



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Relación entre el consumo de edulcorantes no nutritivos y  
la expresión de los receptores CB1 y CB2 en tejido  
pancreático y hepático de ratones.”**

## **TESIS**

Que para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

Alejandra Mercado Beltrán

Comité de Tutores

Director

Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Co-director

Dra. Irazú Contreras García

Asesor

M.C.S Marcela Sánchez Delgado

Toluca, Estado de México

2020

## **Aviso de autoría**

Yo, **Alejandra Mercado Beltrán**, autora responsable de la presente **Tesis**, la cual lleva como título “Relación entre el consumo de edulcorantes no nutritivos y la expresión de los receptores CB1 y CB2 en tejido pancreático y hepático de ratones”, y en representación de los coautores:

- a) **PhD José Antonio Estrada Guadarrama**,
- b) **PhD Irazú Contreras García**, y
- c) **M. en C.S. Marcela Sánchez Delgado**

declaro que la información presentada en este documento es resultado de un protocolo de investigación del cual soy representante, y por tanto me responsabilizo legalmente por el contenido en caso de plagio, deslindando de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma del Estado de México.

## INDICE

	No. página
Resumen	3
Abstract	4
1. Antecedentes	5
1.1 Generalidades del sistema endocanabinoide (SEC)	5
1.1.1 Regulación del balance energético y el sistema endocanabinoide	8
1.1.2 Función del páncreas y el hígado en el balance energético	10
1.1.3 Funciones del sistema endocanabinoide en hígado	12
1.1.4 Funciones del sistema endocanabinoide en páncreas	13
1.1.5 Efecto de la dieta en el funcionamiento de los endocanabinoides	14
1.2 Edulcorantes nutritivos y no nutritivos	15
1.2.1 Sacarosa	17
1.2.2 Sucralosa	18
1.2.3 Glucósidos de esteviol	18
1.3 Edulcorantes no nutritivos en el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs)	19
2. Planteamiento del Problema	21
3. Hipótesis	23
4. Objetivos generales y específicos	24
5. Justificación	25
6. Material y Métodos	26
6.1 Diseño de estudio	26
6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	26
6.3 Procedimientos	27
6.4 Variables de Estudio	33
6.5 Implicaciones Bioéticas	36
6.6 Análisis Estadístico	36
7. Referencias bibliográficas	37
8. Anexos	41
8.1 Carta de envío del artículo	41
8.2 Resumen del artículo	42
8.3 Carta de aprobación del comité de ética	43

## **Resumen:**

Los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide tienen funciones importantes en el hígado y el páncreas, ya que participan en funciones esenciales como la regulación del metabolismo celular, la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa. En general, las dietas de alta energía promueven la activación de los receptores CB, que cuando se estimulan crónicamente, se asocian con anomalías metabólicas e inflamación en condiciones como la obesidad y la diabetes. La ingestión de edulcorantes no nutritivos se ha expandido en poblaciones de todo el mundo con el propósito de reducir el contenido energético de la dieta y para el control de enfermedades crónicas asociadas con alteraciones del metabolismo energético; sin embargo, se desconocen los posibles efectos de estos compuestos sobre la regulación del sistema endocanabinoide a nivel hepático y pancreático. El objeto de estudio fue evaluar la presencia de cambios en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en páncreas e hígado de animales experimentales a quienes se les suministraron edulcorantes no nutritivos comerciales (glucósidos de esteviol o sucralosa) en un período de 6 semanas. Después de la suplementación, se analizó la expresión de los receptores CB1 y CB2 de ambos tejidos mediante la técnica de western blot e inmunofluorescencia. Los resultados muestran reducciones significativas en la expresión de CB1 y CB2 en hígado, particularmente en animales machos suplementados con glucósidos de esteviol, con tendencias hacia una expresión reducida de CB1 en páncreas en el mismo grupo. Por el contrario, hubo una tendencia hacia una mayor expresión de CB1 hepático en animales hembra suplementados con sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol. Estos datos apuntan a que la ingestión frecuente de edulcorantes no nutritivos específicos promueve alteraciones dependientes del sexo en la expresión de los receptores CB en el páncreas y el hígado *in vivo*.

## Abstract

CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors of the endocannabinoid system have important roles in the liver and pancreas, since they participate in essential functions like the regulation of cellular metabolism, insulin release and glucose homeostasis. In general, high-energy diets promote activation of CB receptors, that when chronically stimulated, are associated with metabolic abnormalities and inflammation in conditions like obesity and diabetes. Intake of non-nutritive sweeteners has expanded in populations worldwide with the purpose of reducing dietary energy content and for the control of chronic diseases associated with altered energy metabolism; however, the possible effects of these compounds on the regulation of the endocannabinoid system at the hepatic and pancreatic level is unknown. The object of this study was to evaluate presence of changes in the expression of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors in pancreas and liver of adult mice supplemented with commercial non-nutritive sweeteners (sucralose and steviol glycosides) over a period of 6 weeks. After supplementation, the expression of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors from both tissues was analyzed by western blot and immunofluorescence. The results show significant reductions in hepatic CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> expression particularly in male animals supplemented with steviol glycosides, with trends towards reduced pancreatic CB<sub>1</sub> expression in the same group. In contrast, there was a trend towards enhanced hepatic CB<sub>1</sub> expression in female animals supplemented with either sucrose, sucralose or steviol glycosides. These data suggest that continuous ingestion of specific non-nutritive sweeteners promotes sex-dependent alterations in the expression of CB receptors in the pancreas and liver *in vivo*.

## **1. Antecedentes:**

### **1.1 Generalidades del sistema endocanabinoide**

El descubrimiento del sistema endocanabinoide (SEC) sucedió a finales de la década de los ochenta e inicios de los noventa. Este hallazgo se derivó de las investigaciones realizadas a la planta *Cannabis sativa*, relacionadas con los efectos de bienestar que producía a través de interacciones no específicas. A partir de ello, se localizaron por primera vez los receptores de canabinoides en el cerebro de animales <sup>1</sup>.

El SEC es un sistema de señalización capaz de intervenir en diversos procesos biológicos. Este sistema utiliza los mecanismos biológicos básicos de transducción de señales y es capaz de intervenir en la fisiología del sistema nervioso central (SNC) y periférico (SNP), así como de todo tipo de células y tejidos en el organismo. Actualmente, se sabe que el sistema endocanabinoide tiene una participación clave en la regulación del metabolismo energético a nivel sistémico. Este sistema está involucrado en muchas actividades fisiológicas y patológicas y funciona como un sistema homeostático regulador en varios tejidos, como el cerebro, la piel, el hígado, el sistema cardiovascular, los huesos, los riñones, el páncreas, el tejido adiposo, el muscular y la vía digestiva <sup>2-5</sup>.

El SNC ha sido reconocido durante mucho tiempo como un sitio de control del comportamiento de la alimentación; sin embargo, hay pruebas sustanciales de que la señalización por endocannabinoides en los tejidos periféricos también desempeña un papel importante en la homeostasis energética, ya que está involucrado en la asimilación de glucosa y lípidos <sup>6,7</sup>.

Existen múltiples neurotransmisores y hormonas implicados en la regulación del metabolismo energético. Los mediadores involucrados en el control neuronal del comportamiento del apetito también se han implicado en la regulación del metabolismo de la energía. Esto ocurre debido a que las neuronas especializadas en el cerebro detectan la disponibilidad de nutrientes y el cerebro modifica los mecanismos neuronales y hormonales de acuerdo con las necesidades del cuerpo <sup>3</sup>.

El sistema de endocannabinoides está compuesto por receptores específicos e inespecíficos, y se han identificado dos receptores concretos para canabinoides acoplados a proteínas G: CB1 y

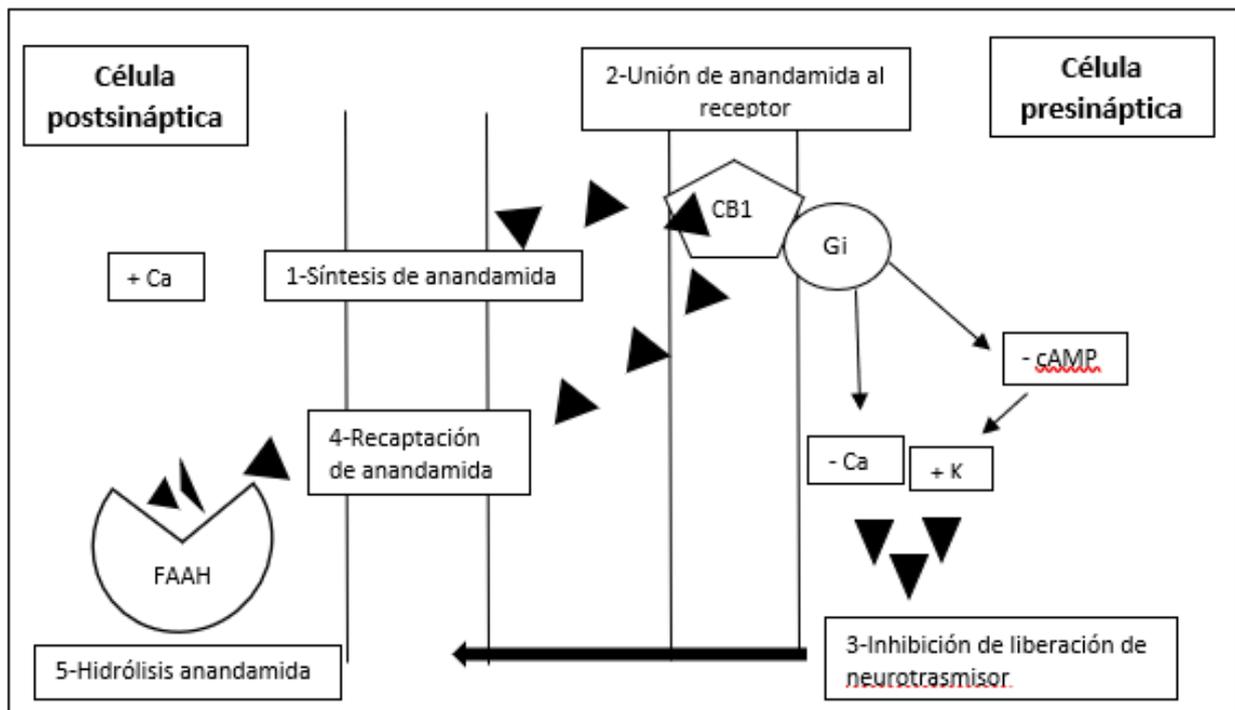
CB2. Estos receptores constan de siete dominios de  $\alpha$ -hélices transmembranales, acopladas con tres regiones intracelulares (i1-i3) y tres fuera de la célula (e1-e3) <sup>2,4</sup>.

El receptor CB1 está ampliamente localizado en el neocórtex, el hipocampo, los ganglios basales, la amígdala, el estriado, el cerebelo y el hipotálamo. Estas regiones cerebrales influyen en una amplia variedad de funciones de comportamiento como el aprendizaje y la memoria, la toma de decisiones en la función ejecutiva, la sensibilidad sensorial y motora, las reacciones emocionales, así como la alimentación y otros procesos homeostáticos. Este receptor se ubica en la superficie de las neuronas presinápticas, regulando el flujo de neurotransmisores como dopamina, noradrenalina, glutamato, GABA y serotonina. Como se mencionó anteriormente, el receptor CB1 está presente no sólo en el SNC, sino también en muchos órganos periféricos. Sus niveles de expresión en tejido adiposo, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas se elevan en condiciones de obesidad y diabetes <sup>2,5</sup>.

Existe una expresión baja de CB2 en el cerebro. Este receptor se encuentra principalmente en células inmunológicas, incluyendo macrófagos y linfocitos T y B, que al activarse reducen la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Las secuencias proteicas del receptor CB2 presentan un 44% de semejanza en comparación con el CB1. Una de sus funciones a nivel fisiológico concierne a la interacción con el sistema inmunitario <sup>2,8</sup>.

Los ligandos endógenos del sistema endocanabinoide consisten en lípidos conocidos como endocanabinoides por su similitud funcional con los cannabinoides vegetales, particularmente el 2-araquidonilglicerol (2-AG) y anandamida (AEA). Ambos se sintetizan a demanda a partir de los glicerofosfolípidos de la membrana celular y ambos cuentan con sus respectivas enzimas de degradación. La enzima ácido graso amida hidrolasa (FAAH) hidroliza a la AEA, y la monoacilglicerol lipasa (MAGL) hidroliza al 2-AG <sup>1,4,9</sup>.

En la figura 1 se muestra una figura adaptada con el modelo de la transmisión sináptica cannabinoide de la anandamida de Elphick y Egertova.



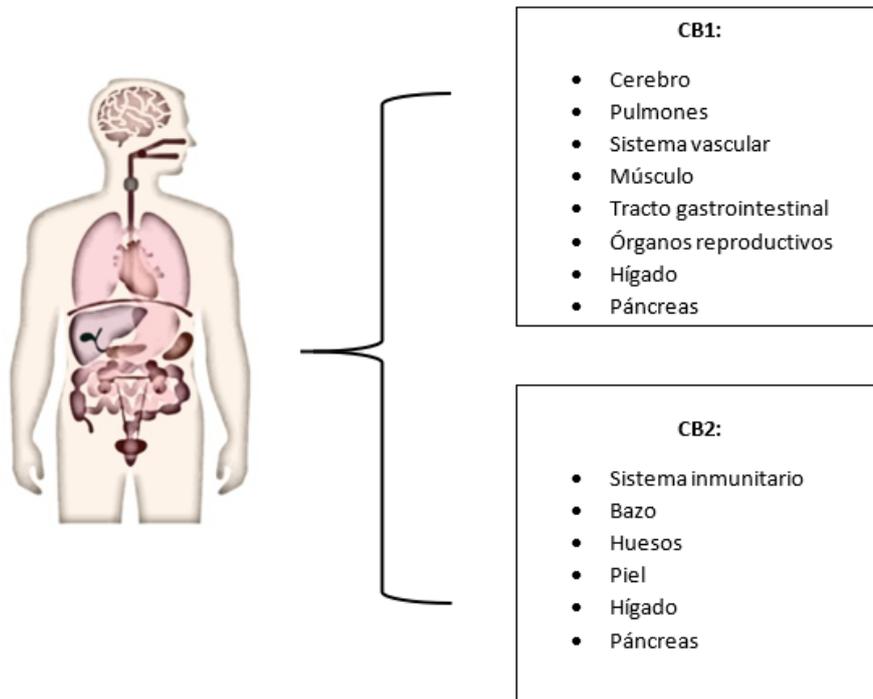
**Figura 1.** (Adaptada) “La anandamida se comporta como una molécula de transmisión retrógrada que inhibe la liberación de distintos neurotransmisores clásicos de terminales presinápticos. La anandamida se sintetiza y libera de la neurona postsináptica y difunde al espacio sináptico, donde se une a los receptores CB1 localizados en las neuronas presinápticas, inhibiendo la liberación del neurotransmisor. La anandamida es hidrolizada intracelularmente por el enzima FAAH”<sup>10</sup>.

La señalización sináptica de los endocannabinoides se caracteriza por un proceso retrógrado. Es decir, una neurona típica que libera un neurotransmisor químico (por ejemplo, glutamato) se denomina como "presináptica"; la neurona objetivo que capta ese neurotransmisor es "postsináptica". Sin embargo, los endocannabinoides se sintetizan y liberan de las células postsinápticas y viajan en dirección opuesta a través de la sinapsis, donde se encuentran con receptores CB1 en terminales nerviosas adyacentes. Estos receptores inhiben la liberación de muchos neurotransmisores inhibidores y excitadores<sup>8</sup>.

Los cambios representados por la expresión de los receptores de cannabinoides pueden hacer que el sujeto sea susceptible a diferentes enfermedades. Por ejemplo, el sistema endocanabinoide se ha relacionado con el desarrollo de muchas enfermedades metabólicas, entre ellas obesidad, diabetes *mellitus* tipo II, enfermedad del hígado graso y enfermedades renales crónicas. La función del SEC en órganos periféricos involucra la regulación del metabolismo de lípidos y glucosa. La activación del receptor CB1 aumenta la acumulación de

lípidos inducida por lipogénesis en hígado y células grasas, por lo que promueve la adipogénesis al aumentar la expresión de enzimas adipogénicas y la actividad de la lipoproteína lipasa, favoreciendo la acumulación de gotas ricas en triglicéridos <sup>5,11</sup>.

En la figura 2 se muestra la distribución de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide.



**Figura 2.** (Adaptada) Distribución de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide <sup>12</sup>.

No obstante, este sistema y las sustancias exógenas que están involucradas siguen en estudio para comprender todos sus mecanismos. La especie vegetal que produce la mayor cantidad de cannabinoides es *Cannabis spp.* Sus variedades más habituales son la americana e índica. En esta especie vegetal se han descrito alrededor de 250 sustancias; más de 70 son cannabinoides, aunque solo existen al momento estudios sobre el tetrahidrocannabinol (THC) y sobre cannabidiol (CDB). El resto de los cannabinoides de la planta aún se investigan <sup>9</sup>.

### 1.1.1 Regulación del balance energético y el sistema endocanabinoide

La alimentación no solo se rige por el déficit de energía a equilibrar, sino que connota un significado más amplio. Por ejemplo, los individuos pueden aumentar la ingestión de alimentos debido a varios factores, tales como costumbre, palatabilidad y disponibilidad de los alimentos,

circunstancias sociales, estrés, procesos inhibitorios debido al consumo de alcohol y estimulación por señales condicionadas, como el olor o la vista <sup>4</sup>.

El sistema gastrointestinal (TGI) produce hormonas que tienen importantes funciones de detección y señalización en la regulación de la homeostasis energética. Los receptores de sabor dulce, T1R2 y T1R3 fueron los primeros identificados en la vía oral y el TGI, donde se observó que se detectaban estímulos de sabor dulce. Una diferencia importante entre el sabor dulce oral y el sabor dulce del TGI es que la activación de los receptores del gusto dulce de este último no permite que se perciba la sensación de dulzura. A pesar de que el cerebro no percibe la dulzura a través de la activación de los receptores del TGI de sabor dulce, la evidencia muestra que la activación de estos receptores desencadena cambios fisiológicos <sup>13, 14</sup>.

La homeostasis energética depende de una gran cantidad de hormonas, muchas de las cuales son secretadas por el TGI. La ghrelina es una hormona intestinal (orexigénica) estimulante del apetito, secretada por las glándulas oxínticas del estómago, y sus concentraciones aumentan antes de las comidas. Otras hormonas intestinales son anorexigénicas; es decir, disminuyen el apetito y la ingestión de alimentos. Estas incluyen la insulina, péptido tirosina-tirosina (PYY), polipéptido pancreático, amilina y los péptidos similares al glucagón GLP-1 y GLP-2 <sup>11</sup>.

El hipotálamo incluye varios tipos neuronales hipotalámicos que tienen acciones diferentes y opuestas en la regulación del balance energético. En consecuencia, se esperaría que la activación del receptor CB1 del sistema endocanabinoide ejerza efectos dependientes del tipo celular en las respuestas metabólicas y de comportamiento. La eliminación de CB1 de las neuronas disminuye la adiposidad al incrementar la acción del sistema nervioso simpático y la lipólisis en el tejido adiposo, lo que facilita los efectos metabólicos de la leptina; sin embargo, la resistencia a la leptina conlleva al efecto contrario, es decir, aumento de la adiposidad. Por lo tanto, la actividad del CB1 en las neuronas actúa como un interruptor molecular que garantiza la flexibilidad metabólica y adapta al organismo a los cambios en la dieta. En conjunto, la activación del CB1 por los endocannabinoides reduce la inhibición de las neuronas en las áreas diana del cerebro, contribuyendo al aumento de la ingestión de alimentos <sup>11</sup>.

El bloqueo de los receptores CB1 disminuye la ingestión de sacarosa y de nutrimentos densos en energía. En varios países, fundamentalmente en Europa, se utilizó terapéuticamente el fármaco SR141716A (Rimonabat) durante dos años (2006-2008), período en el que su consumo

demonstró que el antagonismo del receptor CB1 además de reducir el consumo de alimentos, modifica el metabolismo energético, beneficiando la oxidación de recursos en vez de su almacenamiento; sin embargo, al inhabilitar dicho receptor presente en el SNC, se observan síntomas de depresión o ansiedad en pacientes susceptibles. El SEC se relaciona al equilibrio emocional, que responden a períodos de estrés y ansiedad a través de la activación de CB1 en neuronas por sus agonistas endógenos AEA o 2-AG. Así, la inhibición de CB1 en el SNC facilita la manifestación de efectos secundarios de carácter depresivo y de ansiedad. Debido a ello, se suspendió la comercialización del fármaco en 2009 <sup>15</sup>.

La influencia del sistema endocanabinoide, y el receptor CB1 principalmente, en la utilización de la energía y la homeostasis, no solo se da por mecanismos centrales, sino que también actúa periféricamente para modular el metabolismo del tejido adiposo, la función renal, la lipogénesis hepática, la actividad muscular y la homeostasis pancreática. Estando sobreexcitado de forma tónica durante la obesidad, el sistema endocanabinoide y el receptor CB1 contribuyen al deterioro de la función hormonal y metabólica, como la obesidad, una enfermedad crónico-degenerativa de impacto mundial, por lo que el receptor CB1 se encuentra como un objetivo terapéutico para este padecimiento <sup>5</sup>.

### *1.1.2 Función del páncreas y el hígado en el balance energético*

La regulación del metabolismo energético establece un proceso necesario para el óptimo trabajo celular y que exista un balance entre la síntesis de grasa corporal y se catabolismo. El proceso antes mencionado tiene inicio a nivel del SNC, en el hipotálamo. Los neuropéptidos realizan funciones de regulación digestiva e inmunitaria, son liberados en el hipotálamo y en el TGI, con acciones sinérgicas o antagonistas, interactúan entre sí con diferentes señales neurales, llevando la información al sistema nervioso central, que así emite una respuesta en términos de inicio o fin de la alimentación y por ende, la regulación del gasto energético <sup>16,17</sup>.

La producción endógena de glucosa es eficiente y responde a las necesidades de energía del cuerpo; por ejemplo, en cerebro, músculo esquelético y sistema inmunológico. Los neurotransmisores y las hormonas gastrointestinales que libera el TGI se consideran los principales reguladores periféricos del apetito y la saciedad. Un desequilibrio en esta red de señalización podría desencadenar procesos patológicos crónicos, como la obesidad <sup>14,18</sup>.

El páncreas es una glándula mixta que regula el balance energético. Está compuesto de tejido exocrino que incluye células acinares que secretan enzimas digestivas y por tejido endócrino que contiene los islotes de Langerhans. La homeostasis hormonal del páncreas mantiene los niveles de glucosa normales. Presenta cuatro tipos celulares principales: células  $\beta$  insulinógenas, células  $\alpha$  que secretan de glucagón, células  $\delta$  que sintetizan somatostatina y células  $\epsilon$  que producen polipéptido pancreático. Las diabetes *mellitus* tipo 1 y tipo 2 se relacionan con el déficit de la producción de insulina en las células  $\beta$  y en la respuesta de insulina en otros tejidos, éstos cambios patológicos en el páncreas son críticos para evolución de la enfermedad. Como consecuencia, la masa del páncreas aumenta con la obesidad en sujetos obesos y se caracteriza principalmente por la infiltración de grasa dentro del páncreas exocrino y los espacios interlobulares <sup>19</sup>.

Posterior a la ingestión de alimentos, el páncreas libera insulina, principal hormona reguladora del contenido de glucosa en plasma. Su secreción se regula por hormonas intestinales llamadas incretinas, que incluyen el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y otras moléculas, como el péptido similar al glucagón (GLP-1), además de hormonas secretadas por las células K o L de la pared intestinal. Los tres mecanismos de acción de la insulina son, entre otros, la estimulación de la absorción de glucosa en tejidos periféricos como el tejido adiposo o el músculo, por medio de transportadores de glucosa sensibles a insulina. La insulina es una hormona principalmente anabólica, que facilita el almacenamiento de glucógeno y triglicéridos. Así, inactiva la secreción de glucagón, evitando la gluconeogénesis <sup>20</sup>.

Por otro lado, el hígado es otro de los órganos críticos para procesos fisiológicos que incluyen el metabolismo de los macro nutrientes, la captación, síntesis, empaquetamiento y secreción de lípidos y lipoproteínas; es decir, la homeostasis de los lípidos y el colesterol y la descomposición de los compuestos xenobióticos, incluidos muchos medicamentos actuales. La energía que proviene de la dieta es necesaria para estimular todos los procesos fisiológicos, entre ellos, la capacidad de almacenar la glucosa en forma de glucógeno y de proporcionar glucosa a través de la gluconeogénesis en respuesta al ayuno. En contraste, a concentraciones elevadas de glucosa, el hígado puede ensamblar ácidos grasos y glicerol en triglicéridos y éstos pueden llegar a otros órganos, como el tejido adiposo, para el almacenamiento <sup>14</sup>.

Durante el ayuno, las concentraciones de glucosa en sangre se mantienen gracias a las reservas de glucógeno hepático, lo que permite el abasto de energía en todo el organismo. Esto sucede

cuando las células  $\alpha$  pancreáticas liberan glucagón y se estimula la gluconeogénesis. Esta hormona catabólica se ensambla con receptores asociados a proteínas G, que promueven la gluconeogénesis y glucogenólisis, permitiendo la liberación de glucosa desde el hígado <sup>20</sup>.

### 1.1.3 Funciones del sistema endocanabinoide en hígado

El SEC interfiere en la ingestión de alimentos y el gasto de energía. Está presente en los tejidos periféricos metabólicamente relevantes, es decir, hígado, tejido adiposo, tejido músculo esquelético y páncreas endocrino, cuya fisiología normal se mantiene en parte a través de los receptores CB1. La activación del CB1 puede favorecer la formación de tejido adiposo visceral, que contribuye a la inflamación inducida por la obesidad y la resistencia a la insulina <sup>21</sup>.

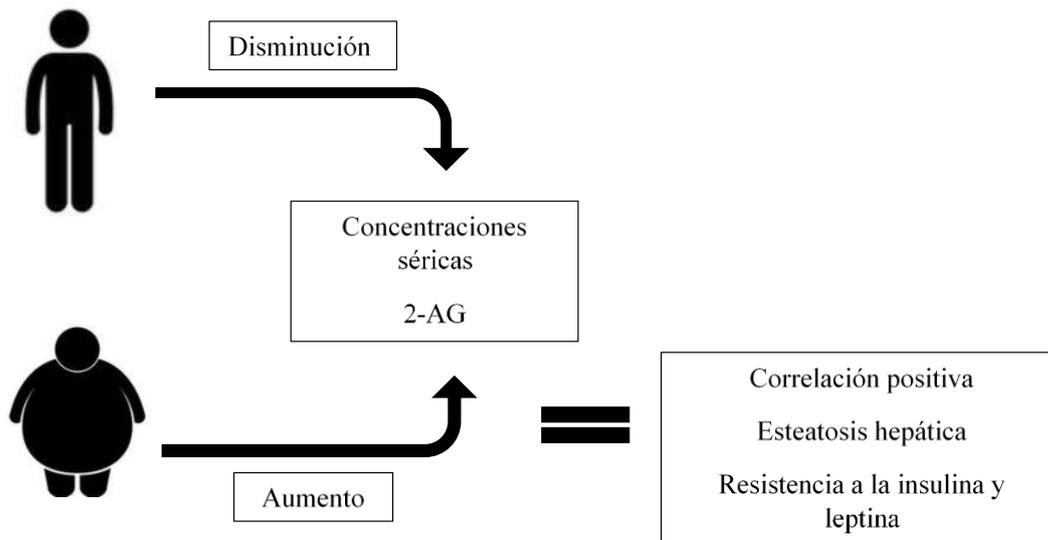
Usualmente, los receptores canabinoides se expresan poco en hígado, donde observan bajas concentraciones de CB1 en hepatocitos y células endoteliales y CB2 en células de Kupffer. No obstante, el incremento de la expresión del CB1 en hepatocitos, miofibroblastos y células endoteliales, y la expresión del CB2 en células de Kupffer y miofibroblastos, se relacionan con daño hepático en distintos grados, ya sea agudo o crónico. Existe un aumento en la concentración de 2-AG en hepatocitos y en células estrelladas, y de la anandamida (AEA) en hepatocitos, células endoteliales y de Kupffer. La activación del receptor CB1 también induce lipogénesis, que es relevante para la esteatosis hepática durante la obesidad <sup>22, 23</sup>.

Los seres humanos no pueden sintetizar el ácido araquidónico *de novo*, por lo que la producción de endocanabinoides se basa en el suministro dietético de ácido araquidónico y linoleico. Existe una relación entre la ingestión de grasa y la producción del endocanabinoide AEA a nivel del tracto gastrointestinal y hepático, por lo que una dieta alta en grasas incrementa la densidad del receptor CB1 en la membrana celular y las tasas basales de síntesis de ácidos grasos <sup>1, 20</sup>.

El receptor CB2 también es importante en la fisiopatología hepática. Su expresión es elevada en el hígado durante la cirrosis hepática, esteatosis no alcohólica e hígado graso. Estas condiciones sugieren también la participación de CB2 en los cambios metabólicos en la fisiopatología hepática. En pacientes obesos con tendencia a desarrollar síndrome metabólico la expresión endocanabinoide aumenta, con concentraciones séricas mayores de 2-AG que los de personas con normopeso. Los niveles de 2-AG en sangre arterial y venosa hepática y el contenido de lípidos en hígado presentan una correlación positiva. Lo anterior indica la

contribución de los endocannabinoides y de los receptores CB2 hepáticos en el desarrollo de esteatosis. El síndrome metabólico y las afecciones que conlleva, como dislipidemia y resistencia a insulina y leptina, se asocian al SEC hepático <sup>22</sup>.

En la figura 3 se muestra en forma resumida la relación del peso con el aumento o disminución de las concentraciones séricas de 2-AG y la correlación positiva de la hiperactivación del SEC.



**Figura 3.** (Adaptada) Relación del peso con el aumento o disminución de las concentraciones séricas de 2-araquidonilglicerol (2-AG) <sup>22</sup>.

#### 1.1.4 Funciones del sistema endocanabinoide en páncreas

En el metabolismo de hidratos de carbono, los endocannabinoides regulan las concentraciones de insulina y el uso de glucosa por los tejidos. En estudios con roedores, el insulinoma de ratas demostró que la producción de endocannabinoides se inhibe por insulina, indicando que el aumento de la activación del SEC por concentraciones elevadas de glucosa en sangre contribuye a las concentraciones mayores de insulina características de la obesidad <sup>16</sup>.

El páncreas endocrino desempeña un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa. La expresión de los receptores CB1 se da en las células  $\alpha$  de los islotes pancreáticos, mientras que la expresión del CB2 se ha evidenciado en las células que secretan somatostatina. La señalización a través del receptor CB1 regula tanto las señales dependientes de insulina, como

su liberación. De manera particular, la activación de los receptores CB1 en células  $\beta$  permiten la reorganización del citoesqueleto, que conduce a la exocitosis de vesículas secretoras de insulina. Por el contrario, el bloqueo farmacológico del receptor CB1 reduce la secreción de insulina, por lo que afecta la glucemia. Además, los endocannabinoides pueden detectarse en la circulación, cuya estrategia facilita la medición de los endocannabinoides en humanos <sup>1,24</sup>.

El aumento de la AEA en plasma está relacionado con una mayor expresión de ARNm del CB1 en sangre de pacientes afectados por trastornos de alimentación, como anorexia y bulimia. Las concentraciones de endocannabinoides en plasma se relacionan positivamente con marcadores de obesidad y trastornos metabólicos, como el IMC, la circunferencia de la cintura, grasa visceral y falta de sensibilidad a la insulina <sup>25</sup>. La obesidad representa una de tantas enfermedades que provocan un desequilibrio homeostático, de ello se deriva una hipersecreción de insulina; sin embargo, también provoca una sobreactivación endocanabinoide de los receptores CB1 en las células  $\beta$ , por lo que más tarde, con un continuo deterioro de la señalización de insulina, favorece al estrés y daño de las células  $\beta$  <sup>26</sup>.

#### *1.1.5 Efecto de la dieta en el funcionamiento de los endocannabinoides*

Los sentidos y el pensamiento estimulan la corteza cerebral cuando una persona piensa o se encuentra ante un alimento, activando de esta forma la fase cefálica de preparación para el consumo de alimento en el sistema nervioso central. Los estímulos que producen el gusto y el olfato son enviados al hipotálamo y a la médula espinal a través del nervio vago, donde inducen a la producción de endocannabinoides. Existe un aumento progresivo de la actividad endocanabinoide entre comidas. A cierto nivel, se motiva al organismo para ingerir alimentos. La carencia aguda de alimentos aumenta significativamente la producción de anandamida y 2-AG, especialmente en el sistema límbico y el hipotálamo. Dicho proceso sugiere una activación de circuitos para la generación de apetito<sup>17</sup>.

La selección de alimentos con alta palatabilidad (lípidos y azúcar) es innata en humanos recién nacidos. La lactancia materna está mediada en parte por el receptor CB1 presente en las papilas gustativas, y su activación incrementa las respuestas neuronales a los alimentos dulces. La cantidad de 2-AG en la leche materna es aproximadamente 100 veces más alto que la AEA. El cambio más importante a lo largo del tiempo en la dieta del hombre fue el aumento en el consumo de hidratos de carbono. En general, dietas altas en contenido energético llevan a una

activación crónica del receptor CB1, que se asocia con un aumento en la predisposición de obesidad, perfil lipídico desfavorable, resistencia a la insulina e inflamación en el hígado y riñón. El aporte dietético en el SEC impulsa el complejo camino fisiológico de la estimulación del apetito y la modulación en la ingestión energética <sup>9</sup>.

El incremento del consumo de alimentos por acción de los endocannabinoides se produce a través de la estimulación del receptor CB1, presente en el hipotálamo en los núcleos hipotalámico lateral y paraventricular, involucrados en el control del apetito. Ahí mismo se produce hormona concentradora de melanina (MCH), por lo que los endocannabinoides estimulan a estas neuronas, generando un aumento en el consumo de alimentos. Los resultados de un estudio con ratones genéticamente modificados para desarrollar obesidad (cepa ob/ob) y con señalización defectuosa de leptina mostraron concentraciones elevadas de endocannabinoides (AEA y 2-AG) hipotalámicos; cuando administraron leptina, disminuyó simultáneamente la ingestión de alimentos y las concentraciones de AEA y 2-AG. De esta forma, la participación de endocannabinoides y del CB1 junto con los efectos de mala señalización de la leptina en la regulación de mediadores orexígenos y anorexígenos hipotalámicos, parecen estar implicados en la hiperfagia y obesidad <sup>1, 22</sup>.

En un estudio experimental de Muccioli, et al. utilizaron ratones manipulados genéticamente para el estudio de las enfermedades humanas y observaron interferencia entre la microbiota intestinal y la regulación de la adipogénesis por el SEC, demostró que la microbiota intestinal regula fisiológicamente la actividad del SEC periférico en el tejido intestinal y adiposo, que a su vez controla la función de barrera intestinal y la adipogénesis. El receptor CB1 controla la permeabilidad intestinal, lo que sugiere un mecanismo dependiente del SEC en la patogénesis de la inflamación asociada a la obesidad (sistémica y hepática) <sup>24</sup>.

## **1.2 Edulcorantes nutritivos y no nutritivos**

Diversas investigaciones refieren que el favoritismo por el sabor dulce es innato y se relaciona con sensaciones de placer y felicidad. El aspecto más importante de los edulcorantes es su dulzura y ésta se mide en relación con la sacarosa, que es el azúcar de referencia. Los edulcorantes no nutritivos son sustancias con una mayor intensidad de dulzor por gramo comparados con los edulcorantes nutritivos, por lo que solo son necesarios en dosis muy bajas

para obtener un dulzor intenso, y actualmente su uso ha incrementado para crear productos en los que se logra la dulzura con la adición de mínimas calorías o sin calorías <sup>27-29</sup>.

Para que se perciba la intensidad del sabor dulce, primero se debe disolver la sustancia en la saliva y entrar en contacto con los receptores presentes en la lengua. Otros parámetros que influyen en el sabor dulce son: el olfato, la estructura del azúcar (la intensidad disminuye a medida que aumenta el número de monosacáridos), la temperatura y el pH <sup>27</sup>.

Existe una clasificación que divide a los edulcorantes por el contenido energético y por su naturaleza u origen. En la tabla 1 se menciona una clasificación de acuerdo con su aporte calórico <sup>30</sup>.

**Tabla 1.** Clasificación de edulcorantes por su contenido calórico

	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y trealosa, tagatosa,
Calóricos		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco y jarabe de sorgo.
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alta fructosa, caramelo, azúcar invertido.
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol.
Acalóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo , stevia, taumatina pentadina, monelina, brazzeína.
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo.

Fuente: García-Almeida J.M., et al; 2013 <sup>30</sup>.

Los edulcorantes no nutritivos son aceptados como un tipo de aditivo alimentario y su incorporación en diversos alimentos industrializados ha ido incrementando paulatinamente. No obstante, esto no hubiera sido posible sin haberlos sometidos primero a una evaluación de seguridad exhaustiva por parte de la FDA, (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América) y otras autoridades reguladoras internacionales. Los protocolos de pruebas de seguridad reglamentarios fueron cuidadosamente evaluados y aprobados durante muchos años de experiencia por autoridades internacionales antes de su aprobación para su uso en el suministro de alimentos y su inclusión en el Código de Reglamentos Federales. En los Estados Unidos de América, los edulcorantes no nutritivos se consideran ingredientes

reconocidos generalmente como seguros. Actualmente, los edulcorantes aditivos aprobados son: acesulfame K, advantame, aspartame, neotame, sucralosa y glucósidos de esteviol; todos permitidos bajo las condiciones de su regulación específica <sup>31,32</sup>.

De acuerdo con el la Organización de Expertos en Aditivos Alimentarios y la Organización Mundial de la Salud, se muestra la tabla 2, que expone la ingestión diaria recomendada (IDA) de los principales edulcorantes comerciales <sup>33</sup>.

**Tabla 2. Ingestión diaria admisible en ENC establecida por el JECFA de la OMS y la FAO, y por la FDA**

ENC	IDA del JECFA, (mg/Kg) (año de evaluación más reciente)	IDA de la FDA (mg/Kg)	Nº de sobres de edulcorantes de mesa equivalentes a la IDA*
Aspartame	40 (1980)	50	75
Acesulfame-K	15 (1991)	15	23
Sucralosa	15 (1991)	5	23
Sacarina	5 (1993)	15	45
Glucósidos de esteviol	4 (2008)	4*	9

\*Establecido por el JECFA.

Fuente: Laviada H, Segui FM, 2017 <sup>33</sup>.

### 1.2.1 Sacarosa

El disacárido más utilizado es la sacarosa, conocido comúnmente como azúcar de mesa o azúcar de caña y es el agente edulcorante más utilizado en el mundo. Su fórmula es C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>. Atribuye una propiedad reductora y ayuda a formar una estructura adecuada para unirse a los receptores de las papilas gustativas, confiriendo el sabor dulce tradicional <sup>27</sup>.

Ha sido utilizado durante años en el consumo humano como un aditivo que concede características organolépticas particulares. Se agrega a los alimentos durante el procesamiento, la preparación o en la mesa. Sus propiedades funcionales, como termoestabilidad y consistencia, le han permitido un extenso uso en la industria alimentaria. Por tal motivo, es importante para la estructura de algunos alimentos (como en la repostería) y auxiliar en la conservación de alimentos <sup>34</sup>.

El incremento en el consumo de azúcar en la dieta es uno de los principales factores etiológicos de diversas enfermedades crónico-degenerativas y cardio metabólicas. Ha surgido como un importante problema de salud pública, principalmente para el desarrollo de la obesidad. Organizaciones líderes, incluyendo la OMS y la Asociación Canadiense de Diabetes (CDA), han recomendado una reducción general en el azúcar añadido a los alimentos <sup>35</sup>.

### 1.2.2 *Sucralosa*

Edulcorante semisintético conocido desde 1976. Tiene entre 400 y 600 veces más poder endulzante que el azúcar. Es estable a temperatura elevada y soluble en agua, cualidad que lo hace adecuado para su uso en alimentos. Su aporte energético se considera nulo. En 2004 se aprobó para su consumo en Estados Unidos. Por el sabor dulce de alta intensidad que ofrece, se ha extendido su uso alrededor del mundo para alimentos y bebidas <sup>36,37</sup>.

La sucralosa se origina por modificación química de la sacarosa. Es estable y de baja absorción en el tubo digestivo. Diversos estudios han mostrado que, en general, se absorbe menos del 1% del compuesto ingerido <sup>38</sup>. Cabe mencionar, que, al día de hoy, la sucralosa ha sido reportada como no inerte, ya que presenta efectos metabólicos que alteran la homeostasis de la glucosa e insulina, posiblemente debido a la disbiosis intestinal de la microbiota o los receptores de sabor dulce expresados en el sistema digestivo <sup>39</sup>.

### 1.2.3 *Glucósidos de esteviol*

Sustancias que se encuentran en vegetales endémicos de América del Sur. La “hierba dulce” (*Stevia rebaudiana Bertoni*) se ha usado desde hace años en diversas partes del mundo; prueba de ello es Paraguay, donde se utiliza como parte de la tradición herbolaria. El extracto de alta pureza es cerca de 300 veces más dulce que la sacarosa. A alta concentración, el extracto crudo contiene otros compuestos con actividad biológica que se han relacionado con efectos en la glucemia y la presión sanguínea, además de infertilidad. Los extractos altamente purificados no contienen éstas <sup>36</sup>.

La *Stevia rebaudiana* se cultiva comercialmente para extraer sus edulcorantes. Contiene otros compuestos (incluidos fitoquímicos) que proporcionan propiedades benéficas para la salud. El sabor dulce característico de las hojas de *Stevia* es debido a su contenido de glicósidos, además

de proteínas, fibra, hidratos de carbono, hierro, fósforo, calcio, sodio, potasio, magnesio, zinc y vitaminas A y C, pero no aportan valor energético <sup>40, 41</sup>.

Los compuestos responsables del dulzor son los glicósidos de esteviol. Estos compuestos se denominaron esteviósidos y rebaudiósidos y son utilizados por la industria alimentaria. Los esteviósidos y los rebaudiósidos A (el compuesto más dulce) representan del 5-10% de las hojas. También hay otros glucósidos minoritarios, como los rebaudiósidos B, C, D, E y F, el rebaudiósido A, el rubósido y el esteviósido, de los cuales el rebaudiósido A se utiliza en la industria alimentaria como sustituto de la sacarosa, mientras que el esteviósido tiene aplicaciones terapéuticas para pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2, así como pacientes obesos y en la prevención de caries, ya que no eleva las concentraciones de glucosa en sangre y no presenta efectos cariogénicos <sup>40</sup>.

La participación del edulcorante stevia dentro del mercado mundial ha ido cobrando fuerza y se ha extendido a nivel industrial como una opción de edulcorante no nutritivo natural, con nulo aporte energético. Sin embargo, su consumo es limitado por los efectos sensoriales indeseables, tales como el sabor amargo o con tinte metálico <sup>41</sup>.

### **1.3 Edulcorantes no nutritivos en el tratamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs)**

Los edulcorantes no nutritivos tienen como fin dar un sabor dulce a los alimentos sin aportar energía. En la terapia nutricional, su uso se ha incrementado como estrategia para reducir el consumo de azúcar y energía en personas con obesidad, sobrepeso, diabetes *mellitus* y otras enfermedades metabólicas. No obstante, cabe destacar que su uso en el control de peso no necesariamente tiene resultados exitosos. Estudios a corto plazo encuentran que el empleo de edulcorantes favorece la glucemia y el control del peso corporal, pero el efecto puede ser ligero o nulo, quizá debido a conductas posteriores de compensación de ingestión energética <sup>28, 42, 43</sup>.

El uso de los edulcorantes no nutritivos se ha extendido desde su descubrimiento. Además, se han comercializado nuevos edulcorantes no nutritivos con nuevas. La industria ha generado nuevas mezclas que buscan mejorar su palatabilidad y por ende la expansión de su uso en diversidad de productos. Diversos organismos internacionales como la FDA, FAO/OMS,

JECSA y EFSA respaldan la seguridad en el consumo de todos los edulcorantes no nutritivos  
15, 33, 36, 44

Se ha mencionado la influencia de varios edulcorantes en la respuesta posprandial de la glucosa en sangre, entre ellos la sucralosa y los glucósidos de esteviol, cuyo resultado no incrementa la glucemia. En contraste, varios estudios han analizado la co-ingestión con bebidas e hidratos de carbono. Los resultados apuntan que la reducción de la glucosa en sangre en estos casos se debe a la menor carga de hidratos de carbono, en lugar de la activación del receptor del sabor dulce<sup>14</sup>. En un ensayo controlado aleatorio, se suministró sucralosa (15% de la IDA) durante 14 días en personas sanas. Los resultados arrojaron una disminución de la sensibilidad a la insulina en estos adultos. Éste estudio suministra evidencia de que la sucralosa tiene un impacto negativo en la acción de la insulina, incluso en individuos sanos. Uno de los mecanismos sugeridos para explicar la disminución de la sensibilidad a la insulina asociada al consumo de sucralosa, es la interacción de esta con los receptores de sabor dulce en páncreas y células enteroendocrinas, que promueven la liberación de insulina y GLP-1<sup>45</sup>.

Otro estudio experimental demostró que los efectos de 200 mg diarios de sucralosa durante 4 semanas disminuyeron la sensibilidad a la insulina, lo que demuestra que la sucralosa no es metabólicamente inactiva, y su uso debería limitarse al control de enfermedades como diabetes y obesidad<sup>46</sup>.

Cabe señalar que, dentro de las estrategias de salud para combatir la actual epidemia en México, la Secretaría de Salud no menciona como tal el uso de edulcorantes no nutritivos como medida profiláctica, sino que se rige en base a la salud pública y atención médica oportuna en pro de la salud de la población. Centra su atención en la promoción de estilos de vida saludables, cruzadas de educación, así como implementación de acciones preventivas. Otras estrategias para regular los problemas de obesidad son la Reforma Educativa, autorizada por la Secretaría de Educación Pública que propone alimentos saludables en las escuelas y la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte que, junto con gremios civiles, promueven acciones para que la población tenga una mayor actividad física<sup>47</sup>.

## 2. Planteamiento del Problema:

El sistema endocanabinoide es un sistema de señalización biológico que tiene como objetivo mantener la homeostasis del cuerpo humano. Por lo que interviene en diversos procesos, como el mantenimiento de la función intestinal y la regulación de la glucemia. Este sistema cuenta con los receptores específicos CB1 y CB2, localizados en diferentes tejidos y órganos, como el hígado y el páncreas, cuya expresión se relaciona con la composición de la dieta y con procesos de digestión y metabolismo energético.

La hiperactivación del sistema endocanabinoide o los cambios en la expresión de sus receptores en páncreas después del consumo de carbohidratos en la alimentación, favorecen la producción de insulina en alta concentración característica de la obesidad. Asimismo, diversos estudios han señalado que dietas altas en lípidos aumentan la expresión de CB1 en hígado, incrementando la lipogénesis y el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo. Un consumo excesivo de alimentos altos en calorías provoca esteatosis, dislipidemia y resistencia a la insulina y leptina, que a su vez se relaciona con una expresión alterada del receptor CB1. Igualmente, la expresión alterada de los receptores CB2 se observa en condiciones inflamatorias crónicas y se relaciona a mecanismos de regulación inmunológica relevantes a la homeostasis metabólica sistémica.

Dado que tanto el sobrepeso como la obesidad son problemas de salud pública actuales a nivel mundial, la población ha ido adoptando diferentes líneas de acción para disminuir o evitar la obesidad, incluyendo la estrategia inicial del uso de edulcorantes no nutritivos para el control de las concentraciones de glucosa en personas con obesidad y diabetes *mellitus* tipo 2. Sin embargo, el incremento en su consumo no está restringido solo a esta población, sino que también se ha presentado un aumento en la sociedad en general como opción para la disminución del aporte energético en la dieta.

Una de las principales características de los edulcorantes no nutritivos es aportar dulzor y mejorar la palatabilidad de los alimentos, sin incrementar las concentraciones de glucosa en sangre ni aportar energía. No obstante, existen diversos estudios científicos contrastados en donde se exponen los efectos secundarios de los edulcorantes no nutritivos, entre ellos, cambios en la microbiota intestinal, aunados a posibles efectos en el aumento de peso y en las características patológicas de la diabetes *mellitus* tipo 2.

Debido al papel esencial del páncreas y el hígado en la regulación del metabolismo energético en el organismo y a la importancia del sistema endocanabinoide en la homeostasis de estos órganos, es necesario determinar los mecanismos mediante los cuales los cambios en la dieta, tales como el consumo frecuente y crónico de edulcorantes no nutritivos, pueden afectar el funcionamiento de estos tejidos. Actualmente, no existe información clara sobre la forma en que el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos puede afectar estos órganos o al sistema de endocannabinoides en general.

Es por lo anterior que se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Existe una relación entre el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos y cambios en la expresión de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide en tejido pancreático y hepático de ratones?

### **3. Hipótesis:**

#### **Hipótesis alterna:**

- Consumir edulcorantes no nutritivos de manera frecuente afecta la expresión de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide en células del páncreas e hígado de ratones BALB/c.

#### **Hipótesis nula:**

- Consumir edulcorantes no nutritivos de manera frecuente no afecta la expresión de receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide en células del páncreas e hígado de ratones BALB/c.

#### **4. Objetivos:**

##### **General:**

Evaluar la expresión de los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide en células pancreáticas y hepáticas de ratones suplementados con edulcorantes no nutritivos.

##### **Específicos:**

- a) Suplementar ratones adultos machos y hembras de la cepa BALB/c con edulcorantes nutritivos (sacarosa) y no nutritivos (sucralosa, glucósidos de esteviol) durante un periodo de 6 semanas.
- b) Determinar el nivel de expresión de los receptores CB1 y CB2 en tejido hepático y pancreático de los animales experimentales, a través de los métodos de inmunofluorescencia y western blot.
- c) Comparar la expresión de los receptores entre grupos de ratones suplementados con edulcorantes no nutritivos y nutritivos, así como un grupo control sin suplementación.
- d) Analizar si existen diferencias en el efecto de la suplementación con edulcorantes entre ratones de ambos sexos.

## 5. Justificación:

Nuestro país se encuentra en los primeros lugares en obesidad a nivel mundial, siendo éste un problema de salud pública por su dimensión y las patologías con las que se relaciona, ya que participa en el desarrollo de patologías metabólicas como diabetes *mellitus* tipo 2 y síndrome metabólico. De acuerdo a las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición <sup>45</sup>, la prevalencia de este problema en adultos mayores a 20 años es de 72.5% en México.

El consumo de los edulcorantes no nutritivos ha aumentado por su menor contenido energético, por lo que correspondería a una reducción en la energía total ingerida. Sin embargo, existen diversos estudios con resultados contradictorios sobre sus efectos en cuanto al aumento de peso, el apetito o la cantidad de grasa corporal en humanos. Además, es necesario tener en cuenta que, en productos procesados, los edulcorantes no nutritivos sustituyen no sólo el dulzor aportado por el azúcar, sino que se combinan con el aporte de otros macronutrientes, como grasas e hidratos de carbono distintos a la glucosa en el alimento, para compensar la ausencia de sacarosa. Por lo tanto, los productos que contienen estos compuestos pueden contener más energía que sus versiones sin ellos, al reemplazar el azúcar con otros nutrientes de mayor aporte energético.

Por otro lado, el uso crónico de edulcorantes añadidos a alimentos puede afectar el metabolismo energético sistémico y el peso corporal. Alteraciones en el equilibrio energético conducen al aumento de peso y a cambios metabólicos, como alteraciones en la secreción de insulina. Estudios realizados en ratones han demostrado la relación entre el equilibrio energético y la dieta, incluido el uso de edulcorantes no nutritivos.

Por lo tanto, al existir evidencia científica que manifiesta que los edulcorantes no nutritivos no son totalmente inertes, aunado al incremento masivo en su consumo entre los diferentes grupos etarios, haciendo referencia al consumo de bebidas y productos procesados que lo contienen, sin tener en cuenta la IDA (ingesta diaria admisible), el presente estudio pretendió determinar la relación de éstos con uno de los sistemas reguladores del metabolismo, el sistema endocanabinoide y sus funciones en dos órganos esenciales para la homeostasis energética en el organismo, el hígado y el páncreas.

## **6. Material y Métodos:**

### **6.1 Diseño de Estudio**

Estudio experimental, comparativo, prospectivo y longitudinal.

#### **Universo**

Roedores BALB/c, de 8 semanas de edad, machos y hembras.

#### **Método de muestreo**

Asignación randomizada, por conveniencia.

#### **Tamaño de muestra**

6 ratones machos y 6 ratones hembras en cada grupo: 48 en total

- Grupo control: 6 machos y 6 hembras
- Grupo sacarosa: 6 machos y 6 hembras
- Grupo sucralosa: 6 machos y 6 hembras
- Grupos glucósidos de esteviol: 6 machos y 6 hembras

### **6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación**

- Criterios inclusión: Ratones BALB/c adultos, sin patología aparente y con un peso mínimo de 18g.
- Criterios exclusión: Ratones que presentaran signos de enfermedad o que estuvieran fuera del rango de peso mínimo.
- Criterios eliminación: Ratones que enfermaran o murieran durante el periodo de estudio.

## 6.3 Procedimientos

### *Crianza de animales experimentales*

La gestación de esta cepa duró aproximadamente entre 19 y 21 días. El periodo de destete y adaptación fue de 4 semanas. Posteriormente, cada ratón adulto (8 semanas) se expuso a la suplementación con edulcorantes durante un periodo de 6 semanas, de acuerdo con los grupos experimentales asignados. La alimentación se realizó bajo los estándares de dieta para roedor (Purina, USA); que se caracteriza por ser completa y equilibrada en el contenido de proteína, grasas, hidratos de carbono, fibra, vitaminas y minerales. En cuanto a hidratación, los consumieron agua purificada libremente, bajo ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas, con temperatura ambiente aproximada de 22° C. Posterior a las 6 semanas de exposición al edulcorante, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062ZOO-1999, empleando 50 µL de pentobarbital sódico por 25 g de peso (CHEMINOVA). Para la extracción de los órganos (páncreas e hígado), la mitad del órgano fue puesto bajo congelamiento en medio OCT (*optimal cutting temperature*) mientras que la otra mitad solo en congelamiento -70°C para su posterior extracción de proteínas.

- *Consumo de alimentos y edulcorantes*

El alimento y agua consumidas diariamente fueron determinados por peso y se llevó un registro. El suministro de estos elementos se realizó bajo las siguientes condiciones:

\*Se colocó una cantidad inicial de 150 g de alimento y se pesaba diariamente para calcular su consumo.

\*El agua se colocó diariamente con la cantidad de 100 mL y con el soluto correspondiente de acuerdo con el grupo control. Las soluciones tuvieron las siguientes concentraciones: 100 mL de agua al 0.025% de glucósidos de esteviol (1 g en 100 mL de agua, presentación comercial), 100 mL de agua al 0.012% de sucralosa (1 g de sobre comercial en 100 mL de agua) y 100 mL de agua al 10% de sacarosa. El consumo total se determinó restando la cantidad final a la cantidad inicial, semanalmente.

- *Peso corporal*

Cada semana se pesaron a los ratones a la misma hora con una báscula eléctrica (Rhino® ADIVIR1661).

#### *Disección de tejido hepático y pancreático*

Se incluyeron instrumentos de acero inoxidable y recipientes para la recolección de muestras en solución buffer de fosfatos (PBS 1x, pH 7.4), para la preservación del tejido. Se utilizaron 50 µL/25 g de peso de pentobarbital sódico (6.3 g/ 100mL) para lograr una anestesia completa en el animal. Posteriormente, se colocó al ratón hacia arriba en el hule espuma y se fijó. A continuación, se procedió a cortar la piel y exponer la vena cava para realizar la perfusión del ratón con PBS 1x a través del ventrículo izquierdo del corazón. Una vez hecho lo anterior, se procedió a la toma de muestras: extracción de tejido hepático y pancreático. La mitad de la muestra se colocó en recipientes con OCT (compuesto preservador) para su conservación en congelación a -70°C, mientras que la otra mitad solo en congelación a -70°C. Los cadáveres se resguardaron en contenedores para residuos biológicos no infecciosos, y se congelaron para su destrucción posterior por la Universidad Autónoma del Estado de México.

#### *Cortes histológicos de tejido hepático y pancreático*

Se realizaron los cortes de tejido pancreático y hepático en un criostato marca Leica, modelo CM1510-3. Éste corta rebanadas de material (tejido congelado a -70°C) encajado en un microtomo de rotación estándar encerrado en una cámara fría. Los cortes se realizaron en una cámara fría establecida generalmente entre -14 y -20 °C. Se realizaron cortes de 10 µm de grosor y fueron fijados a portaobjetos de cristal, posteriormente se pusieron bajo resguardo a una temperatura de -20° C.

#### *Microscopía de fluorescencia*

##### *Materiales y reactivos para tinción de muestras congeladas*

- Anticuerpo primario anti-CB1 980881 (policlonal de conejo)
- Anticuerpo primario anti-CB2 ab3561 (policlonal de conejo)

- Anticuerpo primario anti-amilasa pancreática bs-4030R-A488 conjugado con Alexa Fluor 488, (policlonal de conejo).
- Anticuerpo primario anti-arginasa hepática bs-8585R-A488 conjugado con Alexa Fluor 488, (policlonal de conejo).
- Anticuerpo secundario: Alexa Fluor 647 ab150079 (policlonal de cabra para IgG de conejo).
- Medio de montaje DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol)
- Tubo de 50 mL con acetona
- PBS 1x
- Tween 20
- Barniz
- Caja Petri
- Leche en polvo baja en grasa
- Tubo de 15 mL
- Pinzas
- Pipeta 100 mL

#### *Buffer de bloqueo al 5%*

- PBS 1x
- Leche en polvo baja en grasa

#### *Procedimiento*

Se fijaron las laminillas con las muestras respectivas en acetona en un tubo de 50 mL por 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente se dejaron secar las laminillas y se hizo un borde con el barniz alrededor de cada muestra para evitar derrames de soluciones. Se lavó con PBS 1x-Tween 20 al 0.02% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró PBS 1x-Tween 20 al 0.02% y se agregó el bloqueador a base de leche al 5% (50  $\mu$ L-100  $\mu$ L) en agitación por 1 hora. Para retirar el bloqueador se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.02% en agitación por 5 min cada uno. Al terminar, se añadieron los anticuerpos primarios, 50  $\mu$ L por muestra a una dilución de 1:200. Se dejó incubando a 4°C durante toda la noche, en oscuridad.

\*Hígado: anticuerpo anti-arginasa hepática más CB1 o CB2.

\*Páncreas: anticuerpo anti-amilasa pancreática más CB1 o CB2.

Posterior a ello se enjuagó con PBS 1x-Tween 20 al 0.02% 3 veces por 5 minutos cada vez.

Se agregaron los anticuerpos secundarios (Alexa Fluor 647 ab150079, policlonal de cabra para IgG de conejo) 50  $\mu$ L por muestra a una dilución de 1:200 y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación. Al finalizar se añadió el medio de montaje con DAPI (45  $\mu$ L) y se colocó un cubreobjetos y se selló con barniz. Las muestras se leyeron al microscopio de fluorescencia Nikon 6000, por medio del software NIS-elements, con los objetivos 20x y 60x.

### *Análisis de expresión de proteínas por western blot*

#### *Extracción de proteínas*

*Buffer de lisis (se completa a 100 mL con agua destilada):*

- 10 mL Tris 0.5 M pH 6.8
- 50  $\mu$ L EDTA 0.2 M pH 8.0
- 200  $\mu$ L EGTA 50 mM pH 7.9
- 102  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol
- 1 mL IGEPAL

Adicionar inhibidores de proteasas al momento de usar:

- 20  $\mu$ L/mL IP50X
- 20  $\mu$ L/mL PMSF
- 20  $\mu$ L/mL  $\text{Na}_3\text{VO}_4$
- 100  $\mu$ L/mL NaF

#### *Extracción de proteínas de tejido*

Se usaron 800  $\mu$ L de buffer por muestra, posteriormente se homogeneizó el tejido con dos portaobjetos por la parte esmerilada, se transfirió a un tubo de 1.5 mL e incubó en hielo 45 min, mezclando cada 15 min. Transcurridos 45 min en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 25 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford. En seguida se presenta la tabla correspondiente a la cuantificación y dosificación de proteínas estándar como curva de calibración.

## *Cuantificación y dosificación de proteínas*

Establecimiento de la curva de absorción.

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Albúmina (2mg/ml)</b>	<b>Agua destilada</b>
<b>0.1</b>	50 $\mu$ L	950 $\mu$ L
<b>0.2</b>	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L
<b>0.4</b>	200 $\mu$ L	800 $\mu$ L
<b>0.6</b>	300 $\mu$ L	700 $\mu$ L
<b>0.8</b>	400 $\mu$ L	600 $\mu$ L
<b>1.0</b>	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
<b>1.2</b>	600 $\mu$ L	400 $\mu$ L

Se preparó el reactivo de Bradford (Bio-Rad) con número de catálogo 500-0006, con agua destilada a una dilución de 1:4. Se emplearon placas de 96 pozos, agregando 5  $\mu$ L de estándares, en duplicado, incluyendo blancos con mezcla Bradford y un 1  $\mu$ L de muestra. Se usó el buffer de lisis como control negativo. La absorbancia se leyó a 595 nm. La concentración de proteína se calculó empleando software Excel (Microsoft). Las muestras se ajustaron a concentraciones de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L. Se sometieron a calentamiento por 5 minutos a 95°C y se incubaron en hielo 5 minutos antes de cargarlas.

### *Buffer de carga SLB:4X (volumen final 7.6 mL)*

- 3.8 mL agua destilada
- 1 mL tris 0.5 M pH 6.8
- 0.8 mL glicerol
- 0.4 mL azul bromofenol al 1%
- 1.6 mL SDS 10%

### *Preparación de acrilamida (volumen final 500 mL)*

- Acrilamida/Bis 30%, 2.67%
- 146 g Acrilamida
- 4 g de N'N metilen-bis acrilamida

### *Preparación de gel de corrimiento 10%*

- Agua destilada: 6.97 mL
- Tris 1.5 M pH 8.8: 4.25 mL
- SDS 10%: 170  $\mu$ L
- Acrilamida/bis 30%: 5.61 mL
- APS 10%: 170  $\mu$ L
- TEMED: 34  $\mu$ L

*Preparación del gel de apilamiento 4%*

- Agua destilada: 4.0 mL
- Tris 0.5 M pH 6.8: 1.66 mL
- SDS 10%: 66  $\mu$ L
- Acrilamida/bis 30%: 866  $\mu$ L
- APS 10%: 66  $\mu$ L
- TEMED: 16  $\mu$ L

*Buffer de corrida (running buffer) 5X:*

15 g de Tris base

72 g de glicina

*Buffer de corrida 1X*

<b>Buffer de corrida 5X</b>	<b>200 mL</b>
<b>SDS 10%</b>	10 mL
<b>Agua destilada</b>	790 mL

Una vez ensamblada la cámara de electroforesis, se agregaron en el primer pozo 3  $\mu$ L del marcador de peso molecular y se cargaron 100  $\mu$ g de proteína por muestra, correr a 100V.

*Transferencia de proteínas a membranas de PVDF*

Buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol)

<b>Running buffer 5X</b>	<b>200 mL</b>
<b>Metanol</b>	200 mL

Por cada gel se preparó 1 membrana PVDF y se ordenó de la siguiente manera: esponja/2 papeles Whatman/gel/membrana/2 papeles Whatman/esponja. En cada paso se eliminaron burbujas. Transferencia fue en cámara húmeda y se corrió a 60 mA-30V toda la noche a 4°C.

Al terminar el tiempo de transferencia la membrana se enjuagó con TBS 1X-Tween 20.

TBS 10X (volumen final 1L):

- 80 g NaCl
- 24.2 g Tris base

TBS 1X- tween20:

- 100 mL TBS 10X
- 1 mL tween 20 (concentración final 0.01%)
- 899 mL agua destilada

#### *Incubación de las membranas con los anticuerpos*

El bloqueo de la membrana se realizó en albúmina bovina al 1% en TBS-Tween aproximadamente 4 horas. Posteriormente se incubó el anticuerpo primario previamente diluido toda la noche durante 4°C en agitación. Al terminar, se sometió a 3 lavados x 5 min en TBS-Tween. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario 1 hr a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados x 5 min en TBS-Tween. La membrana se reveló con diaminobenzidina al 0.5% (150 µL) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 µL).

#### **6.4 Variables de Estudio**

- Independientes: Suplementación con edulcorantes, edad y sexo de los ratones.
- Dependientes: Expresión de receptores para endocannabinoides, peso.
- Intervinientes: Consumo de alimento y solución con edulcorante.

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operativa</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Análisis Estadísticos</b>
Suplementación con edulcorantes	Cantidad de solución con edulcorante suplementada en agua para beber.	Volumen de solución con edulcorante consumida por los animales experimentales, determinada en un periodo de 24 horas por variaciones en el volumen inicial y final de la misma.	Cuantitativa continua	ml/día	Datos no paramétricos Kruskall Wallis
Expresión de receptores para endocannabinoides	Presencia de los receptores CB1 y CB2 en células o tejidos específicos.	Detección de la presencia de los receptores CB1 y CB2 en tejido hepático y pancreático por medio de anticuerpos específicos.	Cualitativa nominal  Cuantitativa continua	- Presencia o ausencia de la señal del receptor en el tejido indicado.  Intensidad media de fluorescencia de los anticuerpos marcados en el tejido indicado.  -Presencia en la membrana de una determinada proteína. Análisis en unidades arbitrarias (UA).	Datos no paramétricos Kruskall Wallis

Peso	Masa de los animales experimentales.	Valor de la masa de cada animal, medida con balanza digital.	Cuantitativa Continua	g	Datos no paramétricos Kruskall Wallis
Consumo de alimento	Cantidad de alimento ingerido.	Cantidad de alimento consumido por los animales experimentales, determinado en un periodo de 24 horas por variaciones en la cantidad inicial y final de alimento.	Cuantitativa Continua	g/día	Datos no paramétricos Kruskall Wallis
Sexo	Condición orgánica que distingue a los machos de las hembras.	Valoración del sexo de cada ratón a través de observación directa.	Cualitativa nominal	Macho Hembra	Datos no paramétricos Kruskall Wallis

## **6.5 Implicaciones Bioéticas**

El siguiente estudio se llevó a cabo bajo la autorización del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 3).

Asimismo, se observó la Norma Oficial Mexicana NOM 062-ZOO-1999 y los lineamientos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, para evitar el sufrimiento de los animales.

## **6.6 Análisis Estadísticos**

Se realizaron pruebas estadísticas para no paramétricas, empleando la prueba de Kruskal Wallis, con análisis post-hoc de Dunn. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron significativos. Los análisis se realizaron en el programa GraphPad Prims 6.

Se utilizó el programa Image J para el análisis de densitometría de las bandas del receptor CB1 y CB2 obtenidos del western blot y se informó en unidades arbitrarias (UA). El análisis de microscopía de fluorescencia se realizó por medio del software NIS-elements AR, se analizaron células en base en la intensidad media de fluorescencia.

## 7 Referencias Bibliográficas:

1. Gatta-Cherifi B, Cota D. Endocannabinoids and Metabolic Disorders. En: Pertwee R. Endocannabinoids. Vol. 231. Switzerland: Springer; 2015. p. 369-384.
2. Watkins B, Jeffrey K. The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. *Frontiers in Psychology*. 2015; (5): 1-10.
3. Vicent S, Cota D. Endocannabinoids and metabolism: past, present and future. *Eur J Endocrinol*. 2017; 176(6):309-324.
4. Acharya N, Penukonda S, Shcheglova T, Hagymasi AT, Basu S, Srivastava PK. Endocannabinoid system acts as a regulator of immune homeostasis in the gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(19):5005-5010.
5. Hirsch S, Tam J. Cannabis: From a Plant That Modulates Feeding Behaviors toward Developing Selective Inhibitors of the Peripheral Endocannabinoid System for the Treatment of Obesity and Metabolic Syndrome. *Toxins*. 2019;(11):275.
6. Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience 2010*. *Yale J Biol Med*. 2010; 83(2):101-108.
7. Cenaprece.salud.gob.mx [Internet]. México: Cenaprece.salud.gob.mx; 2018 (Citado Dic 2018). Disponible en:  
[http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\\_PreencionControlObesidadRiesgoCardiovascular2013-2018](http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE_PreencionControlObesidadRiesgoCardiovascular2013-2018).
8. Alger B. Getting High on the Endocannabinoid System. *Cerebrum*. 2013:14.
9. Kunos G, Osei-Hyiaman D, Liu J, Godlewski G, Bátkai S. Endocannabinoids and the control of energy homeostasis. *J Biol Chem*. 2008;283(48):33021-33025.
10. Elphick M, Egertova M. The Neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *The Royal Society*. 2001; 356:381-408.
11. Gertsch J. Cannabimimetic phytochemicals in the diet – an evolutionary link to food selection and metabolic stress adaptation? \*. *British Journal of Pharmacology* .2017; (174): 1464–1483.
12. Fundacion-canna.es. [Internet]. España: Fundación CANNA. [Consultado Dic 2018]. Disponible en: <https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocanabinoide>.
13. Koyuncuo N. Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2014;6(3):129-143.
14. Tucker R. M, et al. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiology & Behavior* .2017; (182) :17–26.

15. Lau BK, Cota D, Cristino L, Borgland SL. Endocannabinoid modulation of homeostatic and non-homeostatic feeding circuits. *Neuropharmacology*. 2017; 124:38–51.
16. González-Jiménez E, Río-Valle J. Regulación de la ingesta alimentaria y del balance energético; factores y mecanismos implicados. *Nutr Hosp*. 2012; 27(6):1850-1859.
17. Vu JP, Larauche M, Flores M, Luong L, Norris J, Oh S, et al. Regulation of Appetite, Body Composition, and Metabolic Hormones by Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). *J Mol Neurosci*. 2015; 56(2):377–87.
18. Rodríguez F. Sistema endocanabinoide y control de la ingesta. *REV MED UNIV NAVARRA*. 2004; 48 (2):18-23.
19. Valenzuela C, Castillo V, Ronco AM, Aguirre C, Hirsch S, Llanos M. Sistema endocanabinoide y desarrollo de esteatosis hepática. *Rev Med Chile*. 2014;142(3):353–60.
20. Cristino L, Becker T, Di Marzo V. Endocannabinoids and energy homeostasis: an update. *Biofactors*. 2014;40(4):389-397.
21. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture Adela. *Pharmacoeconomics*. 2015; 33(7): 673–689.
22. Valenzuela C, Aguirre C, et al. Participación del sistema endocanabinoide en el desarrollo de obesidad. *Rev Med Chile*. 2010; (138): 621-629.
23. Tucci Sonia A, Kirkham Tim C. Relaciones entre el sistema endocanabinoide y apetito: nuevos horizontes en el manejo de la obesidad. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab*. 2004; 2 (3): 2-9.
24. Muccioli G, et al. The endocannabinoid system links gut microbiotato adipogenesis. *Molecular Systems Biology*. 2010; 6(1):392.
25. Silvestri C, Marzo V Di. Review The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metab*. 2013;17(4):475–90.
26. Rohrbach K, Thomas MA, Glick S, et al. Ibipinabant attenuates  $\beta$ -cell loss in male Zucker diabetic fatty rats independently of its effects on body weight. *Diabetes Obes Metab*. 2012;14(6):555-564.
27. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21): 1147-1151.
28. Saisho Y. Pancreas Volume and Fat Deposition in Diabetes and Normal Physiology: Consideration of the Interplay Between Endocrine and Exocrine Pancreas. *Rev Diabet Stud*. 2016;13(2-3):132-147.

29. Osorio Paz I. Control hormonal de la homeostasis energética: de la célula al cerebro. *Rev Educ Bioquímica*. 2012; 31:41–8.
30. Caroch M, Morales P, et al. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem Toxicol*. 2017; 107: 302–17.
31. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Gómez-Díaz RA, et al. Non-Nutritive Sweeteners: Evidence on their Association with Metabolic Diseases and Potential Effects on Glucose Metabolism and Appetite. *Rev Invest Clin*. 2017;69(3):129-138.
32. Chan C, Hashemi Z, Subhan FB. The impact of low and no-caloric sweeteners on glucose absorption, incretin secretion, and glucose tolerance. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42(8):793–801.
33. Gracia M, et al. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp*. 2013; 28(4):17-31.
34. Roberts A. The safety and regulatory process for low calorie sweeteners in the United States. *Physiol Behav*. 2016;164(Pt B):439-444.
35. Berry C, Brusick D, Cohen SM, Hardisty JF, Grotz VL, Williams GM. Sucralose Non-Carcinogenicity: A Review of the Scientific and Regulatory Rationale. *Nutr Cancer*. 2016;68(8):1247–61.
36. Laviada H, Segui FM. Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología sobre los edulcorantes no calóricos. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr*. 2017; 4:24-41.
37. Fidler Mis N, Braegger C, Bronsky J, et al. Sugar in Infants, Children and Adolescents: A Position Paper of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(6):681-696.
38. Khan TA, Sievenpiper JL. Controversies about sugars: results from systematic reviews and meta-analyses on obesity, cardiometabolic disease and diabetes. *Eur J Nutr*. 2016;55(2):25–43.
39. Aldrete- Velasco J, et al. Análisis de la evidencia disponible para el consumo de edulcorantes no calóricos. Documento de expertos. *Med Int Méx*. 2017;33(1):61-83.
40. Kojima I, Nakagawa Y, Hamano K, Medina J, Li L, Nagasawa M. Receptor de detección de glucosa T1R3: un nuevo receptor de señalización activado por glucosa en células  $\beta$  pancreáticas. *Biol Pharm Bull*. 2015; 38: 674–679.
41. Magnuson BA, Roberts A, Nestmann ER. Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food Chem Toxicol*. 2017;106(Pt A):324-355.

42. Samano-Salazar C, et al. Citotoxicidad de los edulcorantes Splenda y Stevia en formulaciones extemporáneas pediátricas. *Acta pediatr. Méx.* 2015; 36 (1): 03-08.
43. Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. *J Med Food.* 2017;20(10):933-43.
44. Agüero SD, Leiva AV, Illanes GM, Castro IS, Espinoza CS, Vega CE, et al. Consumo de stevia en estudiantes universitarios chilenos y su asociación con el estado nutricional. *Nutr Hosp.* 2015;32(1):362-366.
45. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez-Díaz RA, Almeda-Valdes P. Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2018;108(3):485-491.
46. Lertrit A, Srimachai S, Saetung S, et al. Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition.* 2018;55-56:125-130.
47. Drewnowski A, Rehm CD. The use of low-calorie sweeteners is associated with self-reported prior intent to lose weight in a representative sample of US adults. *Nutr Diabetes.* 2016;6(3): e202-8.
48. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016 (ENSANUT MC 2016). Informe final de resultados. Consultado en Dic 2018. [Internet]. Disponible en <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/209093/ENSANUT.pdf>.

## 8. Anexos

### 8.1 Carta de envío del artículo

---

**From:** Journal of Nutritional Science and Vitaminology <onbehalf@manuscriptcentral.com>  
**Sent:** Tuesday, October 6, 2020 13:38  
**To:** José Antonio Estrada Guadarrama <jaestrada@uaemex.mx>  
**Subject:** Journal of Nutritional Science and Vitaminology - Manuscript ID JNSV-2020-0191

07-Oct-2020

Dear Dr. Estrada:

Your manuscript entitled "Consumption of non-nutritive sweeteners and changes in endocannabinoid CB1 and CB2 receptor expression in pancreas and liver of mice" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of Nutritional Science and Vitaminology.

Your manuscript ID is JNSV-2020-0191.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/jnsv> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jnsv>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of Nutritional Science and Vitaminology.

Sincerely,  
Journal of Nutritional Science and Vitaminology Editorial Office

## 8.2 Resumen del artículo

Los receptores CB1 y CB2 del sistema endocanabinoide tienen funciones importantes en el hígado y el páncreas, ya que participan en funciones esenciales como la regulación del metabolismo celular, la liberación de insulina y la homeostasis de la glucosa. En general, las dietas de alta energía promueven la activación de los receptores CB, que cuando se estimulan crónicamente, se asocian con anomalías metabólicas e inflamación en condiciones como la obesidad y la diabetes. El consumo de edulcorantes no nutritivos se ha expandido en poblaciones de todo el mundo con el propósito de reducir el contenido energético de la dieta y para el control de enfermedades crónicas asociadas con alteraciones del metabolismo energético; sin embargo, se desconocen los posibles efectos de estos compuestos sobre la regulación del sistema endocanabinoide a nivel hepático y pancreático. El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de cambios en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en páncreas e hígado de ratones adultos suplementados con edulcorantes no nutritivos comerciales durante un período de 6 semanas. Después de la suplementación, se analizó la expresión de los receptores CB1 y CB2 de ambos tejidos mediante transferencia Western e inmunofluorescencia. Los resultados muestran reducciones significativas en la expresión de CB1 y CB2 hepáticos, particularmente en animales machos suplementados con glucósidos de esteviol, con tendencias hacia una expresión reducida de CB1 pancreático en el mismo grupo. Por el contrario, hubo una tendencia hacia una mayor expresión de CB1 hepático en animales hembra suplementados con sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol. Estos datos sugieren que el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos específicos promueve cambios significativos dependientes del sexo en la expresión de los receptores CB en el páncreas y el hígado in vivo.

Palabras clave: sistema endocannabinoide, receptores de CBD, hígado, páncreas, edulcorantes no nutritivos.

### Anexo 8.3 Carta de aprobación del comité de ética

