



Universidad Autónoma de Aguascalientes
Departamento de Posgrado
Doctorado en Ciencias Biológicas

*“Estudio de las propiedades
electrofisiológicas y farmacológicas de los
receptores purinérgicos P2X en neuronas
mientéricas de ratones diabéticos”.*

Presenta:

Guillermo Alejandro Cabral García

Comité Tutorial

Dra. Raquel Guerrero Alba
Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales
Dr. José Luis Quintanar Stephano

Aguascalientes Ags., junio 2025

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **GUILLERMO ALEJANDRO CABRAL GARCÍA** con ID 64215 quien realizó la tesis titulada: **PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS DE LOS RECEPTORES P2X EN NEURONAS MIENTÉRICAS DE RATONES DIABÉTICOS**, 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 imprimirlo así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

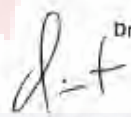
Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 17 de junio de 2025.


Dra. Raquel Guerrero Alba
Tutor de tesis


Dr. Eduardo Emmanuel Valdez Morales
Co-Tutor de tesis


Dr. José Luis Quintanar Stephano
Asesor de tesis

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

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado

Código: DO-SEE-PO-16
Actualización: 00
Emisión: 17/05/19



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



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 18 de junio de 2025

NOMBRE: Guillermo Alejandro Cabral García ID: 04215

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional LGAC (del posgrado): Biotecnología y bioquímica vegetal y animal

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores P2X en neuronas mientéricas de ratones diabéticos

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Este proyecto generó conocimiento nuevo que contribuyó a un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la disfunción de la motilidad intestinal, lo que podría abrir nuevas perspectivas en la identificación de blancos terapéuticos. Por lo tanto, este estudio tiene un impacto social en el sector salud al cual se encuentra alineado con el eje temático del objetivo 3 de PRONACES establecido por SECHTI.

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
NO						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 la señalada 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 tutoral, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberarlo el tutor
N.A.						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 Canacyt 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 Asesorado 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:

SI X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEÑALÉ LA LGAC DE ATRIBUCIÓN:

Dra. Lucia Isabel Chávez Ortiz

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Martínez Domínguez

* En caso de conflicto de intereses, firmar un escrito indicando al NAB que la LGAC correspondiente influye al tutor o miembro del comité tutoral, asignado según Desam

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 Alfórez Chávez

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

Es obligatorio leer el Art. 520C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala acciones y acciones del Consejo Universitario: ... Llevar la estructura interna del programa de posgrado y el Art. 503F del Reglamento del Seminario Técnico, leer el reglamento de los alumnos.

Elaborador: D. Apoyo al Posgrado
Revisado por: D. Control Escolar / D. Asesoría de Calidad
Aprobado por: D. Control Escolar / D. Apoyo al Posgrado

Código: DO-505-FD-15
Revisión: 01
Emitido: 26/04/20



Review

Pharmacology of P2X Receptors and Their Possible Therapeutic Potential in Obesity and Diabetes

Guillermo A. Cabral-García¹, José R. Cruz-Muñoz¹, Eduardo E. Valdez-Morales^{1,2}, Alma Barajas-Espinosa³,
Andrómeda Liñán-Rico^{2,4} and Raquel Guerrero-Alba^{1,*}

¹ Departamento de Fisiología y Farmacología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes 20100, Mexico; al64215@edu.uaa.mx (G.A.C.-G.); ray.cruz010893@gmail.com (J.R.C.-M.); eduardo.valdez@edu.uaa.mx (E.E.V.-M.)

² Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), Ciudad de México (3940), Mexico; andromeda_linan@ucol.mx

³ Escuela Superior de Huejutla, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Huejutla de Reyes 43000, Hidalgo, Mexico; alma_barajas@uah.edu.mx

⁴ Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima, Colima 28045, Mexico

* Correspondence: raquel.guerrero@edu.uaa.mx; Tel.: +52-449-910-7400 (ext. 51261)

Abstract: The role of P2X ionotropic receptors in the behavior of purinergic signaling on pathophysiological processes has been widely studied. In recent years, the important participation of P2X receptors in physiological and pathological processes, such as energy metabolism, characteristic inflammatory responses of the immune system, and nociceptive activity in response to pain stimuli, has been noted. Here, we explore the molecular characteristics of the P2X receptors and the use of the different agonist and antagonist agents recently described, focusing on their potential as new therapeutic targets in the treatment of diseases with emphasis on obesity, diabetes, and some of the complications derived from these pathologies.

Keywords: adenosine 5'-triphosphate; P2X receptors; drugs; obesity; diabetes



Citation: Cabral-García, G.A.; Cruz-Muñoz, J.R.; Valdez-Morales, E.E.; Barajas-Espinosa, A.; Liñán-Rico, A.; Guerrero-Alba, R. Pharmacology of P2X Receptors and Their Possible Therapeutic Potential in Obesity and Diabetes. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 1291. <https://doi.org/10.3390/ph17101291>

Academic Editor: Rajan Couture

Received: 8 August 2024

Revised: 21 September 2024

Accepted: 26 September 2024

Published: 28 September 2024

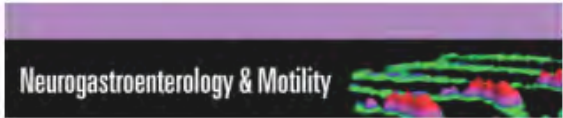


Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The excessive accumulation of fat in adipose tissue during obesity, as well as the anatomical distribution of these deposits, has a crucial impact on the development of multiple metabolic disorders, including insulin resistance, β -cell dysfunction, prediabetes, and type 2 diabetes (T2D) [1,2]. T2D is a metabolic disorder characterized by metabolic dysregulation of glucose due to loss of insulin sensitization and impaired insulin secretion from pancreatic β cells [3]. Currently, the global incidence of diabetes continues to increase. In 2021, nearly 537 million adults (18–79 years old) were reported to have T2D, and an estimated 783 million people will have T2D in 2045 (International Diabetes Federation). Both obesity and T2D share a chronic systemic inflammatory component that drives the development and progression of insulin resistance [4,5].

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is released from the intracellular medium to the extracellular matrix as autocrine and paracrine mediators in response to metabolic stress and inflammation [6]. The complex network of ligands, enzymes, and receptors that purinergic signaling represents plays an essential role in regulating several physiological processes, including energy metabolism and immune responses [7,8]. In this way, the increase in extracellular ATP is, in turn, a driver of systemic inflammation due to the abnormal activation of purinergic signaling through each of its elements, such as the P2X, P2Y, and adenosine receptors [9]. Currently, several studies detail the importance of the participation of purinergic signaling as well as its elements in the development and progression of multiple diseases, including diabetes [10–12].



Decreased excitability and voltage-gated sodium currents in myenteric neurons contribute to the impairment of gut contraction in type 2 diabetes mice.

Journal:	Neurogastroenterology and Motility
Manuscript ID:	NMO-00014-2025.R1
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	08-Apr-2025
Complete List of Authors:	Cabral-García, Guillermo A.; Universidad Autonoma de Aguascalientes Centro de Ciencias Basicas Contreras-Vázquez, Estefanía G.; Universidad Autonoma de Aguascalientes Centro de Ciencias Basicas Liñán-Rico, Andrómeda; Universidad de Colima; Secretaria de Ciencia Tecnología e Innovacion Barajas-Espinosa, Alma; Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo Ochoa-Cortes, Fernando; Universidad Autonoma del Estado de Hidalgo Valdez-Morales, Eduardo E.; Universidad Autonoma de Aguascalientes Centro de Ciencias Basicas; Secretaria de Ciencia Tecnología e Innovacion Guerrero-Alba, Raquel; Universidad Autonoma de Aguascalientes Centro de Ciencias Basicas
Key Words:	dysmotility, myenteric neurons, excitability, sodium channels, type 2 diabetes

Agradecimientos

Agradezco el apoyo económico otorgado por el sistema de becas de posgrado **CONACYT** /SECIHTI (número de beca: 815302), así como a los recursos otorgados por medio del proyecto Ciencia Frontera (CF-2019/21854) que proporcionaron los recursos para mi sustento personal y para la compra de reactivos necesarios para la elaboración de mi trabajo de tesis.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, quien me proporciono acceso a sus instalaciones y los equipos necesarios para la realización de mi proyecto doctoral.

A mis Tutores. Maestros, ¡Muchas gracias por todo! Durante el doctorado seguí aprendiendo sobre la importancia de la constancia y el orden al momento de trabajar. Con ustedes viví grandes etapas, algunas fueron complicadas y otras muy gratificantes. Me llevo una gran cantidad de recuerdos, no solo de la investigación, los considero una guía a seguir en varios aspectos. Espero que su pasión por enseñar e investigar continúe durante toda su vida laboral y admiro el gran sacrificio que hace día a día para cumplir su deseo de investigar. De todo corazón me gustaría que cumplan todos sus objetivos en su vida. De nuevo muchas GRACIAS.

A mis padres. ¡Padres, se logró!, No tengo palabras para ustedes, son los mejores. Agradezco el consuelo, apoyo, guía, regaños. ¡Lo logramos!, gracias por ser mis practicantes de presentaciones, gracias por llevarme comida. De verdad no podría escribir estas palabras sin su apoyo ustedes. ¡Son los mejores!

A mi novio. ¡Amor, fuiste mi motivación y apoyo! Te agradezco toda tu ayuda, en redacción, abrazos, comida, desvelos, el no salir algunos fines de semana para continuar avanzando, etc. Éste logro también es tuyo y realmente espero que lo sientas así. Logremos muchas cosas más juntos.

A mi hermana, cuñado y sobrinos. Agradezco su comprensión y apoyo durante el proyecto, sus palabras fueron de mucha ayuda para concretar este logro.

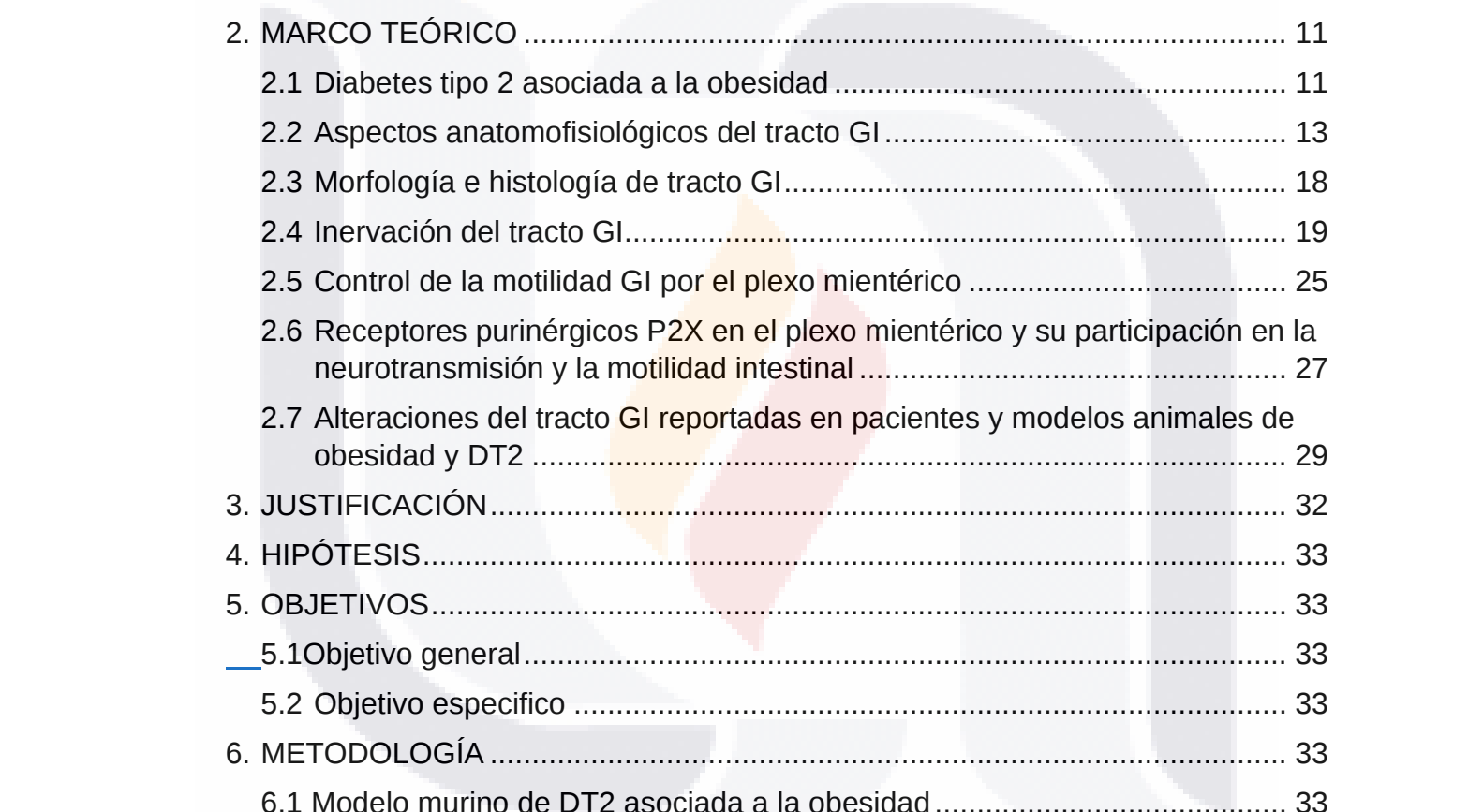
A mis compañeros y amigos. Chuy, Alma, Ana, Ray, Luis, Fanny, Sofi, Tona, Jona, Karen, Samuel, Mauricio y Daniela. El orden no importa, todos me ayudaron de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

muchas maneras, risas, abrazos, comprender temas difíciles, estudiar. Son grandes personas en mi vida y espero siempre contar con ustedes y estaré para ustedes, ¡Los quiero!

A mis mejores amigos. Issac y Thelma. Gracias por escucharme y hacer que me relajara en los momentos más tensos. Espero que sigamos juntos siempre.





Índice general

Índice general..... 1

Índice de figuras..... 3

Índice de tablas 4

ACRÓNIMOS 5

Resumen..... 7

Abstract..... 8

1. INTRODUCCIÓN 9

2. MARCO TEÓRICO 11

 2.1 Diabetes tipo 2 asociada a la obesidad 11

 2.2 Aspectos anatomofisiológicos del tracto GI 13

 2.3 Morfología e histología de tracto GI..... 18

 2.4 Inervación del tracto GI..... 19

 2.5 Control de la motilidad GI por el plexo mientérico 25

 2.6 Receptores purinérgicos P2X en el plexo mientérico y su participación en la neurotransmisión y la motilidad intestinal 27

 2.7 Alteraciones del tracto GI reportadas en pacientes y modelos animales de obesidad y DT2 29

3. JUSTIFICACIÓN..... 32

4. HIPÓTESIS..... 33

5. OBJETIVOS..... 33

 5.1Objetivo general..... 33

 5.2 Objetivo específico 33

6. METODOLOGÍA 33

 6.1 Modelo murino de DT2 asociada a la obesidad 33

 6.2 Evaluación de los niveles de glucosa sanguínea y prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa e insulina..... 35

 6.3 Evaluación de la motilidad propulsiva..... 36

 6.4 Disección del tejido adiposo blanco y colónico 36

 6.5 Ensayos de contractilidad del colon en baño de órgano aislado. 37

 6.6 Obtención de sobrenadantes de tejidos colónicos de ratones CTRL y CAF-STZ..... 38

 6.7 Cultivos primarios de neuronas mientéricas de colon 38

6.8 Registros electrofisiológicos con la técnica de Patch Clamp	38
6.9 Análisis estadístico	42
7. RESULTADOS.....	42
7.1 Los ratones CAF-STZ desarrollaron obesidad y DT2	42
7.2 Los ratones CAF-STZ presentaron alteraciones en la morfología del colon y retraso en el tránsito intestinal.....	45
7.3 Alteración de la contractilidad muscular del colon en ratones CAF-STZ	46
7.4 Las neuronas mientéricas tipo S del colon de ratones CAF-STZ mostraron una reducción en la excitabilidad.....	47
7.5 Las neuronas mientéricas tipo S y AH incubadas con sobrenadantes de tejido colónico de ratones CAF-STZ mostraron también una reducción en la excitabilidad.....	50
7.6 Los receptores purinérgicos P2X no participan en la reducción de la excitabilidad de las neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ	53
7.7 Los sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ no afectaron las propiedades farmacológicas de los receptores P2X en las neuronas mientéricas de ratones.	55
7.8 Efecto de los sobrenadantes del colon de ratones CAF-STZ sobre los canales de Na ⁺ y K ⁺ dependientes de voltaje en las neuronas mientéricas de ratones.....	56
7.9 La reducción de la excitabilidad de las neuronas mientéricas se correlaciona con las alteraciones en la contractilidad muscular del colon.	57
8. DISCUSIÓN	60
9. CONCLUSIONES	67
10. BIBLIOGRAFÍA	68

Índice de figuras

FIGURA 1. INERVACIÓN EXTRÍNSECA DEL TRACTO GI. SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO, PARASIMPÁTICO Y SIMPÁTICO	21
FIGURA 2. CAPAS E INERVACIÓN INTRÍNSECA DEL TRACTO GI.....	24
FIGURA 3. CLASIFICACIÓN DE LAS NEURONAS MIENTÉRICAS DE ACUERDO CON LAS CARACTERÍSTICAS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN.	25
FIGURA 4. LOS RATONES CAF-STZ DESARROLLARON CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE OBESIDAD.....	43
FIGURA 5. LOS RATONES CAF-STZ DESARROLLARON ALTERACIONES EN LA HOMEOSTASIS DEL METABOLISMO DE LA GLUCOSA.	44
FIGURA 6. LA ADMINISTRACIÓN CAF-STZ REDUJO LA LONGITUD Y EL PESO DEL COLON.	45
FIGURA 7. LOS RATONES CAF-STZ PRESENTARON ESTREÑIMIENTO..	46
FIGURA 8. LA AMPLITUD Y FRECUENCIA DE LAS RSC EN EL COLON DE RATONES CAF-STZ Y CTRL.	47
FIGURA 9. EXCITABILIDAD REDUCIDA DE LAS NEURONAS MIENTÉRICAS TIPO S EN RATONES CAF-STZ.	49
FIGURA 10. LA INCUBACIÓN DE NEURONAS MIENTÉRICAS CON LOS SOBRENADANTES DERIVADOS DEL COLON DE RATONES CAF-STZ DISMINUYE LA EXCITABILIDAD NEURONAL.....	52
FIGURA 11. LOS RECEPTORES P2X NO CONTRIBUYEN A LA DISMINUCIÓN DE LA EXCITABILIDAD INDUCIDA POR LOS SOBRENADANTES DEL COLON DE RATONES CAF-STZ.	55
FIGURA 12. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA AL ATP EN NEURONAS MIENTÉRICAS INCUBADAS CON SOBRENADANTES DE COLON DE RATONES CTRL Y CAF-STZ.	56
FIGURA 13. LAS NEURONAS MIENTÉRICAS INCUBADAS DURANTE TODA LA NOCHE CON SOBRENADANTE DE BIOPSIAS DE COLON DE RATONES CAF-STZ MOSTRARON CORRIENTES DE NAV TOTALES REDUCIDAS.	58
FIGURA 14. LOS SOBRENADANTES COLÓNICOS DE RATONES CAF-STZ NO MODIFICAN LAS CORRIENTES Kv DE NEURONAS MIENTÉRICAS TIPO S NI TIPO AH.	59
FIGURA 15. EL AUMENTO DE LA REOBASE DE LAS NEURONAS MIENTÉRICAS SE CORRELACIONÓ CON LAS ALTERACIONES DE LA AMPLITUD Y LA FRECUENCIA DE LAS CONTRACCIONES ESPONTÁNEAS RÍTMICAS (RSC) EN EL COLON DE RATONES CAF-STZ	60

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de las neuronas mientéricas basada en neurotransmisores.....25

Tabla 2. Efecto de HFD en el plexo mientérico.....31

Tabla 3. Propiedades Pasivas de la membrana celular y del potencial de acción de las neuronas mientéricas.....50

Tabla 4. Propiedades pasivas de la membrana celular y del potencial de acción de neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes derivados de tejidos colónicos.....53



ACRÓNIMOS

5-HT: Serotonina

ACh: Acetil colina

AGL: Ácido graso libre

AH: Afterhyperpolaritation

ATP: Adenosín trifosfato

CAF: Cafetería

CAF-STZ: Cafetería-estreptozotocina

CCK: Colecistoquinina

CO: Monóxido de carbono

CTRL: Control

DT2: Diabetes tipo 2

FBG: Glucosa sanguínea en ayuno

GALT: Tejido linfoide asociado al
tracto gastrointestinal

GI: Gastrointestinal

GIP: Péptido inhibidor gástrico

GLP-1: Péptido similar a glucagón

HFD: Dieta alta en grasa

I.P.: Intraperitoneal

I_A: Corriente transitoria rápida

ICC: Células intersticiales de Cajal

IDF: Federación Internacional de
Diabetes

I_K: Corriente de potasio transitoria
lenta

I_{Kv}: Corrientes de potasio
dependientes de voltaje

IMC: Índice de masa corporal

I_{NaV}: Corrientes de sodio

dependientes de voltaje

IPANs: Neuronas aferentes primaria
intrínseca

IPGTT: Prueba de tolerancia a la
glucosa intraperitoneal

ITT: Prueba de tolerancia a la insulina

K_{ITT}: Tasa de desaparición de
glucosa sanguínea

LPS: Lipopolisacáridos

mV: Milivoltios

NMDG: N- Metil glucosamina

NOS: Óxido nítrico sintasa.

NPY: Neuropeptido Y

pA: Picoamperio

PA: Potencial de acción

pF: Picofaradios

PGF: Grasa perigonadal

PPSE: Potenciales postsinápticos
excitatorios

PRF: Grasa Perirrenal

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RPMI: Roswell Park Memorial
Institute

RSC: Contracciones espontáneas
rítmicas

SCF: Grasa subcutánea abdominal.

SCFA: Ácidos grasos de cadena
corta

SEM: Error estándar de la media

SNA: Sistema nervioso autónomo

SNC: Sistema nervioso central

SNE: Sistema nervioso entérico

STZ: Estreptozotocina

TK: Taquininas.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

TTX: Tetrodotoxina

TTX-R: Corrientes resistentes a
tetrodotoxina

TTX-S: Corrientes sensibles a
tetrodotoxina

Vh: Potencial eléctrico constante

VIP: Péptido intestinal vasoactivo

WAT: Tejido adiposo blanco

WOF: Federación mundial de
obesidad

Resumen

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónica caracterizada por hiperglucemia, causada por la resistencia a la insulina. Entre sus principales factores de riesgo se encuentran el sobrepeso, la obesidad y el sedentarismo. Un aspecto clínicamente relevante pero poco comprendido es la alta incidencia de alteraciones en la motilidad gastrointestinal, presentes en cerca del 50% de los pacientes con DT2, lo que afecta negativamente su calidad de vida y aumenta los costos de atención médica. Este estudio se enfocó en investigar cómo la DT2 asociada a la obesidad impacta en las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores purinérgicos P2X, y en la función de la excitabilidad de las neuronas mientéricas, que regulan la motilidad intestinal. Para ello, se utilizó un modelo murino de DT2 alimentando a ratones C57BL/6J con una dieta tipo cafetería durante 21 semanas y administrándoles una inyección intraperitoneal de estreptozotocina. Posteriormente, se analizaron los efectos en la excitabilidad neuronal, contractilidad muscular y motilidad del colon. Se emplearon técnicas como Patch Clamp para registrar la actividad eléctrica de las neuronas mientéricas y propiedades farmacológicas de los receptores P2X, y de baño de órganos aislado para evaluar la contractilidad colónica. Los resultados demuestran que las neuronas mientéricas tipo S de ratones con DT2 o expuestas a sobrenadantes colónicos de estos animales presentaron una notable disminución en su excitabilidad, sin evidenciar cambios significativos en los receptores P2X. Además, se encontró una reducción significativa en las corrientes de sodio dependientes de voltaje (I_{NaV}), lo que sugiere un papel clave de estos canales en la disfunción neuronal. En conjunto, estos hallazgos apuntan a que la reducción en la excitabilidad neuronal y las I_{NaV} en las neuronas mientéricas podría ser mecanismos celulares que contribuyen a la dismotilidad colónica en pacientes con DT2 asociada a la obesidad.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is a chronic disease characterized by hyperglycemia caused by insulin resistance. Its main risk factors include overweight, obesity, and a sedentary lifestyle. A clinically relevant but poorly understood aspect is the high incidence of gastrointestinal motility disorders, present in approximately 50% of patients with T2D, which negatively affects their quality of life and increases healthcare costs. This study investigated how obesity-associated T2D impacts the electrophysiological and pharmacological properties of P2X purinergic receptors and the function of excitability myenteric neurons, which regulate intestinal motility. To this end, a murine model of T2D was used, feeding C57BL/6J mice a cafeteria-type diet for 21 weeks and administering an intraperitoneal injection of streptozotocin. Subsequently, the effects on neuronal excitability, muscle contractility, and colonic motility were analyzed. Patch clamp techniques were used to record the electrical activity of myenteric neurons and the pharmacological properties of P2X receptors, and isolated organ bath techniques were used to evaluate colonic contractility. The results demonstrate that S-type myenteric neurons from mice with T2D or exposed to colonic supernatants from these animals showed a notable decrease in excitability without significant changes in P2X receptors. In addition, a reduction in voltage-gated sodium currents (I_{NaV}) was found, suggesting a key role of these channels in neuronal dysfunction. Together, these findings indicate that the decrease in neuronal excitability and I_{NaV} in myenteric neurons could be cellular mechanisms that contribute to colonic dysmotility in patients with obesity-associated T2D.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 2 (DT2) es una enfermedad crónica caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia) como resultado principalmente de la resistencia a la insulina, y suele estar estrechamente relacionada con el sobrepeso y la obesidad. De hecho, alrededor del 85.2% de las personas con DT2 presentan sobrepeso u obesidad y las proyecciones indican que la prevalencia global de la diabetes podría alcanzar los 643 millones de casos en 2030 y los 738 millones en 2045 (Sun *et al.*, 2022).

Aunque está bien establecido que la obesidad contribuye al desarrollo de la DT2, el mecanismo exacto de esta relación aún no se comprende completamente. Se sabe que la obesidad induce un estado inflamatorio sistémico crónico de bajo grado que favorece la resistencia a la insulina (Wondmkun, 2020), pero los factores que inician este proceso siguen sin esclarecerse. Evidencias recientes sugieren que el inicio de este tipo de inflamación intestinal de bajo grado es producida por un alto consumo de grasa saturada y que puede presentarse incluso antes que la obesidad. Se ha demostrado que el consumo crónico de alimentos con altos niveles calóricos puede comprometer la integridad de la barrera epitelial del intestino, además de generar disbiosis y reducir la expresión de péptidos antimicrobianos en el intestino (Ding & Lund, 2011; Rohr *et al.*, 2020). En consecuencia, el epitelio intestinal al perder su integridad facilita el paso de componentes bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) hacia la circulación sanguínea, lo que conduce a una inflamación sistémica crónica que favorece la resistencia a la insulina (Duan *et al.*, 2018).

Los pacientes con obesidad y DT2 frecuentemente presentan trastornos gastrointestinales (GI), los cuales han sido reconocidos como una de las complicaciones más comunes de la diabetes (Zhao *et al.*, 2017). Entre los síntomas más reportados están la distensión y dolor abdominal, diarrea, estreñimiento e incontinencia fecal (Zhao *et al.*, 2017, Bharucha *et al.*, 2013; Le Pluart *et al.*, 2015;

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Taba Taba *et al.*, 2015). Aunque en muchos casos son inespecíficos, pueden llegar a afectar significativamente la calidad de vida y aumentar los gastos en salud.

Los mecanismos detrás de los trastornos GI son complejos y aún no se comprenden del todo. Estudios anteriores han señalado que la neuropatía autonómica podría desempeñar un papel clave (Dooley *et al.*, 1988; Jung *et al.*, 2003). Sin embargo, los pacientes con diabetes que no presentan neuropatía también experimentan síntomas GI (Bytzer *et al.*, 2001). Investigaciones en modelos murinos con dietas altas en grasas (HFD) han demostrado la pérdida de neuronas mientéricas que se ha relacionado con un retraso en el tránsito colónico (Anitha *et al.*, 2016; Beraldi *et al.*, 2015). Además, los intestinos gruesos de pacientes con diabetes mostraron una reducción significativa en el número de neuronas mientéricas con una reducción en el tamaño de los ganglios del plexo mientérico en comparación con los de personas sanas (Chandrasekharan *et al.*, 2011). También se ha observado una degeneración o pérdida de las células intersticiales de cajal (ICC) a lo largo del tracto GI en modelos animales y pacientes con DT2, lo que conlleva a una disminución de la actividad contráctil cíclica del intestino (Iwasaki *et al.*, 2006).

Adicionalmente, se ha planteado que la diabetes puede modificar canales iónicos en las neuronas mientéricas, alterando su excitabilidad y contribuyendo a los problemas de motilidad GI (Brasileiro *et al.*, 2019). Sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido profundamente estudiada. Por ello, el presente estudio examinó las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores P2X (canales catiónicos activados por ATP) y canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje, así como las propiedades de excitabilidad de las neuronas mientéricas y la contractilidad muscular intestinal para evaluar cómo la DT2 asociada a obesidad afecta la excitabilidad y las corrientes iónicas de las neuronas mientéricas y la motilidad intestinal. Observamos que los sobrenadantes colónicos de ratones con DT2 disminuyeron la excitabilidad de las neuronas mientéricas y las corrientes de Na⁺ dependientes de voltaje (I_{NaV}), sin afectar los receptores P2X. Estos hallazgos

sugieren un nuevo mecanismo que podría contribuir a la disfunción de la motilidad gastrointestinal en la diabetes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Diabetes tipo 2 asociada a la obesidad

La obesidad es una condición que se caracteriza por el incremento en la acumulación de la grasa corporal. El desarrollo de obesidad puede deberse a factores genéticos, psicológicos, ambientales y debido a una desregulación hormonal. Tradicionalmente se diagnostica mediante el índice de masa corporal (IMC) es $\geq 25 \text{ kg/cm}^2$ es considerado sobrepeso y $\geq 30 \text{ kg/cm}^2$ obesidad (April-Sanders *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2024). Sin embargo, el uso exclusivo del IMC no diferencia entre masa magra y grasas, por lo que la incorporación de datos antropométricos como la circunferencia de la cintura, porcentaje del tejido adiposo y niveles de triglicéridos en plasma surgen como medidas útiles para corroborar la presencia de obesidad (Rubino *et al.*, 2025).

Una de las principales causas asociadas al aumento en la incidencia de la obesidad es el consumo de HFD y también la falta de ejercicio físico (Jéquier, 2002). El consumo de HFD induce la obesidad en los humanos y ratones, sin embargo, no existen criterios claros, como en humanos, para determinar la obesidad en ratones. La mayoría de los investigadores establecieron que se podía determinar la obesidad utilizando una relación entre el peso corporal del animal con el peso de la grasa del grupo experimental contra un grupo control (Ghibaudi, *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2003; Avtanski *et al.*, 2019; Preguiça *et al.*, 2020).

Diversos estudios clínicos e investigaciones *in vivo* han confirmado una relación causal directa entre la obesidad y la diabetes tipo 2 (DT2) (Mohajan *et al.*, 2023; Rubino *et al.*, 2025). Aproximadamente el 80% de las personas con diabetes también presentan obesidad (Anand *et al.*, 2024). De manera alarmante, la

Federación Mundial de la Obesidad (WOF, por sus siglas en inglés), informó, que, en el 2023, al menos 2,603 millones de personas mayores de 5 años presentan obesidad y se estima que para el año 2030, alrededor del 60% de la población mundial tendrá sobrepeso u obesidad (WOF, 2023). Además, la Organización mundial de la salud (OMS) señala que la obesidad es responsable del 44% de los casos de DT2 y Según las proyecciones más recientes de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), se espera que el número de personas diagnosticadas con DT2 aumente a 643 millones en 2030 y a 783 millones en 2045 (IDF, consultado el 29 de enero de 2024).

Los mecanismos fisiopatológicos que subyacen la relación entre la obesidad y la DT2 aún no se comprende del todo. Es ampliamente reconocido que la obesidad se asocia con un estado inflamatorio sistémico crónico de bajo grado que promueve el desarrollo de resistencia a la insulina (Kanda *et al.*, 2006; Rubino *et al.*, 2025). Sin embargo, el origen de esta inflamación aún no está claro. La evidencia indica que la inflamación intestinal de bajo grado puede preceder a la aparición de obesidad (Ding *et al.*, 2010). Las HFD alteran el sistema de barrera intestinal al inducir disbiosis, reducir la expresión de péptidos antimicrobianos y proteínas de unión estrecha en el epitelio mucoso. Todos estos factores promueven una respuesta inflamatoria intestinal (Ding & Lund 2011; Rohr *et al.*, 2020). La barrera intestinal comprometida facilita la translocación de componentes bacterianos, como los LPS, a la circulación, lo que desencadena inflamación sistémica crónica, que junto con las células adiposas hipertrofiadas y la infiltración de macrófagos producen citocinas proinflamatorias circulantes, como TNF- α , que interfieren con la señalización de la insulina en diferentes tejidos, incluyendo el tejido adiposo, el hígado y el músculo, reduciendo la capacidad de estos tejidos a responder a la insulina, lo que lleva a un aumento de la glucosa en sangre (hiperglucemia), y, a largo plazo, a DT2 (Banerjee *et al.*, 2019)

La hiperglucemia crónica, característicos de la DT2, favorece la producción de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pueden causar daño celular y tisular. Esta respuesta inflamatoria y oxidativa desencadena una serie de efectos perjudiciales en diversos órganos y sistemas del cuerpo, contribuyendo al desarrollo de complicaciones como enfermedades cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y una mayor susceptibilidad a infecciones (Klein *et al.*, 2022). Muchas de estas complicaciones han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, uno de los sistemas menos explorado en este contexto es el tracto GI, a pesar de que recientemente se ha reconocido que los trastornos GI son una de las complicaciones más comunes de los pacientes con diabetes (Zhao *et al.*, 2017).

2.2 Aspectos anatomofisiológicos del tracto GI

El aparato digestivo está formado por el tracto GI y los órganos accesorios. El tracto GI se extiende desde la boca hasta el ano, está conformado por los siguientes órganos principales: la cavidad oral (boca), la faringe, el esófago, estómago, intestino delgado, grueso y el canal anal. Los órganos accesorios incluyen: los dientes, la lengua y los órganos glandulares (glándulas salivales, hígado, vesícula biliar y el páncreas) (Ogobuiro *et al.*, 2021).

El desarrollo del tracto GI comienza desde la tercera semana de gestación, durante la gastrulación. El endodermo forma el epitelio del tubo digestivo, el mesodermo da origen al tejido conjuntivo y músculo liso de la pared del tubo digestivo. La cresta neural, que proviene del ectodermo, forma el Sistema Nervioso Entérico (SNE) (Bhatia *et al.*, 2023)

Las funciones del tracto GI son la digestión del alimento, la absorción de los nutrientes necesarios para el funcionamiento del cuerpo y excretar los productos de desecho (Ogobuiro *et al.*, 2021)

Cada uno de los órganos principales y accesorios tienen un papel específico para lograr la función del tracto GI, las cuales son las siguientes:

La cavidad oral: recaba información sensorial del alimento antes de deglutirlo, realiza una disrupción mecánica de los alimentos con ayuda de los dientes y lengua. Las glándulas salivales secretan la saliva, la cual contiene mucina cuya función es lubricar el alimento, anticuerpos antimicrobianos y enzimas digestivas, como son, la lipasa y amilasa salival que participan en la digestión inicial de carbohidratos y lípidos (Said, 2018; Ogobuiro *et al.*, 2021).

Faringe: tiene como función dar paso al bolo alimenticio al esófago.

Esófago: transporta alimentos al estómago a través de ondas de contracción del musculo circular y longitudinal conocido como peristaltismo. La sección del esófago más cercana a la faringe contiene musculo esquelético, mientras que la parte más cercana al estómago contiene principalmente musculo liso. El paso del bolo alimenticio por la faringe y el esófago está controlado por el sistema nervioso involuntario a través de fibras aferentes y eferentes de los nervios glosofaríngeos y vago (Ogobuiro *et al.*, 2021).

Estómago: Una vez que el bolo alimenticio llega al estómago es descompuesto mediante acciones químicas y mecánicas. El estómago está formado por tres capas musculares que participan en la mezcla y agitación, esenciales para la formación del quimo (sustancia líquida y semidigerida del bolo alimenticio). Además, el epitelio está constituido por diferentes tipos celulares que participan en la digestión de los alimentos, que incluyen: células parietales que secretan ácido clorhídrico manteniendo el pH del estómago entre los valores de 1.5 a 2.0, el cual destruye a la mayoría de los microorganismos, desnaturaliza las proteínas y permite la activación del pepsinógeno a pepsina. Además, secretan factor intrínseco que contribuye a la absorción de Vitamina B12 necesaria para la formación de eritrocitos; células principales que secretan pepsinógeno, lipasa gástrica, moco y factor estimulante de colonias; células G producen y secretan la hormona gastrina, cuya regulación está dada por la somatostatina liberada por las células D; células foveolares elaboran moco para la protección de la mucosa gástrica y la reparación de lesiones y las células de mucosa del cuello liberan bicarbonato de sodio

protegiendo el revestimiento estomacal (Srikumar *et al.*,2003). Después de mezclarse en el estómago, el quimo pasa a través del esfínter pilórico y entra a los intestinos (Hillman *et al.*, 2017).

Intestino delgado: La mayor parte de la digestión y absorción de los nutrientes se da en el intestino delgado, la mucosa tiene vellosidades, las cuales tienen múltiples microvellosidades que aseguran una absorción óptima (Hillman *et al.*, 2017; Campbell *et al.*, 2019). El intestino delgado tiene tres segmentos, duodeno, yeyuno e íleon. El proceso de digestión ocurre en el duodeno cuando el quimo proveniente del estómago se mezcla con las secreciones del páncreas e hígado, mientras que la absorción de nutrientes como la glucosa ocurre principalmente en el epitelio del yeyuno e íleon (Hillman *et al.*, 2017). En el íleon se encuentra el esfínter ileocecal que controla el flujo del bolo desde íleon hacia el intestino grueso (Campbell *et al.*, 2019).

El intestino delgado contiene abundantes glándulas que participan en la digestión y absorción de nutrientes, así como, en la regulación hormonal. Las glándulas son:

- Glándulas de Brunner: Se encuentran en el duodeno en la capa de la submucosa. Secretan la hormona secretina, que estimula la secreción de moco y bicarbonato de sodio en el páncreas neutralizando el ácido clorhídrico proveniente del estómago.
- Glándulas de Lieberkühn: también conocido criptas de Lieberkühn o criptas intestinales. Estas glándulas se localizan en el revestimiento del intestino delgado y desempeñan una función importante en la producción y secreción del moco, así como la regeneración de las células epiteliales intestinales. En estas glándulas podemos encontrar los siguientes tipos celulares:
- Enterocitos: son las más abundantes y tienen como principal función la absorción de nutrientes, agua y electrolitos.
- Células caliciformes: están especializadas en la secreción de moco que actúa como una capa protectora del revestimiento intestinal.

- Células de Paneth: Se encuentran en la base de las criptas y secretan sustancias antimicrobianas como la lisozima y defensinas. Estas sustancias ayudan a proteger el intestino de una invasión microbiana.
- Células entero-endocrinas: Son células que secretan hormonas y péptidos que regulan diferentes funciones del sistema digestivo, como la secreción de hormonas pancreáticas, la motilidad intestinal y la absorción de nutrientes.

Existen varios tipos de células entero-endocrinas, tanto en el estómago como en el intestino delgado y grueso, son nombradas en base a la hormona o péptido que liberan, por ejemplo:

- Células G: liberan gastrina que aumenta la motilidad del intestino delgado, lo que ayuda a mover los alimentos a lo largo del tracto digestivo y la absorción de nutrientes, también la gastrina puede estimular la secreción de enzimas digestivas por parte del páncreas.
- Células S: liberan secretina que estimula la secreción de bicarbonato de sodio en el páncreas.
- Células I: o células entero-endocrinas y secretan péptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido similar a glucagón (GLP-1), hormonas que ayudan a regular la liberación de insulina en respuesta de niveles altos de glucosa en sangre.
- Células K: Secretan la hormona colecistoquinina (CCK), que estimula la contracción de la vesícula biliar, enzimas pancreáticas y la regulación del apetito en respuesta a grasa, aminoácidos y glucosa.
- Células L: secretan péptidos YY, que regulan la motilidad del intestino y actúan como inhibidores del apetito en respuesta a la glucosa y grasa.
- Células entero-cromafines: Secretan serotonina que participa en el peristaltismo intestinal.
- Células D: Secretan somatostatina, que inhibe la secreción de la hormona gastrina.
- Células entero-endocrinas productoras de motilina o célula M. Secretan motilina, que regulan la motilidad intestinal (Ogobuiro *et al.*, 2021; Crespo *et al.*, 2009).

En el duodeno se vierten las secreciones biliares producidas por el hígado que emulsifican los lípidos para una óptima digestión y absorción de éstos. Así como, las secreciones pancreáticas que contiene enzimas digestivas y bicarbonato de sodio para la neutralización del ácido gástrico (Hillman *et al.*, 2017). El material alimenticio no absorbido y no digerido avanza hacia el intestino grueso.

Intestino grueso o colon: es la última parte del tracto GI que va desde la unión ileocecal hasta el ano, dividido en ocho secciones, las cuales son: ciego, apéndice, colon ascendente, colon transversal, colon descendente, colon sigmoide, recto y conducto anal. Su principal función es la absorción de agua, electrolitos y vitamina K. Así como la excreción de los desechos no digeribles (Treuting *et al.*, 2018; Hugenholtz *et al.*, 2018). En el colon, se encuentra la mayor parte de la microbiota, la cual tiene múltiples funciones, como son la descomposición de los alimentos; producción de metabolitos que contribuyen a la salud del huésped, como los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que disminuyen el pH intestinal y aumenta la solubilidad de minerales esenciales como el calcio, el hierro, y el magnesio (Hillman *et al.*, 2017), los cuales tienen un rol importante en la salud humana (Coudray *et al.*, 2003); participan en la diferenciación y proliferación celular de la mucosa colónica al inducir la apoptosis, y brinda protección contra la colitis y el cáncer colorrectal (Hillman *et al.*, 2017).

Alteraciones de la microbiota se ha asociado a enfermedades en el tracto GI como la enfermedad de Crohn (Feng *et al.*, 2022), el desarrollo de cáncer colorrectal (Coker *et al.*, 2019), síndrome de colon irritable (Sundin *et al.*, 2020), una inflamación intestinal de bajo grado asociada a obesidad (Cani *et al.*, 2012).

Anatómicamente en humanos, el intestino grueso presenta estructuras como, la *taeniae coli* que son tres bandas de músculo liso longitudinal que están en la superficie externa del colon que facilitan el peristaltismo del intestino grueso; los apéndices omentales que son pequeñas masas de grasa que cuelgan a lo largo de las taenias, y las haustras, que son abultamientos que se producen a lo largo del intestino grueso (Hugenholtz *et al.*, 2018).

2.3 Morfología e histología de tracto GI

Los ratones se han convertido en el modelo más estudiado y utilizado en investigaciones relacionadas con el uso de fármacos (Vandamme, 2014) y conocer el papel de la dieta y la microbiota intestinal en distintas enfermedades (Hugenholtz *et al.*, 2018) por lo que resulta importante conocer sus diferencias en el intestino.

El intestino delgado en los ratones adultos mide aproximadamente 35 cm, mientras que en humanos adultos 700 cm. La mucosa del intestino delgado del ratón no tiene pliegues pronunciados mientras que la mucosa del humano contiene pliegues circulares conocidos como *plica circulares* que aumenta el área superficial de absorción (Treuting *et al.*, 2018).

El colon mide aproximadamente en promedio 7.0 cm de largo en los ratones adultos y 150 cm en humanos adultos (incluye el colon y ciego). El ciego del ratón mide de 3 a 4 cm de largo y funciona como un recipiente de fermentación microbiana mientras que en los humanos mide 6 cm de largo y no tiene una función bien definida como en el ratón, pero se atribuye participación en el proceso de fermentación de los nutrientes (Hugenholtz *et al.*, 2018). El colon del humano tiene haustras y en el ratón tiene una apariencia serosa y continua. Además, el colon de ratón se divide en tres segmentos donde la mucosa colónica presenta diferencias: el proximal, tiene pliegues transversales; el segmento intermedio presenta la mucosa plana y el distal con pliegues longitudinales. Mientras que, la mucosa del humano tiene pliegues transversales en todo el colon (Treuting *et al.*, 2018).

Las capas histológicas que conforman el intestino son similares en humanos y ratones. Del lumen hacia dentro se encuentran las siguientes capas: mucosa, submucosa, muscular externa (*muscularis propria*) y serosa (Ver Figura 2).

La capa de la mucosa contiene el epitelio, lámina propia y *muscularis mucosae*. La lámina propia está formada de tejido conjuntivo laxo, capilares, vasos linfáticos y células inmunitarias pertenecientes al tejido linfoide asociado al tracto GI (GALT).

El GALT, en roedores, se encuentra principalmente en el segmento intermedio del intestino delgado y en el ciego, disperso dentro de la lámina propia.

La capa de la submucosa está formada por glándulas secretoras de moco y el plexo nervioso submucoso o de Meissner, que regula las funciones secretomotoras.

La capa de la *muscularis propria* consta de dos capas de músculo, la capa más interna es el músculo circular y la externa el músculo longitudinal. Entre la capa de los músculos se encuentra el plexo nervioso mientérico o de Auerbach, seguido de un revestimiento seroso que cubre la mayor parte del tracto GI. (Treuting *et al.*, 2018).

2.4 Inervación del tracto GI

El tracto GI tiene una inervación extrínseca y una intrínseca. La inervación extrínseca corresponde a los nervios que provienen del Sistema Nervioso Autónomo (SNA), que es un componente del sistema nervioso periférico que controla los movimientos involuntarios de los músculos lisos y cardíacos, de tal manera que controla funciones como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la respiración, la excitación sexual y la digestión. Está constituido por dos clases de neuronas, una neurona preganglionar cuyos cuerpos celulares se ubican en el sistema nervioso central (SNC) y liberan el neurotransmisor acetilcolina (ACh) y una neurona posganglionar que inerva directamente el músculo liso y cardíaco, sus cuerpos celulares se ubican en ganglios autónomos o cerca del músculo que inervan. El SNA se divide anatómicamente en Sistema Nervioso Simpático y Sistema Nervioso Parasimpático.

La división simpática produce la respuesta de lucha o huida aumentando la presión arterial, frecuencia cardíaca y disminuyendo el peristaltismo. El cuerpo celular de las neuronas preganglionares simpáticas del tracto GI están ubicada en las columnas intermediolaterales o astas laterales de la medula espinal. Cuyas fibras presinápticas salen de la medula espinal a través de las raíces anteriores y se

proyectan hacia los nervios espinales torácico 1 (T1) a lumbar 2 (L2) para entrar a la cadena de ganglios paravertebrales donde puede ascender o descender haciendo sinapsis con neuronas posganglionares (Karemaker, 2017). Los nervios que inervan a las vísceras abdominales atraviesan el tronco paravertebral sin hacer sinapsis, convirtiéndose en los nervios espláncnicos mayor, menor y lumbar. Las fibras nerviosas de estos nervios hacen sinapsis con los ganglios prevertebrales que estén próximo al órgano diana. Los ganglios prevertebrales son: el ganglio celíaco, mesentérico superior e inferior. El ganglio celíaco inerva el esófago distal, estómago, duodeno proximal, páncreas, hígado, sistema biliar, bazo y glándulas suprarrenales. El ganglio mesentérico superior inerva el intestino medio, duodeno distal, yeyuno, íleon, ciego, apéndice, colon ascendente y colon transversal proximal y por último el ganglio mesentérico inferior inerva el colon transversal distal, descendente y sigmoideo, recto y canal anal (Figura 1A) (Waxenbaum, *et al.*, 2019).

La división parasimpática promueve los procesos de descanso y digestión mediante la disminución de la presión arterial, frecuencia cardíaca y el incremento del peristaltismo. Las fibras parasimpáticas salen del SNC a través de los nervios craneales III (oculomotor), VII (facial), IX (glossofaríngeo) y X (vago); así como por las raíces nerviosas sacrales 2 a 4. Las fibras nerviosas parasimpáticas que componen el nervio vago inervan la mayoría de las vísceras torácicas y abdominales. Mientras que las fibras parasimpáticas sacrales inervan el colon descendente, sigmoideo y recto (Figura 1B) (Waxenbaum, *et al.*, 2019).

Sistema Nervioso Simpático

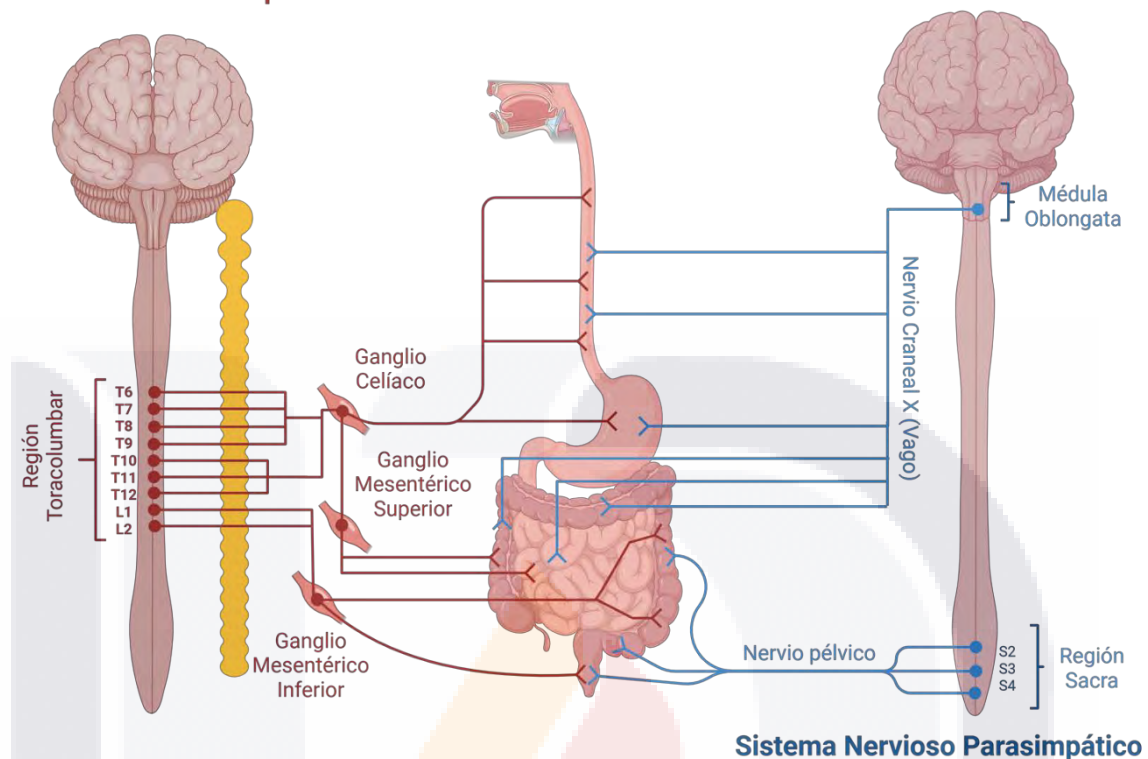


Figura 1. Inervación extrínseca del tracto GI. Sistema nervioso autónomo, parasimpático y simpático. Creado en <https://BioRender.com>.

El tracto GI tiene, además, un extenso sistema nervioso intrínseco conocido como Sistema Nervioso Entérico (SNE), el cual puede controlar las funciones del intestino incluso cuando está completamente separado del SNC. El SNE es una red compleja de ganglios interconectados por fibras neuronales, los cuales están dispuestos en dos plexos, el plexo submucoso y plexo mientérico. Estos plexos están formados por 400 a 600 millones de neuronas, células gliales entéricas y ICC (Furness, 2012). Las ICC son consideradas las células marcapasos del tracto GI, y se encargan de propagar activamente ondas lentas, que son despolarizaciones espontáneas cíclicas que regulan las contracciones del músculo liso (Patel *et al.*, 2022).

El plexo submucoso o de Meissner (llamado así por Georg Meissner, 1829-1905), ubicado principalmente en el intestino delgado y colon controla las funciones de la mucosa, como la secreción de electrolitos, la permeabilidad paracelular y la proliferación de células epiteliales intestinales (Furness, *et al.*, 2014).

El **plexo mientérico o de Auerbach** (llamado así por Leopold Auerbach, 1828-1897) recorre todo el tracto GI desde el tercer tercio del esófago hasta el recto, inerva las capas de músculo liso (músculo liso circular y longitudinal) (Figura 2) (Patel & Thavamani, 2023). Su principal función es controlar la motilidad GI.

Las neuronas del SNE se clasifican de acuerdo con su función en:

Neuronas aferentes primarias intrínsecas (IPANs): También llamadas neuronas sensoriales, constituyen aproximadamente la mitad de las neuronas del plexo mientérico, mientras que en el plexo submucoso constituyen solo un 10 al 15% de las neuronas. Responden a cambios químicos en el lumen intestinal y estímulos mecánicos como son la distorsión de la mucosa, el estiramiento radial y la contracción de los músculos intestinales. Son las primeras neuronas en los reflejos intrínsecos que influyen en los patrones de motilidad, la secreción de líquido a través del epitelio de la mucosa y el flujo sanguíneo local en el intestino delgado y grueso. Tienen corrientes iónicas bien definidas a través de las cuales se determina su excitabilidad y sus funciones en los circuitos nerviosos entéricos. Estos incluyen corrientes de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) dependientes de voltaje y corrientes de potasio (K^+) activada por Ca^{2+} . Por lo general, sus potenciales de acción presentan una hiperpolarización lenta prolongada que dura varios segundos tras la retirada del estímulo, por lo que se les denomina **neuronas tipo AH** (Afterhyperpolarization; Figura 3) (Costa, *et al.*, 2000). Las IPANs exhiben cambios a largo plazo en sus estados de excitabilidad que pueden ser inducidos por períodos prolongados de actividad de baja frecuencia en las entradas sinápticas y por mediadores inflamatorios. Estas entradas sinápticas son principalmente mediadas por sustancia P y taquicininas (Ren *et al.*, 2003). Estas células sensoriales han sido implicadas en cambios patológicos en la función entérica después de una inflamación intestinal (Furness, *et al.*, 2004).

Interneuronas: Se han identificado en todas las regiones del tracto GI, posiblemente, son las neuronas que más varían entre regiones del tracto, comparadas con la sensoriales y las motoneuronas. Son las encargadas de integrar la información generada por las IPANs y de enviar la información a las neuronas motoras. Se clasifican en ascendentes y descendentes, de acuerdo con la dirección de las señales que emiten (oral-anal). Se han descrito diversos tipos, siendo las ascendentes colinérgicas, formando cadenas que se extienden a lo largo del intestino (Furness, 2000). Al parecer estas interneuronas están implicadas en los reflejos locales. Las interneuronas descendentes tienen una mayor complejidad neuroquímica, inervan también el plexo submucoso y están involucradas en los reflejos secreto-motores, pero no directamente en los reflejos locales que controlan motilidad (Mazzone *et al.*, 2007).

Motoneuronas: Representan la conexión final motora con las células musculares lisas de la capa circular y longitudinal. Por el neurotransmisor que liberan se pueden clasificar en excitatorias e inhibitorias (Ver tabla 1) (Furness, 2000), y también se pueden subclasificar según la capa muscular a la que inervan (Costa, *et al.*, 2000). Los neurotransmisores de las excitatorias son mayoritariamente la ACh y las taquicininas. Los neurotransmisores de las neuronas inhibitorias son el óxido nítrico, el ATP, el péptido intestinal vasoactivo, el PACAP y el monóxido de carbono (CO). Por sus características electrofisiológicas se les clasifica como **neuronas 'S'** porque presentan potenciales de acción que carecen de una fase de hiperpolarización lenta y prolongada (Figura 3). Las motoneuronas del plexo submucoso se proyectan a la mucosa y a los vasos sanguíneos intestinales, y son las encargadas de regular la secreción de agua y electrolitos (neuronas secretomotoras) y del flujo sanguíneo (neuronas vasomotoras) (Furness, 2000).

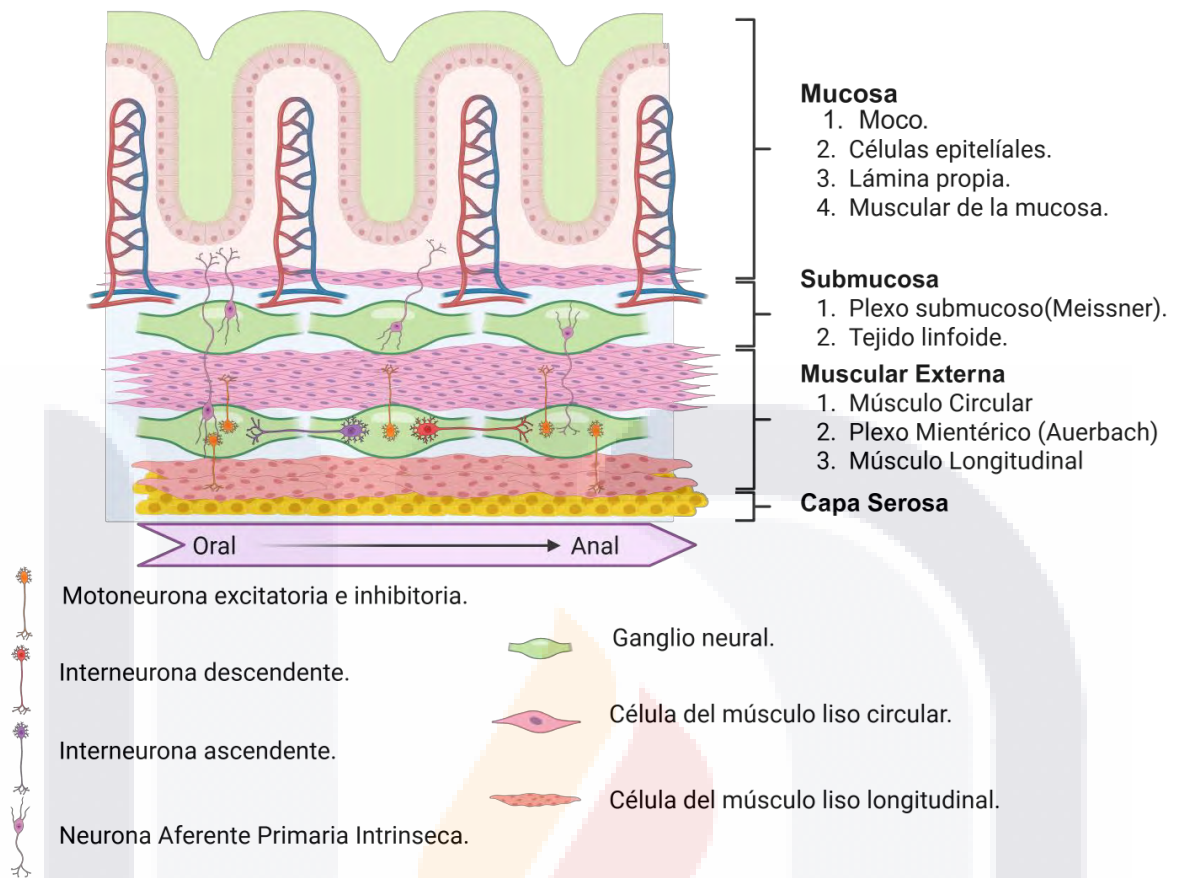


Figura 2. Capas e inervación intrínseca del tracto GI. Organización del SNE mostrando el plexo mientérico y submucoso, así como los principales tipos de neuronas que lo integran. Creado en <https://BioRender.com>.

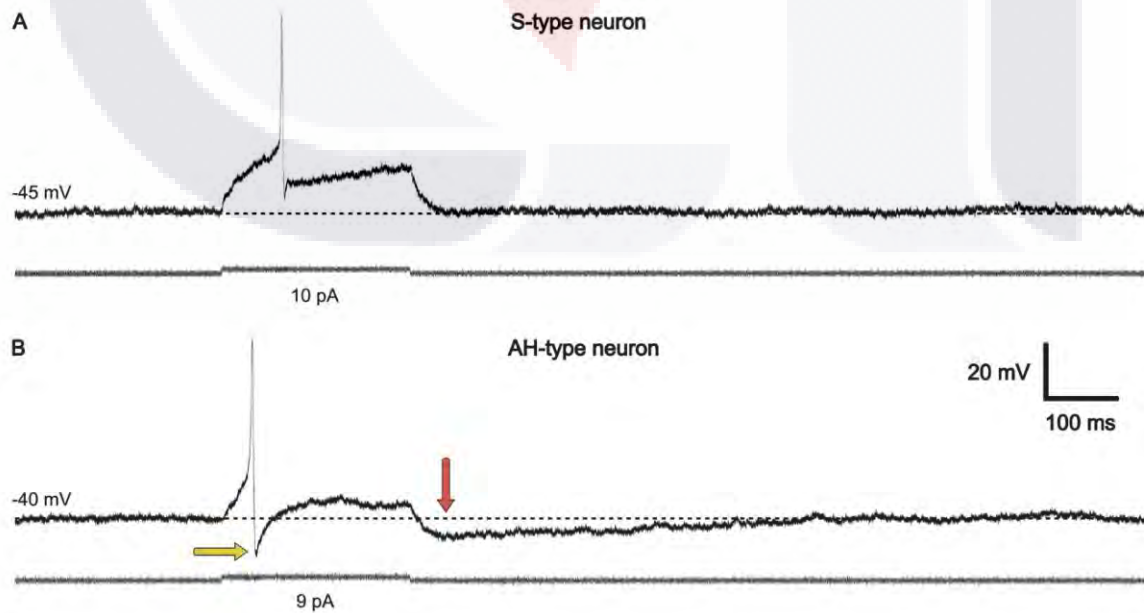


Figura 3. Clasificación de las neuronas mientéricas de acuerdo con las características del potencial de acción. **A)** Registro representativo de una neurona mientérica tipo S, inmediatamente del potencial de acción regresa a su potencial de membrana en reposo después de la estimulación. **B)** Registro representativo de una neurona mientérica tipo AH mostrando una hiperpolarización pronunciada inmediatamente después del potencial de acción (flecha amarilla) y una hiperpolarización prolongada que se mantiene después de quitar el pulso de corriente despolarizante (flecha roja). La línea discontinua en los registros representa el potencial de membrana en reposo.

Tabla 1. Clasificación de las neuronas mientéricas basada en neurotransmisores.

Tipo de neurona	Proporción	Principales Neurotransmisores
Motoneurona excitatoria del musculo circular	12 %	ACh, TK
Motoneurona inhibitoria del musculo circular	16%	NO, ATP, VIP, PACAP
Motoneurona excitatoria del musculo longitudinal	25%	ACh, TK.
Motoneurona inhibitoria del musculo longitudinal	~2%	NO, ATP, VIP PACAP
Interneuronas ascendentes (local)	5%	ACh
Interneuronas descendentes (local)	5%	ACh y ATP
Interneuronas descendentes (secreto motoras)	2%	ACh y 5-HT
Interneuronas descendentes (complejo mioeléctrico)	4%	ACh
Neurona aferente primaria intrínseca	26%	TK
Neurona intestinofugal	< a 1%	ACh

*ACh: Acetilcolina, TK: Taquicinina, NO: Óxido Nítrico, VIP: péptido intestinal vasoactivo, PACAP: Péptido activador de adenil ciclasa pituitaria, ATP: Trifosfato de adenosina, 5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina (Furness *et al.*, 2004).

2.5 Control de la motilidad GI por el plexo mientérico

Las capas musculares del tracto GI son responsables de dirigir tanto la propulsión como la mezcla del bolo alimenticio. La influencia del SNA y el SNE en estas funciones varía a lo largo del tubo digestivo y en diferentes condiciones fisiológicas (Shahrestani & Das, 2022).

En el esófago, se encuentran ganglios que forman parte del SNE; sin embargo, estos tienen una influencia limitada en el control de la motilidad, siendo el SNA el que desempeña un papel dominante en su regulación.

En el estómago, destaca la presencia de un plexo mientérico bien desarrollado cuya actividad es mayormente controlada por el nervio vago. Por otro lado, en el intestino delgado y grueso, el SNE tiene un papel preponderante en el control de diversos patrones de movimiento. Estos patrones incluyen, el peristaltismo, contracción de mezcla o segmentación y complejo mioeléctrico migratorio (Furness, 2014).

Las contracciones peristálticas son el resultado de una comunicación altamente coordinada entre las células del SNE. Todo comienza con la respuesta de las IPANs a estímulos químicos y mecánicos en la mucosa. Las IPANs establecen conexiones con interneuronas tanto ascendentes como descendentes en la capa muscular circular y longitudinal, las cuales integran la información sensorial y activan a las motoneuronas. Las interneuronas ascendentes estimulan a las motoneuronas excitatorias, que principalmente liberan ACh, lo que desencadena la contracción de las capas musculares lisas circular y longitudinal. A su vez, las interneuronas descendentes estimulan a las motoneuronas inhibitorias, liberando NO y ATP lo que produce la relajación de las capas musculares circular y longitudinal. En algunos casos, las IPANs establecen conexiones directas con las motoneuronas encargadas de desencadenar cambios en los patrones motores intestinales (Smith *et al.*, 2007; Furness, 2014; Mercado-Pérez *et al.*, 2022).

Los movimientos de segmentación desempeñan un papel fundamental al mezclar el contenido del bolo alimenticio, lo que favorece la absorción de nutrientes y agua (Patel & Thavamani, 2022), este movimiento tiene una apariencia de patrón de movimiento en cuadros o segmentos, el cual es completamente distinto a una actividad propulsora. Al inicio se propuso que el mecanismo que subyace el movimiento de segmentación es a través de la inhibición y excitación alternada de ambas capas de musculo liso del intestino delgado, reguladas por las neuronas mientéricas, sin embargo, un estudio realizado por Huizinga *et al.* (2014), demostró

que al inhibir la actividad de las neuronas mientéricas utilizando tetrodotoxina continua existiendo movimientos de segmentación del intestino delgado, los cuales son regulados por las ICC y células del musculo liso circular.

2.6 Receptores purinérgicos P2X en el plexo mientérico y su participación en la neurotransmisión y la motilidad intestinal

El Adenosín Trifosfato (ATP) es una molécula que almacena y transfiere energía en las células. No obstante, Geoffrey Burnstock propuso al ATP extracelular como un neurotransmisor. El cual actúa como ligando de los receptores purinérgicos, los cuales se clasifican en receptores P1 (activados por adenosina) y P2 (activados por ATP y otros nucleótidos). Los receptores P2 se subdividen a su vez en receptores P2X y P2Y. Los P2X son receptores ionotrópicos activados por ATP y los P2Y son receptores metabotrópicos que pueden ser activados por ATP, ADP o UTP (Burnstock,2014).

Los receptores P2X constituyen una familia de canales catiónicos, que se encuentran en la membrana plasmática y se activan por la presencia de ATP extracelular. La activación de los receptores P2X permite el flujo de cationes, facilitando la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} , así como la salida de K^{+} . Hasta la fecha se han identificado y clonado siete subunidades distintas de estos receptores, denominadas P2X1 a P2X7. Aunque todos los subtipos responden a ATP, su sensibilidad varía considerablemente, algunos, como el P2X1 y P2X3, presentan alta afinidad en el rango de nanomolar, mientras que otros como P2X2 y P2X4 requieren concentraciones en el rango micromolar, y el receptor P2X7 se activa a concentraciones elevadas en el rango de milimolar (North, 2002).

En las neuronas del plexo mientérico de roedores, se ha reportado la expresión de los receptores P2X2, P2X3, P2X4 P2X5 y P2X7 (Castelucci *et al.*,2002; Poole *et al.*, 2002; Nieto-Pescador *et al.*, 2014; Ruan *et al.*, 2005; Valdez-Morales *et al.*,2011). Específicamente, el receptor P2X2 se ha encontrado en el 25% de las neuronas mientéricas motoras inhibitorias inmunorreactivas para la enzima óxido nítrico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sintasa (NOS) y las IPANs (Castelucci *et al.*, 2002). El receptor P2X3 también ha sido identificado en motoneuronas inhibitorias que expresan NOS y en interneuronas positivas para calretinina. Por su parte, el receptor P2X5 se localiza en neuronas mientéricas inmunorreactivas para NOS, calbindina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Ruan *et al.*, 2005). Estudios adicionales han demostrado que las neuronas mientéricas cultivadas muestran una intensa inmunoreactividad para la subunidad P2X4 (Nieto-Pescador *et al.*, 2013). Asimismo, se ha demostrado por electrofisiología y PCR en célula única la expresión del receptor P2X7 en cultivos primarios de neuronas mientéricas de cobayo (Valdez-Morales *et al.*, 2011).

La evidencia experimental indica que los receptores P2X desempeñan un papel clave en la neurotransmisión en el plexo mientérico y en la neuromodulación presináptica y postsináptica de la unión neuromuscular que regula la motilidad GI. En estudio con ratones, la eliminación del gen que codifica para el receptor P2X2 resultó en la pérdida de los potenciales postsinápticos excitatorios (PPSE) rápidos inducidos por ATP que se relacionó con una alteración significativa en la peristalsis del íleon, sugiriendo que el receptor P2X2 participa activamente en la neurotransmisión entérica necesaria para el control adecuado del tránsito intestinal (Ren *et al.*, 2003).

Por otra parte, el mismo grupo de investigación identificó la localización predominante de los receptores P2X3 en las neuronas IPANs, y observó que su delección también afectaba negativamente la peristalsis intestinal en ratones (Bian *et al.*, 2003). Estas neuronas, que expresan P2X3, proyectan sus terminales hacia la submucosa y establecen conexiones sinápticas con interneuronas y neuronas motoras tanto en el plexo mientérico como en el submucoso. La aplicación de ATP, así como del agonista selectivo α , β -meATP, que activa los receptores P2X1, P2X3 y P2X2/3, induce la activación de las terminales submucosas de las IPANs. Esto respalda la hipótesis de que el ATP liberado por las células epiteliales de la mucosa actúa sobre los receptores P2X3 y P2X2/3 en las IPANs, participando en la detección de la distensión o del aumento de presión intraluminal que desencadena

el reflejo peristáltico (Burnstock, 2012). Estudios adicionales han confirmado la implicación funcional de estos receptores en la motilidad GI. Por ejemplo, en taenia coli de cobayo, la activación de P2X3 mediante α , β -meATP indujo relajación del músculo liso, efecto que fue bloqueado al aplicar el antagonista competitivo A-317491 (King, 2021).

Otro estudio demostró que, bajo condiciones fisiológicas, los receptores P2X7 localizados en las neuronas del plexo mientérico no tiene efectos sobre la motilidad del músculo longitudinal del colon en ratas. No obstante, en un contexto de inflamación intestinal severa, se observó un aumento significativo en la expresión del receptor P2X7 en las neuronas mientéricas y músculo liso longitudinal que se relacionó con el control inhibitorio de la motilidad del colon a través de la activación de neuronas motoras inhibitorias, evidenciando la participación del receptor P2X7 en la dismotilidad del colon en condiciones inflamatorias (Antonioli *et al.*, 2014). Además, otro estudio realizado en el colon de ratas utilizando BzATP se encontró que los receptores P2X4 y P2X7 están involucrados en la regulación del transporte iónico en células del musculo liso, sugiriendo que tienen un posible papel en la motilidad colónica (Ballout *et al.*, 2022).

2.7 Alteraciones del tracto GI reportadas en pacientes y modelos animales de obesidad y DT2

Los pacientes con obesidad y diabetes a menudo padecen trastornos GI, reconocidos recientemente como una de las complicaciones más comunes de la diabetes (Zhao *et al.*, 2017).

En un amplio estudio poblacional de pacientes con DT2 y control, se encontró que, independientemente de la obesidad y otros factores como el tabaquismo, la DT2 es un factor de riesgo para el desarrollo de esófago de Barrett, una patología adquirida producto del reflujo gastroesofágico crónico que provoca la lesión de la mucosa esofágica normal y su reemplazo por mucosa metaplásica, aumentando el riesgo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

para el desarrollo de adenocarcinoma esofágico (Iyer *et al.*, 2013). Asimismo, la DT2 ha sido asociada a alteraciones en el tránsito esofágico, como la disfagia, presente en aproximadamente en el 40 a 60 % de los pacientes (Smout *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2018).

Las personas con diabetes padecen también afectaciones en la motilidad del estómago, incluyendo el vaciamiento gástrico retardado (gastroparesia), movimientos posprandiales deteriorados a causa de alteraciones en la coordinación antro-duodenal, hipomotilidad antral y una presión pilórica aumentada (Thazhath *et al.*, 2013).

En el intestino delgado y grueso se ha reportado el incremento o disminución del tránsito intestinal. Los síntomas pueden ser distensión y dolor abdominal, diarrea, estreñimiento e incontinencia fecal (Marathe *et al.*, 2024). El síntoma más frecuente es el estreñimiento crónico afectando hasta el 60% de los pacientes con diabetes de larga evolución o con glucosa mal controlada (Ohlsson *et al.*, 2006). El estreñimiento crónico suele estar relacionado con diversas complicaciones, y si no se trata, puede progresar a afecciones más graves, como impactación fecal o perforación intestinal (Cui *et al.*, 2024). Estas complicaciones reducen significativamente la calidad de vida de las personas afectadas e imponen una carga económica considerable (Denisson *et al.*, 2005). Por lo tanto, la intervención oportuna es crucial para mitigar las consecuencias adversas asociadas al estreñimiento.

Los mecanismos que subyacen a la aparición y desarrollo de estos trastornos GI son complejos y aún se comprenden poco. Estudios previos han sugerido que la neuropatía entérica diabética es un factor crucial que afecta al sistema nervioso entérico (SNE) y los músculos el tracto GI (Abdalla, 2024). Al respecto, los pacientes con diabetes mostraron una marcada reducción en el tamaño del ganglio debido a la apoptosis y la pérdida de neuronas entéricas NOS, neuropéptido Y (NPY) y colina acetiltransferasa (ChAT) en comparación con individuos sanos (Chandrasekharan *et al.*, 2011). Además, se ha informado que la degeneración o pérdida de las ICC

en todo el tracto GI, tanto en modelos animales como en pacientes con DT2, lleva a una reducción en la frecuencia de las contracciones espontáneas cíclicas (Iwasaki *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2018; Marathe *et al.*, 2024).

Por otra parte, varios trabajos han reportado que las HFD causa perdida neuronal en el plexo mientérico. En la tabla 2, se enlistan estos estudios.

Tabla 2. Efecto de HFD en el plexo mientérico.

Modelo de obesidad	Efecto de la dieta alta en grasas	Duración de la dieta	Referencia
Ratones C57BL/6J. HFD (24% grasa)	Pérdida de neuronas mientéricas de íleon y colon.	24 semanas	Voss <i>et al.</i> , 2013
Ratones C57BL/6J HFD (72% grasa)	Disminución de tamaño del soma y perdida de neuronas (NOS y ChAT) del plexo mientérico del duodeno	20 semanas.	Stenkamp <i>et al.</i> , 2013
Ratones C57BL/6J HFD (60% grasa)	Reducción significativa de neuronas nNOS y ChAT en el plexo mientérico del colon proximal	11 semanas	Nezami <i>et al</i> 2014
Ratones C57BL/6J HFD (24% grasa)	Pérdida de neuronas mientéricas del íleon, ciego y colon	33 semanas	Rivera <i>et al.</i> , 2014
Ratones Swiss Dieta de 72% grasas	Disminuye densidad población neuronal del colon distal.	8 semanas y 17 semanas	Beraldi <i>et al.</i> , 2015
Ratones Swiss HFD (72% grasas)	Incremento de la densidad de neuronas mientéricas positivas a NOS en yeyuno e íleon.	8 semanas	Soares <i>et al.</i> , 2015
Ratones C57BL/6J Machos Dieta Western (34% grasa)	Promueve una pérdida de neuronas mientéricas NOS en el colon, causando un retraso del tránsito intestinal	12 semanas	Reichardt <i>et al.</i> , 2017
Ratones C57BL/6J HFD (45% grasa)	Perdida de neuronas mientéricas NOS acompañada de reducida excitabilidad del músculo liso y motilidad intestinal	8 semanas	Nyavor <i>et al.</i> , 2021

3. JUSTIFICACIÓN

La DT2 asociada a la obesidad representa un grave problema de salud pública en México, al estar vinculada con múltiples complicaciones a largo plazo y generar costos económicos considerables para el sistema de salud. Entre las diversas complicaciones, los trastornos gastrointestinales han sido los menos estudiados, a pesar de su alta prevalencia y de representar una causa importante de morbilidad, costos de atención médica, un desafío diagnóstico y terapéutico. Por consiguiente, las disfunciones gastrointestinales en paciente con DT2 asociada a la obesidad es un área de investigación emergente con importantes implicaciones para la comprensión de las interacciones del eje intestino-enfermedades metabólicas.

Este estudio busca profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los trastornos de la motilidad intestinal en la DT2 asociada a obesidad, con un especial énfasis en el plexo mientérico, red nerviosa responsable del control de los patrones motores del intestino, y en los receptores P2X, reconocidos como actores moleculares clave en la neurotransmisión y la regulación de la motilidad intestinal, así como en los canales iónicos de sodio y potasio dependientes de voltaje, esenciales para la generación del potencial de acción y la excitabilidad neuronal.

El conocimiento nuevo generado en este trabajo contribuirá a un mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la disfunción de la motilidad intestinal, lo que podría abrir nuevas perspectivas en la identificación de blancos terapéuticos. Por lo tanto, este estudio podría tener un impacto en la medicina traslacional, con miras a mejorar la salud de las personas con DT2.

4. HIPÓTESIS

En un modelo murino de DT2 asociada a obesidad, las neuronas del plexo mientérico presentan alteraciones en su excitabilidad como consecuencia de una disfunción en la señalización mediada por los receptores P2X y los canales iónicos dependientes de voltaje, lo que podría estar contribuyendo en parte a los trastornos en la motilidad intestinal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar electrofisiológica y farmacológicamente los receptores P2X en neuronas mientéricas de ratones diabéticos

5.2 Objetivo específico

1. Establecer y validar el modelo experimental de diabetes tipo 2.
2. Caracterizar las corrientes activadas por ATP en neuronas mientéricas derivadas de los ratones C57BL/6 control y diabéticos.
3. Caracterizar la respuesta farmacológica de los receptores purinérgicos P2X en neuronas mientéricas derivadas de ratones C57BL/6 control y diabéticos utilizando distintos agonistas y antagonistas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Modelo murino de DT2 asociada a la obesidad

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, adquiridos en la empresa "Círculo AND" S.A. de C.V. (Ciudad de México, México). Los protocolos experimentales con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las normas de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y fueron revisados y aprobados por

el Comité de Ética en la Enseñanza e Investigación con Animales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA) con el número de acreditación INV 010/2023. Los animales fueron alojados en condiciones controladas a temperatura ambiente (23-25°C), con acceso *ad libitum* a agua y alimento, y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

El modelo murino de DT2 inducido mediante la administración de la dieta de cafetería seguida de una inyección intraperitoneal (I.P.) de 100 mg/Kg de estreptozotocina (STZ), es un modelo que imita fielmente el desarrollo de la DT2 asociada a la obesidad en humanos y ha sido utilizado comúnmente en la literatura debido a que se desarrolla resistencia a la insulina con una disfunción leve en las células β -pancreáticas sin comprometer en su totalidad la secreción de insulina (Reed *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2017; Cruz-Muñoz *et al.*, 2024).

Para llevar a cabo el modelo DT2 asociado a obesidad, veinte ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos con 5 ratones por jaula: un grupo fue designado como control (CTRL) y el otro como cafetería-estreptozotocina (CAF-STZ). El grupo CTRL fue alimentado con una dieta estándar (Nutricubo, Purina®), que contenía 49% de carbohidratos, 3% de grasa y 23% de proteína con un aporte calórico de 2.46 kcal/g. El grupo CAF-STZ fue alimentado con una dieta tipo cafetería, preparada de manera casera con paté de cerdo (Spam-classic®), tocino (FUD), papas fritas (Sabritas® originales con sal), galletas (Marías Gamesa®) y chocolate líquido (Hershey's® sabor a chocolate) en una proporción de 2:1:1:1:1, respectivamente, además de alimento estándar, con un aporte nutricional de 39% de carbohidratos, 49% de grasa, 12% de proteína y 513.3 mg de sodio (3.72 kcal/g), como fue descrito anteriormente (Cárdenas-Perez *et al.*, 2018).

En la sexta semana después de iniciar la dieta tipo cafetería, los ratones del grupo CAF-STZ recibieron una inyección I.P. de STZ a una dosis de 100 mg/kg, disuelta en buffer de citrato 0.1 M (pH= 4.5), mientras que al grupo CTRL se inyectó I.P. únicamente el buffer de citrato en un volumen de 0.25 ml/kg. Ambos grupos continuaron con sus respectivas dietas hasta completar 21 semanas.

La ingesta de alimento se midió por jaula y el consumo diario se calculó restando el alimento sobrante de la cantidad proporcionada y dividiéndolo entre el número de ratones para estimar la ingesta individual. Los gramos consumidos se convirtieron a ingesta calórica utilizando la densidad calórica conocida de la dieta, y los datos se expresaron como ingesta calórica promedio semanal. El peso corporal se midió individualmente una vez por semana, el mismo día por la mañana.

6.2 Evaluación de los niveles de glucosa sanguínea y prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa e insulina

Antes de medir los niveles de glucosa en sangre, los ratones fueron sometidos a un ayuno de 8 horas con acceso libre al agua. Los niveles de glucosa sanguínea en ayuno (FBG) se midieron cada dos semanas mediante una punción en la punta de la cola, utilizando tiras reactivas de glucosa Freestyle Optimum marca Abbott y el glucómetro Freestyle Optimum, Abbott.

A las 20 semanas de haber iniciado la dieta, se realizaron la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) y la prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Para la IPGTT, los ratones recibieron una inyección I.P. de D-glucosa al 20% (2 g/Kg), y los niveles de glucosa se midieron a partir de muestras de sangre obtenidas de la cola antes y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de la D-glucosa. El área bajo la curva de la IPGTT se calculó restando la glucosa basal para estimar la tolerancia a la glucosa de la misma manera que lo realizó Virtue y colaboradores (2021).

Para la ITT, a los ratones se les administró vía I.P. insulina (0.5 UI/kg) y se tomaron muestras de sangre de la cola antes y a los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos después de la inyección de insulina.

El índice K_{ITT} se calculó para evaluar la resistencia a la insulina. Este índice se obtiene mediante el análisis de mínimos cuadrados de las concentraciones de glucosa desde 0 hasta 15 minutos después de la inyección de insulina en la curva

de ITT, utilizando la siguiente ecuación: $K_{ITT} = (0.693/t^{1/2}) \times 100$. Donde $t^{1/2}$ es el tiempo requerido para reducir la glucosa basal a la mitad. Un valor de K_{ITT} menor a 1.5%/min se considera indicativo de un estado de resistencia a la insulina.

El colon se cortó en tres secciones de aproximadamente 1-2 cm: la sección distal se utilizó para generar sobrenadantes, la sección media del colon se empleó para realizar cultivos primarios de neuronas mientéricas y la sección proximal del colon se destinó a ensayos de motilidad.

6.3 Evaluación de la motilidad propulsiva

Para determinar la motilidad intestinal, se midió la duración total del tránsito GI y la frecuencia de la defecación durante la última semana del protocolo experimental.

Para evaluar la duración total del tránsito GI, los ratones CTRL y CAF-STZ recibieron 0.1 ml de azul de Evans al 5 % en NaCl al 0.9 % con metilcelulosa al 0.5 % por sonda oral. El tránsito total del GI se definió como el intervalo desde la administración de la solución de azul de Evans hasta la expulsión del primer excremento de color azul.

Para medir la frecuencia en la producción fecal, cada ratón se colocó en una jaula vacía y limpia con una fuente de agua durante una hora, y se contó el número de heces para examinar la frecuencia de la defecación. Se recogieron y pesaron las heces para calcular el peso fresco húmedo promedio. Las heces se secaron durante la noche a 60 °C y se pesaron de nuevo para obtener el peso seco. El contenido de agua se calculó a partir de la diferencia entre el peso húmedo y el seco, expresado en porcentaje.

6.4 Disección del tejido adiposo blanco y colónico.

Al terminar el protocolo experimental de alimentación de 21 semanas, los ratones se mantuvieron en ayuno durante 8 h, se anestesiaron con isoflurano inhalado y, posteriormente, se les practicó eutanasia mediante dislocación cervical. Se recogió

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y pesó tejido adiposo blanco (WAT) de la grasa perigonadal (PGF), la grasa perirrenal (PRF) y la grasa subcutánea abdominal (SCF), como se describió previamente (Tan *et al.*, 2018).

Tras la disección del colon completo, las muestras de colon fueron fotografiadas y enjuagadas a fondo con solución de Krebs modificada fría y oxigenada (en mM: 126 NaCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 5 KCl, 25 NaHCO₃, 11 glucosa) utilizando una jeringa para eliminar el contenido fecal residual. Los tejidos limpios se secaron con una toalla de papel y se pesaron para su posterior análisis. El colon fue cortado en tres secciones de aprox. 1-2 cm: la sección distal se utilizó para generar sobrenadantes, la sección del colon medio se utilizó para realizar cultivos primarios de neuronas mientéricas y la sección del colon proximal se utilizó para ensayos de contractilidad.

6.5 Ensayos de contractilidad del colon en baño de órgano aislado.

Se extrajeron 2 cm del colon proximal de ratones CTRL y CAF-STZ y se colocaron en cámaras de baño de órganos (50 ml) con solución de Ringer-Tyrode (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 CaCl₂, 1.0 MgSO₄·7H₂O, 11.9 NaHCO₃, 0.4 NaH₂PO₃, 5.5 glucosa, pH 7.4). El baño se burbujeó constantemente (95 % O₂, 5 % CO₂) para oxigenar el tejido y se mantuvo a 37 °C. Cada segmento de colon se montó en dirección oro-aboral con ligaduras de seda en ambos extremos, cerrando el lumen del segmento. Una ligadura se fijó al fondo de la cámara, mientras que la otra se conectó a un transductor de fuerza TSD125 C de 50 g (Biopac System Inc., Santa Bárbara, CA, EE. UU.) conectado a un amplificador DA100C (Biopac System Inc.). Los cambios en la fuerza isométrica se registraron en un sistema de adquisición de datos MP150 (Biopac System Inc) y se analizaron con el software Acknowledge 4.1. Los tejidos colónicos se estiraron utilizando 1 g de tensión y se dejaron equilibrar durante 60 min con perfusión continua con solución oxigenada de Ringer-Tyrode. Se registraron las contracciones espontáneas rítmicas (RSC), o contracciones fásicas. Luego, los tejidos se lavaron tres veces durante 3 minutos antes de agregar KCl (80 mM) para evaluar la viabilidad tisular.

6.6 Obtención de sobrenadantes de tejidos colónicos de ratones CTRL y CAF-STZ.

El tejido del colon distal (1-2 cm) se cortó en pequeños fragmentos de aproximadamente 5 mm de longitud y se incubó toda la noche en 200 µl de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contenía 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomicina y 10% de suero bovino fetal (FBS). Después de este período de incubación, los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80°C. Para los experimentos, se combinaron 100 µl de sobrenadantes con 900 µl de medio de Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F12) suplementado con 10 % de FBS.

6.7 Cultivos primarios de neuronas mientéricas de colon

Se utilizaron ratones nuevos sin experimentación, CTRL y CAF-STZ para realizar cultivos primarios de neuronas mientéricas de colon. Se extrajo un segmento de aproximadamente 2 cm del colon medio, el cual se colocó en solución de Krebs fría y oxigenada, y se cortó longitudinalmente. Luego, se diseccionaron las capas mucosa y submucosa de este segmento y se recolectó la capa muscular externa con el plexo mientérico.

La capa muscular externa se disgregó mediante un tratamiento secuencial con dos soluciones enzimáticas. La primera solución contenía papaína (0.1 ml/ml) y L-cisteína (0.4 mg/ml), y la segunda colagenasa D (1 mg/ml) y dispasa II (4 mg/ml). Las enzimas fueron lavadas con solución salina de Hank (HBSS) y las células disociadas se sembraron en cubreobjetos redondos recubiertos con Poli-L-Lisina (1 mg/ml). Las células se mantuvieron en medio DMEM/F12 con 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomicina. Luego, se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ y 95% O₂ a 37°C durante toda la noche.

6.8 Registros electrofisiológicos con la técnica de Patch Clamp

Medición de la excitabilidad neuronal

La excitabilidad neuronal se definió como la capacidad de las neuronas para responder a un estímulo modificando su potencial de membrana y activando potenciales de acción. La excitabilidad neuronal se evaluó midiendo la corriente mínima requerida para generar un potencial de acción, denominada reobase, y el número de potenciales de acción disparados al doble de la reobase.

Se cultivaron neuronas mientéricas de ratones CTRL y CAF-STZ o neuronas de ratones nuevos sin experimentación incubadas con sobrenadantes provenientes de tejidos colónicos de ratones CTRL y CAF-STZ durante 16-18 horas en cubreobjetos redondos. Después de ese período de incubación, los cubreobjetos se colocaron bajo un microscopio invertido y las células se visualizaron para llevar a cabo la técnica de Patch Clamp, la cual consiste en acercar una micropipeta de vidrio, que contiene un electrodo de registro, a la membrana celular para realizar un sello entre la pipeta y los lípidos de la membrana. Una vez que se tiene el sello, se espera unos minutos para que la anfotericina (0.24 mg/ml) contenida en la micropipeta produzca poros pequeños en la membrana para permitir el acceso eléctrico a la célula sin alterar su interior lo que se denomina parche perforado. Con la configuración parche perforado, la reobase se determinó aplicando pasos de pulso de corriente despolarizante, comenzando con una inyección de -1.0 pA durante 250 ms y aumentando gradualmente 1 pA hasta que se observa un potencial de acción.

Las células fueron perfundidas continuamente con una solución externa estándar que contenía (en mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES y 10 D-glucosa, con pH ajustado a 7.4 con NaOH, y la solución interna de la micropipeta contenía (en mM): 110 K-gluconato, 30 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂ y 10 HEPES, con pH ajustado a 7.3 mediante KOH. Las micropipetas se fabricaron utilizando capilares de vidrio de borosilicato de pared gruesa (Cat. No. 1B200F-6; World Precision Instruments) utilizando un microscopio/ pulidor PB-7 (Narishige, Inc.) quedando una resistencia de la micropipeta de 2-3 MΩ. Las señales eléctricas se amplificaron con

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un amplificador Axopatch 200B y digitalizaron con un convertidor A/D Digidata 1322A (Axon Instruments).

Para determinar la participación de los receptores P2X en la excitabilidad de las neuronas mientéricas, las células fueron incubadas con el agonista ATP- γ -S (100 μ M) y el antagonista PPADS (10 μ M) durante toda la noche junto con los sobrenadantes de los ratones CTRL y CAF-STZ. El antagonista se aplicó 30 min antes de aplicar el agonista y los sobrenadantes.

Medición de las corrientes inducidas por ATP

Las corrientes inducidas por ATP (I_{ATP}) se midieron también utilizando la técnica de Patch Clamp en la configuración de célula completa en su modalidad fijación de voltaje con el amplificador Axopatch 200B digitalizado por el convertidor AD Digidata 1322A. Las neuronas mientéricas se perfundieron con una solución externa que contenía (en mM): NaCl, 160; glucosa, 11; HEPES, 4.8; CsCl, 3; $CaCl_2$, 1; con un pH entre 7.3-7.4 ajustado con NaOH. La solución interna contenía (en mM): CsCl, 140; NaCl, 5.5; EGTA, 10; HEPES, 5; Na-ATP, 4.5; GTP-Na 0.1 y se ajusta el pH a 7.3-7.4 con CsOH. El potencial de membrana se fijó a -60 mV. El ATP (0.1-1000 μ M) se aplicó frente a la célula con un dispositivo de 8 microtubos que se mueve con un micromanipulador (WR-88; Narishigue Scientific Instrument Lab). El ATP fue lavado por el regreso a la solución control. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente.

Medición de las corrientes de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje

Se utilizó el modo de fijación de voltaje con la configuración parche perforado para medir las corrientes de sodio (I_{NaV}) y potasio (I_{KV}) dependientes del voltaje de neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes CTRL y CAF-STZ. Para las I_{NaV} , se utilizó la solución externa de cesio/sodio, que contenía 85 mM de CsCl, 55 mM de NaCl, 2 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$, 0.1 de $CdCl_2$, 5 mM de D-glucosa y 10 mM de HEPES, con un pH ajustado a 7.3-7.4 con NaOH, y la solución de la

pipeta interna contenía 110 mM de CsMeSO₃, 30 mM de CsCl, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 4 mM de ATP-Mg, 0.1 mM de GTP-Na y 10 mM de EGTA, se ajustó el pH 7.2 con CsOH. La solución externa estándar se intercambió por la solución de cesio/sodio tras obtener el parche perforado. Las células fueron perfundidas durante 10 min con la solución de cesio/sodio para asegurar un intercambio adecuado de la solución; transcurrido este tiempo, se registraron las I_{NaV} totales utilizando un potencial sostenido (V_h) de -100 mV, con una duración 200 ms e incrementos de +10 mV entre -80 y +40 mV y una frecuencia de muestreo de 20 kHz y filtrado a 5 kHz. El tiempo entre potenciales para permitir la recuperación de las I_{NaV} fue de 300 ms. El mismo protocolo se utilizó para obtener la I_{NaV} resistentes a TTX (TTX-R), después de 3 min de perfusión con 1 μ M de TTX. Para calcular la amplitud de la I_{NaV} sensible a TTX (TTX-S), se substrajo el pico de la amplitud de las I_{NaV} TTX-R del pico de la amplitud de la corriente total de NaV ($I_{Total NaV}$).

Para las I_{Kv} , se utilizó la solución externa conteniendo 140 mM de NMDG, 4 mM de KCl, 1 mM de CaCl₂, 1 mM de MgCl₂, 1.8 mM de HEPES y 1 mM de D-glucosa, con un pH ajustado a 7.4 con HCl. La composición de la solución de la pipeta interna fue la misma que la utilizada en los experimentos de excitabilidad. Una corriente transitoria de tipo A (I_A) y una corriente de tipo rectificador retardado sostenida (I_K) se separaron por sus propiedades de inactivación. Las I_{Kv} se obtuvieron con un potencial de membrana sostenido de $V_h = -100$ mV para la corriente total de Kv ($I_{Total Kv}$) y de -40 mV para I_K con pulsos de voltaje de 500 ms entre -90 y + 50 mV. El tiempo entre potenciales para permitir la recuperación de las I_{Kv} fue de 900 ms. La amplitud de I_K se midió al final de cada paso de voltaje, y la I_A se obtuvo al inicio (pico) de los registros, generadas al restar I_K de $I_{Total Kv}$. Las corrientes se normalizaron según la capacitancia de la célula y se presentaron como densidad de corriente (pA/pF).

6.9 Análisis estadístico

Todos los datos numéricos están presentados como la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM). El número de experimentos realizados se designa como "n".

El peso corporal, la ingesta calórica, la curva FBG y las curvas de las corrientes de N_{av} y K_v fueron analizados mediante ANOVA de dos vías con la prueba post hoc de Bonferroni. Para la comparación entre dos grupos, se utilizó la prueba t de Student para muestras independientes. Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism 8.0 y fueron considerados estadísticamente diferentes cuando $P < 0.05$. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson (r) para evaluar la correlación entre las medidas de excitabilidad neuronal y la motilidad del colon.

7. RESULTADOS

7.1 Los ratones CAF-STZ desarrollaron obesidad y DT2

Los ratones del grupo CAF-STZ exhibieron en promedio un peso corporal significativamente mayor que los ratones del grupo CTRL a partir de la semana 11 y hasta el final del protocolo dietético (21 semanas). Para la semana 21, el peso corporal promedio del grupo CTRL fue de 25.11 ± 0.43 g, mientras que para el grupo CAF-STZ fue de $34.65 \text{ g} \pm 1.68$, observándose un aumento de aproximado del 37% en comparación con el grupo CTRL ($P < 0.0001$; Figura. 4A). El consumo calórico registrado durante las 21 semanas fue mayor en el grupo CAF-STZ comparado con el grupo CTRL, siendo aproximadamente el doble que el grupo CTRL ($P < 0.0001$; Figura 4B).

El aumento del peso corporal observado en el grupo CAF-STZ estuvo acompañado por un incremento en el WAT. A las 21 semanas de iniciar la dieta, el peso de la grasa PGF, PRF y SCF en relación con la masa corporal fue 5, 3 y 6 veces mayor, respectivamente, en el grupo CAF-STZ en comparación al grupo CTRL ($P < 0,001$; Fig. 4C), demostrando que los ratones CAF-STZ presentaron un aumento de peso

asociado con una acumulación de grasa visceral, lo cual es un indicador característico de obesidad.

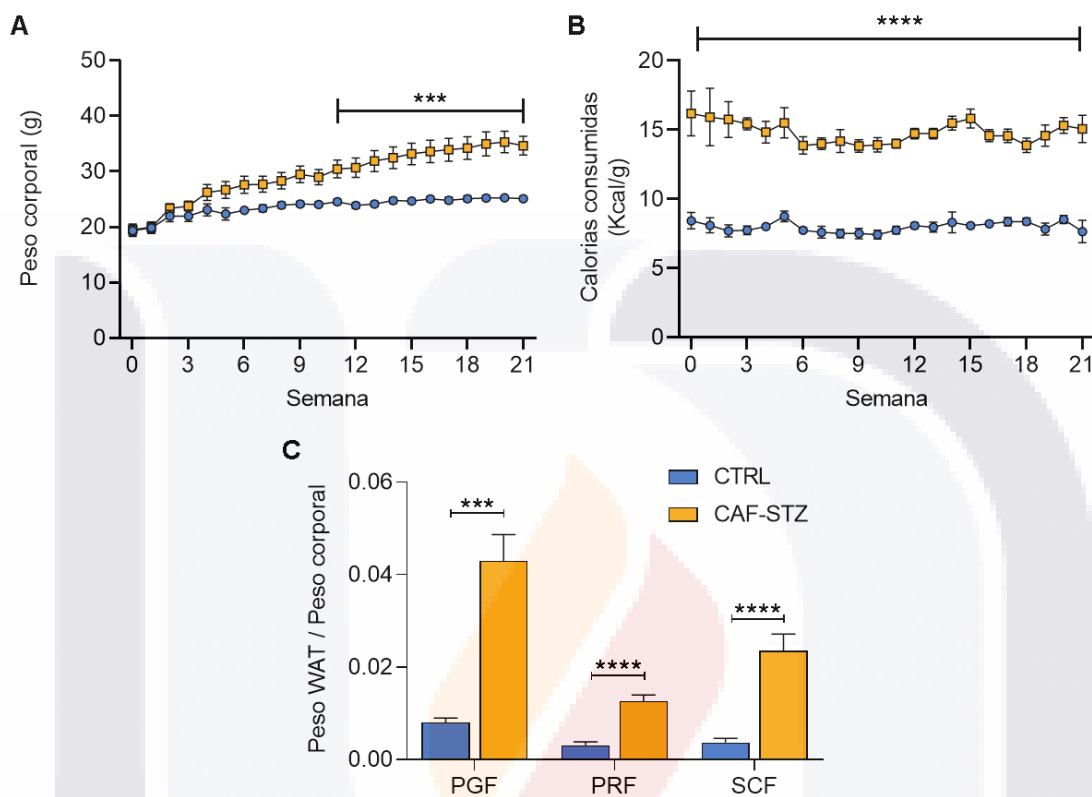


Figura 4. Los ratones CAF-STZ desarrollaron características fenotípicas de obesidad. **A)** Peso corporal promedio semanal de ratones macho C57BL/6J. **B)** Ingesta calórica semanal promedio. **C)** Peso del tejido adiposo blanco (WAT) de la grasa perigonadal (PGF), perirrenal (PRF) y subcutánea abdominal (SCF) en proporción al peso corporal. Los datos están expresados en media $\pm$ SEM. $n = 14$ ratones CTRL y $n = 13$ ratones CAF-STZ. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ mediante ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Bonferroni en los incisos A y B y prueba de t -student no pareada en el inciso C.

Para determinar alteraciones en la homeostasis del metabolismo de la glucosa, se evaluaron los niveles de FBG, tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. Los ratones CAF-STZ mostraron un aumento significativo en los niveles de FBG a partir de la novena semana de iniciar la dieta (CAF-STZ: 227 ± 14.4 mg/dl vs. CTRL: 154 ± 7.2 mg/dl) y persistió hasta el final del protocolo (CAF-STZ: 262 ± 16.2 mg/dl vs. CTRL: 150 ± 7.8 mg/dl; Fig. 5A). La tolerancia a la glucosa se evaluó mediante IPGTT y se demostró que 120 min después de la carga de glucosa, la glucosa

circulante permaneció elevada en ratones CAF-STZ mientras que había regresado a los niveles basales en los ratones CTRL (Fig. 5B). El área bajo la curva se calculó a partir de IPGTT y fue notablemente más significativa en el grupo CAF-STZ (20735 ± 3689) que en el grupo CTRL (10089 ± 2061), indicando una tolerancia a la glucosa alterada en los ratones CAF-STZ ($P < 0.0001$; Fig. 5C). La resistencia a la insulina se evaluó mediante ITT, y hubo una diferencia entre los ratones CTRL y CAF-STZ ($P < 0.001$; Fig. 5D), revelando el desarrollo de resistencia a la insulina como lo confirmó el valor de K_{ITT} (CAF-STZ: $0.6 \pm 0,003$ %/min vs. CTRL: $5.9 \pm 0,003$ %/min) (Figura 5E). En conjunto, estos resultados demostraron que los ratones CAF-STZ desarrollaron características comunes de la DT2.

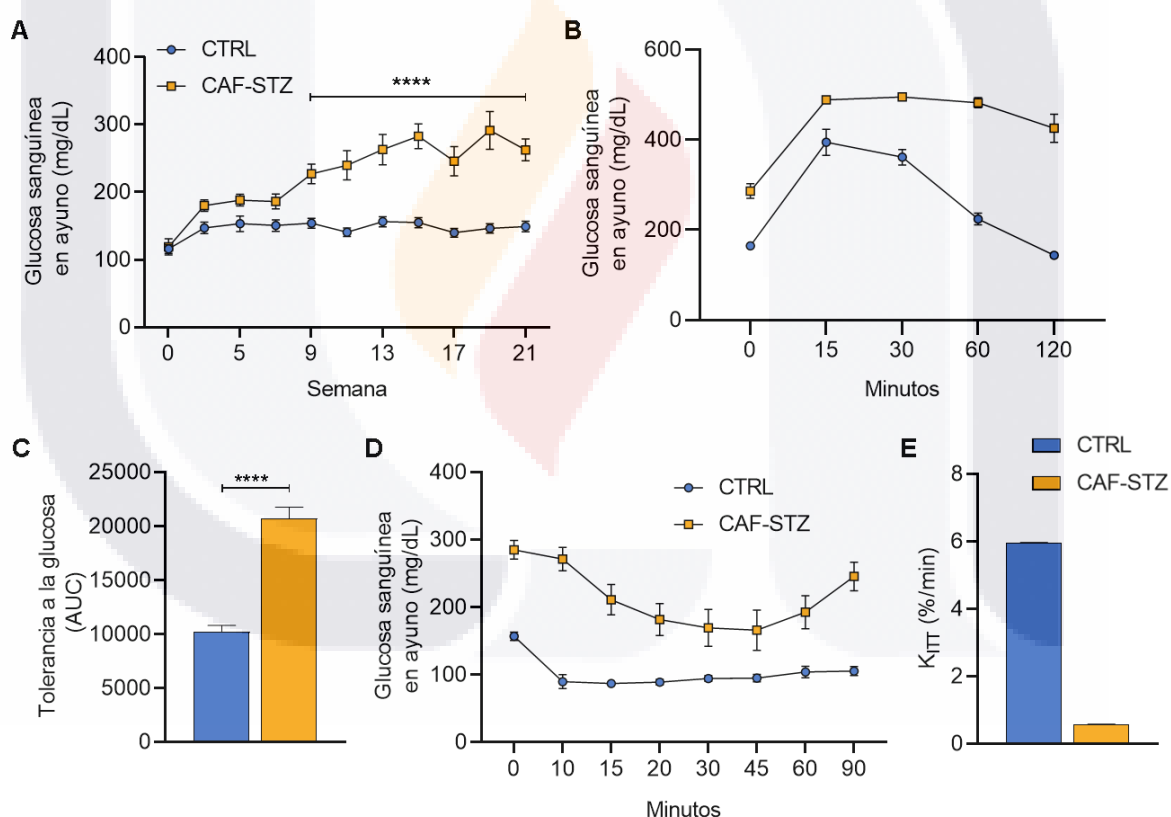


Figura 5. Los ratones CAF-STZ desarrollaron alteraciones en la homeostasis del metabolismo de la glucosa. **A)** Glucosa sanguínea en ayuno (FBG) evaluada quincenalmente indicando una hiperglucemia en el grupo CAF-STZ. **B)** Curvas de la IPGTT al final del protocolo dietético de 21 semanas. **C)** Área bajo la curva (AUC) de la curva IPGTT indicando una alteración en la tolerancia a la glucosa sanguínea. **D)** Curvas de la ITT. **E)** Tasa de desaparición de glucosa (K_{ITT}) en %/min. Los datos están expresados en media $\pm$ SEM de $n = 14$ ratones CTRL y $n = 13$ ratones CAF-STZ. * $P <$

0.05, ***P < 0.001 y ****P < 0.0001 indican diferencias estadísticamente significativas al comparar CAF-STZ versus CTRL mediante la prueba *t*-student no pareada en los incisos C y ANOVA de dos vías seguido Los ratones alimentados con la dieta tipo cafetería y una dosis de estreptozotocina desarrollaron alteraciones morfológicas y fisiológicas en el tracto gastrointestinal.

7.2 Los ratones CAF-STZ presentaron alteraciones en la morfología del colon y retraso en el tránsito intestinal

Se analizó la longitud y peso del colon para evaluar la inflamación intestinal en el modelo murino de DT2 asociado a obesidad. Se observó una reducción en la longitud y peso promedio del colon de los ratones CAF-STZ en comparación con de los ratones CTRL, siendo el promedio de la longitud y el peso del colon en el grupo CAF-STZ de 5.64 ± 0.12 cm y 0.19 ± 0.01 g, respectivamente; mientras que en los ratones CTRL fue de 7.0 ± 0.21 cm y 0.27 ± 0.01 g (Fig. 6).

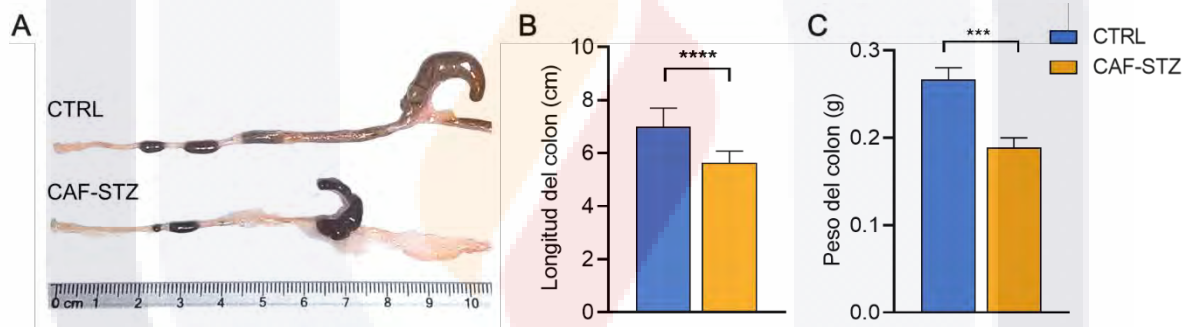


Figura 6. La administración CAF-STZ redujo la longitud y el peso del colon. **A)** Fotografías representativas de un colon aislado de un ratón CTRL y un ratón CAF-STZ. **B)** Longitud del colon medida desde la unión ileocecal hasta el recto. **C)** Peso del colon en proporción al peso corporal en gramos. Los datos están representados en media $\pm$ SEM de $n = 11$ ratones CTRL y $n = 12$ ratones CAF-STZ. La ***P < 0,001 y **** P < 0,0001 denotan diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba *t*-student para muestras no pareadas.

Las alteraciones observadas en la morfología del colon de los ratones CAF-STZ se acompañaron de una alteración en la motilidad colónica. El tiempo total del tránsito GI fue mayor en los ratones CAF-STZ (9.3 ± 0.21 h) en comparación con los ratones CTRL (7.1 ± 0.02 h) (Fig. 7A), indicando que el tránsito GI fue significativamente más lento en el grupo CAF-STZ. Dado que el retardo en el tiempo de tránsito GI puede afectar la cantidad y la húmeda de las heces expulsadas, se midió la producción de heces y el contenido de agua en las heces. Los resultados mostraron

que los ratones CAF-STZ tuvieron una disminución significativa en el número de heces excretadas por hora, el peso húmedo y el porcentaje de contenido de agua de las heces en comparación con los ratones CTRL (Fig. 7B-D), lo que indica el desarrollo de estreñimiento.

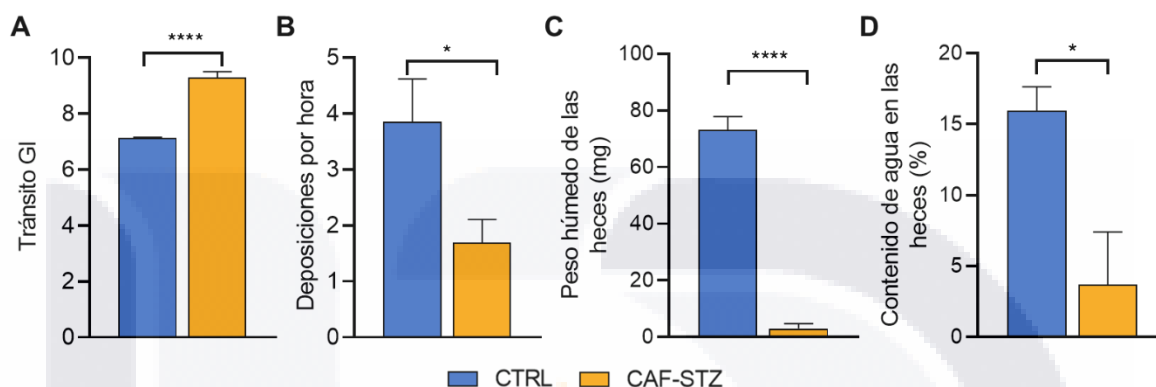


Figura 7. Los ratones CAF-STZ presentaron estreñimiento. **A)** Comparación del tiempo medio de tránsito del azul de Evan a través del tracto GI entre ratones CAF-STZ (n = 5) y ratones CTRL (n = 5). **B)** Número de heces excretadas por hora por ratones pertenecientes a ambos grupos experimentales (n = 14 ratones CTRL y n = 13 ratones CAF-STZ). **C)** Peso húmedo de las heces fecales (n = 5 por grupo experimental). **D)** El contenido de agua fecal se calculó con la diferencia entre el peso húmedo y seco en porcentaje (n = 3 por grupo experimental). Los valores se representan mediante la media ± SEM. *P < 0.05, ***P < 0.001 y **** P < 0.0001 expresa significancia estadística mediante la prueba t-student no pareada.

7.3 Alteración de la contractilidad muscular del colon en ratones CAF-STZ

Al concluir el protocolo de dieta de veintidós semanas, se estudiaron segmentos de colon extirpados de ratones CTRL y CAF-STZ en experimentos de baño de órgano aislado para examinar los efectos de la DT2 sobre las contracciones espontáneas rítmicas (RSC, por sus siglas en inglés) del músculo liso controlado por la inervación intrínseca. Los resultados evidencian que las RSC en los ratones CAF-STZ mostraron una disminución significativa tanto en la amplitud de la fuerza de contracción como en la frecuencia, en comparación con los ratones del grupo CTRL (Fig. 8A). La amplitud promedio de la fuerza de contracción del RSC en los ratones de control fue de 0.78 ± 0.005 g, mientras que en los ratones CAF-STZ fue de 0.51 ± 0.03 g (P = 0.0003; Fig. 8B). La frecuencia de estas contracciones también se vio afectada; en los ratones CTRL se registraron 2.2 ± 0.3 ciclos/min, mientras que en los ratones CAF-STZ se observaron 1.2 ± 0.2 ciclos/min (P = 0.01; Fig. 8C).

Además, se midió la duración de la fase de relajación de RSC y se encontró que era significativamente más larga en el grupo CAF-STZ (4.7 ± 0.3 s) que en el grupo CTRL (3.0 ± 0.1 s; Fig. 8D), lo que indica una reducción en la contractilidad colónica en los ratones CAF-STZ.

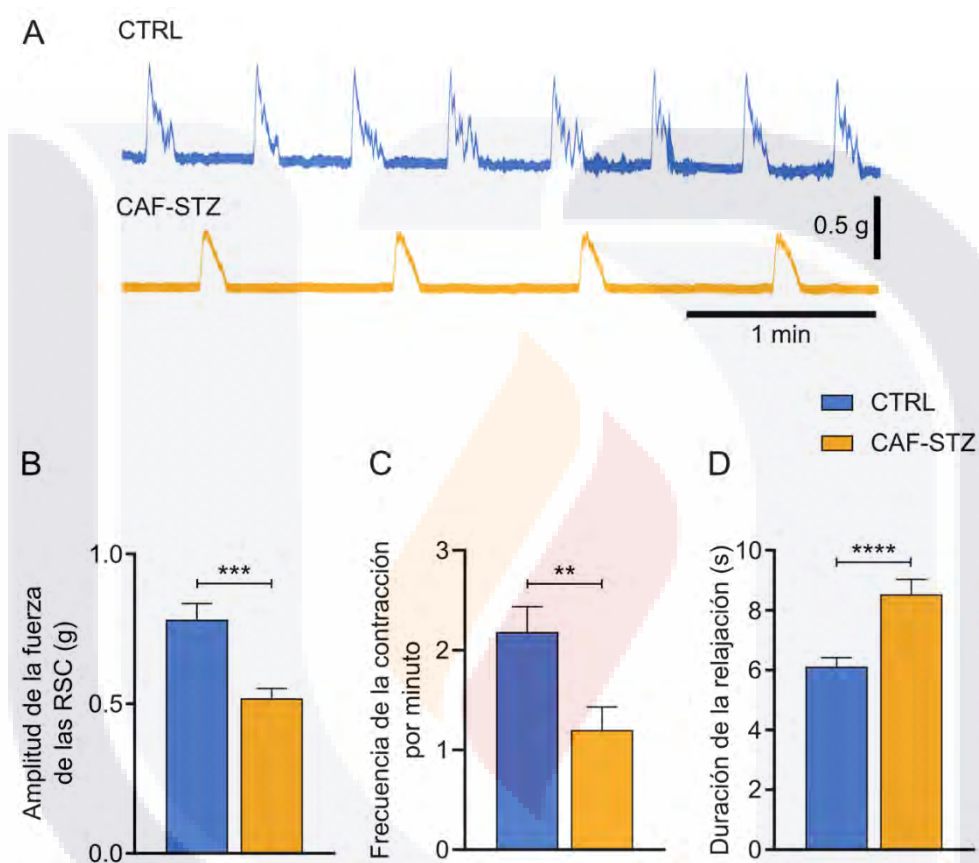


Figura 8. La amplitud y frecuencia de las RSC en el colon de ratones CAF-STZ y CTRL. **A)** Registros representativos de las RSC en segmentos aislados del colon de un ratón CTRL (panel superior) y un ratón CAF-STZ (panel inferior) tras un período de equilibrio de 60 min. **B)** Promedio de la amplitud de la fuerza de la contracción **C)** frecuencia de la contracción por minuto y **D)** tiempo medio de la relajación máxima de las RSC. Los datos están expresados como media $\pm$ SEM de $n = 5$ por cada grupo experimental. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ y **** $P < 0.0001$ expresa significancia estadística en comparación con el grupo CTRL mediante la prueba *t*-student para muestras no pareadas.

7.4 Las neuronas mientéricas tipo S del colon de ratones CAF-STZ mostraron una reducción en la excitabilidad

Las neuronas mientéricas se clasificaron en dos subtipos, S y AH, de acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas, conforme a lo descrito en estudios previos

(Bornstein, *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2013). Se registraron un total de 128 células. De estas, 75 neuronas generaron potenciales de acción con un retorno inmediato al potencial de membrana en reposo tras la estimulación y carecían de hiperpolarización lenta después del potencial de acción (AHP), características que definen a las neuronas mientéricas tipo S. En contraste, 53 neuronas presentaron una hiperpolarización rápida tras el potencial de acción (AHP rápida) y una AHP prolongada (>200 ms) al quitar el estímulo, durante la cual el potencial de membrana descendió por debajo del potencial de membrana basal antes de regresar gradualmente al valor inicial; estas neuronas fueron clasificadas como tipo AH (Figura 3).

Las neuronas mientéricas de tipo S en ratones CAF-STZ mostraron una reducción de la excitabilidad intrínseca (Figura 9A), evidenciada por un aumento significativo de la reobase, que fue 4.2 veces mayor en comparación con el grupo control (Figura 9B, trazo superior; CTRL: 6 ± 1.8 pA vs. CAF-STZ: 25 ± 5.3 pA; $p = 0.004$). Sin embargo, la frecuencia de disparo de potenciales de acción (PA) al doble de la reobase no difirió significativamente entre los grupos experimentales (Figura 9B, trazo inferior). El umbral de activación del PA fue similar entre neuronas tipo S de los grupos CAF-STZ (-27.97 ± 2.96 mV) y CTRL (-29.60 ± 5.3 mV), lo que sugiere que, en el grupo CAF-STZ, se requiere un estímulo de mayor intensidad para alcanzar dicho umbral.

Por otro lado, ni la frecuencia de disparo ni el número de reobases necesarios para inducir PA en las neuronas mientéricas de tipo AH se vieron afectados por el tratamiento con CAF-STZ (Figura 9C–D). Asimismo, el análisis de la derivada del potencial de acción (dV/dt) no reveló diferencias significativas en el umbral de activación entre los grupos (CAF-STZ: -15.02 ± 5.93 mV vs. CTRL: -13.33 ± 7.75 mV). Finalmente, el potencial de membrana en reposo, la resistencia de entrada y las propiedades intrínsecas de los potenciales de acción en neuronas tipo S y AH no presentaron alteraciones en ratones tratados con CAF-STZ (Tabla 3)

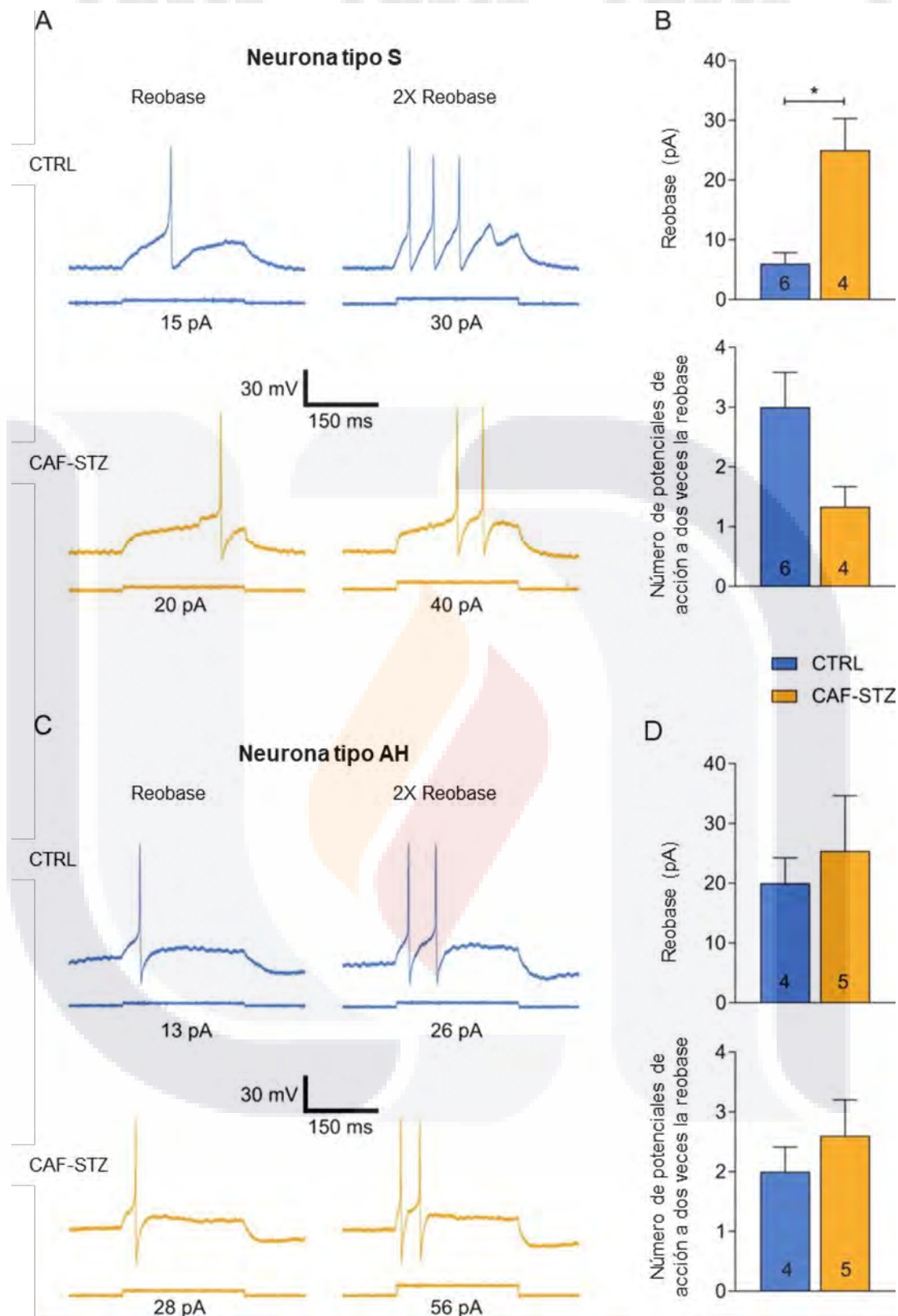


Figura 9. Excitabilidad reducida de las neuronas mientéricas tipo S en ratones CAF-STZ. **A)** Registros representativos de una neurona tipo S obtenida de un ratón CTRL y CAF-STZ. Los trazos cuadrados situados debajo de los potenciales de acción indican la corriente despolarizante que

indujo su generación. **B)** Gráficos de barras que resumen los datos cuantitativos de la excitabilidad neuronal. Se observa un aumento significativo en la reobase de las neuronas tipo S en ratones CAF-STZ en comparación con los controles ($n = 6$ para CTRL, $n = 4$ para CAF-STZ; $p = 0.004$, prueba t -student no pareada; panel superior). No se detectaron diferencias significativas en el número de potenciales de acción generados al aplicar una corriente equivalente al doble de la reobase (panel inferior). **C)** Registros representativos de una neurona tipo AH de un ratón CTRL y CAF-STZ. Los trazos cuadrados bajo los potenciales de acción representan la corriente despolarizante aplicada. **D)** Gráficos de barras que muestran el resumen de la excitabilidad de las neuronas tipo AH. No se observaron diferencias significativas en la reobase (panel superior), ni en el número de potenciales de acción generados al doble de la reobase (panel inferior) entre ambos grupos ($n = 4$ para CTRL, $n = 5$ para CAF-STZ). La línea discontinua en los trazos indica el potencial de membrana en reposo. Las barras representan la media $\pm$ SEM. El asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa. $p < 0.05$; prueba t -student para datos no pareados.

Tabla 3. Propiedades pasivas de la membrana celular y del potencial de acción de las neuronas mientéricas de colon de ratones C57BL/6J

Propiedades	Neurona tipo S			Neurona tipo AH		
	CTRL	CAF-STZ	P	CTRL	CAF-STZ	P
Capacitancia (pF)	20 ± 1.8	19 ± 2.4	0.76	21 ± 5.3	17 ± 3.6	0.54
PMR (mV)	-51 ± 8.1	-43 ± 8.2	0.55	-45 ± 7.8	-34 ± 4.1	0.23
Resistencia de entrada (M Ω)	5.5 ± 1.0	8.1 ± 2.4	0.31	4.5 ± 0.1	6.5 ± 1.6	0.33
Amplitud del PA (mV)	86 ± 7.8	96 ± 22	0.76	98 ± 18.1	106 ± 4.7	0.63
Amplitud de AHP del PA (mV)	6.1 ± 6.3	3.0 ± 9.1	0.41	21 ± 2.4	19.9 ± 9.9	0.82
Amplitud de la AHP lenta (mV)	NP	NP	-	7.0 ± 1.3	5.9 ± 0.7	0.46
Half-width (ms)	3.4 ± 0.7	1.8 ± 0.4	0.15	2.2 ± 0.5	1.4 ± 0.07	0.17

El valor P para las neuronas tipo S y AH fueron calculadas usando la prueba t -student. NP, no presente; Half-width es tiempo necesario para alcanzar la mitad de la amplitud del potencial de acción con respecto al potencial umbral.

7.5 Las neuronas mientéricas tipo S y AH incubadas con sobrenadantes de tejido colónico de ratones CAF-STZ mostraron también una reducción en la excitabilidad

Para evaluar si factores solubles presentes en el colon de ratones CAF-STZ afectan la excitabilidad de las neuronas mientéricas, se incubaron neuronas mientéricas aisladas de ratones que no formaban parte de los grupos experimentales, con sobrenadantes del colon de ratones CTRL y CAF-STZ durante toda la noche. La Figura 10A muestra los registros representativos de los PA de una neurona

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mientérica de tipo S incubada con sobrenadantes derivados de ratones CTRL o CAF-STZ.

Los sobrenadantes derivados del colon de ratones CAF-STZ redujeron significativamente la excitabilidad intrínseca de las neuronas mientéricas tipo S, evidenciada por un aumento de 2.9 veces la reobase en comparación con los efectos de los sobrenadantes del grupo CTRL (Figura 10B; CTRL = 7.7 ± 1.0 pA vs CAF-STZ = 22.1 ± 2.7 pA; $P < 0.0001$). De igual manera, los sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ también disminuyen 1.5 veces la reobase de las neuronas mientéricas tipo AH en comparación con los efectos de los sobrenadantes de ratones CTRL (Figura 10D; CTRL = 9.3 ± 1.3 pA vs CAF-STZ = 14.1 ± 1.7 pA; $P = 0.03$); se muestra un registro representativo en la Figura 10C.

Estos efectos en la excitabilidad se produjeron sin cambios significativos en el número de PA generados al aplicar el doble de la reobase, ni en el umbral del potencial de acción en ambos tipos de neuronas mientéricas; neuronas tipo S (CTRL = -19.84 ± 3.42 mV vs CAF-STZ = -19.45 ± 2.94 mV) y neuronas tipo AH (CTRL = -11.32 ± 2.28 mV vs CAF-STZ = -11.17 ± 3.23 mV), como se muestran en los paneles inferiores de las Figuras 10 B y D. Estos resultados imitan el perfil de baja excitabilidad observado en las neuronas mientéricas tipo S directamente obtenidas de ratones CAF-STZ, lo que indica que los factores solubles secretados por el colon de estos animales impactan en la excitabilidad neuronal mientérica. Los sobrenadantes de CAF-STZ no afectaron las propiedades pasivas de la membrana de las neuronas tipo S y AH (Tabla 4), pero sí afectaron las propiedades de excitabilidad neuronal, haciéndolas menos excitables.

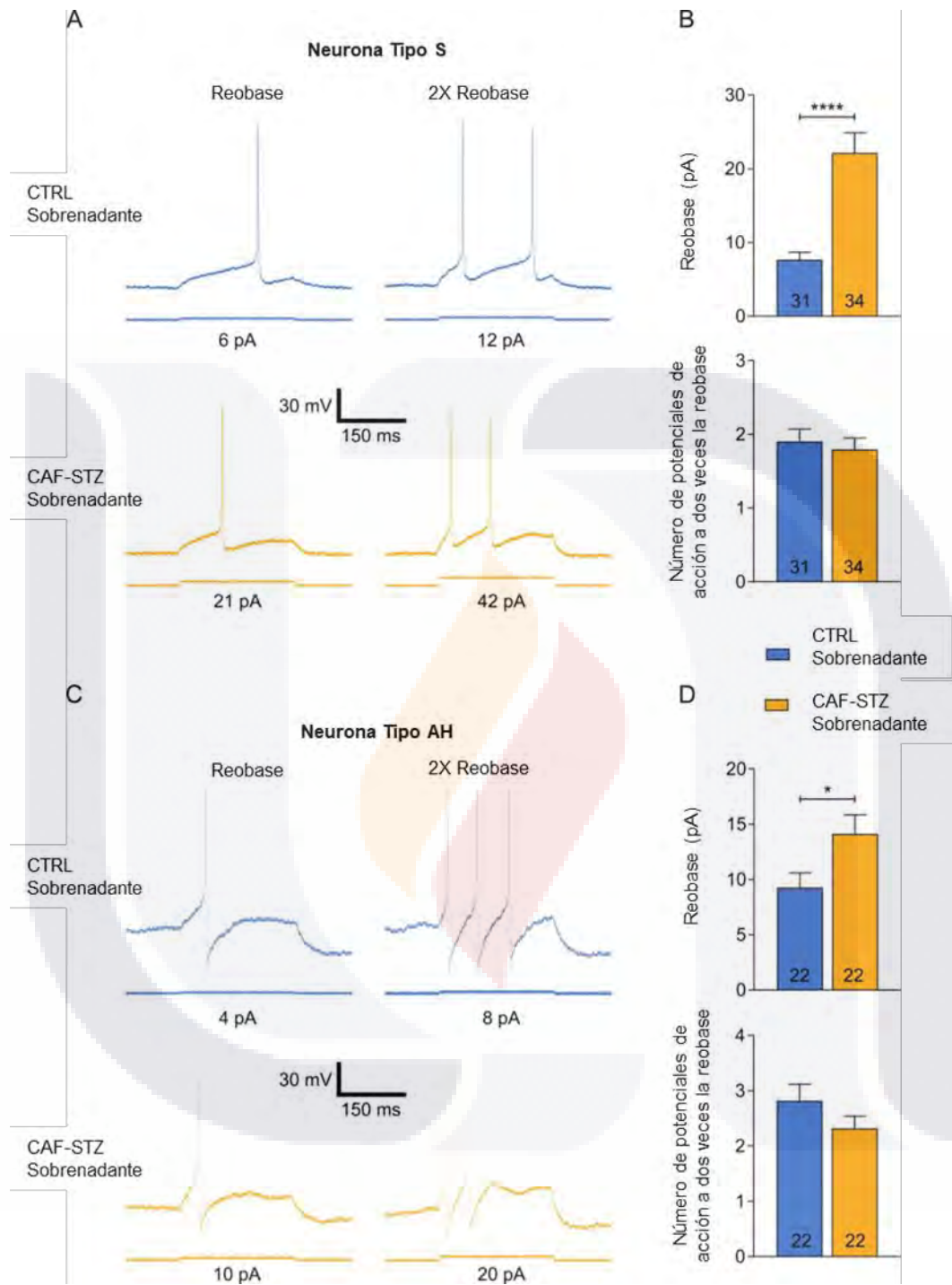


Figura 10. La incubación de neuronas mientéricas con los sobrenadantes derivados del colon de ratones CAF-STZ disminuye la excitabilidad neuronal. **A)** Registros representativos de neuronas mientéricas tipo S incubadas durante toda la noche con sobrenadante derivados de colon de ratones CTRL (panel superior izquierdo) o CAF-STZ (panel inferior izquierdo). Los trazos cuadrados debajo del potencial de acción representan la corriente despolarizante que se aplicó para disparar el potencial de acción. **B)** Los gráficos de barras muestran el resumen de los datos para la rebase después de la incubación durante toda la noche con sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ (n = 31 por CTRL y n = 34 por grupo CAF-STZ, $P < 0.0001$, prueba *t*-student no pareada, panel superior derecho). No se observan cambios significativos en el número de PA en el doble de la

reobase después de la incubación con sobrenadante CAF-STZ (panel inferior derecho). **C)** Registros representativos de neuronas tipo AH incubada con sobrenadante CTRL (panel superior izquierdo) o CAF-STZ (panel inferior izquierdo). Los trazos cuadrados debajo del potencial de acción representan la corriente despolarizante a la que se desencadenó el potencial de acción. **D)** Gráficos de barras que muestran el resumen de los datos para la reobase en las neuronas tipo AH después de la incubación con sobrenadantes CAF-STZ (n = 22 por grupo, P = 0.03, prueba *t*-student no pareada, panel superior derecho). No se observan cambios significativos en el número de PA en el doble de reobase después de la incubación con sobrenadante CAF-STZ (panel inferior derecho). La línea discontinua en los registros representa el potencial de membrana en reposo. Las barras representan la media $\pm$ SEM.

Tabla 4. Propiedades pasivas de la membrana celular y del potencial de acción de neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes derivados de tejidos colónicos.

Propiedades	Neurona tipo S			Neurona tipo AH		
	CTRL	CAF-STZ	P	CTRL	CAF-STZ	P
Capacitancia (pF)	18.8 $\pm$ 0.9	20.7 $\pm$ 1.2	0.24	20.3 $\pm$ 1.07	20.5 $\pm$ 1.7	0.94
PMR (mV)	-47 $\pm$ 3.1	-46 $\pm$ 2.3	0.66	-34 $\pm$ 1.6	-38 $\pm$ 1.7	0.10
Resistencia de entrada (G Ω)	5.7 $\pm$ 0.6	5.5 $\pm$ 0.6	0.63	4.4 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.1	0.71
Amplitud del PA (mV)	120 $\pm$ 5.3	109 $\pm$ 5.0	0.13	105 $\pm$ 3.5	102 $\pm$ 5.5	0.62
Amplitud de la AHP del PA (mV)	1.6 $\pm$ 2.2	1.8 $\pm$ 1.8	0.96	14 $\pm$ 0.8	14.3 $\pm$ 0.9	0.64
Amplitud de la AHP lenta (mV)	NP	NP	-	4.5 $\pm$ 0.2	4.1 $\pm$ 0.3	0.47
Half-width (ms)	2.6 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.3	0.08	1.8 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.3	0.08

El valor P para las neuronas tipo S y AH fueron calculadas usando la prueba *t*-student. NP, no presente; Half-width es el tiempo necesario para alcanzar la mitad de la amplitud del potencial de acción con respecto al potencial de membrana en reposo.

7.6 Los receptores purinérgicos P2X no participan en la reducción de la excitabilidad de las neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ

Para evaluar si la activación de los receptor P2X contribuye a la disminución de la excitabilidad observada en las neuronas mientéricas expuestas a los sobrenadantes derivados del colon de ratones CAF-STZ, se incubaron las neuronas con PPADS (10 μ M), un antagonista no selectivo de los receptores P2X, 30 min antes de la exposición a los sobrenadantes de colon de ratones CTRL o CAF-STZ, en presencia

o ausencia de ATP- γ -S (100 μ M), un agonista no hidrolizable de receptores P2X que permite su activación constante.

Se replicó el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ sobre la excitabilidad de las neuronas mientéricas (Figura 11A). La reobase media de las neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes del grupo CTRL fue de 8.14 ± 0.85 pA, mientras que aquellas neuronas expuestas a sobrenadantes de colon del grupo CAF-STZ presentaron una reobase significativamente mayor (24.55 ± 3.246 pA), confirmando una reducción en la excitabilidad intrínseca de las neuronas mientéricas. La activación de los receptores P2X mediante ATP- γ -S no modificó la excitabilidad de las neuronas mientéricas incubadas con los sobrenadantes CTRL y CAF-STZ. Del mismo modo, la aplicación del antagonista PPADS no tuvo efectos sobre la reducida excitabilidad inducida por los sobrenadantes CAF-STZ en las neuronas mientéricas (Figura 11A). Además, no se observaron diferencias significativas en el número de potenciales de acción generados al aplicar una corriente equivalente al doble de la reobase en ninguno de los grupos experimentales (Figura 11B), lo que indica que los receptores P2X no contribuyen a la disminución de la excitabilidad observada en las neuronas mientéricas expuestas a los sobrenadantes derivados del colon de ratones CAF-STZ.

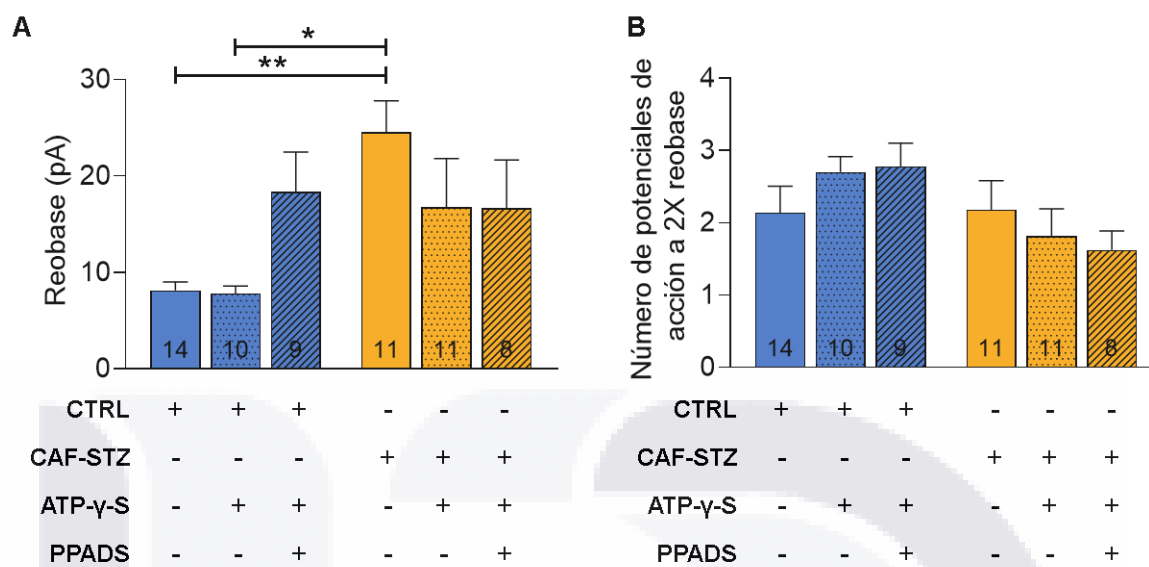
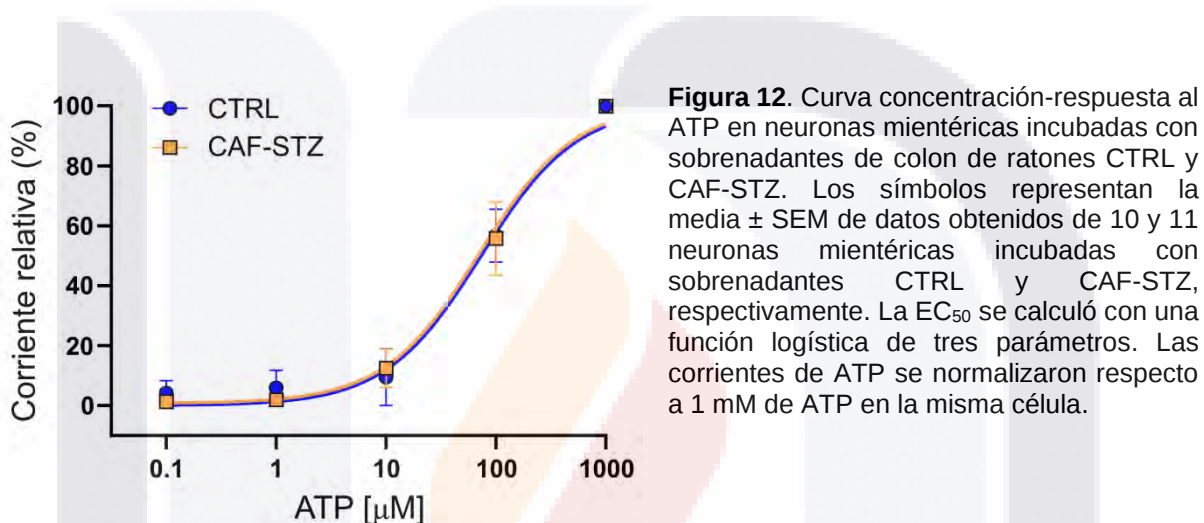


Figura 11. Los receptores P2X no contribuyen a la disminución de la excitabilidad inducida por los sobrenadantes del colon de ratones CAF-STZ. Las neuronas mientéricas de ratones fueron incubadas con sobrenadantes de colon de ratones CTRL o CAF-STZ en presencia o ausencia de ATP-γ-S (100 μM) y el antagonista PPADS (10 μM). El antagonista se incubó 30 min antes de aplicar los sobrenadantes y el ATP-γ-S. **A)** Gráfica de barras mostrando la reobase promedio ± SEM de las neuronas mientéricas en las diferentes condiciones experimentales. **B)** Gráfica de barras mostrando el promedio ± SEM del número de potenciales de acción al aplicar dos veces la reobase de las neuronas mientéricas. Se analizaron los datos mediante ANOVA de una vía y un análisis post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ denotan diferencias estadísticamente significativas.

7.7 Los sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ no afectaron las propiedades farmacológicas de los receptores P2X en las neuronas mientéricas de ratones.

Dado que los receptores P2X son canales iónicos activados por ATP implicados en la neurotransmisión y en la modulación de las respuestas celulares a estímulos extracelulares, se evaluó si los sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ podrían alterar sus propiedades farmacológicas. Para ello, se analizaron las curvas de concentración-respuesta al ATP en neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes CTRL y CAF-STZ, con el objetivo de determinar posibles cambios en la sensibilidad (EC_{50}) o eficacia de los receptores P2X.

La Figura 12 muestra las curvas concentración-respuesta al ATP (0.1 – 1000 μM) en neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes CTRL y CAF-STZ. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en la potencia ni en la eficacia del ATP entre ambos grupos experimentales. El valor de EC_{50} para las neuronas incubadas con sobrenadantes de colon de ratones CTRL fue de $73.52 \pm 1.8 \mu\text{M}$ y de $72.42 \pm 1.8 \mu\text{M}$ para aquellas incubadas con sobrenadantes del grupo CAF-STZ (Fig. 12)



7.8 Efecto de los sobrenadantes del colon de ratones CAF-STZ sobre los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje en las neuronas mientéricas de ratones.

El aumento en la reobase en las neuronas mientéricas de ratones CAF-STZ o expuestas a los sobrenadantes de biopsias de colon de estos animales sugiere una alteración en la actividad de los canales de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje que regulan la electro génesis de los potenciales de acción. Para explorar esta posibilidad, se estimularon eléctricamente neuronas mientéricas mediante protocolos de pulsos de voltaje (Figura 13A), con el fin de generar corrientes de Na^+ dependientes de voltaje (I_{NaV}). Dado que este protocolo de fijación de voltaje no permite distinguir entre neuronas mientéricas tipo S y AH, y considerando que los sobrenadantes de colon CAF-STZ afectaron la reobase en ambos tipos neuronales, se evaluó la participación de los canales iónicos dependientes de voltaje en neuronas expuestas a sobrenadantes.

Las neuronas incubadas con sobrenadantes colónicos de CAF-STZ ($n = 10$) presentaron una reducción significativa en la amplitud de las I_{NaV} totales en comparación con aquellas incubadas con sobrenadantes colónicos de ratones CTRL ($n = 12$), específicamente en el rango de -30 a -10 mV ($P < 0.05$; Figura 13B). Para examinar el tipo de I_{NaV} afectada se aplicó tetrodotoxina (TTX; 1 μ M). No se detectaron I_{NaV} resistentes a TTX en neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes CTRL o CAF-STZ. Las I_{NaV} sensibles a TTX expresadas en neuronas mientéricas no se vieron afectadas por la incubación durante la noche con sobrenadantes de CAF-STZ (Figura 13C).

También se analizaron las corrientes de potasio dependientes de voltaje totales (I_{KV}), así como sus componentes rectificadores lento (IK) y de inactivación rápida (IA) en neuronas mientéricas tipo S (Figura 14B) y tipo AH (Figura 14C). Los protocolos de pulsos de voltaje se muestran en la Figura 14A. Los resultados mostraron que la incubación de las neuronas mientéricas tipo S y AH con los sobrenadantes de biopsias de colon de ratones CAF-STZ no tuvieron efecto significativo sobre la amplitud de las I_{KV} , IK y IA (Figura 14).

7.9 La reducción de la excitabilidad de las neuronas mientéricas se correlaciona con las alteraciones en la contractilidad muscular del colon.

En un mismo ratón del grupo CAF-STZ, en el que se evaluaron simultáneamente la excitabilidad de las neuronas mientéricas y la contractilidad muscular, se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar la relación entre un aumento en la reobase neuronal y las alteraciones en la contractilidad colónica. Los resultados revelaron una correlación negativa significativa entre los valores de la reobase y tanto la frecuencia como la tensión de las RSC (Figura 15A y B, respectivamente), sugiriendo que la reducción de la excitabilidad neuronal podría estar contribuyendo al desarrollo de la dismotilidad colónica en ratones DT2.

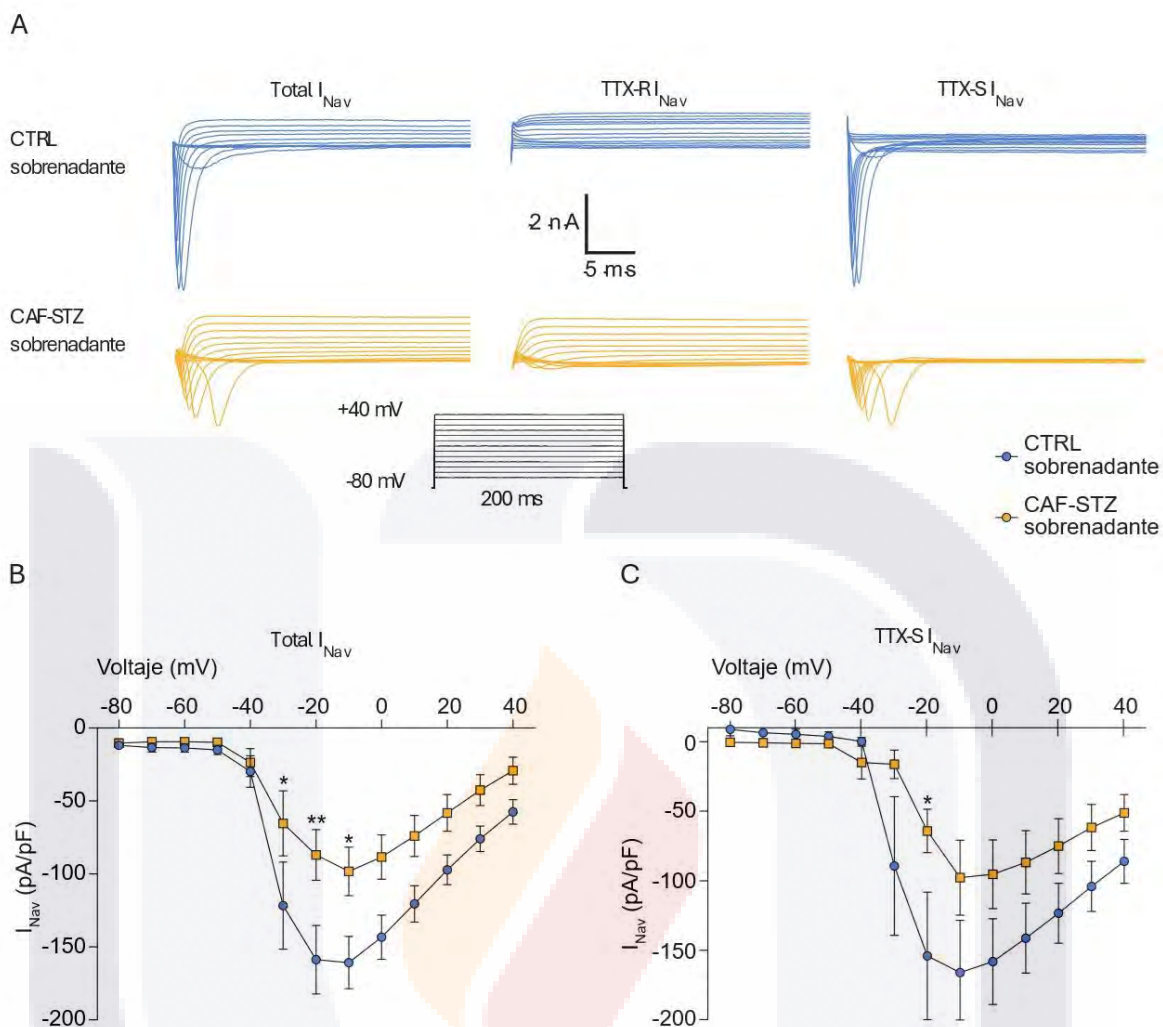


Figura 13. Las neuronas mientéricas incubadas durante toda la noche con sobrenadante de biopsias de colon de ratones CAF-STZ mostraron corrientes de Nav totales reducidas. **A)** Registro representativo de las corrientes Nav totales, TTX-R y TTX-S obtenidas de neuronas mientéricas incubadas con sobrenadante CTRL (panel superior) o CAF-STZ (panel inferior). Las corrientes Nav entrantes en las neuronas mientéricas se evocaron mediante un pulso de prueba de 200 ms, que se incrementó en +10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV en presencia o ausencia de 1 μ M TTX durante 3 min. Las corrientes Nav TTX-S se obtuvieron restando las corrientes Nav TTX-R del total. **B)** Curvas de corriente-voltaje de corrientes Nav totales que muestran una disminución estadísticamente significativa de las corrientes Nav totales después de la incubación con los sobrenadante CAF-STZ ($n = 10$) en comparación con CTRL ($n = 12$, $P < 0.05$) a -30 mV a -10 mV. **C)** Relación voltaje-corriente de corrientes NaV TTX-S. No se observan cambios significativos en las curvas de corriente-voltaje de corrientes de sodio TTX-S después de la incubación con sobrenadante CAF-STZ en comparación con CTRL ($n = 6$ por grupo) en todas las pruebas de pasos de voltaje, excepto en el voltaje de -20 mV ($P = 0.04$). Los datos representan la media $\pm$ SEM. * $P < 0,05$ y ** $P = 0,002$ indican diferencia estadísticamente significativa mediante el ANOVA de dos vías con la prueba posteriores de Bonferroni

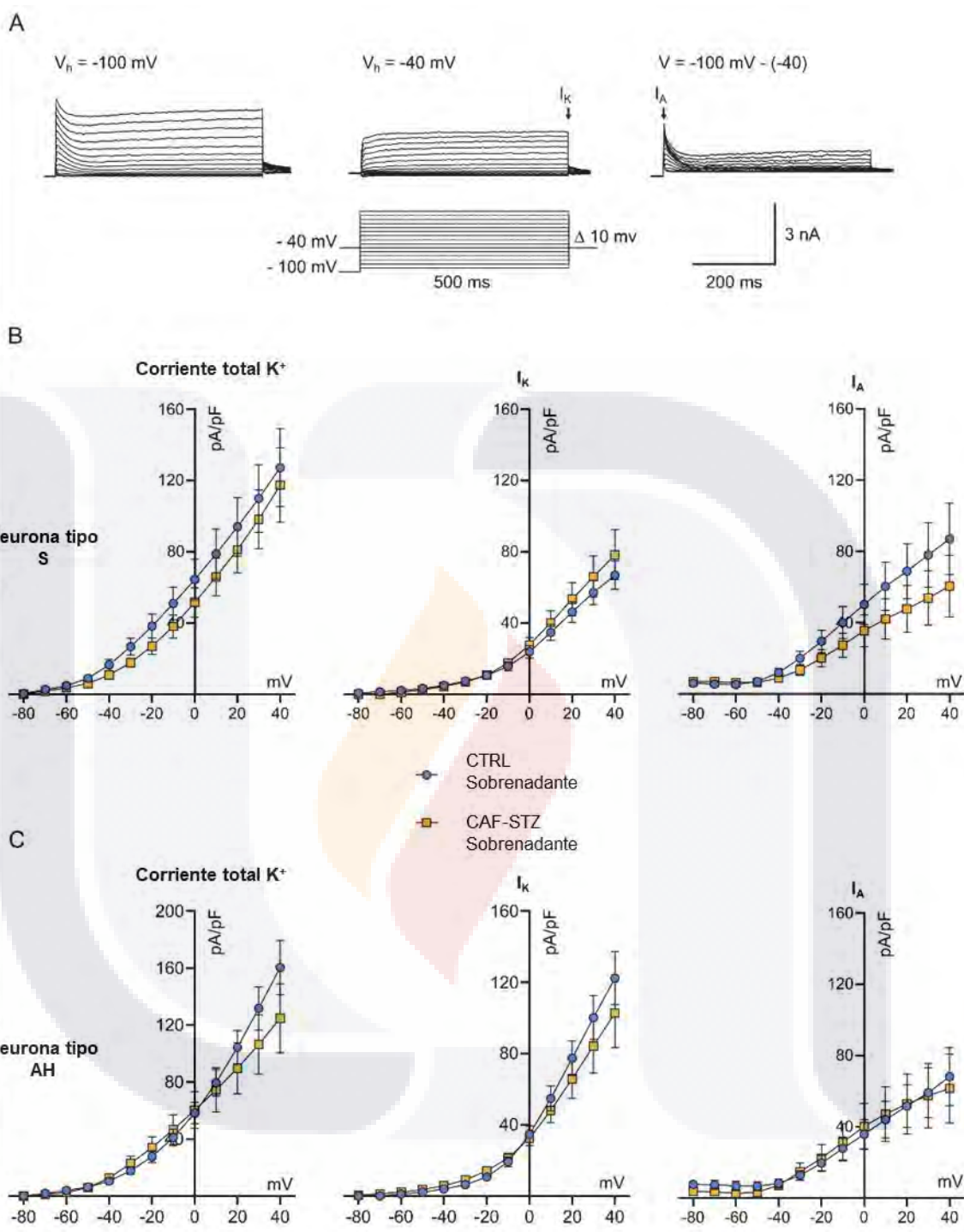


Figura 14. Los sobrenadantes colónicos de ratones CAF-STZ no modifican las corrientes Kv de neuronas mientéricas tipo S ni tipo AH. **A)** Registros representativo de las corrientes de potasio total (panel izquierdo), I_K (panel central) e I_A (panel derecho). Las curvas corriente-voltaje de las corrientes Kv totales (**B**), I_A (**C**) e I_K (**D**) no mostraron diferencias significativas tras la incubación con sobrenadantes colónicos de ratones CAF-STZ. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías con pruebas posteriores de Bonferroni.

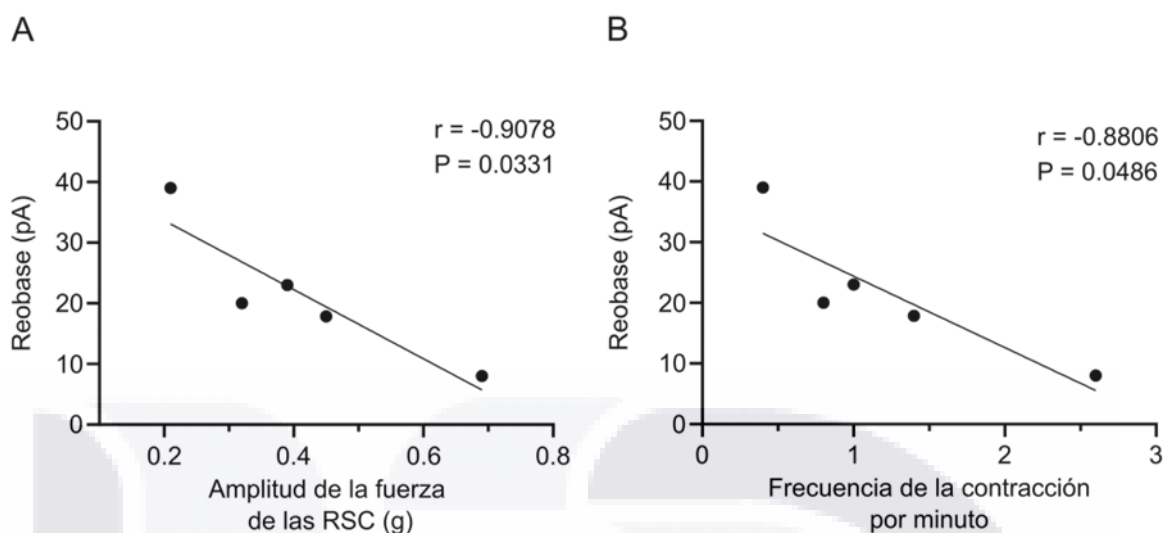


Figura 15. El aumento de la rebase de las neuronas mientéricas se correlacionó con las alteraciones de la amplitud y la frecuencia de las contracciones espontáneas rítmicas (RSC) en el colon de ratones CAF-STZ evaluados individualmente ($n = 5$). La rebase se correlacionó negativamente con la amplitud **A**) y la frecuencia **B**) de las RSC. El análisis estadístico se realizó mediante una correlación de Pearson, considerando como significativas aquellas correlaciones con valores de $P < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

Los pacientes con obesidad y diabetes con frecuencia presentan trastornos GI, incluida la dismotilidad intestinal, la cual ha sido reconocida recientemente como una de las complicaciones más comunes de la enfermedad y un factor que puede afectar significativamente la calidad de vida (Zhao *et al.*, 2017). A pesar de su relevancia clínica, los mecanismos fisiopatológicos subyacentes a esta complicación han sido escasamente investigados. En el presente estudio se reportaron varios hallazgos relevantes: 1) los mediadores químicos presentes en los sobrenadantes obtenidos de biopsias de colon de ratones con DT2 asociada a obesidad redujeron significativamente la excitabilidad de las neuronas mientéricas, evidenciado por un aumento en la rebase, 2) las corrientes totales de Na^+ dependientes de voltaje (Na_v) se vieron reducidas en las neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes de tejido colónico de ratones con DT2, 3) la disminución en la excitabilidad neuronal mientérica se correlacionó negativamente

con las alteraciones en las contracciones fásicas en ratones con DT2 y 4) los receptores P2X claves en la neurotransmisión no contribuyen a la reducción en la actividad excitatoria de las neuronas mientéricas. En conjunto, estos resultados identifican un mecanismo celular y molecular clave que contribuye a la disfunción colónica asociada a la DT2 y aportan información valiosa para comprender la fisiopatología de las complicaciones gastrointestinales diabéticas.

En este estudio se utilizó una dieta tipo cafetería combinada con una dosis de STZ para establecer un modelo murino de DT2 asociada a la obesidad. Los resultados confirmaron que este modelo (CAF-STZ) indujo un fenotipo de diabetes en los ratones, demostrado por una marcada acumulación de tejido adiposo blanco periférico, hiperglucemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, como se ha reportado en estudios previos (Reed *et al.*, 2000; Cruz- Muñoz *et al.*, 2024).

Además de los efectos metabólicos, la administración con CAF-STZ provocó alteraciones significativas en el colon, incluyendo un acortamiento notable de la longitud y una reducción del peso del colon. Alteraciones similares han sido reportadas en modelos murinos alimentados con dietas altas en proteínas, lo cual se atribuyó a una absorción insuficiente de nutrientes por daño en la barrera epitelial de la mucosa (Thomas *et al.*, 2023). No obstante, la reducción en la longitud del colon no es exclusiva de los modelos dietéticos y constituye una característica bien documentada en diversos modelos de inflamación intestinal (Park *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2020; Cruz-Muñoz *et al.*, 2022). Además, en un trabajo previo realizado por nuestro grupo de trabajo, utilizamos el mismo modelo CAF-STZ y se observó, no solo un acortamiento del colon, sino también un deterioro estructural evidente en las capas de la pared intestinal, caracterizado por un adelgazamiento de las capas mucosa y muscular, así como un aumento en la expresión de marcadores proinflamatorios IL-1 β y NF- κ B (Cruz-Muñoz *et al.*, 2024), lo que indica que las alteraciones morfológicas inducidas por la administración CAF-STZ podrían estar mediadas, al menos en parte, por procesos inflamatorios subyacentes.

Las alteraciones morfológicas observadas en el colon se asociaron con un aumento significativo en el tiempo de tránsito GI, así como una disminución en la producción y el contenido de agua en las heces, parámetros que en conjunto son indicativos de estreñimiento por tránsito lento. Este tipo de estreñimiento ha sido ampliamente reconocido como uno de los síntomas GI más prevalentes tanto en la diabetes (Horvath *et al.*, 2015; Maleki & Locke, 2000) como en la obesidad (Almeida *et al.*, 2022), y se ha atribuido principalmente a mecanismos como la denervación extrínseca (Brock *et al.*, 2013) o la pérdida de neuronas del SNE inducida por estrés oxidativo (Chandrasekharan *et al.*, 2011).

En el presente estudio, demostramos una reducción en la excitabilidad de las neuronas mientéricas tipo S en ratones CAF-STZ, caracterizada por un aumento en la reobase. Esta disminución de la excitabilidad neuronal se correlacionó con una disminución tanto en la amplitud como en la frecuencia de las contracciones espontáneas rítmicas (RSC, por sus siglas en inglés). Estas contracciones, también conocidas como contracciones fásicas, desempeñan un papel esencial en la propulsión y la mezcla del contenido luminal, procesos fundamentales para la peristalsis y la segmentación (Spencer *et al.*, 2016). Por lo tanto, la reducción observada en la fuerza y las frecuencias de las contracciones fásicas probablemente contribuye al enlentecimiento de la motilidad intestinal. Interesantemente, en un estudio previo, nuestro grupo ya había reportado alteraciones en la actividad de las RSC tanto en colon como en íleon, junto con una disminución en la excitabilidad de las neuronas mientéricas de ratones con obesidad, inducida por la dieta de cafetería durante 8 semanas (Ramírez-Maldonado *et al.*, 2025). Estos hallazgos subrayan los efectos sostenidos de la obesidad inducida por la dieta sobre la función intestinal, y revelan que las alteraciones en la motilidad y en las propiedades neuronales pueden persistir y agravarse durante la progresión desde la obesidad hacia la DT2. No obstante, es importante considerar que la hiperglucemia también podría estar implicada en las disfunciones entéricas observadas. Un estudio previo utilizando STZ como único agente para inducir diabetes han demostrado que la hiperglucemia por sí sola puede

afectar la motilidad intestinal (Izbeki *et al.*, 2008). Sin embargo, en contraste con nuestros hallazgos, dicho estudio reportó un tránsito intestinal acelerado en ratas con diabetes en comparación con controles, sugiriendo que la disfunción intestinal asociada a la diabetes es multifactorial y depende del contexto fisiopatológico subyacente.

Los mecanismos que subyacen a las RSC del músculo liso intestinal son complejos y aún no se comprenden por completo. Diversos estudios han propuesto que estas contracciones pueden estar inducidas por la actividad neuronal entérica (Spencer *et al.*, 2002). En particular, se ha demostrado que las neuronas mientéricas mecanosensoriales tipo S participan en la generación de un patrón rítmico en el colon de cobayos (Spencer *et al.*, 2004), lo que respalda nuestros resultados de correlación. Sin embargo, es importante señalar que la actividad neuronal entérica no es esencial para la generación de las RSC, ya que se originan a partir de la actividad marcapaso de las células intersticiales de Cajal (ICC) (Huizinga *et al.*, 2011). Por lo que, no se puede descartar la participación de las ICC en los fenómenos fisiopatológicos observados. No obstante, el papel exacto de las ICC en la disfunción GI asociada a la diabetes sigue siendo motivo de debate. Por ejemplo, se ha reportado que una disminución en la red de ICC, junto con alteraciones en los receptores colinérgicos y la enzima óxido nítrico sintasa neuronal en el colon proximal, contribuye a la disfunción motora en modelos de diabetes (Kim, *et al.*, 2011). En contraste, un estudio realizado en muestras de colon de pacientes con DT2 no encontró una asociación clara entre la pérdida de ICC y la presencia de síntomas de estreñimiento (Nakahara *et al.*, 2002). Además, de las posibles alteraciones neuronales y de las ICC, es plausible que la disminución en la amplitud y la frecuencia de las RSC observadas en nuestro modelo refleje disfunciones intrínsecas del músculo liso (Pei *et al.*, 2023). Se necesitan estudios moleculares, electrofisiológicos y funcionales adicionales para dilucidar la interacción entre las redes ICC, las neuronas mientéricas y las células del músculo liso en el deterioro funcional del colon relacionado con la diabetes.

Se observó una disminución en la excitabilidad intrínseca de las neuronas mientéricas colónicas tipo S aisladas de ratones CAF-STZ. En contraste, las neuronas tipo AH no mostraron alteraciones significativas en su excitabilidad. De manera interesante, cuando las neuronas mientéricas colónicas de ratones sin experimentación se expusieron durante toda la noche a sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ, tanto las neuronas de tipo S como las de tipo AH mostraron una reducción significativa de la excitabilidad mediante un aumento de la reobase. No se tiene una explicación sencilla para estos resultados; es posible que los cambios en la excitabilidad de las neuronas tipo AH sean menos pronunciados que los observados en las neuronas S en las mismas condiciones, o que las neuronas mientéricas AH sean más resistentes o menos sensibles a los cambios inducidos por el estado similar a la diabetes. Estos hallazgos indican que el colon de los ratones CAF-STZ libera mediadores solubles que influyen en la excitabilidad de las neuronas mientéricas. La identificación de estos mediadores químicos es una dirección prometedora para investigaciones futuras.

Previamente hemos demostrado que el tejido colónico de ratones CAF-STZ presenta inflamación de bajo grado, una condición que se asoció con una mayor liberación de ATP luminal (Cruz-Muñoz *et al.*, 2024), lo que sugiere que la señalización del ATP a través de sus receptores purinérgicos podría estar desregulada. Al respecto, los receptores P2X, particularmente en el SNE, desempeñan un papel crucial en la neurotransmisión y la excitabilidad de las neuronas mientéricas al actuar como canales iónicos que responden a la liberación de ATP (Furness, 2006). Además, se ha descrito su participación en la motilidad del tracto GI (Ballout *et al.*, 2022). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los receptores P2X no participan en la disminución de la excitabilidad de las neuronas mientéricas y los sobrenadantes de ratones CAF-STZ no afectaron su función, lo que indica estos receptores no tienen un papel clave en las alteraciones de la excitabilidad neuronal y la contractilidad muscular del colon observadas en los ratones con DT2.

Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_v) desempeñan un papel fundamental en la fisiología GI, ya que permiten la transmisión de impulsos despolarizantes en las neuronas entéricas, facilitando así la coordinación de la motilidad intestinal (Osorio *et al.*, 2014). En ratones, al menos dos isoformas de canales Na_v , $\text{Na}_v1.7$ y $\text{Na}_v 1.9$, se expresan en las neuronas del plexo mientérico, las cuales son clasificadas como resistentes a TTX (TTX-R) y contribuyen a la regulación de la excitabilidad neuronal mientérica (Osorio *et al.*, 2014; Padilla *et al.*, 2007). En el presente estudio, no se detectaron corrientes de Na_v TTX-R, lo cual coincide con observaciones previas en neuronas mientéricas de cobayo (Zholos *et al.*, 2002). Las diferencias en los métodos de aislamiento celular y preparación tisular podrían explicar estas discrepancias. Por ejemplo, en nuestro trabajo se utilizaron neuronas mientéricas aisladas y cultivadas, mientras que en el trabajo de Osorio y colaboradores (2014) analizaron neuronas en preparaciones de tejido intacto del músculo longitudinal con el plexo mientérico, lo que sugiere que la expresión funcional de los canales Na_v podría depender de interacciones con otras células presentes en el tejido, como la glía entérica o las células musculares, así como mediadores locales, como lo han demostrado algunos estudios (Ponce *et al.*, 2018). Otra explicación es que los sobrenadantes colónicos de ratones CTRL y CAF-STZ afecten la expresión de los canales Na_v TTX-R. Esta posibilidad es apoyada por el hecho de que la expresión de los Na_v puede ser regulada por factores neurotróficos o mediadores inflamatorios (Black *et al.*, 2004; Cummins *et al.*, 2000). Además, cabe considerar que la concentración de TTX utilizada ($1\mu\text{M}$) pudiera haber bloqueado corrientes de Na_v TTX-R; sin embargo, esto es poco probable, ya que los canales de Na_v TTX-R suelen bloquearse con valores de IC_{50} de TTX superiores a $10\mu\text{M}$ (Narahashi, 2008).

Este es el primer estudio que señala que la atenuación de las corrientes totales de Na_v podría ser la causa principal de la disminución en la excitabilidad de las neuronas mientéricas en animales con DT2. Este hallazgo sugiere que las alteraciones en la excitabilidad neuronal mientérica mediadas por canales Na_v , podrían desempeñar un papel clave en la patogénesis de los trastornos de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

motilidad intestinal asociada a diabetes. En apoyo a esta interpretación, un estudio previo reportó una asociación entre la reducción de las corrientes Na_v y una menor excitabilidad de las neuronas mientéricas en un modelo *in vitro* de estreñimiento inducido por morfina (Smith *et al.*, 2013b) Si bien estudios anteriores han atribuido la reducción de la excitabilidad neuronal mientérica al aumento de la conductancia de K^+ en modelos animales no diabéticos (Cherubini *et al.*, 1984; North, 1974; North & Tonini, 1977), en nuestro estudio no se observaron cambios significativos en las corrientes totales de K_v , I_A o I_K en neuronas mientéricas incubadas con sobrenadantes de colon de ratones CAF-STZ, lo que sugiere que los canales K_v no están involucrados en los efectos observados sobre la excitabilidad neuronal en el modelo de DT2 asociado a obesidad.

Los canales de Na_v desempeñan un papel esencial en la actividad eléctrica y mecánica del tracto GI y representan un objetivo terapéutico potencial para el tratamiento de trastornos funcionales y de motilidad GI (Maqoud *et al.*, 2023). No obstante, su aplicación clínica se ve limitada por los posibles efectos adversos sobre el SNC. Entre las estrategias para superar esta limitación se encuentran el desarrollo de fármacos que no atraviesen la barrera hematoencefálica (Bagal & Bungay, 2014) o el uso de nanopartículas dirigidas específicamente a las neuronas mientéricas (Garbati, *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2018). Será necesario realizar estudios futuros para evaluar y optimizar estas aproximaciones terapéuticas.

9. CONCLUSIONES

Los ratones con DT2 asociada a obesidad presentan una reducción en la excitabilidad de las neuronas mientéricas y alteraciones en la contractilidad muscular y motilidad del colon.

Los receptores P2X no contribuyen en la disminución de la excitabilidad de las neuronas mientéricas de ratones CAF-STZ, ni en aquellas incubadas con los sobrenadantes de colon provenientes de estos animales.

Los mediadores químicos presentes en los sobrenadantes de biopsias de colon de ratones con DT2 no alteraron las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los receptores P2X.

Los mediadores químicos solubles liberados por el colon de animales con DT2 inducen una disminución en las corrientes de Na_v en las neuronas mientéricas de los ratones DT2, lo que podría representar el principal mecanismo responsable de la reducción en la excitabilidad neuronal.

La reducida excitabilidad neuronal mientérica podría contribuir a la disminución en la amplitud de la fuerza y frecuencia de las contracciones espontáneas rítmicas del colon distal, provocando un retraso en el tránsito intestinal, una complicación común en la diabetes.

Estos hallazgos subrayan la importancia de identificar los subtipos específicos de los canales de Na_v y los mediadores solubles presentes en los sobrenadantes colónicos de los ratones con DT2, ya que podrían desempeñar un papel clave en la fisiopatología de los trastornos de la motilidad intestinal asociados a la DT2, enfermedad que va en aumento en México.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla M. M. I. (2024). Enteric neuropathy in diabetes: Implications for gastrointestinal function. *World journal of gastroenterology*, 30(22), 2852–2865. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i22.2852>.
- Almeida, P. P., Valdetaro, L., Thomasi, B. B. M., Stockler-Pinto, M. B., & Tavares-Gomes, A. L. (2022). High-fat diets on the enteric nervous system: Possible interactions and mechanisms underlying dysmotility. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 23(4), e13404. <https://doi.org/10.1111/obr.13404>
- Anand, S., & Patel, T. N. (2024). Integrating the metabolic and molecular circuits in diabetes, obesity and cancer: a comprehensive review. *Discover Oncology*, 15(1), 779.
- Anitha, M., Reichardt, F., Tabatabavakili, S., Nezami, B. G., Chassaing, B., Mwangi, S., ... & 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.
- 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>.
- April-Sanders AK, Rodriguez CJ. (2021). Metabolically Healthy Obesity Redefined. *JAMA Netw Open*, 4(5):e218860. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.8860
- Avtanski, D., Pavlov, V. A., Tracey, K. J., & Poretsky, L. (2019). Characterization of inflammation and insulin resistance in high-fat diet-induced male C57BL/6J mouse model of obesity. *Animal models and experimental medicine*, 2(4), 252–258. <https://doi.org/10.1002/ame2.12084>
- Bagal, S., & Bungay, P. (2014). Restricting CNS penetration of drugs to minimise adverse events: role of drug transporters. *Drug discovery today. Technologies*, 12, e79–e85. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.03.008>
- 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.
- Banerjee, S., Talukdar, I., Banerjee, A., Gupta, A., Balaji, A., & Aduri, R. (2019). Type II diabetes mellitus and obesity: Common links, existing therapeutics and future developments. *Journal of biosciences*, 44(6), 150.

- Beraldi, E.J., Soares, A., Borges, S.C. *et al.* (2015). High-Fat Diet Promotes Neuronal Loss in the Myenteric Plexus of the Large Intestine in Mice. *Dig Dis Sci* 60, 841–849.
- 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>
- Bhatia A, Shatanof RA, Bordoni B. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; Treasure Island (FL): May 1, 2023. Embryology, Gastrointestinal.
- 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>.
- Black, J. A., Liu, S., Tanaka, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2004). Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain*, 108(3), 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2003.12.035>.
- Brasileiro, A. D., Garcia, L. P., da Silva, S. D. C., Rocha, L. B., Pedrosa, A. L., Vieira, A. S., ... & Rodrigues, A. R. A. (2019). Effects of diabetes mellitus on myenteric neuronal density and sodium channel expression in the rat ileum. *Brain Research*, 1708, 1-9.
- Brock C, Softeland E, Gunterberg V, *et al.* Diabetic autonomic neuropathy affects 730 symptom generation and brain-gut axis. *Diabetes Care*. 2013;36(11):3698-3705
- 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. (2012). P2X receptors in the gut. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling*, 1(3), 269-279.
- Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M. Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med*. 2001;161(16):1989-1996.
- Campbell, J., Berry, J., & Liang, Y. (2019). Anatomy and physiology of the small intestine. In *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract*, 2 Volume Set (pp. 817-841). Elsevier.
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut microbes*, 3(4), 279-288.
- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., De la Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., ... & Camacho, A. (2018). Maternal overnutrition by

- hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition & metabolism*, 15, 1-16.
- Castelucci P, Robbins HL, Poole DP *et al* (2002) The distribution of purine P2X(2) receptors in the guinea-pig enteric nervous system. *Histochem Cell Biol* 117:415–422.
- Chandrasekharan, B., Anitha, M., Blatt, R., Shahnavaaz, N., Kooby, D., Staley, C., ... & Srinivasan, S. (2011). Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterology & Motility*, 23(2), 131-e26.
- Cherubini E, Morita K, North RA. Morphine augments calcium-dependent potassium conductance in guinea-pig myenteric neurones. *Br J Pharmacol*. 1984;81(4):617-622.
- Coker, O. O., Nakatsu, G., Dai, R. Z., Wu, W. K. K., Wong, S. H., Ng, S. C., ... & Yu, J. (2019). Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. *Gut*, 68(4), 654-662.
- Costa, M., Brookes, S. J., & Hennig, G. W. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut*, 47(suppl 4).
- Coudray, C., Demigné, C., & Rayssiguier, Y. (2003). Effects of dietary fibers on magnesium absorption in animals and humans. *The Journal of nutrition*, 133(1), 1-4.
- Crespo, M. Á., Lozano, M. G., Paz, S. F., Pérez, M. R., Gago, E. V., & Ferrer, F. M. (2009). Las hormonas gastrointestinales en el control de la ingesta de alimentos. *Endocrinología y Nutrición*, 56(6), 317-330.
- Cruz-Muñoz JR, Valdez-Morales EE, Barajas-Espinosa A, Barrios-García T, Liñán-Rico A, Guerrero-Alba R. Gene expression alterations of purinergic signaling components in obesity-associated intestinal low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Purinergic Signal*. 2024 Dec;20(6):629-643. doi: 10.1007/s11302-024-10006-1
- Cruz-Muñoz, J. R., Barrios-García, T., Valdez-Morales, E. E., Durán-Vazquez, M. F., Méndez-Rodríguez, K. B., Barajas-Espinosa, A., Ochoa-Cortes, F., Martínez-Saldaña, M. C., Gómez-Aguirre, Y. A., & Alba, R. G. (2022). Ethanol extract from *Lepidium virginicum* L. ameliorates DNBS-induced colitis in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 289, 115056. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115056>.
- Cui, J., Xie, F., Yue, H., Xie, C., Ma, J., Han, H., ... & Yao, F. (2024). Physical activity and constipation: A systematic review of cohort studies. *Journal of Global Health*, 14, 04197.
- Cummins, T. R., Black, J. A., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2000). Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), 8754–8761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08754.2000>

- Dennison, C., Prasad, M., Lloyd, A., Bhattacharyya, S. K., Dhawan, R., & Coyne, K. (2005). The health-related quality of life and economic burden of constipation. *Pharmacoeconomics*, 23, 461-476.
- 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>.
- Dooley CP, el Newihi HM, Zeidler A, Valenzuela JE. Abnormalities of the migrating motor complex in diabetics with autonomic neuropathy and diarrhea. *Scand J Gastroenterol*. 1988;23(2):217-223.
- Du, Y. T., Rayner, C. K., Jones, K. L., Talley, N. J., & Horowitz, M. (2018). Gastrointestinal symptoms in diabetes: prevalence, assessment, pathogenesis, and management. *Diabetes care*, 41(3), 627-637.
- 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>
- Feng, L., Zhou, N., Li, Z., Fu, D., Guo, Y., Gao, X., & Liu, X. (2022). Co-occurrence of gut microbiota dysbiosis and bile acid metabolism alteration is associated with psychological disorders in Crohn's disease. *The FASEB Journal*, 36(1), e22100.
- Furness J. B. (2000). Types of neurons in the enteric nervous system. *Journal of the autonomic nervous system*, 81(1-3), 87–96.
- Furness J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(5), 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>.
- Furness, J. B. (2006). Constituent neurons of the enteric nervous system. In J. B. Furness (Ed.), *The enteric nervous system* (pp. 29–79). Blackwell Publishing.
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R., & Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Advances in experimental medicine and biology*, 817, 39–71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3.
- Furness, J. B., Jones, C., Nurgali, K., & Clerc, N. (2004). Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Progress in neurobiology*, 72(2), 143–164.
- Garbati, P., Picco, C., Magrassi, R., Signorello, P., Cacopardo, L., Dalla Serra, M., Faticato, M. G., De Luca, M., Balestra, F., Scavo, M. P., & Viti, F. (2024). Targeting the Gut: A Systematic Review of Specific Drug Nanocarriers. *Pharmaceutics*, 16(3), 431. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16030431>.

- Ghibaudi, L., Cook, J., Farley, C., van Heek, M., & Hwa, J. J. (2002). Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity research*, 10(9), 956–963. <https://doi.org/10.1038/oby.2002.130>
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T., & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and environments*, 32(4), 300-313.
- Horváth, V. J., Putz, Z., Izbéki, F., Körei, A. E., Gerő, L., Lengyel, C., Kempler, P., & Várkonyi, T. (2015). Diabetes-related dysfunction of the small intestine and the colon: focus on motility. *Current diabetes reports*, 15(11), 94. <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0672-8>.
- Hugenholtz, F., de Vos, W.M. Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 149–160 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2693-8>
- Huizinga, J. D., Chen, J. H., Fang Zhu, Y., Pawelka, A., McGinn, R. J., Bardakjian, B. L., ... & Chen, D. (2014). The origin of segmentation motor activity in the intestine. *Nature communications*, 5(1), 3326.
- Huizinga, J. D., Martz, S., Gil, V., Wang, X. Y., Jimenez, M., & Parsons, S. (2011). Two independent networks of interstitial cells of cajal work cooperatively with the enteric nervous system to create colonic motor patterns. *Frontiers in neuroscience*, 5, 93. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00093>.
- Iwasaki H, Kajimura M, Osawa S, *et al*. 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. *J Gastroenterol*. 2006;41(11):1076-1087.
- Iyer, P. G., Borah, B. J., Heien, H. C., Das, A., Cooper, G. S., & Chak, A. (2013). Association of Barrett's esophagus with type II diabetes mellitus: results from a large population-based case-control study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 11(9), 1108-1114.
- Izbéki, F., Wittman, T., Rosztóczy, A., Linke, N., Bódi, N., Fekete, E., & Bagyánszki, M. (2008). Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 80(2), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.12.013>.
- Jéquier E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967, 379–388. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04293.x>
- Jung HK, Kim DY, Moon IH, Hong YS. Colonic transit time in diabetic patients comparison with healthy subjects and the effect of autonomic neuropathy. *Yonsei Med J*. 2003;44(2):265-272.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., ... & Kasuga, M. (2006). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12366–12371. <https://doi.org/10.1073/pnas.1133870100>

- Karemaker JM. An introduction into autonomic nervous function. *Physiol Meas.* 2017 May;38(5):R89-R118.
- Kim SJ, Park JH, Song DK, *et al.* Alterations of colonic contractility in long-term diabetic rat model. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17(4):372-380.
- King B. F. (2021). P2X3 receptors participate in purinergic inhibition of gastrointestinal smooth muscle. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*, 234, 102830. <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2021.102830>
- Klein S, Gastaldelli A, Yki-Järvinen H, Scherer PE. Why does obesity cause diabetes? *Cell Metab.* 2022;34(1):11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.12.012>.
- 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>
- Maleki, D., Locke, G. R., 3rd, Camilleri, M., Zinsmeister, A. R., Yawn, B. P., Leibson, C., & Melton, L. J., 3rd (2000). Gastrointestinal tract symptoms among persons with diabetes mellitus in the community. *Archives of internal medicine*, 160(18), 2808–2816. <https://doi.org/10.1001/archinte.160.18.2808>.
- Maqoud, F., Tricarico, D., Mallamaci, R., Orlando, A., & Russo, F. (2023). The Role of Ion Channels in Functional Gastrointestinal Disorders (FGID): Evidence of Channelopathies and Potential Avenues for Future Research and Therapeutic Targets. *International journal of molecular sciences*, 24(13), 11074. <https://doi.org/10.3390/ijms241311074>.
- Marathe, C. S., Rayner, C. K., Wu, T., Jones, K. L., & Horowitz, M. (2024). Gastrointestinal disorders in diabetes. *Endotext* [Internet].
- Mazzone, A., & Farrugia, G. (2007). Evolving concepts in the cellular control of gastrointestinal motility: neurogastroenterology and enteric sciences. *Gastroenterology Clinics of North America*, 36(3), 499-513.
- Mercado-Perez, A., & Beyder, A. (2022). Gut feelings: mechanosensing in the gastrointestinal tract. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 19(5), 283–296. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00561-y>
- Mohajan, D., & Mohajan, H. K. (2023). Obesity and its related diseases: a new escalating alarming in global health. *Journal of Innovations in Medical Research*, 2(3), 12-23.
- Nakahara M, Isozaki K, Hirota S, *et al.* Deficiency of KIT-positive cells in the colon of patients with diabetes mellitus. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17(6):666-670.
- Narahashi T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2008;84(5): 147-154.
- 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. (2013). Las Subunidades del receptor P2X4 forman parte de los canales P2X nativos en las neuronas mientéricas del ráton.
- North RA, Tonini M. The mechanism of action of narcotic analgesics in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol*. 1977;61(4):541-549.
- North RA. Effects of morphine on myenteric plexus neurones. *Neuropharmacology*. 1976;15(11):719-721.
- North, R. A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews*, 82(4), 1013–1067.
- Nyavor, Y., Brands, C. R., Nicholson, J., Kuther, S., Cox, K. K., May, G., ... & Balemba, O. B. (2021). Supernatants of intestinal luminal contents from mice fed high-fat diet impair intestinal motility by injuring enteric neurons and smooth muscle cells. *Neurogastroenterology & Motility*, 33(1), e13990.
- Ogobuiro, I., Gonzales, J., & Tuma, F. (2021). Physiology, gastrointestinal. In StatPearls. StatPearls Publishing.
- Ohlsson, B., Melander, O., Thorsson, O., Olsson, R., Ekberg, O., & Sundkvist, G. (2006). Oesophageal dysmotility, delayed gastric emptying and autonomic neuropathy correlate to disturbed glucose homeostasis. *Diabetologia*, 49(9), 2010–2014. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0354-9>
- OMS, México. (2019). Retrieved September 25, 2024, from <https://data.who.int/countries/484>
- Osorio, N., Korogod, S., & Delmas, P. (2014). Specialized functions of Nav1. 5 and Nav1. 9 channels in electrogenesis of myenteric neurons in intact mouse ganglia. *Journal of Neuroscience*, 34(15), 5233-5244.
- Padilla, F., Couble, M. L., Coste, B., Maingret, F., Clerc, N., Crest, M., Ritter, A. M., Magloire, H., & Delmas, P. (2007). Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: implication for intestinal reflex function and orofacial pain. *Molecular and cellular neurosciences*, 35(1), 138–152. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.008>.
- Park, D. D., Yum, H. W., Zhong, X., Kim, S. H., Kim, S. H., Kim, D. H., Kim, S. J., Na, H. K., Sato, A., Miura, T., & Surh, Y. J. (2017). *Perilla frutescens* Extracts Protects against Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis: NF-κB, STAT3, and Nrf2 as Putative Targets. *Frontiers in pharmacology*, 8, 482. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00482>
- Patel, K. S., & Thavamani, A. (2022). Physiology, peristalsis. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Pei, Y., Wang, R., Chen, W., Yi, S., Huang, C., Liang, S., Cao, H., Xu, Y., & Tan, B. (2023). Impaired colonic motility in high-glycemic diet-induced diabetic mice is associated with

- disrupted gut microbiota and neuromuscular function. *Endocrine Connections*, 12(9), e230078. Retrieved Dec 11, 2024, from <https://doi.org/10.1530/EC-23-0078>
- Ponce, A., Castillo, A., Hinojosa, L., Martinez-Rendon, J., & Cereijido, M. (2018). The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. *Physiological reports*, 6(8), e13663. <https://doi.org/10.14814/phy2.13663>
- Poole, D. P., Castelucci, P., Robbins, H. L., Chiocchetti, R., & Furness, J. B. (2002). The distribution of P2X3 purine receptor subunits in the guinea pig enteric nervous system. *Autonomic Neuroscience*, 101(1-2), 39-47.
- Preguiça, I., Alves, A., Nunes, S., Fernandes, R., Gomes, P., Viana, S. D., & Reis, F. (2020). Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders—a guide to a translational perspective. *Obesity Reviews*, 21(12), e13081.
- Ramírez-Maldonado, L. M., Guerrero-Castro, J., Rodríguez-Mejía, J. L., Cárdenas-Conejo, Y., Bonales-Alatorre, E. O., Valencia-Cruz, G., Anguiano-García, P. T., Vega-Juárez, I. I., Dagnino-Acosta, A., Ruvalcaba-Galindo, J., Valdez-Morales, E. E., Ochoa-Cortes, F., Barajas-Espinosa, A., Guerrero-Alba, R., & Liñán-Rico, A. (2025). Obesogenic cafeteria diet induces dynamic changes in gut microbiota, reduces myenteric neuron excitability, and impairs gut contraction in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 328(1), G32–G48. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00198.2024>.
- 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>.
- Reichardt, F., Chassaing, B., Nezami, B. G., Li, G., Tabatabavakili, S., Mwangi, S., Uppal, K., Liang, B., Vijay-Kumar, M., Jones, D., Gewirtz, A. T., & Srinivasan, S. (2017). Western diet induces colonic nitrergic myenteric neuropathy and dysmotility in mice via saturated fatty acid- and lipopolysaccharide-induced TLR4 signalling. *The Journal of physiology*, 595(5), 1831–1846. <https://doi.org/10.1113/JP273269>
- 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(3), 809-821.
- Rivera, L. R., Leung, C., Pustovit, R. V., Hunne, B. L., Andrikopoulos, S., Herath, C., ... & Furness, J. B. (2014). Damage to enteric neurons occurs in mice that develop fatty liver disease but not diabetes in response to a high-fat diet. *Neurogastroenterology & Motility*, 26(8), 1188-1199.
- 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*, 11(1), 77-91.
- Ruan H-Z, Burnstock G (2005) The distribution of P2X5 purinergic receptors in the enteric nervous system of mouse. *Cell Tiss Res* 319:191–200.

- Rubino, F., Cummings, D. E., Eckel, R. H., Cohen, R. V., Wilding, J. P. H., Brown, W. A., Stanford, F. C., Batterham, R. L., Farooqi, I. S., Farpour-Lambert, N. J., le Roux, C. W., Sattar, N., Baur, L. A., Morrison, K. M., Misra, A., Kadowaki, T., Tham, K. W., Sumithran, P., Garvey, W. T., Kirwan, J. P., ... Mingrone, G. (2025). Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 13(3), 221–262. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(24\)00316-4](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(24)00316-4)
- Said, H. M. (Ed.). (2018). *Physiology of the gastrointestinal tract*. Academic Press.
- Shahrestani, J., & Das, J. M. (2022). Neuroanatomy, auerbach plexus. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
- Smith TH, Grider JR, Dewey WL, Akbarali HI (2013) Correction: Morphine Decreases Enteric Neuron Excitability via Inhibition of Sodium Channels. *PLOS ONE* 8(5): 10.1371/annotation/c2d0d839-3fea-4dfd-ad78-4e4fb1271b20. <https://doi.org/10.1371/annotation/c2d0d839-3fea-4dfd-ad78-4e4fb1271b20>
- Smith, T. H., Ngwainmbi, J., Grider, J. R., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2013b). An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (78), 50688.
- Smith, T. K., Spencer, N. J., Hennig, G. W., & Dickson, E. J. (2007). Recent advances in enteric neurobiology: mechanosensitive interneurons. *Neurogastroenterology and motility*, 19(11), 869–878. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2007.01019.x>
- Smout AJ. Oesophageal function. In *Gastrointestinal Function in Diabetes Mellitus*. Horowitz M, Samsom M, Eds. Chichester, Wiley, 2004, p. 97–116
- Soares, A., Beraldi, E. J., Ferreira, P. E., Bazotte, R. B., & Buttow, N. C. (2015). Intestinal and neuronal myenteric adaptations in the small intestine induced by a high-fat diet in mice. *BMC gastroenterology*, 15, 3. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0228-z>
- Spencer, N. J., & Bywater, R. A. (2002). Enteric nerve stimulation evokes a premature colonic migrating motor complex in mouse. *Neurogastroenterology and motility*, 14(6), 657–665. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2982.2002.00367.x>
- Spencer, N. J., & Smith, T. K. (2004). Mechanosensory S-neurons rather than AH-neurons appear to generate a rhythmic motor pattern in guinea-pig distal colon. *The Journal of physiology*, 558(Pt 2), 577–596. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.063586>
- Spencer, N. J., Dinning, P. G., Brookes, S. J., & Costa, M. (2016). Insights into the mechanisms underlying colonic motor patterns. *The Journal of physiology*, 594(15), 4099–4116. <https://doi.org/10.1113/JP271919>
- Srikumar K, Premalatha R. Effect of gastrointestinal proteases on purified human intrinsic factor-vitamin B12 (IF-B12) complex. *Indian J Biochem Biophys*. 2003 Apr;40(2):139-42.

- Stenkamp-Strahm CM, Kappmeyer AJ, Schmalz JT, Gericke M, Balemba O. High-fat diet ingestion correlates with neuropathy in the duodenum myenteric plexus of obese mice with symptoms of type 2 diabetes. *Cell Tissue Res.* 2013 Nov;354(2):381-94. doi: 10.1007/s00441-013-1681-z
- Sun, H., Saeedi, P., Karuranga, S., Pinkepank, M., Ogurtsova, K., Duncan, B. B., Stein, C., Basit, A., Chan, J. C. N., Mbanya, J. C., Pavkov, M. E., Ramachandaran, A., Wild, S. H., James, S., Herman, W. H., Zhang, P., Bommer, C., Kuo, S., Boyko, E. J., & Magliano, D. J. (2022). IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes research and clinical practice*, 183, 109119. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
- Sundin, J., Aziz, I., Nordlander, S., Polster, A., Hu, Y. O., Hugerth, L. W., ... & Öhman, L. (2020). Evidence of altered mucosa-associated and fecal microbiota composition in patients with Irritable Bowel Syndrome. *Scientific reports*, 10(1), 593.
- 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
- Tan P, Pepin E, Lavoie JL. (2018). Mouse Adipose Tissue Collection and Processing for RNA Analysis. *J Vis Exp.* (131).
- Thazhath, S. S., Jones, K. L., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2013). Diabetic gastroparesis: recent insights into pathophysiology and implications for management. *Expert review of gastroenterology & hepatology*, 7(2), 127–139. <https://doi.org/10.1586/egh.12.82>
- Thomas, S., Dilbarov, N., Kelly, J., Mercogliano, G., & Prendergast, G. C. (2023). Diet effects on colonic health influence the efficacy of Bin1 mAb immunotherapy for ulcerative colitis. *Scientific reports*, 13(1), 11802. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38830-2>
- Treuting, P. M., Arends, M. J., & Dintzis, S. M. (2018). In *Comparative Anatomy and Histology* (pp. 191-227). Academic Press.
- Valdez-Morales, E., Guerrero-Alba, R., Liñán-Rico, A., Espinosa-Luna, R., Zarazua-Guzman, S., Miranda-Morales, 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.
- Vandamme T. F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 6(1), 2–9.
- Virtue S, Vidal-Puig A. GTTs and ITTs in mice: simple tests, complex answers. *Nat Metab.* 2021;3(7):883-886
- Voss, U., Sand, E., Olde, B., & Ekblad, E. (2013). Enteric neuropathy can be induced by high fat diet in vivo and palmitic acid exposure in vitro. *PloS one*, 8(12), e81413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081413>
- Waxenbaum, J. A., Reddy, V., & Varacallo, M. (2019). *Anatomy, autonomic nervous system*.

- Wondmkun YT. Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes: Associations and Therapeutic Implications. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2020;13:3611-3616.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Rushing, P. A., D'Alessio, D., & Tso, P. (2003). A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *The Journal of nutrition*, 133(4), 1081–1087. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1081>
- Wu, Y., Li, D., & Vermund, S. H. (2024). Advantages and Limitations of the Body Mass Index (BMI) to Assess Adult Obesity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 21(6), 757. <https://doi.org/10.3390/ijerph21060757>
- Yan, Y., Zhou, X., Guo, K., Zhou, F., & Yang, H. (2020). Chlorogenic Acid Protects Against Indomethacin-Induced Inflammation and Mucosa Damage by Decreasing Bacteroides-Derived LPS. *Frontiers in immunology*, 11, 1125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01125>.
- 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>.
- Zhang, M., & Merlin, D. (2018). Nanoparticle-Based Oral Drug Delivery Systems Targeting the Colon for Treatment of Ulcerative Colitis. *Inflammatory bowel diseases*, 24(7), 1401–1415. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy123>
- 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>
- Zholos, A. V., Baidan, L. V., & Wood, J. D. (2002). Sodium conductance in cultured myenteric AH-type neurons from guinea-pig small intestine. *Autonomic Neuroscience*, 96(2), 93-102.