZ y su posterior degradación por la ectoenzima CD73 podrían dar como resultado altas concentraciones sostenidas de adenosina (Robson et al., 2006), que puede estimular a los receptores P1 en las células T, lo que lleva a un aumento del AMPc y a la supresión de la función de las células T, como se ha demostrado en trabajos anteriores (Huang et al., 1997). Por lo tanto, es plausible que la expresión elevada de CD73 sirva como mecanismo protector para reducir el ATP elevado y desempeñe un papel importante en la modulación de la señalización purinérgica durante la inflamación entérica de bajo grado (Antonioli et al., 2013b). Además, la respuesta inflamatoria modulada por CD73 en macrófagos estimulados con lipopolisacárido (LPS) requiere la participación de las vías de señalización NF- κ B y ERK (Wang et al., 2023). En este trabajo observamos un aumento en la expresión génica de NF- κ B en el colon de ratones CAF-STZ, aunque su nivel de expresión no se correlacionó con los niveles aumentados del ARNm de NT5E. Es posible que el aumento de la expresión de la transcripción de ADA, una enzima que facilita la desaminación de adenosina a inosina, pueda controlar los niveles elevados de adenosina extracelular que resultan de la regulación positiva de CD73 durante la inflamación intestinal de bajo grado. Por lo tanto, la regulación positiva de ADA puede conducir a una reducción de los niveles de adenosina extracelular y, por tanto, reducir la activación tónica de los receptores P1. Esto, a su vez, previene las respuestas antiinflamatorias de estos receptores y se mantiene la respuesta inflamatoria en el intestino. En este sentido, varios estudios han

demostrado una correlación entre niveles elevados de ADA y la gravedad de la inflamación intestinal (Antonioli et al., 2020).

En este estudio demostramos datos sobre cuatro receptores purinérgicos expresados diferencialmente en el colon de ratones CAF-STZ. El primero fue una reducción inesperada de los niveles de ARNm de P2X7, un receptor expresado principalmente en neuronas entéricas, células inmunitarias y músculo longitudinal y que se sabe que se sobreexpresa en un modelo de colitis aguda (Atarashi et al., 2008; Gulbransen et al., 2012; Neves et al., 2014) y está asociado con anomalías motoras en el colon inflamado (Antonioli et al., 2014). La importancia fisiológica de la reducción observada del ARNm de P2X7 puede explicarse, en parte, por el aumento del ATP extracelular que podría llevar a una estimulación crónica sostenida del receptor. Esto, a su vez, conduce a su eventual regulación negativa y pérdida de expresión en la membrana y formación de poros, previniendo así la apoptosis celular. De hecho, algunos estudios han demostrado la regulación negativa de la expresión del receptor P2X7 y la desregulación del Ca^{2+} intracelular en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (Liu et al., 2016) y células RAW (Hiken & Steinberg, 2004) después de una estimulación repetitiva a largo plazo con ATP. En varios tipos de células, particularmente en células inmunes, la expresión de P2X7 se ha relacionado con la producción y liberación de citocinas proinflamatorias, como la IL-6 (Kurashima et al., 2012). Interesantemente, se encontró que la reducción en la expresión del transcrito P2X7 se correlacionaba con una disminución en los niveles de IL-6, lo que aboga por un papel protector en el intestino.

El segundo receptor purinérgico que se redujo significativamente fue el P2X2, ampliamente expresado en las neuronas mientéricas y los músculos lisos longitudinales y circulares (Giaroni et al., 2002), cuya disminución se observó en neuronas entéricas NOS, ChAT y calretina de ratones ob/ob (Mizuno et al., 2012). La expresión reducida de P2X2 en neuronas mientéricas de ratones CAF-STZ puede tener consecuencias significativas en los reflejos intestinales y la motilidad. Interesantemente, hubo una correlación positiva entre la regulación negativa del receptor P2X2 y la disminución del grosor de la capa muscular, lo que sugiere que la pérdida del receptor puede inducir la atrofia muscular externa del colon observada en este estudio; sin embargo, se requieren estudios futuros para investigar esta posibilidad.

El tercer receptor purinérgico significativamente alterado fue el P2Y2, cuya expresión génica fue a la alza y se ha demostrado que su expresión está influenciada por NF-κB en las células epiteliales intestinales (Degagné et al., 2009), que también se encontró que este factor de transcripción aumenta en el colon de ratones CAF-STZ. El receptor P2Y2 ha sido implicado en el desarrollo de la obesidad inducida por la dieta al promover la adipogénesis y la inflamación (Zhang et al., 2020), y su regulación positiva se ha correlacionado con la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (Seye et al., 2003), destacando su importancia en la promoción de la inflamación. Debido a esto, se ha propuesto a P2Y2 como un posible nuevo objetivo farmacológico para tratar la obesidad y la DT2 (Qian et al., 2022), y como hemos documentado su regulación positiva incluso en inflamación de bajo grado, es posible que represente un objetivo para tratamientos de procesos inflamatorios subclínicos asociados con la obesidad y la DT2.

El cuarto receptor que observamos significativamente alterado con una reducción fue el receptor de adenosina A3. El papel del receptor A3 en la modulación de la inflamación intestinal es controvertido (Antoniolli, et al. 2020), puesto que varios estudios han reportado efectos contrarios de la regulación de A3R en la EII. En la colitis ulcerosa se ha reportado una reducción de la expresión de A3R, así mismo se le atribuye un efecto protector al utilizar agonistas como tratamiento en modelos experimentales (Wu et al., 2017). Al contrario, otros estudios reportan un aumento de la expresión de A3R en enfermedad de Crohn, así como una mejoría de la inflamación intestinal inducida por DSS al inhibir este receptor (Ren et al., 2011). Por ello, el papel del receptor A3 en el desarrollo de la inflamación de bajo grado no es del todo clara, por lo que se requerirán más estudios a futuro.

Analizamos el número de deposiciones por hora por ratón de los grupos CAF-STZ y CTRL para determinar si existen alteraciones en la motilidad intestinal, como se ha reportado en estudios previos utilizando modelos animales de obesidad y diabetes, donde se observa estreñimiento y tiempos de tránsito colónico más prolongados en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Nezami et al., 2014; Anitha et al., 2016; Zhao et al., 2017). Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el número de heces entre los grupos. No obstante, observamos una disminución significativa en la tensión y frecuencia de las contracciones espontáneas rítmicas, la cuales proporcionan la base para los patrones de motilidad como el peristaltismo (Sanders, 2019), sugiriendo que los ratones CAF-STZ mostraron una disminución en la propulsión intestinal que podría dar

estrenimiento como también lo sugieren los resultados observados con la tendencia a disminuir el número de heces producidas por los ratones CAF-STZ en comparación con los ratones CTRL. Además, también en este trabajo se observó una disminución en la tensión de la contracción inducida por ACh en el colon de los ratones CAF-STZ, confirmando que los ratones con DT2 presentaron problemas de motilidad intestinal como se ha reportado en estudios preclínicos y clínicos (Zhao et al., 2017), ya que la ACh actúa directamente en el músculo liso intestinal a través de la activación de receptores muscarínicos M2 y M3 que desencadenan una compleja serie de eventos bioquímicos y eléctricos que incluyen, la movilización de Ca^{2+} intracelular en la célula muscular lisa a través de proteínas G, lo que conduce a la contracción del músculo liso y facilita la motilidad gastrointestinal (Tanahashi et al., 2021).

Estudios previos obtenidos en el colon de roedores muestran que el ATP genera potenciales de unión inhibitorios (IJP) en el músculo liso provocando la relajación del musculo liso intestinal (Bornstein, 2008); considerando que el ATP puede afectar las contracciones del colon en sitios neuronales y/o musculares, se evaluó el efecto del ATP en presencia de una estimulación directa del músculo liso del colon por ACh. Los resultados mostraron que el ATP disminuye la tensión de la contracción inducida por ACh de una manera dependiente de la concentración de una forma muy similar en los ratones CTRL y CAF-STZ, indicando que el ATP actúa en sitios musculares para controlar las funciones neuromusculares del colon probablemente a través de la activación del receptor P2Y1 como lo han demostrado otros estudios (Gallego et al., 2012; Hwang et al., 2012), receptor cuya expresión génica no se vio afectada en el intestino inflamado de bajo grado, indicando que el control inhibitorio del ATP sobre la motilidad colinérgica no se encuentra afectada en el colon de ratones diabéticos.

Los resultados de inmunofluorescencia mostraron que el receptor P2X7 disminuyo en las capas de la mucosa y musculo longitudinal sugiriendo que este receptor podría estar participando en las alteraciones de las contracciones espontáneas rítmicas y/o inducidas por ACh asociadas con la inflamación intestinal de bajo grado en los ratones CAF-STZ. Para abordar esta cuestión, se probó A804598 sobre las contracciones espontáneas rítmicas e inducidas por ACh. Los resultados demostraron que el antagonista del receptor P2X7 no afectó las contracciones espontáneas rítmicas, ni las contracciones inducidas por ACh en el músculo liso del colon de ratón CTRL y CAF-STZ indicando que el receptor P2X7

no participa en la modulación de la propulsión de la heces fecales y contracción colinérgica del colon murino en condiciones normales y de inflamación intestinal de bajo grado asociada a DT2. Contrario a nuestros resultados, un estudio previo encontró que el receptor P2X7 participa en la disfunción motora del colon asociada con la inflamación intestinal en ratas, pero no así en condiciones normales (Antonioli et al., 2014). Cabe destacar que en este estudio se utilizó un modelo de colitis aguda severa y observaron una sobreexpresión del receptor P2X7 en el plexo mientérico y músculo liso longitudinal, a diferencia de nuestro modelo de DT2 donde observamos una inflamación de bajo grado crónica en el colon y una expresión a la baja, sugiriendo que la participación del receptor P2X7 en la disfunción motora intestinal depende del grado de inflamación.

10. CONCLUSIONES

La dieta de cafetería combinada con una dosis baja de estreptozotocina es una estrategia efectiva para generar un modelo murino que imita la historia natural y las características metabólicas de la DT2 de humanos.

El modelo de DT2 mostró una inflamación de bajo grado en el colon de ratones C57BL/6J al observarse alteraciones en los parámetros morfológicos e histológicos del colon, así como la presencia de marcadores inflamatorios, como son los niveles elevados de ARNm de NF- κ B e IL-1 β y disminuidos de IL-10.

La expresión de los genes P2X2, P2X7, P2Y2, A3, CD73 y ADA está alterada en la inflamación intestinal de bajo grado asociada con la DT2, sugiriendo que estos componentes de señalización purinérgica podrían ser relevantes en la fisiopatología de la DT2 y podría representar objetivos terapéuticos potenciales en las complicaciones disfuncionales del tracto gastrointestinal relacionadas con esta enfermedad; sin embargo, es necesario realizar estudios futuros para explorar esta posibilidad.

Los ratones con DT2 exhibieron una disminución significativa en la tensión y frecuencia de las contracciones espontáneas rítmicas y una disminución en la tensión de las contracciones inducidas por ACh en el colon indicando que existe una alteración en la motilidad intestinal.

El receptor P2X7 no participa en las alteraciones observadas en las contracciones espontáneas rítmicas y las inducidas por ACh. Sin embargo, se requieren más experimentos para determinar el papel de los otros receptores purinérgicos, que resultaron diferencialmente expresados, en las alteraciones de la motilidad colónica observadas en el modelo de DT2.



BIBLIOGRAFÍA

- Abramowski, P., Ogrodczyk, C., Martin, R., & Pongs, O. (2014). A truncation variant of the cation channel P2RX5 is upregulated during T cell activation. *PloS one*, 9(9), e104692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104692>.
- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., & Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive *E. coli* infection and intestinal inflammation. *Scientific reports*, 6, 19032. <https://doi.org/10.1038/srep19032>.
- Anitha, M., Gondha, C., Sutliff, R., Parsadian, A., Mwangi, S., Sitaraman, S. V., & Srinivasan, S. (2006). GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *The Journal of clinical investigation*, 116(2), 344–356. <https://doi.org/10.1172/JCI26295>.
- Anitha, M., Reichardt, F., Tabatabavakili, S., Nezami, B. G., Chassaing, B., Mwangi, S., Vijay-Kumar, M., Gewirtz, A., & Srinivasan, S. (2016). Intestinal dysbiosis contributes to the delayed gastrointestinal transit in high-fat diet fed mice. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 2(3), 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.008>.
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2019a). The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Pharmacological reviews*, 71(3), 345–382. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014878>.
- Antonioli, L., Caputi, V., Fornai, M., Pellegrini, C., Gentile, D., Giron, M. C., Orso, G., Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., Csóka, B., Haskó, G., Németh, Z. H., Scarpignato, C., Blandizzi, C., & Colucci, R. (2019b). Interplay between colonic inflammation and tachykininergic pathways in the onset of colonic dysmotility in a mouse model of diet-induced obesity. *International journal of obesity*, 43(2), 331–343. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0166-2>.

- Antonioli, L., Colucci, R., Pellegrini, C., Giustarini, G., Tuccori, M., Blandizzi, C., & Fornai, M. (2013a). The role of purinergic pathways in the pathophysiology of gut diseases: pharmacological modulation and potential therapeutic applications. *Pharmacology & therapeutics*, 139(2), 157–188. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.04.002>.
- Antonioli, L., Fornai, M., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2019c). Adenosine signaling and the immune system: when a lot could be too much. *Immunology Letters*, 205, 9–15. doi: 10.1016/j.imlet.2018.04.006.
- Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Awwad, O., Ghisu, N., Tuccori, M., Da Settimo, F., La Motta, C., Natale, G., Duranti, E., Viridis, A., & Blandizzi, C. (2010a). The blockade of adenosine deaminase ameliorates chronic experimental colitis through the recruitment of adenosine A2A and A3 receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335(2), 434–442. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.171223>.
- Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Tuccori, M., Awwad, O., Bin, A., Zoppellaro, C., Castagliuolo, I., Gaion, R. M., Giron, M. C., & Blandizzi, C. (2010b). Control of enteric neuromuscular functions by purinergic A(3) receptors in normal rat distal colon and experimental bowel inflammation. *British journal of pharmacology*, 161(4), 856–871. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00917.x>.
- Antonioli, L., Fornai, M., Pellegrini, C., Bertani, L., Nemeth, Z. H., & Blandizzi, C. (2020). Inflammatory Bowel Diseases: It's Time for the Adenosine System. *Frontiers in immunology*, 11, 1310. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01310>.
- Antonioli, L., Giron, M. C., Colucci, R., Pellegrini, C., Sacco, D., Caputi, V., Orso, G., Tuccori, M., Scarpignato, C., Blandizzi, C., & Fornai, M. (2014). Involvement of the P2X7 purinergic receptor in colonic motor dysfunction associated with bowel inflammation in rats. *PLoS one*, 9(12), e116253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116253>.
- Antonioli, L., Pacher, P., Vizi, E. S., & Haskó, G. (2013b). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine*, 19(6), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>.
- Antonioli, L., Pellegrini, C., Fornai, M., Tirota, E., Gentile, D., Benvenuti, L., Giron, M. C., Caputi, V., Marsilio, I., Orso, G., Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., Csóka, B.,

- Németh, Z. H., Haskó, G., Scarpignato, C., Blandizzi, C., & Colucci, R. (2017). Colonic motor dysfunctions in a mouse model of high-fat diet-induced obesity: an involvement of A2B adenosine receptors. *Purinergic signalling*, 13(4), 497–510. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9577-0>.
- Araújo, J. R., Tomas, J., Brenner, C., & Sansonetti, P. J. (2017). Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and intestinal small physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie*, 141, 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.05.019>.
- Arguin, G., Bourzac, J. F., Placet, M., Molle, C. M., Paquette, M., Beaudoin, J. F., Rousseau, J. A., Lecomte, R., Plourde, M., & Gendron, F. P. (2017). The loss of P2X7 receptor expression leads to increase intestinal glucose transit and hepatic steatosis. *Scientific reports*, 7(1), 12917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13300-8>.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and biophysical research communications*, 257(1), 79–83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>.
- Atarashi K, Nishimura J, Shima T, Umesaki Y, Yamamoto M, Onoue M, Yagita H, Ishii N, Evans R, Honda K, Takeda K (2008) ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature* 455(7214):808–812. <https://doi.org/10.1038/nature07240>.
- Ballout, J., Claßen, R., Richter, K., Grau, V., & Diener, M. (2022). Ionotropic P2X4 and P2X7 receptors in the regulation of ion transport across rat colon. *British journal of pharmacology*, 179(21), 4992–5011. <https://doi.org/10.1111/bph.15928>.
- Bharucha, A. E., Low, P., Camilleri, M., Veil, E., Burton, D., Kudva, Y., Shah, P., Gehrking, T., & Zinsmeister, A. R. (2013). A randomised controlled study of the effect of cholinesterase inhibition on colon function in patients with diabetes mellitus and constipation. *Gut*, 62(5), 708–715. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302483>.
- Basto-Abreu A, López-Olmedo N, Rojas-Martínez R, Aguilar-Salinas CA, Moreno-Banda GL, Carnalla M, Rivera JA, Romero-Martínez M, Barquera S, Barrientos-Gutiérrez

- T. (2023) Prevalence of prediabetes and diabetes in Mexico: Ensanut 2022. *Salud Publica Mex.* 65(supl 1): S163-S168. <https://doi.org/10.21149/14832>.
- Beraldi EJ, Soares A, Borges SC, de Souza AC, Natali MR, Bazotte RB, Buttow NC (2015) High-fat diet promotes neuronal loss in the myenteric plexus of the large intestine in mice. *Dig Dis Sci* 60(4):841-9. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3402-1>.
- Bian, X., Ren, J., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D. A., Ford, A. P., & Galligan, J. J. (2003). Peristalsis is impaired in the small intestine of mice lacking the P2X3 subunit. *The Journal of physiology*, 551(Pt 1), 309–322. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.044172>.
- Bleau, C., Karelis, A. D., St-Pierre, D. H., & Lamontagne, L. (2015). Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 31(6), 545–561. <https://doi.org/10.1002/dmrr.2617>.
- Bodin, P., & Burnstock, G. (1995). Synergistic effect of acute hypoxia on flow-induced release of ATP from cultured endothelial cells. *Experientia*, 51(3), 256–259. <https://doi.org/10.1007/BF01931108>.
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological reviews*, 98(3), 1591–1625. <https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017>.
- Bornstein J. C. (2008). Purinergic mechanisms in the control of gastrointestinal motility. *Purinergic signalling*, 4(3), 197–212. <https://doi.org/10.1007/s11302-007-9081-z>.
- Bourzac, J. F., L'Érigger, K., Larrivée, J. F., Arguin, G., Bilodeau, M. S., Stankova, J., & Gendron, F. P. (2013). Glucose transporter 2 expression is down regulated following P2X7 activation in enterocytes. *Journal of cellular physiology*, 228(1), 120–129. <https://doi.org/10.1002/jcp.24111>.
- Bozaoglu, K., Bolton, K., McMillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., Walder, K., & Segal, D. (2007). Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic

syndrome. *Endocrinology*, 148(10), 4687–4694. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0175>.

Burnstock, G. (2007). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiological Reviews*, 87(2), 659-797. doi:10.1152/physrev.00043.2006.

Burnstock, G. (2012). P2X receptors in the gut. *WIREs Membr Transp Signal* 1:269–279. doi: 10.1002/wmts.16.

Burnstock G. (2014). Purinergic signalling in the gastrointestinal tract and related organs in health and disease. *Purinergic signalling*, 10(1), 3–50. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9397-9>.

Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and neuroscience Advances*, 2, 1-10. doi:10.1177/2398212818817494.

Burnstock, G., & Boeynaems, J. M. (2014). Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic signalling*, 10(4), 529–564. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9427-2>.

Butler, M., Sanmugalingam, D., Burton, V. J., Wilson, T., Pearson, R., Watson, R. P., Smith, P., & Parkinson, S. J. (2012). Impairment of adenosine A3 receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. *European journal of immunology*, 42(12), 3358–3368. <https://doi.org/10.1002/eji.201242655>.

Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M (2001) Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med* 161(16): 1989-96. <https://doi.org/10.1001/archinte.161.16.1989>.

Caër, C., & Wick, M. J. (2020). Human Intestinal Mononuclear Phagocytes in Health and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00410.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C., Waget, A., Delmée, E., Cousin, B., Sulpice, T., Chamontin, B., Ferrières, J., Tanti, J. F., Gibson, G. R., Casteilla, L., Delzenne, N. M., ... Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761–1772. <https://doi.org/10.2337/db06-1491>.

- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., de la Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Garcia, A., Corona-Castillo, J. C., Tovar, A. R., Zambrano, E., Ortiz-Lopez, R., Saville, J., Fuller, M., & Camacho, A. (2018). Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition & metabolism*, 15, 38. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0279-6>.
- Cekic, C., & Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 16(3), 177–192. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.4>.
- Coimbra, S., Brandão Proença, J., Santos-Silva, A., & Neuparth, M. J. (2014). Adiponectin, leptin, and chemerin in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a close linkage with obesity and length of the disease. *BioMed research international*, 2014, 701915. <https://doi.org/10.1155/2014/701915>.
- Cooke, H. J., Wang, Y., Liu, C. Y., Zhang, H., & Christofi, F. L. (1999). Activation of neuronal adenosine A1 receptors suppresses secretory reflexes in the guinea pig colon. *The American journal of physiology*, 276(2), G451–G462. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.2.G451>.
- Cooke, H. J., Xue, J., Yu, J. G., Wunderlich, J., Wang, Y. Z., Guzman, J., Javed, N., & Christofi, F. L. (2004). Mechanical stimulation releases nucleotides that activate P2Y1 receptors to trigger neural reflex chloride secretion in guinea pig distal colon. *The Journal of comparative neurology*, 469(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cne.10960>.
- Cuevas-Sierra, A., Ramos-Lopez, O., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., & Martinez, J. A. (2019). Diet, Gut Microbiota, and Obesity: Links with Host Genetics and Epigenetics and Potential Applications. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 10(suppl_1), S17–S30. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy078>.
- Chandrasekharan, B., Anitha, M., Blatt, R., Shahnavaz, N., Kooby, D., Staley, C., Mwangi, S., Jones, D. P., Sitaraman, S. V., & Srinivasan, S. (2011). Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterology and motility*, 23(2), 131–e26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01611.x>.

- Chandrasekharan, B. P., Kolachala, V. L., Dalmasso, G., Merlin, D., Ravid, K., Sitaraman, S. V., & Srinivasan, S. (2009). Adenosine 2B receptors (A(2B)AR) on enteric neurons regulate murine distal colonic motility. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(8), 2727–2734. <https://doi.org/10.1096/fj.09-129544>.
- Chen, H., Redelman, D., Ro, S., Ward, S. M., Ordög, T., & Sanders, K. M. (2007). Selective labeling and isolation of functional classes of interstitial cells of Cajal of human and murine small intestine. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292(1), C497–C507. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00147.2006>.
- Chen, P. C., Chien, Y. W., & Yang, S. C. (2019). The alteration of gut microbiota in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 63-64, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.11.019>.
- Chen P., Zhao J., Zhang H., Yang X., Zhao T., Zhang H., Yan M., Pan L., Li X., Zhang Y., Li P. (2017). Tangshen Formula Attenuates Colonic Structure Remodeling in Type 2 Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017: 4064156. doi: 10.1155/2017/4064156. S.
- Chow, A. K., & Gulbransen, B. D. (2017). Potential roles of enteric glia in bridging neuroimmune communication in the gut. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 312(2), G145–G152. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00384.2016>.
- Christofi F. L. (2008). Purinergic receptors and gastrointestinal secretomotor function. *Purinergic signalling*, 4(3), 213–236. <https://doi.org/10.1007/s11302-008-9104-4>.
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., & Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Medicinal research reviews*, 21(2), 105–128. [https://doi.org/10.1002/1098-1128\(200103\)21:2<105:aid-med1002>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1098-1128(200103)21:2<105:aid-med1002>3.0.co;2-u).
- D'Antongiovanni, V., Benvenuti, L., Fornai, M., Pellegrini, C., van den Wijngaard, R., Cerantola, S., Giron, M. C., Caputi, V., Colucci, R., Haskó, G., Németh, Z. H., Blandizzi, C., & Antonioli, L. (2020). Glial A2B Adenosine Receptors Modulate Abnormal Tachykininergic Responses and Prevent Enteric Inflammation Associated

with High Fat Diet-Induced Obesity. *Cells*, 9(5), 1245.
<https://doi.org/10.3390/cells9051245>.

Dal Ben, D., Antonioli, L., Lambertucci, C., Fornai, M., Blandizzi, C., & Volpini, R. (2018). Purinergic Ligands as Potential Therapeutic Tools for the Treatment of Inflammation-Related Intestinal Diseases. *Frontiers in pharmacology*, 9, 212.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00212>.

De Heredia, F., Gómez-Martínez, S., & Marcos, A. (2012). Obesity, inflammation, and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), 332–338.
[doi:10.1017/S0029665112000092](https://doi.org/10.1017/S0029665112000092).

de La Serre, C. B., Ellis, C. L., Lee, J., Hartman, A. L., Rutledge, J. C., & Raybould, H. E. (2010). Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 299(2), G440–G448.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00098.2010>.

De Man, J. G., De Winter, B. Y., Seerden, T. C., De Schepper, H. U., Herman, A. G., & Pelckmans, P. A. (2003). Functional evidence that ATP or a related purine is an inhibitory NANC neurotransmitter in the mouse jejunum: study on the identity of P2X and P2Y purinoceptors involved. *British journal of pharmacology*, 140(6), 1108–1116. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705536>.

DeFronzo, R. A. (2004). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am*, 88(4), 787-835.

Degagné, E., Degrandmaison, J., Grbic, D. M., Vinette, V., Arguin, G., & Gendron, F. P. (2013). P2Y2 receptor promotes intestinal microtubule stabilization and mucosal re-epithelization in experimental colitis. *Journal of cellular physiology*, 228(1), 99–109.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24109>.

Degagné, E., Grbic, D. M., Dupuis, A. A., Lavoie, E. G., Langlois, C., Jain, N., Weisman, G. A., Sévigny, J., & Gendron, F. P. (2009). P2Y2 receptor transcription is increased by NF-kappa B and stimulates cyclooxygenase-2 expression and PGE2 released by intestinal epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(7), 4521–4529. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803977>.

- Degagné, E., Turgeon, N., Moore-Gagné, J., Asselin, C., & Gendron, F. P. (2012). P2Y₂ receptor expression is regulated by C/EBP β during inflammation in intestinal epithelial cells. *The FEBS journal*, 279(16), 2957–2965. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08676.x>.
- Di Virgilio, F., Dal Ben, D., Sarti, A. C., Giuliani, A. L., & Falzoni, S. (2017). The P2X₇ Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity*, 47(1), 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.020>.
- Di Virgilio, F., & Vuerich, M. (2015). Purinergic signaling in the immune system. *Auton. Neurosci. Basic Clin.*, 191, 117-123. doi: 10.1016/j.autneu.2015.04.011.
- Ding, S., & Lund, P. K. (2011). Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(4), 328–333. doi:10.1097/MCO.0b013e3283478727.
- Ding, S., Chi, M. M., Scull, B. P., Rigby, R., Schwerbrock, N. M., Magness, S., Jobin, C., & Lund, P. K. (2010). High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. *PloS one*, 5(8), e12191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012191>.
- Doherty, G. A., Bai, A., Hanidziar, D., Longhi, M. S., Lawlor, G. O., Putheti, P., Csizmadia, E., Nowak, M., Cheifetz, A. S., Moss, A. C., & Robson, S. C. (2012). CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *European journal of immunology*, 42(11), 3062–3072. <https://doi.org/10.1002/eji.201242623>.
- Dong, X., Smoll, E. J., Ko, K. H., Lee, J., Chow, J. Y., Kim, H. D., Insel, P. A., & Dong, H. (2009). P2Y receptors mediate Ca²⁺ signaling in duodenocytes and contribute to duodenal mucosal bicarbonate secretion. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 296(2), G424–G432. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90314.2008>.
- Dooley CP, el Newihi HM, Zeidler A, Valenzuela JE (1988) Abnormalities of the migrating motor complex in diabetics with autonomic neuropathy and diarrhea. *Scand J Gastroenterol* 23(2): 217-23. <https://doi: 10.3109/00365528809103971>.

- Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., & Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1222. <https://doi.org/10.3390/ijms19041222>.
- Duan, Y., Zeng, L., Zheng, C., Song, B., Li, F., Kong, X., & Xu, K. (2018). Inflammatory Links Between High Fat Diets and Diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 2649. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02649>.
- Duncan, S. H., Lobley, G. E., Holtrop, G., Ince, J., Johnstone, A. M., Louis, P., & Flint, H. J. (2008). Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity (2005)*, 32(11), 1720–1724. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.155>.
- Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2012). Purinergic signaling during inflammation. *The New England journal of medicine*, 367(24), 2322–2333. doi:10.1056/NEJMra1205750.
- Engevik, K. A., Scribano, F. J., Gebert, J. T., Perry, J. L., Crawford, S. E., & Hyser, J. M. (2024). Distribution of P2Y and P2X purinergic receptor expression within the intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 326(2), G107–G119. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00108.2023>.
- Ernst, M. C., Issa, M., Goralski, K. B., & Sinal, C. J. (2010). Chemerin exacerbates glucose intolerance in mouse models of obesity and diabetes. *Endocrinology*, 151(5), 1998–2007. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1098>.
- Figliuolo, V. R., Savio, L. E. B., Safya, H., Nanini, H., Bernardazzi, C., Abalo, A., de Souza, H. S. P., Kanellopoulos, J., Bobé, P., Coutinho, C. M. L. M., & Coutinho-Silva, R. (2017). P2X7 receptor promotes intestinal inflammation in chemically induced colitis and triggers death of mucosal regulatory T cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1863(6), 1183–1194. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.004>.
- Fleming, M. A., 2nd, Ehsan, L., Moore, S. R., & Levin, D. E. (2020). The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. *Gastroenterology research and practice*, 2020, 8024171. <https://doi.org/10.1155/2020/8024171>.

- Friedman, D. J., Kunzli, B. M., Yi, A. R., Sevigny, J., Berberat, P. O., Enyoji, K., & Csizmadia, E. (2009). From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106, 16788–16793.
- Fujiyama, Y., Hokari, R., Miura, S., Watanabe, C., Komoto, S., Oyama, T., Kurihara, C., Nagata, H., & Hibi, T. (2007). Butter feeding enhances TNF-alpha production from macrophages and lymphocyte adherence in murine small intestinal microvessels. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22(11), 1838–1845. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04905.x>.
- Furness J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, 81(1-3), 87–96. [https://doi.org/10.1016/s0165-1838\(00\)00127-2](https://doi.org/10.1016/s0165-1838(00)00127-2).
- Fuster, J. J., & Walsh, K. (2014). The good, the bad, and the ugly of interleukin-6 signaling. *The EMBO journal*, 33(13), 1425–1427. <https://doi.org/10.15252/embj.201488856>.
- Fysekidis, M., Bouchoucha, M., Bihan, H., Reach, G., Benamouzig, R., & Catheline, J. M. (2012). Prevalence and co-occurrence of upper and lower functional gastrointestinal symptoms in patients eligible for bariatric surgery. *Obesity surgery*, 22(3), 403–410. <https://doi.org/10.1007/s11695-011-0396-z>.
- GalicBeraldi EJ, Borges SC, de Almeida FLA, Dos Santos A, Saad MJA, Buttow NC (2020) Colonic neuronal loss and delayed motility induced by high-fat diet occur independently of changes in the major groups of microbiota in Swiss mice. *Neurogastroenterol Motil* 32(2): e13745. <https://doi: 10.1111/nmo.13745>.
- Gallego, D., Gil, V., Martínez-Cutillas, M., Mane, N., Martín, M. T., & Jiménez, M. (2012). Purinergic neuromuscular transmission is absent in the colon of P2Y(1) knocked out mice. *J Physiol*, 590, 1943-1956.
- Gallego D, Mañé N, Gil V, Martínez-Cutillas M, Jiménez M. (2016). Mecanismos responsables de la relajación neuromuscular en el tracto gastrointestinal. *Rev Esp Enferm Dig* 108(9):721-731. DOI: 10.17235/reed.2015.4058/2015

- Gao, Z. G., Ding, Y., & Jacobson, K. A. (2010). UDP-glucose acting at P2Y14 receptors is a mediator of mast cell degranulation. *Biochemical pharmacology*, 79(6), 873–879. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.024>.
- Garlanda, C., Dinarello, C. A., & Mantovani, A. (2013). The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010>.
- Ghanem, E., Robaye, B., Leal, T., Leipziger, J., Van Driessche, W., Beauwens, R., & Boeynaems, J. M. (2005). The role of epithelial P2Y2 and P2Y4 receptors in the regulation of intestinal chloride secretion. *British journal of pharmacology*, 146(3), 364–369. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706353>.
- Giaroni, C., Knight, G. E., Ruan, H. Z., Glass, R., Bardini, M., Lecchini, S., Frigo, G., & Burnstock, G. (2002). P2 receptors in the murine gastrointestinal tract. *Neuropharmacology*, 43(8), 1313–1323. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00294-0](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00294-0).
- Gibson, D. J., Elliott, L., McDermott, E., Tosetto, M., Keegan, D., Byrne, K., Martin, S. T., Rispens, T., Cullen, G., Mulcahy, H. E., Cheifetz, A. S., Moss, A. C., Robson, S. C., Doherty, G. A., & Ryan, E. J. (2015). Heightened Expression of CD39 by Regulatory T Lymphocytes Is Associated with Therapeutic Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory bowel diseases*, 21(12), 2806–2814. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000566>.
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2019). Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunology Letters*, 205, 16-24. doi: 10.1016/j.imlet.2018.11.006.
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology*, 20(2), 95–112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>.
- Gougeon, P. Y., Lourenssen, S., Han, T. Y., Nair, D. G., Ropeleski, M. J., & Blennerhassett, M. G. (2013). The pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF α are neurotrophic for enteric neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3339–3351. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3564-12.2013>.

- Graessler, J., Gruber, M., Radke, R. B., Kopprasch, S., Schwarz, P. E., Kamke, W., Bornstein, S. R., & Fischer, S. (2011). Type 2 diabetes in octogenarians is associated with decreased low molecular weight adiponectin. *Gerontology*, 57(4), 316–326. <https://doi.org/10.1159/000316575>.
- Grbic, D. M., Degagné, É., Larrivée, J. F., Bilodeau, M. S., Vinette, V., Arguin, G., Stankova, J., & Gendron, F. P. (2012). P2Y6 receptor contributes to neutrophil recruitment to inflamed intestinal mucosa by increasing CXC chemokine ligand 8 expression in an AP-1-dependent manner in epithelial cells. *Inflammatory bowel diseases*, 18(8), 1456–1469. <https://doi.org/10.1002/ibd.21931>.
- Grossmann, V., Schmitt, V. H., Zeller, T., Panova-Noeva, M., Schulz, A., Laubert-Reh, D., Juenger, C., Schnabel, R. B., Abt, T. G., Laskowski, R., Wiltink, J., Schulz, E., Blankenberg, S., Lackner, K. J., Münzel, T., & Wild, P. S. (2015). Profile of the Immune and Inflammatory Response in Individuals With Prediabetes and Type 2 Diabetes. *Diabetes care*, 38(7), 1356–1364. <https://doi.org/10.2337/dc14-3008>.
- Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Juárez, E. H., Miranda-Morales, M., Ramírez-Martínez, J. F., Espinosa-Luna, R., & Barajas-López, C. (2010). Two suramin binding sites are present in guinea pig but only one in murine native P2X myenteric receptors. *European journal of pharmacology*, 626(2-3), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.063>.
- Gulbransen, B. D., Bashashati, M., Hirota, S. A., Gui, X., Roberts, J. A., MacDonald, J. A., Muruve, D. A., McKay, D. M., Beck, P. L., Mawe, G. M., Thompson, R. J., & Sharkey, K. A. (2012). Activation of neuronal P2X7 receptor-pannexin-1 mediates death of enteric neurons during colitis. *Nature medicine*, 18(4), 600–604. <https://doi.org/10.1038/nm.2679>.
- Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., Olivares-Reyes J.A. (2017). Mecanismos moleculares de la Resistencia a la Insulina: una actualización. *Gac Med Mex*. 153: 214-28.
- Guzman, J., Yu, J. G., Suntres, Z., Bozarov, A., Cooke, H., Javed, N., Auer, H., Palatini, J., Hassanain, H. H., Cardounel, A. J., Javed, A., Grants, I., Wunderlich, J. E., & Christofi, F. L. (2006). ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof

by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflammatory bowel diseases*, 12(8), 766–789. <https://doi.org/10.1097/00054725-200608000-00014>.

He, Q. X., Zhao, L., Tong, J. S., Liang, X. Y., Li, R. N., Zhang, P., & Liang, X. H. (2022). The impact of obesity epidemic on type 2 diabetes in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Primary care diabetes*, 16(6), 736–744. <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2022.09.006>.

Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P., & Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Publica de Mexico*, 55(1), 129–136.

Hiken, J. F., & Steinberg, T. H. (2004). ATP downregulates P2X7 and inhibits osteoclast formation in RAW cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 287(2), C403–C412. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00361.2003>.

Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M., & Sitkovsky, M. (1997). Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood*, 90(4), 1600–1610.

Huber, J., Kiefer, F. W., Zeyda, M., Ludvik, B., Silberhumer, G. R., Prager, G., Zlabinger, G. J., & Stulnig, T. M. (2008). CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(8), 3215–3221. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2630>.

Hwang, S. J., Blair, P. J., Durnin, L., Mutafova-Yambolieva, V., Sanders, K. M., & Ward, S. M. (2012). P2Y1 purinoreceptors are fundamental to inhibitory motor control of murine colonic excitability and transit. *The Journal of physiology*, 590(8), 1957–1972. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224634>.

Idzko, M., Ferrari, D., & Eltzschig, H. K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature*, 509(7500), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>.

Inami, A., Kiyono, H., & Kurashima, Y. (2018). ATP as a Pathophysiologic Mediator of Bacteria-Host Crosstalk in the Gastrointestinal Tract. *International journal of molecular sciences*, 19(8), 2371. <https://doi.org/10.3390/ijms19082371>.

- Islam, M. S., & Wilson, R. D. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 933, 161–174. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7_10.
- Iwasaki, H., Kajimura, M., Osawa, S., Kanaoka, S., Furuta, T., Ikuma, M., & Hishida, A. (2006). A deficiency of gastric interstitial cells of Cajal accompanied by decreased expression of neuronal nitric oxide synthase and substance P in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of gastroenterology*, 41(11), 1076–1087. <https://doi.org/10.1007/s00535-006-1909-8>.
- Jacobson, K. A., Delicado, E. G., Gachet, C., Kennedy, C., von Kügelgen, I., Li, B., Miras-Portugal, M. T., Novak, I., Schöneberg, T., Perez-Sen, R., Thor, D., Wu, B., Yang, Z., & Müller, C. E. (2020). Update of P2Y receptor pharmacology: IUPHAR Review 27. *British journal of pharmacology*, 177(11), 2413–2433. <https://doi.org/10.1111/bph.15005>.
- Jacobson, A., Yang, D., Vella, M., & Chiu, I. M. (2021). The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal immunology*, 14(3), 555–565. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00368-1>.
- Jiang, Z. F., Wu, W., Hu, H. B., Li, Z. Y., Zhong, M., & Zhang, L. (2022). P2X7 receptor as the regulator of T-cell function in intestinal barrier disruption. *World journal of gastroenterology*, 28(36), 5265–5279. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i36.5265>.
- Joost HG., Al-Hasani H.& Schürmann A. (2012). *Animal Models in Diabetes Research, Methods in Molecular Biology*, vol. 933. Springer Science+Business Media, LLC. DOI 10.1007/978-1-62703-068-7_10.
- Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS (2003) Colonic transit time in diabetic patients comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J* 44(2):265-72. <https://doi: 10.3349/ymj.2003.44.2.265>.
- Kanasaki, K., & Koya, D. (2011). Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, 197636. <https://doi.org/10.1155/2011/197636>.

- Karlsson, F. H., Tremaroli, V., Nookaew, I., Bergström, G., Behre, C. J., Fagerberg, B., Nielsen, J., & Bäckhed, F. (2013). Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*, 498(7452), 99–103. <https://doi.org/10.1038/nature12198>.
- Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nature communications*, 7, 10555. <https://doi.org/10.1038/ncomms10555>.
- Kawai, T., Autieri, M. V., & Scalia, R. (2021). Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American journal of physiology. Cell physiology*, 320(3), C375–C391. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00379.2020>.
- Kibble J.D., & Halsey C.R.(2014). *Gastrointestinal physiology. Medical Physiology: The Big Picture.* McGraw-Hill Education. <https://accessmedicine-mhmedical-com-443.webvpn.sysu.edu.cn/content.aspx?bookid=1291§ionid=75577353>.
- Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., & Kim, D. H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway. *PLoS one*, 7(10), e47713. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047713>.
- Kim, S. J., Kim, S. E., Kim, A. R., Kang, S., Park, M. Y., & Sung, M. K. (2019). Dietary fat intake and age modulate the composition of the gut microbiota and colonic inflammation in C57BL/6J mice. *BMC microbiology*, 19(1), 193. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1557-9>.
- Kim J.E., Seol A., Choi Y.J., Lee S.J., Jin Y.J., Roh Y.J., Song H.J., Hong J.T., Hwang D.Y. (2022). Similarities and differences in constipation phenotypes between Lep knockout mice and high fat diet-induced obesity mice. *PLoS One*. 17(12):e0276445. doi: 10.1371/journal.pone.0276445.
- King A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British journal of pharmacology*, 166(3), 877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>.
- King B. F. (2015). Purinergic signalling in the enteric nervous system (An overview of current perspectives). *Autonomic neuroscience: basic & clinical*, 191, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2015.05.005>.

- Kindt, S., Vanden Berghe, P., Boesmans, W., Roosen, L., & Tack, J. (2010). Prolonged IL-1beta exposure alters neurotransmitter and electrically induced Ca(2+) responses in the myenteric plexus. *Neurogastroenterology and motility*, 22(3), 321–e85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01414.x>.
- Köttgen, M., Löffler, T., Jacobi, C., Nitschke, R., Pavenstädt, H., Schreiber, R., Frische, S., Nielsen, S., & Leipziger, J. (2003). P2Y6 receptor mediates colonic NaCl secretion via differential activation of cAMP-mediated transport. *The Journal of clinical investigation*, 111(3), 371–379. <https://doi.org/10.1172/JCI16711>.
- Koves, T. R., Ussher, J. R., Noland, R. C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., Bain, J., Stevens, R., Dyck, J. R., Newgard, C. B., Lopaschuk, G. D., & Muoio, D. M. (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell metabolism*, 7(1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.013>.
- Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kubo, M., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2012). Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature communications*, 3, 1034. <https://doi.org/10.1038/ncomms2023>.
- Laflamme, C., Mailhot, G. B., & Pouliot, M. (2017). Age-related decline of the acute local inflammation response: a mitigating role for the adenosine A2A receptor. *Aging*, 9(10), 2083–2097. <https://doi.org/10.18632/aging.101303>.
- Lalanza, J. F., & Snoeren, E. M. S. (2021). The cafeteria diet: A standardized protocol and its effects on behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 122, 92–119. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.003>.
- Langlois, C., & Gendron, F. P. (2009). Promoting MPhi transepithelial migration by stimulating the epithelial cell P2Y(2) receptor. *European journal of immunology*, 39(10), 2895–2905. <https://doi.org/10.1002/eji.200939369>.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M.,

- Levenez, F., ... Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541–546. <https://doi.org/10.1038/nature12506>.
- Le Pluart, D., Sabaté, J. M., Bouchoucha, M., Hercberg, S., Benamouzig, R., & Julia, C. (2015). Functional gastrointestinal disorders in 35,447 adults and their association with body mass index. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 41(8), 758–767. <https://doi.org/10.1111/apt.13143>.
- Lee, C. H., & Lam, K. S. (2019). Obesity-induced insulin resistance and macrophage infiltration of the adipose tissue: A vicious cycle. *Journal of diabetes investigation*, 10(1), 29–31. <https://doi.org/10.1111/jdi.12918>
- Li, H., Lelliott, C., Håkansson, P., Ploj, K., Tuneld, A., Verolin-Johansson, M., Benthem, L., Carlsson, B., Storlien, L., & Michaëlsson, E. (2008). Intestinal, adipose, and liver inflammation in diet-induced obese mice. *Metabolism: clinical and experimental*, 57(12), 1704–1710. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.029>.
- Li, Y., Xu, S., Zhang, X., Yi, Z., & Cichello, S. (2015). Skeletal intramyocellular lipid metabolism and insulin resistance. *Biophysics reports*, 1, 90–98. <https://doi.org/10.1007/s41048-015-0013-0>.
- Liñán-Rico, A., Wunderlich, J. E., Grants, I. S., Frankel, W. L., Xue, J., Williams, K. C., Harzman, A. E., Enneking, J. T., Cooke, H. J., & Christofi, F. L. (2013). Purinergic autocrine regulation of mechanosensitivity and serotonin release in a human EC model: ATP-gated P2X3 channels in EC are downregulated in ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 19(11), 2366–2379. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e31829ecf4d>.
- Liñán-Rico, A., Ochoa-Cortes, F., Beyder, A., Soghomonyan, S., Zuleta-Alarcon, A., Coppola, V., & Christofi, F. L. (2016). Mechanosensory Signaling in Enterochromaffin Cells and 5-HT Release: Potential Implications for Gut Inflammation. *Frontiers in neuroscience*, 10, 564. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00564>.
- Liu, J., Prell, T., Stubendorff, B., Keiner, S., Ringer, T., Gunkel, A., Tadic, V., Goldhammer, N., Malci, A., Witte, O. W., & Grosskreutz, J. (2016). Down-regulation of purinergic P2X7 receptor expression and intracellular calcium dysregulation in peripheral blood

mononuclear cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 630, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.07.039>.

Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>.

Longhi, M. S., Moss, A., Bai, A., Wu, Y., Huang, H., Cheifetz, A., Quintana, F. J., & Robson, S. C. (2014). Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. *PloS one*, 9(2), e87956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087956>.

Longhi, M. S., Moss, A., Jiang, Z. G., & Robson, S. C. (2017). Purinergic signaling during intestinal inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95(9), 915–925. doi:10.1007/s00109-017-1545-1.

Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms20092358>.

Malesza, I. J., Malesza, M., Walkowiak, J., Mussin, N., Walkowiak, D., Aringazina, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., & Mądry, E. (2021). High-Fat, Western-Style Diet, Systemic Inflammation, and Gut Microbiota: A Narrative Review. *Cells*, 10(11), 3164. <https://doi.org/10.3390/cells10113164>.

Malmsj , M., Chu, Z. M., Croft, K., Erlinge, D., Edvinsson, L., & Beilin, L. J. (2002). P2Y receptor-induced EDHF vasodilatation is of primary importance for the regulation of perfusion pressure in the peripheral circulation of the rat. *Acta physiologica Scandinavica*, 174(4), 301–309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2002.00956.x>.

Marques, C. C., Castelo-Branco, M. T., Pacheco, R. G., Buongusto, F., do Ros rio, A., Jr, Schanaider, A., Coutinho-Silva, R., & de Souza, H. S. (2014). Prophylactic systemic P2X7 receptor blockade prevents experimental colitis. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(1), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.012>.

- Matos, J. E., Robaye, B., Boeynaems, J. M., Beauwens, R., & Leipziger, J. (2005). K⁺ secretion activated by luminal P2Y₂ and P2Y₄ receptors in mouse colon. *The Journal of physiology*, 564(Pt 1), 269–279. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080002>.
- Matos, J. E., Sorensen, M. V., Geyti, C. S., Robaye, B., Boeynaems, J. M., & Leipziger, J. (2007). Distal colonic Na⁽⁺⁾ absorption inhibited by luminal P2Y₍₂₎ receptors. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 454(6), 977–987. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0248-9>.
- McCarthy, A. E., Yoshioka, C., & Mansoor, S. E. (2019). Full-Length P2X₇ Structures Reveal How Palmitoylation Prevents Channel Desensitization. *Cell*, 179(3), 659–670.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.017>.
- McColl, S. R., St-Onge, M., Dussault, A. A., Laflamme, C., Bouchard, L., Boulanger, J., & Pouliot, M. (2006). Immunomodulatory impact of the A_{2A} adenosine receptor on the profile of chemokines produced by neutrophils. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(1), 187–189. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4804fje>.
- Medina, C., Tolentino-Mayo, L., López-Ridaura, R., & Barquera, S. (2017). Evidence of increasing sedentarism in Mexico City during the last decade: Sitting time prevalence, trends, and associations with obesity and diabetes. *PloS one*, 12(12), e0188518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188518>.
- Meldgaard, T., Olesen, S. S., Farmer, A. D., Krogh, K., Wendel, A. A., Brock, B., Drewes, A. M., & Brock, C. (2018). Diabetic Enteropathy: From Molecule to Mechanism-Based Treatment. *Journal of diabetes research*, 2018, 3827301. <https://doi.org/10.1155/2018/3827301>.
- Mizuno, M. S., Crisma, A. R., Borelli, P., & Castelucci, P. (2012). Expression of the P2X₂ receptor in different classes of ileum myenteric neurons in the female obese ob/ob mouse. *World journal of gastroenterology*, 18(34), 4693–4703. <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i34.4693>.
- Mizuno, M. S., Crisma, A. R., Borelli, P., Schäfer, B. T., Silveira, M. P., & Castelucci, P. (2014). Distribution of the P2X₂ receptor and chemical coding in ileal enteric neurons

of obese male mice (ob/ob). *World journal of gastroenterology*, 20(38), 13911–13919. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13911>.

Monzillo, L. U., & Hamdy, O. (2003). Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutrition reviews*, 61(12), 397–412. <https://doi.org/10.1301/nr.2003.dec.397-412>.

Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., & Bégeot, M. (2003). Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology*, 144(11), 4773–4782. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0456>.

Mushref, M. A., & Srinivasan, S. (2013). Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. *Annals of translational medicine*, 1(2), 14. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2012.11.01>.

Natali, A., Toschi, E., Baldeweg, S., Ciociaro, D., Favilla, S., Saccà, L., & Ferrannini, E. (2006). Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes*, 55(4), 1133–1140. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1076>.

Neves, A. R., Castelo-Branco, M. T., Figliuolo, V. R., Bernardazzi, C., Buongusto, F., Yoshimoto, A., Nanini, H. F., Coutinho, C. M., Carneiro, A. J., Coutinho-Silva, R., & de Souza, H. S. (2014). Overexpression of ATP-activated P2X7 receptors in the intestinal mucosa is implicated in the pathogenesis of Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*, 20(3), 444–457. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000441201.10454.06>.

Nezami, B. G., Mwangi, S. M., Lee, J. E., Jeppsson, S., Anitha, M., Yarandi, S. S., Farris, A. B., 3rd, & Srinivasan, S. (2014). MicroRNA 375 mediates palmitate-induced enteric neuronal damage and high-fat diet-induced delayed intestinal transit in mice. *Gastroenterology*, 146(2), 473–83.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.10.053>.

Nieto-Pescador, M. G., Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E., Espinosa-Luna, R., Jiménez-Vargas, N., Liñan-Rico Andrómeda, A., Ramos-Lomas, T. L., Díaz-Hernández Verónica, V., Montañó, L. M., & Barajas-López, C. (2013). P2X4 subunits are part of

P2X native channels in murine myenteric neurons. *European journal of pharmacology*, 709(1-3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.045>.

Novak I. (2011). Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 202(3), 501–522. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02225.x>.

Neuparth, M. J., Proença, J. B., Santos-Silva, A., & Coimbra, S. (2013). Adipokines, oxidized low-density lipoprotein, and C-reactive protein levels in lean, overweight, and obese portuguese patients with type 2 diabetes. *ISRN obesity*, 2013, 142097. <https://doi.org/10.1155/2013/142097>.

Ochaion, A., Bar-Yehuda, S., Cohen, S., Barer, F., Patoka, R., Amital, H., Reitblat, T., Reitblat, A., Ophir, J., Konfino, I., Chowers, Y., Ben-Horin, S., & Fishman, P. (2009). The anti-inflammatory target A(3) adenosine receptor is over-expressed in rheumatoid arthritis, psoriasis and Crohn's disease. *Cellular immunology*, 258(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2009.03.020>.

Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R., & Christofi, F. L. (2016). Enteric Glial Cells: A New Frontier in Neurogastroenterology and Clinical Target for Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 22(2), 433–449. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000667>.

Olivares-Reyes, J. A., & Arellano-Plancarte, A. (2008). Bases Moleculares de las acciones de la insulina. *REB*, 27(1), 9-18.

Phillips CM, Perry IJ. 2013. Does inflammation determine metabolic health status in obese and nonobese adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 98: E1610–9.

Populin, L., Stebbing, M. J., & Furness, J. B. (2021). Neuronal regulation of the gut immune system and neuromodulation for treating inflammatory bowel disease. *FASEB bioAdvances*, 3(11), 953–966. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00070>.

Qian S, Shi Y, Peng Q, Senfeld J, Shen J (2022) P2Y2 receptor upregulation and signaling during adipogenesis and inflammation: a new mechanism in insulin resistance. *FASEB J* 36(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R2881>.

- Qin, C., Zhou, J., Gao, Y., Lai, W., Yang, C., Cai, Y., Chen, S., & Du, C. (2017). Critical Role of P2Y12 Receptor in Regulation of Th17 Differentiation and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 199(1), 72–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601549>.
- Qin, J., Li, Y., Cai, Z., Li, S., Zhu, J., Zhang, F., Liang, S., Zhang, W., Guan, Y., Shen, D., Peng, Y., Zhang, D., Jie, Z., Wu, W., Qin, Y., Xue, W., Li, J., Han, L., Lu, D., Wu, P., ... Wang, J. (2012). A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*, 490(7418), 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature11450>.
- Rajindrajith, S., Devanarayana, N. M., & Benninga, M. A. (2014). Obesity and functional gastrointestinal diseases in children. *Journal of neurogastroenterology and motility*, 20(3), 414–416. <https://doi.org/10.5056/jnm14067>.
- Rakhra, V., Galappaththy, S. L., Bulchandani, S., & Cabandugama, P. K. (2020). Obesity and the Western Diet: How We Got Here. *Missouri medicine*, 117(6), 536–538.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1996). Relative contribution of P2U- and P2Y-purinoceptors to endothelium-dependent vasodilatation in the golden hamster isolated mesenteric arterial bed. *British journal of pharmacology*, 117(8), 1797–1802. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15357.x>.
- Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM (2000) A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 49(11): 1390-4. <http://doi:10.1053/meta.2000.17721>.
- Reichert, K. P., Vera-Castro, M. F., Assmann, C. E., Bottari, N. B., Miron, V. V., Cardoso, A., Schetinger, M. R. (2021). Diabetes and hypertension: Pivotal involvement of purinergic signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 137, 111273. [doi:10.1016/j.biopha.2021.111273](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111273).
- Rémond, D., Shahar, D. R., Gille, D., Pinto, P., Kachal, J., Peyron, M. A., Dos Santos, C. N., Walther, B., Bordoni, A., Dupont, D., Tomás-Cobos, L., & Vergères, G. (2015). Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget*, 6(16), 13858–13898. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4030>.

- Ren, J., Bian, X., DeVries, M., Schnegelsberg, B., Cockayne, D. A., Ford, A. P., & Galligan, J. J. (2003). P2X2 subunits contribute to fast synaptic excitation in myenteric neurons of the mouse small intestine. *The Journal of physiology*, 552(Pt 3), 809–821. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.047944>.
- Ren, T., Grants, I., Alhaj, M., McKiernan, M., Jacobson, M., Hassanain, H. H., Frankel, W., Wunderlich, J., & Christofi, F. L. (2011). Impact of disrupting adenosine A₃ receptors (A₃^{-/-} AR) on colonic motility or progression of colitis in the mouse. *Inflammatory bowel diseases*, 17(8), 1698–1713. <https://doi.org/10.1002/ibd.21553>.
- Ren, T., Tian, T., Feng, X., Ye, S., Wang, H., Wu, W., Qiu, Y., Yu, C., He, Y., Zeng, J., Cen, J., & Zhou, Y. (2015). An adenosine A3 receptor agonist inhibits DSS-induced colitis in mice through modulation of the NF-κB signaling pathway. *Scientific reports*, 5, 9047. <https://doi.org/10.1038/srep09047>.
- Ren, Y., Zhao, H., Yin, C., Lan, X., Wu, L., Du, X., Griffiths, H. R., & Gao, D. (2022). Adipokines, Hepatokines and Myokines: Focus on Their Role and Molecular Mechanisms in Adipose Tissue Inflammation. *Frontiers in endocrinology*, 13, 873699. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.873699>.
- Roberts, J. A., Lukewich, M. K., Sharkey, K. A., Furness, J. B., Mawe, G. M., & Lomax, A. E. (2012). The roles of purinergic signaling during gastrointestinal inflammation. *Current opinion in pharmacology*, 12(6), 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.09.011>.
- Robson, S. C., Sévigny, J., & Zimmermann, H. (2006). The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signalling*, 2(2), 409–430. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9003-5>.
- Rodrigues, L., Miranda, I. M., Andrade, G. M., Mota, M., Cortes, L., Rodrigues, A. G., Cunha, R. A., & Gonçalves, T. (2016). Blunted dynamics of adenosine A2A receptors is associated with increased susceptibility to *Candida albicans* infection in the elderly. *Oncotarget*, 7(39), 62862–62872. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11760>.

- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.), 11(1), 77–91. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz061>.
- Rourke, J. L., Dranse, H. J., & Sinal, C. J. (2013). Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 14(3), 245–262. <https://doi.org/10.1111/obr.12009>.
- Ruiyang Y., Yong X., Jinrong H., Xiaosong H., Qun S. (2020) The effects of diet and streptozotocin on metabolism and gut microbiota in a type 2 diabetes mellitus mouse model, *Food and Agricultural Immunology*; 31:1, 723-739, doi:10.1080/09540105.2020.1761302.
- Salem, M., El Azreq, M. A., Pelletier, J., Robaye, B., Aoudjit, F., & Sévigny, J. (2019). Exacerbated intestinal inflammation in P2Y6 deficient mice is associated with Th17 activation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(10), 2595–2605. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.06.019>.
- Sanders K. M. (2019). Spontaneous Electrical Activity and Rhythmicity in Gastrointestinal Smooth Muscles. *Advances in experimental medicine and biology*, 1124, 3–46. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1_1.
- Saul, A., Hausmann, R., Kless, A., & Nicke, A. (2013). Heteromeric assembly of P2X subunits. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 250. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00250>.
- Sell H, Eckel J (2010) Adipose tissue inflammation: novel insight into the role of macrophages and lymphocytes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13(4): 366-370. <https://doi: 10.1097/MCO.0b013e32833aab7f>.
- Seye CI, Yu N, Jain R, Kong Q, Minor T, Newton J, Erb L, González FA, Weisman GA (2003) The P2Y2 nucleotide receptor mediates UTP-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in coronary artery endothelial cells. *J Biol Chem* 278(27):24960–24965. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301439200>.

- Sheth, S., Brito, R., Mukherjea, D., Rybak, L. P., & Ramkumar, V. (2014). Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International journal of molecular sciences*, 15(2), 2024–2052. <https://doi.org/10.3390/ijms15022024>.
- Shouval, D. S., Biswas, A., Goettel, J. A., McCann, K., Conaway, E., Redhu, N. S., Mascanfroni, I. D., Al Adham, Z., Lavoie, S., Ibourk, M., Nguyen, D. D., Samsom, J. N., Escher, J. C., Somech, R., Weiss, B., Beier, R., Conklin, L. S., Ebens, C. L., Santos, F. G., Ferreira, A. R., ... Snapper, S. B. (2014). Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity*, 40(5), 706–719. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.011>.
- Sluyter, R., Barden, J. A., & Wiley, J. S. (2001). Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell and tissue research*, 304(2), 231–236. <https://doi.org/10.1007/s004410100372>.
- Speakman J. R. (2019). Use of high-fat diets to study rodent obesity as a model of human obesity. *International journal of obesity* (2005), 43(8), 1491–1492. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0363-7>.
- Spencer, N. J., Walsh, M., & Smith, T. K. (2000). Purinergic and cholinergic neuro-neuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea-pig ileum. *The Journal of physiology*, 522 Pt 2(Pt 2), 321–331. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00321.x>.
- Srinivasan, K., & Ramarao, P. (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *The Indian journal of medical research*, 125(3), 451–472.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological research*, 52(4), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>.
- Statnick, M. A., Beavers, L. S., Conner, L. J., Corominola, H., Johnson, D., Hammond, C. D., Rafaeloff-Phail, R., Seng, T., Suter, T. M., Sluka, J. P., Ravussin, E., Gadski, R. A., & Caro, J. F. (2000). Decreased expression of apM1 in omental and

subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *International journal of experimental diabetes research*, 1(2), 81–88. <https://doi.org/10.1155/edr.2000.81>.

Strong, D. S., Cornbrooks, C. F., Roberts, J. A., Hoffman, J. M., Sharkey, K. A., & Mawe, G. M. (2010). Purinergic neuromuscular transmission is selectively attenuated in ulcerated regions of inflamed guinea pig distal colon. *The Journal of physiology*, 588(Pt 5), 847–859. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.185082>.

Strohmeier, G. R., Reppert, S. M., Lencer, W. I., & Madara, J. L. (1995). The A2b adenosine receptor mediates cAMP responses to adenosine receptor agonists in human intestinal epithelia. *The Journal of biological chemistry*, 270(5), 2387–2394. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2387>.

Suárez-Carmona W, Sánchez-Oliver AJ, González-Jurado JA. (2017). Fisiopatología de la obesidad: Perspectiva actual. *Rev. Chil Nutr* 44(3): 226-233. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182017000300226>.

Sun, W. C., Moore, J. N., Hurley, D. J., Vandenplas, M. L., Linden, J., Cao, Z., & Murray, T. F. (2008). Adenosine A2A receptor agonists inhibit lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor-alpha by equine monocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*, 121(1-2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.08.011>.

Taba Taba Vakili, S., Nezami, B. G., Shetty, A., Chetty, V. K., & Srinivasan, S. (2015). Association of high dietary saturated fat intake and uncontrolled diabetes with constipation: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Neurogastroenterology and motility*, 27(10), 1389–1397. <https://doi.org/10.1111/nmo.12630>.

Tan, P., Pepin, É., & Lavoie, J. L. (2018). Mouse Adipose Tissue Collection and Processing for RNA Analysis. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (131), 57026. <https://doi.org/10.3791/57026>.

Tanahashi, Y., Komori, S., Matsuyama, H., Kitazawa, T., & Unno, T. (2021). Functions of Muscarinic Receptor Subtypes in Gastrointestinal Smooth Muscle: A Review of Studies with Receptor-Knockout Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 926. <https://doi.org/10.3390/ijms22020926>.

- Tanti, J. F., & Jager, J. (2009). Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Curr Opin Pharmacol*, 9(6), 753–62.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031. <https://doi.org/10.1038/nature05414>.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*, 3(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>.
- Valdez-Morales, E., Guerrero-Alba, R., Liñán-Rico, A., Espinosa-Luna, R., Zarazua-Guzman, S., Miranda-Morales, M., Montañó, L. M., & Barajas-López, C. (2011). P2X7 receptors contribute to the currents induced by ATP in guinea pig intestinal myenteric neurons. *European journal of pharmacology*, 668(3), 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.07.019>.
- van der Hoeven, D., Wan, T. C., & Auchampach, J. A. (2008). Activation of the A(3) adenosine receptor suppresses superoxide production and chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils. *Molecular pharmacology*, 74(3), 685–696. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048066>.
- van der Hoeven, D., Wan, T. C., Gizewski, E. T., Kreckler, L. M., Maas, J. E., Van Orman, J., Ravid, K., & Auchampach, J. A. (2011). A role for the low-affinity A2B adenosine receptor in regulating superoxide generation by murine neutrophils. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 338(3), 1004–1012. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.181792>
- Vanderwinden, J. M., Timmermans, J. P., & Schiffmann, S. N. (2003). Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell and tissue research*, 312(2), 149–154. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0716-2>.
- Vargas-Martínez, E. M., Gómez-Coronado, K. S., Espinosa-Luna, R., Valdez-Morales, E. E., Barrios-García, T., Barajas-Espinosa, A., Ochoa-Cortes, F., Montañó, L. M., Barajas-López, C., & Guerrero-Alba, R. (2020). Functional expression of P2X1,

P2X4 and P2X7 purinergic receptors in human monocyte-derived macrophages. *European journal of pharmacology*, 888, 173460. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173460>.

Verdam, F. J., Greve, J. W., Roosta, S., van Eijk, H., Bouvy, N., Buurman, W. A., & Rensen, S. S. (2011). Small intestinal alterations in severely obese hyperglycemic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 96(2), E379–E383. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-1333>.

Veronese, N., Cooper, C., Reginster, J. Y., Hochberg, M., Branco, J., Bruyère, O., Chapurlat, R., Al-Daghri, N., Dennison, E., Herrero-Beaumont, G., Kaux, J. F., Maheu, E., Rizzoli, R., Roth, R., Rovati, L. C., Uebelhart, D., Vlaskovska, M., & Scheen, A. (2019). Type 2 diabetes mellitus and osteoarthritis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 49(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.01.005>.

Virtue, S., & Vidal-Puig, A. (2021). GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nature metabolism*, 3(7), 883–886. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00414-7>.

Von Kügelgen, I. (2019). Pharmacology of P2Y receptors. *Brain Research Bulletin*, 151, 12–24. doi:10.1016/j.brainresbull.2019.03.010.

Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. 2002. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*.51:455–61.

Vuerich, M., Mukherjee, S., Robson, S. C., & Longhi, M. S. (2020). Control of Gut Inflammation by Modulation of Purinergic Signaling. *Frontiers in immunology*, 11, 1882. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01882>.

Wang, R., Wang, Y., Wu, C., Jin, G., Zhu, F., Yang, Y., Wang, Y., & Zhou, G. (2023). CD73 blockade alleviates intestinal inflammatory responses by regulating macrophage differentiation in ulcerative colitis. *Experimental and therapeutic medicine*, 25(6), 272. <https://doi.org/10.3892/etm.2023.11972>.

Winer, D. A., Luck, H., Tsai, S., & Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell metabolism*, 23(3), 413–426. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.003>.

- Wu, W., He, Y., Feng, X., Ye, S., Wang, H., Tan, W., Yu, C., Hu, J., Zheng, R., & Zhou, Y. (2017). MicroRNA-206 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis via regulation of adenosine A3 receptor. *Oncotarget*, 8(1), 705–721. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13525>.
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 8, 181–188. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S82272>.
- Xie, Y., Ding, F., Di, W., Lv, Y., Xia, F., Sheng, Y., Yu, J., & Ding, G. (2020). Impact of a high-fat diet on intestinal stem cells and epithelial barrier function in middle-aged female mice. *Molecular medicine reports*, 21(3), 1133–1144. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.10932>.
- Yang, G., Wei, J., Liu, P., Zhang, Q., Tian, Y., Hou, G., Meng, L., Xin, Y., & Jiang, X. (2021). Role of the gut microbiota in type 2 diabetes and related diseases. *Metabolism: clinical and experimental*, 117, 154712. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2021.154712>.
- Ye, J. H., & Rajendran, V. M. (2009). Adenosine: an immune modulator of inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology*, 15(36), 4491–4498. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.4491>.
- Yu T, Sungelo MJ, Goldberg IJ, Wang H, Eckel RH (2017) Streptozotocin-Treated High Fat Fed Mice: A New Type 2 Diabetes Model Used to Study Canagliflozin-Induced Alterations in Lipids and Lipoproteins. *Horm Metab Res* 49(5):400-406. <http://doi:10.1055/s-0042-110934>.
- Yung, J. H. M., & Giacca, A. (2020). Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) in Obesity and Type 2 Diabetes. *Cells*, 9(3), 706. <https://doi.org/10.3390/cells9030706>.
- Zhang, Y., Ecelbarger, C. M., Lesniewski, L. A., Müller, C. E., & Kishore, B. K. (2020). P2Y2 Receptor Promotes High-Fat Diet-Induced Obesity. *Frontiers in endocrinology*, 11, 341. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00341>.

- Zhang, Y., Lomax, A. E., & Paterson, W. G. (2010). P2Y1 receptors mediate apamin-sensitive and -insensitive inhibitory junction potentials in murine colonic circular smooth muscle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 333(2), 602–611. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.160978>.
- Zhao, M., Liao, D., & Zhao, J. (2017). Diabetes-induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. *World journal of diabetes*, 8(6), 249–269. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i6.249>.
- Zietz, B., Büchler, C., Herfarth, H., Müller-Ladner, U., Spiegel, D., Schölmerich, J., & Schäffler, A. (2005). Caucasian patients with type 2 diabetes mellitus have elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 that are not influenced by the -2518 A->G promoter polymorphism. *Diabetes, obesity & metabolism*, 7(5), 570–578. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2004.00436.x>.
- Zigmond, E., Bernshtein, B., Friedlander, G., Walker, C. R., Yona, S., Kim, K. W., Brenner, O., Krauthgamer, R., Varol, C., Müller, W., & Jung, S. (2014). Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity*, 40(5), 720–733. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.012>.
- Zizzo, M. G., Mastropaolo, M., Lentini, L., Mulè, F., & Serio, R. (2011). Adenosine negatively regulates duodenal motility in mice: role of A(1) and A(2A) receptors. *British journal of pharmacology*, 164(6), 1580–1589. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01498.x>.