



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud
Departamento de Estudios Avanzados

**Expresión del receptor CB1 en astrocitos dependiente del consumo de
edulcorantes**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

B.L.C. María de los Ángeles Aguirre Fuerte

Comité de Tutores

Tutor Académico:

Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Tutor Interno:

Dra. Irazú Contreras García

Tutor externo:

Dr. Vladimir Paredes Cervantes

Agradecimientos

Quiero agradecerle a Dios por todas sus bendiciones, a mis padres, a mí hermano y a mi prima, por ser los principales promotores de mis sueños, porque siempre creyeron y confiaron en mí, porque supieron aconsejarme y porque me formaron como una persona con valores y principios fundamentados en la disciplina.

Agradezco también a mis tutores, quienes a lo largo del periodo de aprendizaje compartieron sus conocimientos y experiencias de vida, que hoy en día los forjan como excelentes investigadores. Gracias por su paciencia, dedicación y el tiempo que me brindaron para hacer parte de mi construcción como profesional y como persona.

A todos mis viejos y nuevos amigos, porque sin importar la distancia o las circunstancias siempre estuvieron ahí regalándome palabras de fortaleza y recordándome que incondicionalmente cuento con su apoyo y a todos quienes contribuyeron con un granito de arena para culminar con éxito la meta propuesta.

ÍNDICE

	No. página
Resumen	6
Abstract	7
1. Antecedentes	8
1.1. Enfermedades metabólicas crónicas no transmisibles	8
1.1.2. Definición	8
1.1.3. Epidemiología mundial	8
1.1.4. Epidemiología en México	9
1.2. Papel de los edulcorantes en la alimentación general y en el tratamiento de las ECNTs	10
1.2.1. Definición	10
1.2.2. Clasificación y aporte energético	11
1.2.3. Edulcorantes calóricos	
1.2.3.1. Sacarosa	11
1.2.3.2. Fructosa	11
1.2.4. Edulcorantes no calóricos	12
1.2.4.1. Estevia	12
1.2.4.2. Sucralosa	13
1.2.5. Papel de los edulcorantes en la alimentación y tratamiento de las ECNTs	13
1.3. Regulación central de la conducta alimentaria	14
1.3.1. Relación de los edulcorantes con la conducta alimentaria	14
1.4. Sistema endocanabinoide	16
1.4.1. Definición	16
1.4.2. Endocannabinoides	16
1.4.3. Receptores	17
1.4.4. Funciones en el organismo	18
1.4.5. Funciones en la regulación del apetito y metabolismo energético	19

1.5.	Los endocannabinoides en el sistema nervioso central	20
1.5.1.	Sistema endocannabinoide glial	20
1.5.2.	Astrocitos	20
1.5.3.	Importancia de los astrocitos en la homeostasis y funcionamiento del SNC	21
1.5.4.	Sistema endocannabinoide en los astrocitos	22
1.6.	Alteraciones nutricionales y modificaciones en el sistema endocannabinoide	23
2.	Planteamiento del Problema	25
3.	Hipótesis	27
4.	Objetivos	28
5.	Justificación	29
6.	Material y Métodos	31
6.1.	Diseño de estudio	31
6.2.	Criterios de inclusión y eliminación	31
6.3.	Variables de Estudio	31
6.4.	Procedimientos	32
6.4.1.	Sacrificio de los animales de experimentación	33
6.4.2.	Disección	33
6.4.3.	Preparación del tejido y cortes histológicos	33
6.4.4.	Inmunofluorescencia	33
6.4.5.	Ensayo de western Blot	34
6.4.5.1.	Extracción de proteínas totales del tejido	34
6.4.5.2.	Cuantificación de proteínas	34
6.4.5.3.	Preparación de geles de poliacrilamida y solución amortiguadora de corrida	35
6.4.5.4.	Electroforesis	35
6.4.5.5.	Transferencia húmeda de la	

	membrana	36
	6.4.5.6. Bloqueo de membrana	36
	6.4.5.7. Incubación con anticuerpos	36
	6.4.5.8. Inmunodetección (revelado de la membrana)	37
	6.5. Recolección de Datos	41
	6.6. Análisis Estadístico	41
	6.7. Implicaciones Bioéticas	41
7.	Resultados	42
	7.1 Título de artículo	42
	7.1.1 Página frontal del manuscrito	43
	7.1.2 Carta de envío o aceptación	44
	7.1.3 Abstract	45
	7.1.5 Introduction	46
	7.1.6 Experimental procedures	49
	7.1.7 Results	52
	7.1.8 Discussion	56
	7.1.9 References	62
	7.1.10 Figures and Legends	67
8.	Conclusiones generales	73
	8.1 Conclusiones	73
	8.2 Limitaciones	73
	8.3 Recomendaciones	74
9.	Referencias Bibliográficas	75
10.	Anexos	81
	10.1. Anexo 1. Soluciones amortiguadoras y otras soluciones	81

Resumen

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs) son consideradas un problema de salud pública. Su prevalencia en México alcanza el 75% de la población adulta y están fuertemente asociadas a la presencia de obesidad. Modificaciones en la cantidad de calorías y composición de la dieta han sido estrategias recomendadas para su prevención. Por lo tanto, los edulcorantes no calóricos se han convertido en una alternativa atractiva para tratar estas enfermedades, aunque recientemente, existe evidencia que sugiere que estos compuestos pueden tener efectos negativos en el metabolismo y homeostasis energético.

El sistema endocanabinoide (SEC) es un importante regulador del metabolismo de la energía en el organismo. Sus efectos dependen de la activación de dos receptores localizados principalmente en el sistema nervioso central (SNC) conocidos como CB1 y CB2. El receptor CB1 se localiza principalmente en células del SNC, incluyendo los astrocitos, los cuales, son responsables del mantenimiento de las funciones neuronales, la homeostasis de energía en el tejido nervioso y regulación del intercambio de nutrientes entre el SNC la circulación sistémica.

La modificación de la disponibilidad de glucosa a través de la suplementación de edulcorantes no calóricos provocan cambios en la expresión del receptor CB1 en tejido adiposo, alterando sus funciones, sin embargo, a pesar de que estos compuestos son utilizados indiscriminadamente a nivel mundial, los estudios que evalúen otros efectos fisiológicos son muy limitados.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el consumo crónico de edulcorantes calóricos y no calóricos altera la expresión de CB1 en tejido nervioso, específicamente en astrocitos. Para este fin, ratones adultos machos y hembras fueron suplementados con edulcorantes calóricos y no calóricos durante 6 semanas y los cambios en la expresión de CB1 fueron analizados por medio de inmunofluorescencia y western blot. Los resultados muestran una mayor expresión de CB1 en el cerebro completo y en astrocitos de los grupos suplementados con edulcorantes no calóricos, en comparación con el grupo sin suplementación. Estos datos nos indican que la ingesta frecuente de edulcorantes no calóricos, modifica las funciones del SEC en el tejido nervioso, lo que podría tener un efecto relevante en el metabolismo energético y las funciones neuronales.

Abstract

Chronic non-communicable diseases (CNCDs) are considered a public health problem. Their prevalence reaches 75% of the adult population in Mexico and they are strongly associated with the presence of obesity. Modifications to diet composition and calorie content have been recommended as strategies for their prevention. Therefore, non-nutritive sweeteners have become an attractive therapeutic alternative for treating these pathologies, although recent evidence suggests they may have detrimental metabolic effects on systemic energy homeostasis.

The endocannabinoid system (ECS) is an important regulator of energy metabolism in the organism. Its effects depend on activation of two main receptors, CB1 and CB2. CB1 receptors are located mainly in cells of the central nervous system (CNS), including astrocytes, which are responsible for the maintenance of neuronal function and energy homeostasis in nervous tissue, and regulate nutrient exchange between the CNS and the systemic circulation.

The modification of glucose availability through supplementation with non-nutritive sweeteners has been shown to promote changes in the expression of CB1 receptors in adipose tissue, altering adipocyte functions; however, despite the fact that these compounds are used extensively and indiscriminately by human populations worldwide, studies on their possible physiologic effects are very limited.

The objective of this study was to determine if frequent consumption of non-nutritive sweeteners alters the expression of CB1 receptors in nervous tissue and specifically, in astrocytes. To this end, adult mice were supplemented with either nutritive or non-nutritive sweeteners for 6 weeks and changes in CB1 expression were analyzed by immunofluorescence and western-blot. The results showed increased CB1 expression both in whole brain tissue and in astrocytes from groups supplemented with non-nutritive sweeteners, compared to groups without supplementation. These data suggest that frequent intake of non-nutritive modifies ECS functions in nervous tissue, which could have relevant effects on energy metabolism and neural functions.

1. ANTECEDENTES

1.1. Enfermedades crónicas no transmisibles

1.1.2. Definición

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs) son alteraciones del estado de salud de evolución lenta, caracterizadas por su larga duración y por el hecho de no ser contagiosas. Estas enfermedades afectan a la población general y aunque están asociadas a la tercera edad, hay evidencia de que los factores de riesgo como el consumo de tabaco y alcohol, la inactividad física y en general los entornos de vida poco saludables, afectan a niños, adultos y ancianos, haciéndolos vulnerables de presentar patologías como la obesidad, hipertensión, hiperglucemia, hiperlipidemia, enfermedades cardiovasculares, respiratorias crónicas y cáncer, siendo estas las principales ECNTs, las cuales causan por lo menos el 82% de muertes a nivel mundial, donde países de ingresos medios y bajos son los principales afectados por estas enfermedades (1).

1.1.3. Epidemiología mundial

Para 1990, se estimó la existencia de más de 600 millones de hipertensos en el mundo, mientras la prevalencia global de Diabetes Mellitus tipo 2 aumentó de 4.9% a 6.2% para el 2002, con un impacto de mortandad mayor al 19% de todas las muertes en población mayor de 25 años (2). Para el 2005, se estimó que la distribución de estas enfermedades correspondía al 37% para países de ingresos bajos y 35% a países de ingresos medios, correspondientes a un 75% de muertes por ECNTs. En 2010, países con ingresos medios y altos reflejaron una prevalencia mayor al 65%, entre estos, Estados Unidos y México, evidenciando así un aumento de ECNTs a través del tiempo y convirtiéndose en la mayor causa de muertes al año, donde 17.5 millones se relacionan con enfermedades cardiovasculares, 8.2 millones con cáncer y 1.5 millones con diabetes (3).

Estos datos se relacionan con otras estadísticas que indican que a nivel mundial, el 81% de los adolescentes no realizan actividad física, en tanto que el 23% de

mayores de 18 años tampoco lo hacen; siendo las mujeres menos activas que los hombres, rasgo que aumenta la probabilidad de obesidad y por ende, el desarrollo de diabetes, hipertensión, cardiopatías y ciertos tipos de cáncer (4).

Las ECNTs son la causa principal de muerte en el mundo; en Latino América y el Caribe, se registraron 56 millones de muertes en el año 2013, de las cuales 38 millones (68%) fueron a causa de las ECNTs, además de que dos de cada tres muertes se presentan en menores de 70 años (5).

1.1.4. Epidemiología en México

Para el año 2000, la Encuesta Nacional de Salud (ENSA) en México ofreció datos que abordaron información sobre las ECNTs. Incluyó a 38,377 sujetos entre los 20 y 69 años de edad. Los datos del estudio se relacionaron con la detección de valores alterados de presión arterial y concentración de glucosa en suero, que se relacionaban con obesidad, tabaquismo y proteinuria. La hipertensión arterial tuvo una prevalencia del 30.05% siendo un 75% en sujetos menores de 54 años de edad (6). El 10.8% de la población tenía diabetes mellitus tipo 2 y se encontró prevalencia de obesidad correspondiente al 24.4%, siendo mayor en los estados del norte del país, al igual que los casos de Hipertensión Arterial Sistémica (HTAS), siendo un importante problema de salud. En el año 2006, la prevalencia aumentó a 30.8%, 39.8% y 30.8 para obesidad, sobrepeso e hipertensión arterial, respectivamente. En el período de 1994 a 2000 aumento en un 13% el porcentaje de la población con un IMC >25 Kg/m², mientras que en el periodo comprendido entre los años 2000 a 2006, su incremento fue del 33.5% (7).

México, con una prevalencia en adultos correspondiente al 72.5% para la obesidad y un 65% para diabetes, es considerado uno de los países con mayor predominio para dichas patologías. Su desarrollo se asocia con diferentes factores, incluyendo el estilo de vida. De manera general, por lo menos el 50% de la población mexicana sufre de una ECNT, lo que alerta sobre la actual necesidad de dar solución a este grave problema de salud pública, atendiendo de manera inmediata la obesidad como el factor de riesgo más importante, aunado al hecho de que la mayor población afectada son los menores a 50 años (6).

1.2. Papel de los edulcorantes en la alimentación general y en el tratamiento de las ECNTs

1.2.1. Definición

Los edulcorantes son cualquier sustancia, bien sea natural o artificial que dota de sabor dulce a un alimento o producto. Una clase importante de los sustitutos del azúcar es conocida como edulcorantes de alta intensidad y son compuestos con una dulzura en ocasiones mucho mayor que la otorgada por la sacarosa o azúcar común; como resultado, se requiere menor cantidad de edulcorante, y la contribución de energía es a menudo insignificante (8).

La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA, siglas en inglés) de Estados Unidos se encarga de regular el uso de los edulcorantes artificiales como aditivos alimentarios. La mayoría de los sustitutos del azúcar aprobados para uso alimentario son compuestos sintetizados artificialmente; sin embargo, se sabe de la existencia de algunos sustitutos de azúcar natural, incluyendo el sorbitol y el xilitol, que se encuentran en las bayas, frutas, verduras y setas (9).

Los edulcorantes bajos en calorías y su efecto en el control de peso han sido un tema de controversia, debido a que en algunos estudios se ha observado que el uso de estos productos dificulta la pérdida de peso al promover una mayor ingestión de alimentos (10), no obstante, en otros estudios se encontró que no implica aumento en el apetito (11–14), es por ello que el efecto del consumo de edulcorantes sobre la conducta alimentaria y el equilibrio energético aún no es claro (12).

1.2.2. Clasificación y aporte energético

Los edulcorantes se clasifican básicamente como naturales y artificiales (9). Los edulcorantes naturales son extraídos a partir de productos naturales, sin ninguna modificación química. Algunos de estos han estado en uso durante décadas, otros durante siglos. Entre ellos se encuentra la miel de abeja, miel de maple, estevia y sacarosa. Por otro lado, los edulcorantes artificiales se derivan de una síntesis química de compuestos orgánicos que pueden o no ser encontrados en la

naturaleza, entre ellos se encuentran el acesulfame, aspartame, neotame, sacarina y sucralosa (15,16).

Se pueden también clasificar en calóricos, con un aporte promedio de 4 kilocalorías por gramo (e.g. sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa y maltosa) y no calóricos, que aportan menos de 1 kilocaloría por gramo (e.g. acesulfame K, sucralosa, sacarina, ciclamato, neotame, aspartame y taumatina) (17).

1.2.3. Edulcorantes calóricos

1.2.3.1. Sacarosa

La sacarosa es un disacárido obtenido principalmente del jugo de caña, formado a partir de los monosacáridos α -D-glucosa y fructosa, unidos por un enlace glicosídico entre el átomo de carbono 1 de la unidad de glucosa y el átomo de carbono 2 de la unidad de fructosa. Tiene la fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_{11}$ y un peso molecular de 342.30 g/mol (18).

La sacarosa contiene 4 kilocalorías por gramo, al igual que otros azúcares, como la fructuosa y la glucosa. Sin embargo, algunos azúcares son más dulces que otros, por lo que no es necesario añadir mucho para conseguir el mismo nivel de dulzor (19).

1.2.3.2. Fructosa

La fructosa es uno de los principales tipos de azúcares que se encuentran en frutas como manzanas, en los zumos de frutas y en la miel de abeja. Una diferencia importante es que la fructosa puede ser dos veces más dulce que la sacarosa. Esto significa que menos fructosa se puede utilizar para lograr el mismo nivel de dulzor. A diferencia del azúcar de mesa o sacarosa, la fructosa no causa aumento rápido en los niveles de glucosa en la sangre, lo que significa que tiene una carga glucémica baja. El índice glucémico (carga glucémica por gramo de hidratos de carbono) es una medida de cómo los carbohidratos afectan a las concentraciones de glucosa en sangre (20).

1.2.4. Edulcorantes no calóricos

Los edulcorantes no calóricos aparecen ante el hecho de amortiguar las condiciones de salud negativas relacionadas con el consumo excesivo de azúcar. Se sabe que son de 30 a 13,000 veces más dulces en gusto que su homóloga natural la sacarosa y no aportan energía. El consumo de dicha alternativa alimentaria ha aumentado significativamente desde 1999 hasta 2008, pasando de 6.1% a 12.5% en niños y de 18.7% a 24.1% en adultos. Los edulcorantes artificiales emplean compuestos que poseen altas intensidades de dulzura, son usados en alimentos para limitar la ingestión de energía o prevenir caries dentales (21).

1.2.4.1. Estevia

Stevia rebaudiana es planta que crece hasta 80 cm de altura, con hojas sésiles, dispuestas en oposición. La estevia es una planta subtropical que se puede cultivar fácilmente como cualquier otro cultivo de hortalizas (22). El género *Stevia* comprende al menos 110 especies. Las diferentes especies de *Stevia* contienen varios compuestos potenciales edulcorantes, siendo *S. rebaudiana* la más dulce de todas. Una variedad de términos se han utilizado para referirse al agente edulcorante extraído de esta planta, incluyendo estevia™, esteviósido, y glicósidos de esteviol (22).

La *Stevia rebaudiana* como edulcorante se utiliza en muchas partes de América Central y América del Sur. Esta planta se ha utilizado en varias zonas del mundo, como Brasil y Paraguay, como control natural para la diabetes (23). La estevia también se ha utilizado para ayudar a controlar el peso en personas obesas (24).

La estevia es un ingrediente alimentario aprobado y se vende en los Estados Unidos como un "suplemento dietético", de acuerdo con lo dispuesto en la Ley de Salud y Educación (DSHEA) de los Suplementos Dietéticos, que fue aprobada en 1994. Varios informes en animales y humanos indican que la seguridad de esta hierba no se ha determinado todavía por completo. La estevia tiene una toxicidad aguda muy baja y no hay reacciones alérgicas descritas (24).

1.2.4.2. Sucralosa

La sucralosa fue descubierta en 1976, aprobada por la FDA en 1998, y puesta a disposición del consumidor como Splenda™ en octubre del año 2000. La sucralosa tiene un perfil de sabor muy similar al azúcar, catalogado como edulcorante de alta intensidad. Es 600 veces más dulce que el azúcar de mesa, pero no promueve la caries dental y pequeñas cantidades son metabolizadas por el cuerpo. La sucralosa no tiene ningún efecto sobre la concentración de glucosa, ya sea en pacientes con diabetes tipo 1 o tipo 2 o en pacientes sanos (25).

La sucralosa se considera segura para el consumo para pacientes con diabetes, ya que no tiene ningún efecto sobre el metabolismo de hidratos de carbono (26).

El perfil de seguridad de la sucralosa ha sido revisado extensamente, sometiéndose a más de 100 estudios. Existen algunas afirmaciones de que la sucralosa puede afectar negativamente la salud, ya que al menos un estudio encontró que provocaba efectos en el tracto gastrointestinal. En este estudio, las ratas que consumieron sucralosa tuvieron una disminución significativa de las bacterias intestinales beneficiosas, dando como resultado aumento de peso, aumento del pH fecal debido a la disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta por las bacterias del colon y aumento de la expresión de los citocromos en el cuerpo, que pueden afectar potencialmente la biodisponibilidad de los nutrientes (26).

1.2.5 Papel de los edulcorantes en la alimentación y tratamiento de las ECNTs

Los edulcorantes no calóricos, como parte del contenido de ciertos alimentos y bebidas de consumo diario, se han venido empleando como sustitutos de azúcares trayendo como consecuencia un aumento en su consumo tanto en la población adulta como joven. Su uso está ligado a alternativas dietéticas en el control de peso, en la diabetes, en el manejo de la presión arterial, enfermedades crónicas no transmisibles y alternativamente, como estrategia para la prevención de caries. Todo ello asociado a un hábito de vida saludable (27).

El uso de sustancias de óptima calidad alimenticia para el consumo de aquellas personas con necesidades específicas, como lo son los sujetos que tienen diabetes u obesidad con demandas que favorezcan su salud y mejoren su calidad de vida, ha evidenciado un aumento en el consumo de edulcorantes no calóricos, sin embargo, la sustitución del azúcar por dichos edulcorantes no se asocia estrictamente a una menor ingestión energética y podría inducir un desequilibrio en la conducta alimentaria, asociado a una interferencia en la absorción, metabolismo o excreción de nutrientes y otros metabolitos, así como su efecto en la microbiota intestinal, alteración de las concentraciones de glucosa en sangre o posibles interacciones con otros fármacos o drogas (28).

Por otro lado, la OMS aconseja un consumo de azúcares menor al 10% del valor energético total de la dieta, fomentando una alimentación saludable en la que se limite el consumo de bebidas azucaradas, asociado a una mejor calidad de vida y a estrategias de prevención de ECNTs. De forma más sencilla para obtener mayores beneficios, el limitar el consumo de azúcares a menos de 3 veces al día en pacientes con ECNTs, se convierte en planes o propuestas de control para dichas patologías y la caries (6).

1.3. Regulación central de la conducta alimentaria

1.3.1. Relación de los edulcorantes con la conducta alimentaria

El efecto del consumo de edulcorantes sobre la conducta alimentaria y el equilibrio energético se ha evaluado en una variedad de modelos animales y también en sujetos humanos; sin embargo, el consenso del beneficio o perjuicio relacionado al consumo de estos productos aun no es claro (29).

En modelos murinos, la suplementación con sacarina aumenta el apetito y el peso a expensas del tejido adiposo, en comparación con un grupo de bajo consumo de glucosa (30). Se reportó que la suplementación con aspartame puede beneficiar el aumento de peso, sin asociarse al consumo de alimentos (31).

En contraste, los resultados en estudios humanos arrojan una serie de discrepancias. La suplementación con estevia genera un mayor consumo energético durante el día, en comparación con el consumo de sacarosa (32). Sin embargo, en un estudio con grupos suplementados con sacarosa, sucralosa y estevia, no se encontraron diferencias en los niveles de saciedad y consumo energético (17). La mayoría de los estudios publicados sobre los edulcorantes artificiales son estudios a corto plazo, que duran desde unas pocas horas hasta 1-2 días. Raben y colaboradores, encontraron un efecto estimulante sobre el apetito por parte de los edulcorantes artificiales (33). En contraste, estudios a largo plazo encontraron que la ingestión de edulcorantes artificiales disminuye el peso corporal en comparación con el consumo de sacarosa. Un estudio que comparó los efectos del consumo de sacarosa y edulcorantes artificiales durante 10 semanas encontró que el grupo consumidor de sacarosa aumento la masa corporal y las cifras de tensión arterial, con diferencia significativa del grupo de edulcorantes artificiales, donde no se observaron estos efectos (31).

Por otro lado, debido la epidemia de enfermedades cardiovasculares y el aumento de tasas de obesidad e hipertensión, diversos estudios suponen que la ingestión excesiva de fructosa juega un papel crítico en la epidemia en estas enfermedades, debido a su relación con el aumento del ácido úrico en el organismo. Estudios clínicos también han demostrado que las concentraciones de triacilglicéridos en suero se incrementaron en pacientes que consumieron dietas suplementadas con 200 g de fructosa. En estudios realizados en ratones también se ha observado una relación entre la ingestión de fructosa y el síndrome metabólico, característica no inducida por cantidades equivalentes de glucosa. Estos estudios no se pueden comparar con estudios en sujetos humanos, pues las dosis administradas a roedores no siempre son dosis normales (34).

A partir de observaciones experimentales en modelos animales y clínicas en modelos humanos, se ha considerado al hipotálamo como una estructura esencial en el control del balance energético en el sistema nervioso central (SNC). Del mismo modo, otras regiones cerebrales, como la amígdala o la corteza prefrontal, se han implicado en la generación de alteraciones en la alimentación y el almacenamiento de energía. Dichas regiones centrales reciben señales periféricas que informan

sobre el estado energético corporal, las cuales pueden efectuar su acción a través de la vía neuronal o por vía humoral y que pueden actuar a nivel de diferentes sistemas, entre ellos el sistema endocanabinoide, como circuito de recompensa (35).

1.4. Sistema endocanabinoide

1.4.1. Definición

La determinación de la estructura del Δ^9 -tetrahidrocannabinol, principio activo de la planta *Cannabis sativa*, en 1964, fue el primer paso en la comprensión de su actuación a nivel cerebral y en la identificación del sistema endocanabinoide (SEC, siglas en español) (36). Se denomina como un conjunto de receptores (CB1 y CB2) y sus respectivos ligandos sintetizados por el organismo, denominados endocannabinoides por su analogía funcional con los cannabinoides, como el canabidiol, entre otros, y las enzimas involucradas en su síntesis e inhibición (37).

1.4.2. Endocannabinoides

Los endocannabinoides son compuestos endógenos, de naturaleza lipídica que se derivan de ácidos grasos poliinsaturados. Los principales endocannabinoides son N-araquidonil-etanolamida (AEA) y 2-araquidonilglicerol (2-AG), sin embargo, hay otros lípidos considerados endocannabinoides, como lo son el 2-araquidonilglicerol éter (2-AGE o noladin éter) (38), la N-araquidonil dopamina (NADA) (39) y posiblemente la oleamida (40), sintetizados a partir de ácido araquidónico (41). Los endocannabinoides son sintetizados a demanda, de acuerdo a las necesidades fisiológicas del organismo y de la misma manera son inactivados y degradados (42).

La AEA, conocida también como anadamida, se aisló por primera vez del cerebro porcino y se identificó como canabinoide endógeno en 1992. Puede actuar a nivel de los dos receptores pertenecientes al SEC (CB1 y CB2) (41).

La producción de anadamida no es exclusiva de las neuronas; también los astrocitos y microglía, entre otros tipos celulares, producen este ligando (43). Su síntesis tiene lugar a partir de los fosfolípidos de la membrana o a partir de la fosfatidiletanolamina

presente en la misma, por acción hidrolítica de fosfodiesterasas (36). A partir de la fosfatidiletanolamina y un glicerofosfolípido, se forma el precursor N-araquidonoilfosfatidiletanolamina (N-ArPE), reacción catalizada por una N-aciltransferasa dependiente de calcio (NAT). Posteriormente, la hidrólisis de N-ArPE permite la liberación de ácido fosfatídico y anandamida. Su degradación tiene lugar por acción de una hidrolasa de ácidos grasos (FAAH, siglas en inglés) que hidroliza la anandamida, dando lugar a etanolamina y ácido araquidónico (44).

Por otro lado, el 2-AG, identificado en 1995 en el intestino canino, se sintetiza a partir del diacilglicerol (DAG) con ácido araquidónico (45). La obtención de 2-AG a partir de DAG está catalizada por DAG lipasas (DAGL- α y DAGL- β) (46). El 2-AG se comporta como agonista de CB1 y CB2, con una avidez menor que AEA. Su degradación tiene lugar por acción de la enzima monoacilglicerol lipasa (MAGL), obteniendo glicerol y ácido araquidónico (47).

1.4.3. Receptores

Los endocannabinoides llevan a término su función a partir de su interacción con receptores fijos en la membrana celular. Se han identificado dos tipos de receptores involucrados en este sistema, denominados receptor endocannabinoide 1 (CB1) y receptor endocannabinoide 2 (CB2), que pertenecen a la familia de los receptores asociados a proteína G, con siete dominios transmembranales (48).

El receptor CB1, fue aislado y secuenciado por primera vez en 1990, por Matsuda y cols. en cerebro de rata (49). Se caracteriza por contener de 472 a 473 aminoácidos organizados en una secuencia altamente conservada (Figura 1) (50). Poco después, Gerad y colaboradores aislaron a partir de muestras del tronco encefálico en humano y se logró identificar su localización en el cromosoma 6, codificado por el gen CNR1. Es de resaltar que la homología de secuencia en los aminoácidos de dicho receptor entre humanos y ratones equivale al 90% (51). El receptor CB1, se localiza en la mayoría de las células del organismo, principalmente a nivel del SNC. Bajo el uso de técnicas autorradiográficas y estudios inmunohistoquímicos se ha identificado de forma definida la localización de dicho receptor en cerebro de ratas, arrojando como resultado una mayor distribución a nivel de ganglios basales e

hipocampo. Un estudio demuestra su localización a nivel de neuronas presinápticas y en las células gliales, que incluyen los astrocitos (37). A su vez, se ha puesto en evidencia su localización en tejidos periféricos, que incluyen el tejido adiposo, tracto gastrointestinal, cavidad oral (52), ojos (30), sistema cardiovascular, hígado, páncreas, huesos, musculo esquelético y sistema inmunológico (37).

El receptor CB2, fue clonado en 1993 por Munro y cols. en muestras de bazo de rata y una línea leucémica humana (HL60). Es un polipéptido de 360 aminoácidos que pertenece también a la superfamilia de los receptores asociados a proteína G. El receptor CB2 se localiza principalmente en células del sistema inmunológico, como macrófagos y monocitos, en la región de las amígdalas y bazo (36). La estructura de ambos receptores se muestra en la figura 1.

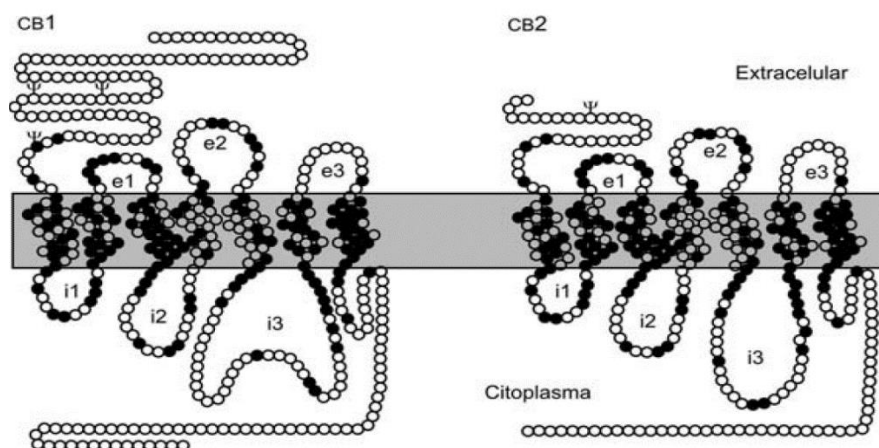


Figura 1. Representación de la secuencia de los receptores del sistema endocannabinoide CB1y CB2 (48).

1.4.4. Funciones en el organismo

El SEC está presente en todos los animales vertebrados. Cumple con funciones vitales que intervienen en una amplia gama de procesos fisiológicos (53), entre estos, la actividad locomotora, procesos de aprendizaje y memoria, procesos emocionales como el miedo, el comportamiento y la ansiedad, el apetito, el balance energético, neuroprotección, la modulación de la neurotransmisión, remodelación ósea, modulación del sistema inmune y funciones endocrinas (54). Debido a que el campo de acción de los endocannabinoides se considera un fenómeno en crecimiento, se considera que es uno de los sistemas que interfiere en los tres

sistemas esenciales de regulación fisiológica: el sistema nervioso, el sistema endocrino y el sistema inmune (55).

1.4.5. Funciones en la regulación del apetito y metabolismo energético

Comer es una acción en la que intervienen varios mecanismos de señalización central y periférica, que mantienen en equilibrio los sistemas reguladores del hambre y la saciedad. El hipotálamo asume el control del estado homeostático, regulando funciones endócrinas, autonómicas y conductuales, que incluyen la ingestión de alimento y el gasto energético. El núcleo arqueado (ARC), junto a los núcleos paraventricular (NPV), ventromedial (NVM), el dorsomedial (NDM) y el área hipotalámica lateral (AHL), son núcleos hipotalámicos involucrados en la regulación energética y el consumo de alimentos, que reciben señales periféricas del estado nutricional y están compuestos por al menos dos poblaciones neuronales, importantes para la regulación de los mecanismos de hambre/saciedad, una con actividad anorexigénica y otra con actividad orexigénica (56).

Cuando una señal anorexígena alcanza al ARC, las neuronas con efecto anorexigénico incrementan su actividad, lo que resulta en una disminución en la ingestión de alimento y un aumento del gasto energético (57). En contraste, una señal orexígena conlleva la estimulación de neuronas con actividad orexigénica y, por consiguiente, se estimula la conducta alimentaria y disminuye el gasto de energía. Se ha considerado que, dentro de estas interacciones neuronales, los receptores CB1 tienen una participación importante en el control del consumo de alimento y del gasto de energía (56).

Ravinet y colaboradores observaron que ratones *knockout* para el receptor CB1 (CB1^{-/-}) sometidos a una dieta rica en grasa tuvieron un peso corporal y una adiposidad significativamente menor respecto al grupo control y a su vez, no desarrollaron obesidad y tampoco generaron una conducta hiperfágica, lo que sugiere la participación del receptor CB1 en la conducta alimentaria (58). Por otro lado, pacientes con diabetes tipo 2 muestran un incremento en la actividad del ECB en la grasa visceral y altas concentraciones de endocannabinoides en sangre, en comparación con un grupo control (54). En el estudio de Blüher, se correlacionó la

concentración de 2-AG circulante, la grasa visceral y concentraciones plasmáticas de insulina en ayunas en pacientes obesos (59).

Otros estudios han propuesto que las concentraciones de leptina se relacionan indirectamente con las concentraciones séricas de endocannabinoides y que roedores obesos deficientes de la acción de leptina muestran un aumento significativo en la concentración de endocannabinoides en el hipotálamo (52).

La modulación de la expresión del receptor CB1 a través de la dieta o por su bloqueo farmacológico ha demostrado una mejoría en varios parámetros metabólicos, por lo que se convierte en una estrategia a futuro para el manejo de enfermedades como el sobrepeso y la obesidad (37).

1.5. Los endocannabinoides en el sistema nervioso central

1.5.1. Sistema endocannabinoide glial

El sistema nervioso central está constituido principalmente por neuronas y células gliales, y la relación entre estas es esencial para el mantenimiento de la homeostasis cerebral. Las células gliales llevan a cabo una serie de funciones esenciales para la homeostasis del sistema nervioso, entre ellas, servir de soporte a las neuronas, mantener los niveles de oxígeno y mantener reguladas las funciones metabólicas del tejido nervioso, además de intervenir en procesos de defensa y recuperación del SNC frente a agresiones externas (48). Entre las células gliales, se describen los oligodendrocitos, la microglia y los astrocitos (53).

1.5.2. Astrocitos

Son el tipo celular más abundante en el SNC, de mayor tamaño y como su nombre lo indica, tienen forma estrellada (60). Estas células gliales forman la microarquitectura del cerebro, proporcionando soporte estructural (61), responden al estímulo por diferentes neurotransmisores como el glutamato (62) y son responsables de la homeostasis de iones, aminoácidos y metabolitos energéticos necesarios para el mantenimiento de la función neuronal (60).

1.5.3. Importancia de los astrocitos en la homeostasis y funcionamiento del SNC

Los astrocitos contribuyen de manera importante en el metabolismo, homeostasis y funcionamiento del SNC (60). Los astrocitos, tienen contacto con los vasos sanguíneos y a su vez, con las neuronas. Esto les otorga un papel privilegiado en la captación de glucosa y en el suministro de metabolitos energéticos necesarios para la función neuronal (62). Varios estudios sugieren que la glucosa se acumula inicialmente en los astrocitos y se libera, bien sea como glucosa o lactato, cuando se incrementa la demanda metabólica (63). Además, tienen un papel fundamental en el flujo de sustratos energéticos desde los vasos sanguíneos hacia las células que componen el SNC (64). Algunos intermediarios metabólicos, como los cuerpos cetónicos, bajo circunstancias singulares (ayuno prolongado o diabetes), pueden utilizarse como sustrato alternativo en el metabolismo cerebral (65).

El transporte de glucosa hacia los astrocitos es facilitada por acción de los transportadores GLUT 1 y GLUT 4. Una vez esta entra a la célula, la hexocinasa la fosforila y puede entrar a través de la ruta glicolítica, de las pentosas fosfato, o bien almacenarse en forma de glucógeno (64).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC. Estimula la captura de glucosa y la liberación de lactato por los astrocitos (64). Los transportadores de dicho neurotransmisor presentes en la glía son GLT-1 y GLAST, y están dirigidos por un gradiente de sodio (Na^+), lo que indica que una molécula de glutamato es transportada por 3 iones de Na^+ hacia el interior de la célula y como resultado, un ion de potasio (K^+) sale. Este proceso implica el gasto de ATP y por lo tanto la activación de la glucólisis y la producción de lactato (figura 2) (60).

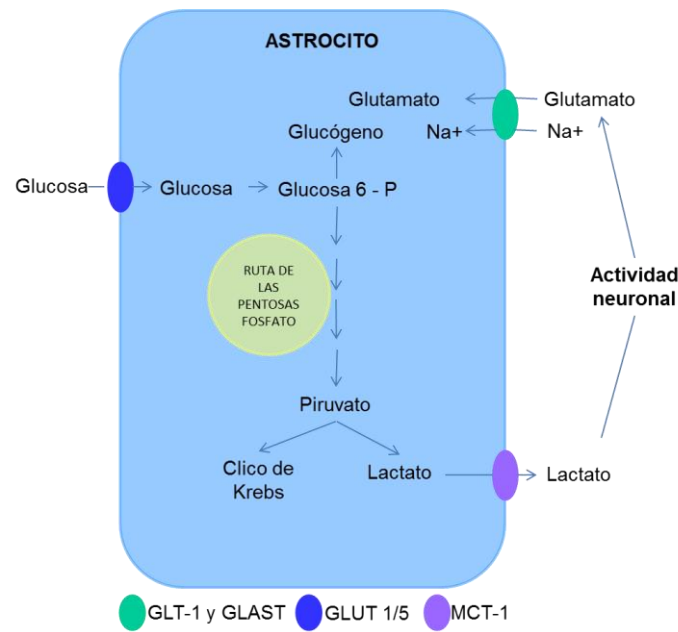


Figura 2. Rutas metabólicas de la glucosa en astrocitos y activación de la glucólisis por glutamato en condiciones de activación neuronal (60).

Los astrocitos tienen un papel activo en la regulación del metabolismo energético a nivel cerebral, capturando y metabolizando glucosa como fuente principal de energía. Además, se consideran la principal fuente de almacenamiento de glucógeno en el SNC y su tasa de recambio con las neuronas se coordina directamente con la actividad sináptica, regulando la neurotransmisión por intermedio del sistema endocanabinoide (64).

1.5.4. Sistema endocanabinoide en los astrocitos

Los astrocitos están en constante comunicación con las neuronas, se establece que además del flujo de información entre las neuronas pre y post sinápticas, el intercambio de información de astrocitos con los elementos neuronales sinápticos, como respuesta a la actividad sináptica se asocia con la regulación de la transmisión sináptica (62). A partir de ello, se ha evidenciado que los astrocitos basan su excitabilidad celular en variaciones de concentraciones citoplasmáticas de Ca²⁺, y estas elevaciones pueden darse de forma espontánea o por acción de neurotransmisores o endocanabinoides liberados durante la actividad sináptica (66).

A su vez, los astrocitos liberan varias moléculas neuroactivas, como glutamato, ATP, adenosina, GABA, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), prostaglandinas, proteínas y péptidos, que pueden influir en la fisiología neuronal y sináptica. Es así como se propone que el glutamato liberado por los astrocitos por acción de los endocannabinoides liberados en la neurotransmisión podrían activar las neuronas adyacentes no conectadas, lo que sugiere que los astrocitos sirven como puente para la comunicación no sináptica entre las neuronas (62).

Los astrocitos, se consideran elementos emergentes importantes en la regulación de la función sináptica y en la plasticidad neuronal que responden a diferentes compuestos endógenos, entre ellos los endocannabinoides, estableciendo de este modo una interacción con las neuronas (67).

1.6. Alteraciones nutricionales y modificaciones en el sistema endocanabinoide

El uso de edulcorantes ha aumentado conforme a las necesidades de la población debido a diferentes factores, entre ellos, los factores intrínsecos a la salud y socio-económicos. Esto ha generado como consecuencia su asociación a dietas alimenticias consumidas de forma regular, un aumento de su uso por parte de la industria y una mayor participación en estrategias que mejoren el estado de salud, posicionándolos en un plano amplio de estudio, considerándolos un determinante importante en el manejo de enfermedades metabólicas crónicas (68).

Se ha puesto de manifiesto que las dietas ricas en ácidos grasos linoléico, un precursor del ácido araquidónico, puede generar un aumento en la síntesis de endocannabinoides (69), lo que conduce al desarrollo de obesidad y por consecuencia la necesidad de métodos que favorezcan la condición de salud del individuo, entre ellos, los edulcorantes, considerados como herramientas útiles en el manejo de dichas alteraciones metabólicas (70). Sin embargo, estudios recientes indican que el consumo de los edulcorantes artificiales puede intervenir en el desarrollo de la intolerancia a la glucosa y la obesidad, dicho efecto como consecuencia del cambio de la composición y función de la microbiota intestinal generando como resultado alteraciones metabólicas en el organismo hospedero

(71). Dentro de los mecanismos por los que la microbiota influye directa e indirectamente en la homeostasis metabólica y energética se puede enlistar, la regulación de la ingestión energética de la dieta, la interacción con moléculas de señalización del hospedador, como los endocannabinoides, las modificaciones en la permeabilidad intestinal y el vertimiento de hormonas entéricas (72).

El uso de edulcorantes en la dieta común, se ha convertido en un punto de controversia debido al debate existente entre sus beneficios y efectos secundarios, que intervienen en diferentes niveles del organismo, como por ejemplo el sistema endocanabinoide, considerado uno de los puntos clave en el tratamiento de patologías metabólicas, como la obesidad, debido a la participación de sus componentes tanto en la ingestión de alimentos como en el control del almacenamiento y gasto energético a nivel central y periférico (73).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las ECNTs, presentan tasas de prevalencia correspondientes hasta un 60% a nivel mundial, siendo la obesidad y la diabetes las enfermedades con mayor número de casos presentados.

Los edulcorantes son aditivos que confieren un sabor dulce a los alimentos y pueden clasificarse de acuerdo a su naturaleza y su aporte energético. En la actualidad, los edulcorantes artificiales sin aporte calórico son adoptados como alternativa frente a una gran variedad de aspectos que se correlacionan con el estado de salud de un individuo, entre ellos patologías relacionadas con diabetes y obesidad. En México, se atribuye un consumo libre aproximado del 16% para dichos edulcorantes; sin embargo, teniendo en cuenta que la industria los ha incorporado en gran variedad de productos de consumo diario y debido a que estos compuestos modifican la disponibilidad de glucosa en el organismo, existe la posibilidad de que los mismos afecten la homeostasis de diversos tejidos, incluyendo el tejido nervioso y, por lo tanto, su funcionamiento, relacionándose con cambios en el metabolismo energético y el apetito que pueden ser benéficos o dañinos para el individuo. Por ello, es necesario estudiar sus efectos a nivel celular en el sistema nervioso central.

El SEC denominado así, por su analogía funcional con los canabinoides, principios activos de la planta *Cannabis sativa*, se designa como un conjunto de receptores (CB1 y CB2) y sus respectivos ligandos sintetizados por el organismo, endocannabinoides y las enzimas involucradas en su síntesis e inhibición. El receptor CB1 participa en actividades que regulan el metabolismo energético, el apetito, la modulación de la neurotransmisión, el dolor y el sueño. El receptor CB2 se relaciona con la reducción del dolor, la actividad locomotora y el comportamiento. Dichos receptores pueden localizarse en diferentes lugares del organismo. Los CB1 se han descrito presentes en neuronas y astrocitos en el sistema nervioso central, así como en el páncreas, hígado, músculo esquelético, hueso, tejido adiposo, gastrointestinal y vascular. Por otro lado, los receptores CB2 se vinculan con mayor frecuencia a las células del sistema inmunológico.

El sistema endocannabinoide ha cobrado gran importancia debido a su relación estrecha con la homeostasis y funcionamiento del metabolismo energético, a través de sus efectos en diversos tejidos, entre ellos el sistema nervioso central. Los astrocitos, células presentes en este tejido, encargadas de mantener el funcionamiento neuronal, son componentes integrales en la regulación de la neurotransmisión por intermedio de dicho sistema y mantienen el flujo de sustancias nutritivas al cerebro modulando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Se ha evidenciado que los cambios en la dieta pueden afectar al SEC. En la obesidad, un incremento en la síntesis de endocannabinoides, una baja degradación de los mismos y una sobre expresión de sus receptores, se relacionan con varios factores, como la dieta y la masa corporal, lo que se refleja en un aumento del consumo de alimentos, la lipogénesis y la inducción de la resistencia a la insulina.

Debido a que los edulcorantes no calóricos pueden modificar la disponibilidad energética en el organismo y que los astrocitos mantienen el flujo de sustancias de acuerdo a las necesidades neuronales, además de intervenir en procesos sinápticos, por medio del SEC, existe la posibilidad de que una alteración en dichos procesos fisiológicos que incluyen mecanismos de señalización central y periférica para mantener en equilibrio los sistemas reguladores del hambre y la saciedad, afecten el funcionamiento y homeostasis en el organismo de un individuo.

Pregunta investigación:

¿El consumo crónico de edulcorantes incrementa la expresión del receptor CB1 en astrocitos de ratones BALB/c?

3. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna: El consumo crónico de glucósidos de esteviol y sucralosa provocará un incremento en la expresión del receptor CB1 en astrocitos, en comparación con el consumo de sacarosa, a su vez, el consumo crónico de esta provocará un incremento en la expresión del receptor CB1 en astrocitos, en comparación con el grupo control sin edulcorante.

Hipótesis nula: El consumo crónico de glucósidos de esteviol y sucralosa no provocará un incremento en la expresión del receptor CB1 en astrocitos, en comparación con el consumo de sacarosa, a su vez, el consumo crónico de esta tampoco provocará un incremento en la expresión del receptor CB1 en astrocitos, en comparación con el grupo control sin edulcorante.

4. OBJETIVOS

General:

Determinar si el consumo crónico de edulcorantes calóricos y no calóricos incrementa la expresión del receptor CB1 en astrocitos en comparación con un grupo control sin edulcorante.

Específicos:

- Comparar la expresión del receptor CB1 en astrocitos de ratones suplementados con sacarosa, como edulcorante calórico; frente a ratones suplementados con sucralosa y glucósidos de esteviol, como edulcorantes no calóricos.
- Contrastar la expresión del receptor CB1 en astrocitos de ratones suplementados con sucralosa frente a ratones suplementados con glucósidos de esteviol.
- Determinar la posible relación entre la expresión del receptor CB1 en astrocitos y cambios en el consumo de agua, alimento y el peso corporal, en los ratones suplementados con edulcorantes.

5. JUSTIFICACIÓN

México, con una prevalencia de obesidad en adultos correspondiente al 71.3% (ENSANUT, 2012) y del 60% de diabetes, es considerado uno de los países con mayor predominio para dichas patologías. Su desarrollo se asocia con diferentes factores, principalmente y con mayor frecuencia al estilo de vida, donde interviene la dieta.

La dieta se ha convertido en un factor controversial en el control de enfermedades metabólicas y se considera uno de los ejes principales para promover su prevención. Como estrategia, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la OMS, han establecido metas de ingestión de nutrimentos, es decir, dietas equilibradas, que favorecen el estado de salud y previenen el desarrollo de dichas patologías, donde se incluye el consumo de edulcorantes como método para disminuir el aumento progresivo del peso corporal a expensas de la acumulación de grasa en el organismo.

El uso de edulcorantes ha aumentado conforme a las necesidades de la población debido a diferentes factores, entre ellos, los factores intrínsecos a la salud y socio-económicos. Como consecuencia de su asociación en las dietas consumidas de forma regular, su participación en la industria, que ha cobrado mayor auge, y el uso de estos como alternativas que mejoren el estado de salud, los ha posicionado en un plano amplio de estudio. Sin embargo, estudios recientes relacionan el consumo de edulcorantes no calóricos con el cambio de la microbiota y como consecuencia sus reacciones bioquímicas a través de la secreción de sustancias que provocan una respuesta inflamatoria y como resultado, alteraciones metabólicas en el organismo hospedero.

Los datos bibliográficos relacionan estrechamente dichas patologías con las funciones fisiológicas que lleva a cabo el sistema endocanabinoide y su receptor CB1 en diferentes tejidos, entre ellos el SNC. Los astrocitos, presentes en este, son considerados elementos emergentes importantes en la regulación de la función sináptica, en la plasticidad neuronal y que tienen un papel importante en la regulación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica para suplir las

necesidades energéticas a nivel cerebral como respuesta a diferentes compuestos endógenos, entre ellos los endocannabinoides, dependiendo del estado nutricional.

Por ello, es necesario estudiar los efectos de los cambios en el consumo energético derivados del consumo crónico de edulcorantes sobre el sistema de los endocannabinoides en células del sistema nervioso central, específicamente, en los astrocitos, ya que estas células se encargan de mantener la homeostasis del SNC con base a las necesidades metabólicas neuronales.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo, comparativo.

Universo: Ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 14 semanas de edad.

Tamaño de muestra: Se formaron grupos de 10 ratones hembras y 10 ratones machos de 8 semanas de vida para cada edulcorante (sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa) y grupo control (agua).

6.2. Criterios de inclusión y eliminación

Criterios de inclusión: Ratones de la cepa BALB/c, hembras y machos, que consumieron sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol como edulcorantes y agua como grupo control, con 8 semanas de edad y un peso que oscile entre 18 a 22 g.

Criterios de eliminación: Enfermedad o muerte prematura de animales en experimentación.

6.3. Variables de Estudio

Independientes:

- Consumo de edulcorantes.
- Sexo.

Dependientes:

- Expresión del receptor CB1.
- Peso corporal.
- Consumo de alimento y agua.

6.4. Procedimientos

Los ratones de la cepa BALB/c se criaron en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo condiciones de temperatura regulada próxima a los 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Se siguieron las especificaciones de cuidado, manipulación y producción de animales de laboratorio establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los ratones contaron con alimento y agua purificada a libre demanda durante las primeras ocho semanas de vida. La dieta fue completa en contenido de proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (LabDiet 5001). Transcurridas 8 semanas de vida, se inició con la formación de grupos experimentales, los cuales bebieron en el agua consumida a diario el edulcorante asignado, durante 6 semanas, con excepción del grupo control. La evaluación y registro del consumo de agua y alimento ingerido por los ratones se realizó diariamente bajo las mismas condiciones y en un mismo horario (12:00 pm), del mismo modo, el peso se registro cada tercer día bajo las mismas condiciones.

Se formaron 4 grupos experimentales de la siguiente manera:

Grupo experimental	Número de ratones
Grupo control (Agua purificada)	10 hembras y 10 machos.
Grupo glucósidos de esteviol (0.025%) (Presentación comercial 1g en 100 mL de agua)	10 hembras y 10 machos.
Grupo Sucralosa (0.012%) (Presentación comercial 1g en 100 mL de agua)	10 hembras y 10 machos.
Grupo Sacarosa (10%) (10 gr de azúcar en 100 mL de agua)	10 hembras y 10 machos.

Tabla 1. Grupos experimentales.

6.4.1. Sacrificio de los animales de experimentación

Los ratones fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL; 50 μ L/25 g de peso del ratón). Los signos de reflejo se revisaron antes de iniciar la disección para la recolección del cerebro para la posterior obtención de cortes con 5 μ m de grosor de dicho tejido.

6.4.2. Disección

Una vez sacrificado el ratón, se procedió a perfundir con 30 mL de tampón fosfatado salino (PBS), para eliminar el exceso de eritrocitos en tejido cerebral. Una vez realizado este procedimiento, con ayuda de unas tijeras finas se cortó el cráneo para obtener el tejido cerebral. El tejido fue utilizado en base al ensayo requerido para cada muestra, como se describe a continuación.

6.4.3. Preparación del tejido para cortes histológicos

Una vez obtenido el tejido cerebral del ratón de forma íntegra, se incluyó en el medio de congelación “*Optimal Cutting Temperature*” (OCT). A continuación, el tejido ubicado en las placas se llevó a una temperatura cercana a los -70°C para conseguir la solidificación del OCT. Finalmente, los cortes histológicos se llevaron a termino con ayuda del criostato, programado para realizar cortes con un grosor de 5 μ m para su posterior análisis por inmunofluorescencia.

6.4.4. Inmunofluorescencia

Se emplearon al menos 4 cortes por tejido para cada muestra y se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo, como se enuncia en la tabla 2:

Anticuerpo	Fluorocromo	Identificación	Tipo	Compañía
GFAP (Proteína glial fibrilar ácida)	Alexa Fluor® 488	53989280	Anti- mouse	eBioscience

CB1	N/A	ab136410	Anticuerpo policlonal de conejo	Abcam
Anti- IgG	Alexa Fluor® 647	ab195884	Anticuerpo de cabra anti – IgG de conejo	Abcam

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

Se analizaron 100 células por cada animal de experimentación, en un microscopio de fluorescencia Nikon 6000 bajo objetivos de 20X y 60X, por medio del software NIS-elements incluido en el equipo. Se evaluó la población celular con señal positiva para el receptor CB1, y a partir de ello se determinó el número de células correspondiente a astrocitos, con base en la intensidad media de fluorescencia.

6.4.5. Ensayo de western Blot

6.4.5.1. Extracción de proteínas totales del tejido

La extracción de proteínas totales del cerebro se llevó a cabo utilizando 500 µL de solución amortiguadora de lisis, el cual fue completado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (20 µg/mL Aprotinina, 20 µg/mL Leupeptina, 1mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 50 mM NaF). Se homogeneizó el tejido con la ayuda de un émbolo de jeringa de 1 mL. Una vez homogeneizado el tejido, se procedió a agregar nuevamente solución amortiguadora de lisis. La muestra se incubó en hielo durante 45 min, agitando en vortex cada 15 min. Al haber transcurrido los 45 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min. Finalmente, se recuperó el sobrenadante en un tubo limpio y etiquetado.

6.4.5.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de la fracción soluble de proteína se determinó con el ensayo colorimétrico de Bradford (Bio-Rad). Para la curva estándar se utilizó Albumina bovina (BSA) (2 mg/mL) a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL (Anexo 1).

Se preparó el reactivo de Bradford con agua destilada, a una dilución de 1:4; se utilizó lo correspondiente a 200 μL del reactivo por pozo, a 4°C. En una placa de 96 pozos se agregaron 5 μL de los estándares de BSA, por duplicado, dejando los dos primeros pozos como blanco (solo mezcla de Bradford). Posteriormente, se agregó 1 μL de muestra por duplicado y se usó a solución amortiguadora de lisis como control negativo. A cada pozo se agregaron 200 μL de la mezcla de Bradford y la absorbancia fue leída a 590nm.

Una vez obtenida la concentración de proteína de cada muestra de tejido cerebral, ésta se ajustó a una concentración de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Se agregó solución amortiguadora de carga (SLB, *sample loading buffer*) para completar un volumen final de 100 μL de muestra. Se calentaron las muestras 5 min a 95°C y se incubaron 5 min en hielo a (4°C). De ser necesario, las muestras se centrifugaron 1 minuto a 13,000 rpm para bajar el agua de evaporación, antes de cargarlas al gel.

6.4.5.3. Preparación de geles de poliacrilamida y solución amortiguadora de corrida

Se ensambló la cámara de electroforesis y se llenó con la solución amortiguadora de corrida frío. Se limpiaron las placas de vidrio con etanol al 70% y toallas de papel. Una vez ensambladas las placas en los casetes, se llenaron con el gel de corrida. Una vez polimerizado, se colocó gel de apilamiento e inmediatamente el peine. Al polimerizar el gel de apilamiento, se removió el peine. En el primer pozo de izquierda a derecha se agregaron 2 μL de marcador de peso molecular (Thermo). A partir del segundo pozo, se cargaron 60 μg de proteína de las muestras (Anexo 1).

6.4.5.4. Electroforesis

Una vez colocadas las muestras en los pozos del gel, se dejaron correr a un voltaje constante de 100 mV, hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel. Cuando la migración de proteínas terminó, se separaron los geles de las placas de vidrio; se cortó el gel de apilamiento y el gel de corrida se remojó en solución amortiguadora de transferencia por 1 min (Anexo 1).

6.4.5.5. Transferencia semi-húmeda de la membrana

Se transfirió el gel a una membrana de transferencia fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se cortó la membrana del tamaño del gel. Se requirieron 4 papeles filtro gruesos que se utilizaron como filtros. Se hidrató la membrana en metanol absoluto por 30 segundos y después se enjuagó con la solución amortiguadora de transferencia 1 ó 2 minutos.

El sándwich de transferencia se preparó de la siguiente manera, comenzando desde cátodo hacia el ánodo: En la placa de transferencia se colocaron, 2 papeles filtro, el gel, la membrana de PVDF y 2 papeles filtro (todo humedecido con el buffer de transferencia). Se cerró la cámara y se dejó transferir a 15 mA (constante), durante 50 minutos.

6.4.5.6. Bloqueo de membrana

Con la finalidad de reducir los lugares de unión no específicos al anticuerpo, se procedió a bloquear el resto de los sitios activos de la membrana PVDF con una solución de BSA al 1% en TBST durante 2 hr o toda la noche a 4°C en agitación suave.

6.4.5.7. Incubación con anticuerpos

Para la evaluación de la expresión de la proteína de interés, se utilizó anticuerpo primario dirigido al receptor endocanabinoide tipo 1 diluido en BSA al 5%, en una dilución 1:500, los cuales fueron incubados a 4°C durante toda la noche. Una vez realizado este proceso de incubación, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBST durante 5 minutos.

Posteriormente se procedió a incubar el anticuerpo secundario. En este caso se utilizó el anticuerpo anti-conejo diluido en BSA al 1% en una dilución 1:5,000. La incubación se realizó a temperatura ambiente, durante 2 hr en agitación suave, una vez culminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con TBST durante 5 minutos cada uno. Finalmente, se utilizó biotina con el fin de potencializar la señal en

una dilución 1:1000. La incubación se realizó durante 2 hr a temperatura ambiente, una vez culminado el tiempo se procedió a realizar 3 lavados durante 5 minutos cada uno. El control de carga fue realizado con el anticuerpo anti- β actina en una dilución 1:10,000.

6.4.5.8. Inmunodetección (revelado de la membrana)

La membrana se colocó en una solución de revelado (150 μ L de DAB al 0.5% en PBS 1X y 30 μ L de H₂O₂). Se colocó en agitación suave hasta la aparición de las bandas. Para inactivar la reacción, se lavó con agua destilada.

Se realizó un control de carga utilizando un anticuerpo anti- β -actina a una dilución de 1: 10,000 (A4700, Sigma Aldrich). El análisis de densitometría para la expresión de proteínas se realizó con el software ImageJ (National Institutes of Health). La densidad de la banda se normalizó a la expresión de actina y se informó en unidades arbitrarias (UA).

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición	Análisis Estadísticos
Consumo de edulcorantes	Administración de una concentración conocida y establecida de cualquier sustancia, natural o artificial que dota de sabor dulce a un alimento o producto.	<p>El consumo de edulcorantes está dado por la cantidad de solución con edulcorante consumida a libre demanda durante un periodo de 6 semanas.</p> <p>Soluciones empleadas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 100 mL de glucósidos de esteviol al 0.025% - 100 mL de Sucralosa al 0,012%. - 100 mL de Sacarosa al 10%. 	Variable independiente cuantitativa categórica	Diferencia en mililitros de edulcorante consumidos diariamente en comparación con la concentración inicial.	ANOVA

		- 100 mL de agua.			
Genero	Condición orgánica que distingue a los organismos machos de las hembras.	- Macho. - Hembra.	Variable independiente cualitativa.	- Macho - Hembra	N/A
Expresión del receptor CB1	Receptor propio del sistema endocanabinoide participe en actividades que regulan el metabolismo energético, el apetito, el dolor y el sueño. Está presente en neuronas y astrocitos en el sistema nervioso central, páncreas, hígado, musculo esquelético, hueso, tejido adiposo, gastrointestinal y vascular.	Número de células y emisión de fluorescencia positiva para el marcador CB1, identificado por el anticuerpo comercial ab23703, analizada por inmunofluorescencia.	Variable dependiente cuantitativa.	- Número de células por campo. - Valores arbitrarios para la intensidad media de fluorescencia (IMF).	ANOVA
Consumo de alimento y agua	Alimento y bebida ingerida por los ratones de estudio.	Promedio de los gramos de alimento y bebida consumida por los ratones de estudio	Variable independiente de tipo continúa.	- Gramos - Mililitros	ANOVA

		semanalmente. Para ello se mide diariamente los mL y g de diferencia a la concentración inicial de agua y alimento, respectivamente, preferiblemente a la misma hora.			
Masa corporal	Masa del cuerpo en gramos, conocida también como masa corporal.	Gramos de peso del animal, que se obtendrán semanalmente.	Variable independiente de tipo continúa.	Gramos.	ANOVA

6.5 Recolección de Datos

Una vez que se llevaron a cabo los procedimientos experimentales, la información referente a frecuencias y números de células positivas para los marcadores empleados, intensidad media de fluorescencia (IMF) para la expresión de receptor CB1, unidades arbitrarias para la cuantificación de la expresión del receptor CB1, consumo de alimento, agua y la masa corporal, se almaceno en bases de datos para su consecuente análisis estadístico.

6.6 Análisis Estadísticos

Para el análisis de las variables de estudio, se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal Wallis, para la comparación entre grupos y U de Mann Whitney para la comparación de los grupos de experimentales con el grupo control. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos .

6.7 Implicaciones Bioéticas

Este proyecto de investigación se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos del comité de Ética en la Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Estado de México, y con base a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO- 1999: sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Las condiciones de crianza y de reproducción fueron las adecuadas y únicamente se criaron los ratones necesarios para llevar a término los experimentos establecidos.

7. RESULTADOS

7.1 Título del artículo

Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on commercial sweetener intake

7.1.1 Página frontal del manuscrito

Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on commercial sweetener intake

María Aguirre-Fuerte^a, Irazú Contreras^a, José Antonio Estrada^{a}*

^a Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza s/n, Colonia Moderna de la Cruz, CP 50180. Toluca, Estado de México, México.

** Corresponding author: José Antonio Estrada. Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza s/n, Colonia Moderna de la Cruz. C.P. 50180. Toluca, Estado de México, México. Tel. +52(722)217-3552 ext. 218. Email: jaestrada@uaemex.mx*

7.1.2 Carta de envío de artículo

6/11/2018 Gmail - Fw: TICN Submission Confirmation for Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on com...



Maria Aguirre Fuerte <maria.aguirre.fuerte13@gmail.com>

Fw: TICN Submission Confirmation for Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on commercial sweetener intake

1 mensaje

José Antonio Estrada Guadarrama <jaestrada@uaemex.mx>

6 de noviembre de 2018, 13:03

Para: "Maria.aguirre.fuerte13@gmail.com" <Maria.aguirre.fuerte13@gmail.com>

From: em.tin.0.5f1354.7f10ac2c@editorialmanager.com <em.tin.0.5f1354.7f10ac2c@editorialmanager.com> on behalf of Judith A. Gilbride <em@editorialmanager.com>
 Sent: Tuesday, November 6, 2018 08:17
 To: José Antonio Estrada Guadarrama
 Subject: TICN Submission Confirmation for Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on commercial sweetener intake

11/06/2018

Dear José,

Your submission entitled "Alterations in mouse brain endocannabinoid CB1 receptor expression dependent on commercial sweetener intake" has been received by journal <i>Topics in Clinical Nutrition</i>.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://tin.editorialmanager.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for your support of submitting your work to <i>Topics in Clinical Nutrition</i>.

Sincerely,

<i>Topics in Clinical Nutrition</i>

Additionally, you may view the Additional Information questions to obtain the copyright information by clicking here: [Additional Information](#)

3. José Antonio Estrada, PhD

Question: RETAINED RIGHTS: Except for copyright, other proprietary rights related to the Work (e.g., patent or other rights to any process or procedure) shall be retained by the author. To reproduce any text, figures, tables, or illustrations from this Work in future works of their own, the author must obtain written permission from Wolters Kluwer Health, Inc. ("WKH").

ORIGINALITY: Each author warrants that his or her submission to the Work is original, does not infringe upon, violate, or misappropriate any copyright or other intellectual property rights, or any other proprietary right, contract or other right or interest of any third party, and that he or she has full power to enter into this agreement. Neither this Work nor a similar work has been published nor shall be submitted for publication elsewhere while under consideration by this Publication.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=e6f13cca3f&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1616412415625284224&simpl=msg-f%3A161641241562...> 1/5

7.1.3 Abstract

Chronic non-communicable diseases (NCDs) such as obesity and type 2 diabetes mellitus are public health issues worldwide. Non-nutritive sweeteners are commonly used as a therapeutic alternative for these pathologies, as well as in healthy people for aesthetic and health reasons. Although considered safe, recent studies have shown that chronic intake of these compounds may impact health. The endocannabinoid system (ECS) regulates metabolism in various tissues, including the central nervous system. Nutritional alterations related to the development of obesity are known to alter endocannabinoid synthesis, as well as expression of their specific receptor CB1, causing metabolic dysregulation; however, the effects of nutritional interventions to prevent NCDs, such as chronic use of non-nutritive sweeteners, on the endocannabinoid system, are unknown. The objective of this study was to evaluate the effect of frequent intake of non-nutritive sweeteners on the expression of CB1 receptors in murine brains, and in astrocytes in particular, since they participate in the regulation of metabolism in response to neuronal energy requirements, modifying neurotransmitter release in part through the ECS. Adult BALB/c mice were supplemented daily with commercial presentations of sucralose, steviol glycosides or sucrose in their drinking water, for 8 weeks. After treatment, brains were dissected and analyzed for total CB1 expression and CB1 expression in astrocytes. Our results show increased total CB1 expression and enhanced CB1 expression in astrocytes from the sucralose and steviol glycosides groups, compared to the control groups. These changes may be related to alterations in feeding behavior that may be relevant to health.

Key words: Endocannabinoids, CB1, central nervous system, astrocytes, non-nutritive sweeteners.

7.1.4 Introduction

Chronic non-communicable diseases (NCDs) present prevalence rates of up to 60% worldwide, with obesity and type 2 diabetes mellitus being the most common (1,2). As these diseases have been extensively related to consumption of high calorie-content diets, non-nutritive sweeteners are commonly used as therapeutic alternatives for their management and prevention and they are used as well as in the general population for aesthetic and health-related reasons (3–5).

The effects of non-nutritive sweeteners on appetite and energy balance have been tested in both animal models and humans; however, there is no consensus on whether consumption of these additives has a beneficial or detrimental effect on feeding behavior and weight loss (6). Recent studies have shown that human health may be impacted by chronic intake of non-nutritive sweeteners. It has been demonstrated that consumption of these compounds increases the risk of developing metabolic syndrome and associates with risk factors for development of type 2 diabetes mellitus (7), as well as coronary artery disease in women (8), but the mechanisms involved are as yet unknown.

Appetite and energy balance are regulated by central and peripheral signals that interact to modulate nutrient intake. These functions are mainly regulated by the hypothalamus, which obtains information about the nutritional and energy state of the organism through orexigenic and anorexigenic signals (7,8). The endocannabinoid system (ECS) is involved in the regulation of homeostasis, energy metabolism and feeding behavior through its effects on various tissues, including the central nervous system. The ECS consists of two main G protein-coupled receptors, CB1 and CB2, along with their principal endogenous ligands anandamide and 2-arachidonoyl glycerol, and the enzymes involved in their biosynthesis and degradation (9,10). CB1 is expressed at high levels in the brain but it is also found at functionally relevant concentrations in various peripheral tissues, which includes adipose tissue, liver, pancreas, bone and muscle (11,12).

The ECS is an important player in energy metabolism by positively regulating appetite, satiety and energy expenditure through its actions in the CNS (13,14). Astrocytes are the most abundant glial cells in the nervous system and are responsible for the homeostasis of ions, amino acids and energy metabolites necessary for the maintenance of neuronal homeostasis (15). They modulate neuronal functions either directly by secretion of cytokines, growth factors and neurotransmitters, or indirectly by controlling blood-brain barrier permeability in response to the metabolic needs of nervous tissue (16). Furthermore, they are considered the main source of glycogen in the CNS and their turnover rate with neurons is directly coordinated with synaptic activity, regulating neurotransmission (17,18). CB1 receptors are considered to play an important role in the control of feeding behavior and energy expenditure through modulation of astrocyte functions dependent on Ca^{2+} concentrations, which change in response to neurotransmitter and endocannabinoid signaling during synaptic activity (18).

It has been demonstrated that nutritional alterations promote changes in the functions of the endocannabinoid system. For example, hyperactivity of the sympathetic nervous system is related to the development of obesity, and experimental models of high-fat and linoleic acid-rich diets have demonstrated increases in endocannabinoid and CB1 receptor expression in the rostral ventrolateral medulla, a critical brain region regulating the activity of the sympathetic nervous system (19,20). In the same way, caloric restriction has been shown to increase endocannabinoid concentrations in the hypothalamus, the hippocampus and the olfactory bulb, key target tissues for the regulation of energy balance (21). On the other hand, an isocaloric diet rich in fat increases CB1 expression in the hypothalamus, but decreases it in brown adipose tissue (22). This change could be a risk factor for the development of obesity, as a consequence of the imbalance between energy intake and expenditure (23).

Despite these data, the effect of other dietary modifications, such as the use of non-nutritive sweeteners, on the endocannabinoid system, has not been explored.

Non-nutritive sweeteners are known to modify energy availability throughout the organism by decreasing glucose concentrations from diet and recent reports have shown that frequent intake of non-nutritive sweeteners promotes alterations in brain signaling pathways related to the control of appetite in mice (36). As astrocytes maintain the flow of nutritive substances into the central nervous system according to neuronal needs, in addition to modulating synaptic processes through the ECS, an alteration in energy availability could affect nutrient homeostasis in nervous tissue via changes in endocannabinoid receptor expression, affecting neuronal functioning. In this study, we evaluated the effect of frequent intake of commercially available non-nutritive sweeteners on the expression of CB1 receptors in brain tissue and specifically, in murine astrocytes.

7.1.5 Experimental procedures

All procedures were performed complying with national guidelines for animal care in science and with the approval of the Ethics Committee from the authors' institution, protocol number 4320/2017/CI.

Animals and experimental groups

BALB/c mice were bred and raised at the facilities of the authors' institution, under standard conditions, with a regulated temperature of $22\pm 1^\circ\text{C}$ and a 12:12 hours light-dark cycle. Mice were weaned at three weeks of age. At week eight, three study groups, comprised of 10 male and 10 female mice each, were established to begin the sweetener supplementation regime as follows: Sucrose (10% dilution of common sugar, in purified water); Steviol glycosides (0.025% dilution of steviol glycosides in commercially available presentation for human consumption, in purified water) and; Sucralose (0.012% dilution of sucralose in commercially available presentation for human consumption, in purified water). Additionally, a control group (10 male and 10 female mice) was established without sweetener supplementation. Mice were kept at 3 animals per cage and separated by sex. Samples from 6 males and 6 females per group were used for immunofluorescence analysis and the remaining mice (4 males and 4 females per group) were used for analysis of protein expression by western blot. All animals were fed standard rodent chow (Rodent Laboratory Chow, catalog number 5001, LabDiet) and had access to their corresponding beverage *ad libitum*. After the supplementation period, mice were sacrificed by intraperitoneal administration of sodium pentobarbital (6.3 g/100 mL; 50 μL /25 g of body weight) and the brains were dissected and stored at -70°C for further analysis. Water consumption was evaluated daily and weekly weight gain was recorded.

Determination of water and food consumption and weight gain

A daily record of food and water intake was made. The initial amount of food and water provided for each cage was recorded and then measured again 24 h later, at

a scheduled time (12: 00m) throughout the supplementation period. The difference between each measurement was determined and consumption was established. As animals were kept 3 per cage, measured quantities were averaged. Individual animal weight was also recorded, weekly, in order to insure no severe variations in food and water intake were present in individual mice within each cage.

Determination of brain CB1 receptor expression by western blot

Brains were dissected and the tissue was disaggregated using lysis buffer (0.5 M tris, 0.2 M EDTA, 50 mM EGTA, 0,1% 2- mercaptoethanol, 1% IGEPAL, 20 µg/mL Aprotinine, 20 µg/mL Leupeptine, 1mM PMSF, 2mM Na₃VO₄, 50 mM NaF; pH 6.8) at 4°C for 45 minutes, mixing by vortex every 15 minutes and finally, centrifuging at 13,000 rpm for 25 min at 4°C. Supernatants were obtained and total protein contents were quantified by the Bradford method (Bio-Rad), dosed 4:1, aliquoted in sample loading buffer (SLB) and stored at -70°C for further use. 60 µg of protein per sample were loaded on SDS-Polyacrylamide gels for electrophoresis (3 h, 100 mV) and transferred afterwards onto PVDF membranes previously hydrated with 100% methanol (50 min, 60 mV). Membranes containing transferred proteins were blocked in 1% BSA in TBS-Tween 20 (TBS-T) for 2 h at room temperature and incubated with primary antibody for endocannabinoid receptor 1 (Ab2370303, Abcam) in a 1:500 dilution in 5% BSA, overnight at 4°C. After incubation with primary antibody, membranes were washed with TBS-T 3x5 minutes and incubated with a secondary goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to Horseradish peroxidase (HRP, 31460, Thermo- Fisher) at a 1:5,000 dilution for 2 h at room temperature, then washed with TBS-T 3x5 minutes. The reaction was developed with 150 µL diaminobencidine and 30 µL hydrogen peroxide in 10 mL TBS. A loading control was performed using anti-β actin antibody at 1:10,000 dilution (A4700, Sigma Aldrich). Densitometry analysis for protein expression was performed with the ImageJ software (National Institutes of Health). Band density was normalized to actin expression and is reported in arbitrary units (AU).

Immunofluorescence analysis for CB1 expression in astrocytes

Dissected brains were frozen in O.C.T. compound (Fisher Scientific) and stored at -70°C . $5\ \mu\text{m}$ sagittal sections were obtained using a cryostat and were fixed in acetone for 10 minutes at -20°C . After fixation, samples were hydrated in PBS (phosphate buffered saline, pH 7.2) with 0.1% tween 20 (PBS-T) for 5 min and blocked in 5% milk in PBS-T for 2 h, with mild shaking, at room temperature in a wet chamber. After blocking, primary antibodies Alexa Fluor 488-conjugated mouse anti-glia fibrillary acidic protein (1:100) (GFAP, 539892-82, eBioscience) and rabbit anti-cannabinoid receptor 1 (Ab2370303, Abcam) (1:100) were incubated overnight in PBS-T at 4°C . After incubation, slides were washed with PBS-T 3x5 min with mild shaking and incubated with a secondary Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Ab150079, Abcam) (1:100) for CB1 detection, 2 h at 4°C . Following incubation, slides were washed with PBS-T 3x5 min at room temperature and mounted in Vectashield Prolong Diamond antifade mountant with DAPI (H-1500, Thermo-Fisher). Slides were analyzed by fluorescence microscopy using a Nikon Eclipse Ti fluorescence microscope with the NIS-elements AR 4. 50.00 software. To analyze the mean fluorescence intensity of CB1 receptor expression, 1200 cells were analyzed for each group (10 cells per field captured, 10 fields per sample, for a total of 100 cells per sample and 6 male and 6 female samples per group). In addition, the total number of CB1 receptor-positive astrocytes was quantified in each field analyzed.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SD. Comparisons among groups were performed with the Kruskal-Wallis test for non-normally distributed data using GraphPad Prism software (version 7.0). p values <0.05 were considered statistically significant.

7.1.6 Results

Feeding behavior and weight gain in sweetener-supplemented mice

In order to evaluate the changes in feeding behavior and weight gain in the experimental groups, daily consumption of water and food was determined during the supplementation period and the animals' weekly weight gain was recorded. The results show that both male and female mice supplemented with sucrose increased their consumption of water throughout the study period, compared to the control group; however, a significant difference was observed only for females in this group (5.6 ± 0.91 vs. 2.2 ± 0.61 , $p=0.0003$). In the case of males, although water intake was also increased, no significant differences compared to the control group were found (5.2 ± 0.89 vs. 3.6 ± 0.73). Water intake in female mice from the sucralose group also showed a significant increase, compared to the control group (4.7 ± 1.04 vs. 2.2 ± 0.61 , $p=0.0280$), in contrast, water intake in males from the sucralose group was not significantly altered, compared to the control group (4.6 ± 1.15 vs. 3.6 ± 0.73). Water consumption in male and female mice under treatment with steviol glycosides showed no significant differences compared to the control group (4.4 ± 1.29 vs. 3.6 ± 0.73 and 2.4 ± 0.70 vs. 2.2 ± 0.61 , respectively) (Figs. 1A, B).

Regarding food intake, female mice under sucrose supplementation showed no significant decrease in the amount of food ingested during the treatment period, compared to the control group (2.4 ± 0.5 vs. 2.5 ± 0.7). On the other hand, females under supplementation with sucralose or steviol glycosides showed a non-significant increase in food intake (2.9 ± 0.6 and 3.6 ± 0.8 , respectively). Similarly, males under sucrose supplementation showed no significant difference during the treatment period compared to the control group (2.2 ± 0.5 vs. 2.5 ± 0.4), and food intake for males under supplementation with sucralose or steviol glycosides showed a non-significant upward trend throughout the treatment period (3.5 ± 0.7 and 3.4 ± 0.6 , respectively) (Fig. 1C, D).

Regarding weight gain, the results show that both male and female animals maintained progressive weight gain over time in all experimental groups. As expected, both males and females under supplementation with sucrose showed greater weight gain, compared to the control group, however the results showed no significant difference (2.5 ± 0.5 vs. 1.2 ± 0.26 and 2.4 ± 0.30 vs. 1.1 ± 0.37 , $p > 0.9395$ and $p > 0.9999$, respectively); females under supplementation with sucralose or steviol glycosides also showed greater weight gain over the treatment period compared to the control group (2.3 ± 0.58 and 2.4 ± 0.47 vs. 1.16 ± 0.37 , $p > 0.05$, respectively). In the same way, males under supplementation with sucralose or steviol glycosides also showed greater weight gain, compared to the control group (2.7 ± 0.36 and 2.9 ± 0.28 vs. 1.2 ± 0.26 , $p > 0.05$) (Figs. 2A, B).

CB1 receptor expression in the brains of sweetener supplemented mice

In order to evaluate the differences in CB1 receptor expression in mice under supplementation with non-nutritive sweeteners, we determined the presence of CB1 in total protein extracts from whole brain tissue by western blot. Densitometry analysis revealed significant differences in male mice under sucralose and steviol glycosides supplementation, compared to controls (9530 ± 1264 and 8163 ± 3140 vs. 1165 ± 297 , $p < 0.0011$) (Figs. 3A, B). Males under treatment with sucrose showed no significant difference in CB1 receptor expression compared to the control group (3692 ± 1099 vs. 1165 ± 297 , $p = 0.7043$) (Fig. 3A). Similarly, females under treatment with steviol glycosides showed a significant increase in CB1 expression compared to controls (5988 ± 686.1 vs. 785.3 ± 209.5 , $p = 0.0033$) (Fig. 3B). In contrast, female mice under sucrose or sucralose supplementation showed no significant differences (2500 ± 658.6 and 4015 ± 2067 vs. 785.3 ± 209.5 , $p = 0.3566$ and $p = 0.0640$, respectively) (Fig. 3B).

Comparisons by sex show no significant differences among male and female mice under treatment with either sucralose (9530 ± 2067 vs. 4015 ± 1264 , male and female, respectively); steviol glycosides (8163 ± 686.1 vs. 5988 ± 3140) or sucrose (3692 ± 658.6 vs. 2500 ± 1099).

CB1 receptor expression in astrocytes from sweetener supplemented mice

In order to evaluate differences in CB1 receptor expression in astrocytes in mice under non-nutritive sweetener supplementation, we quantified the number of CB1+ astrocytes by immunofluorescence of brain tissue. Additionally, mean fluorescence intensity for CB1+ cells was analyzed for each experimental group.

The results show that males under treatment with sucralose or steviol glycosides had a significant increase in the number of CB1+ astrocytes compared to the control group (6.9 ± 0.5 and 6.8 ± 0.8 vs. 3.6 ± 0.7 cells/group, $p=0.0017$ and $p=0.0018$, respectively) (Figs. 4A, B). Male animals supplemented with sucrose did not show a significant change (5.7 ± 0.9 vs. 3.6 ± 0.7 cells/group) (Fig. 4C). On the other hand, only female mice under treatment with steviol glycosides showed a significantly increased number of CB1+ astrocytes compared to the control group (7.4 ± 0.5 vs. 3.0 ± 0.5 cells/group respectively, $p= 0.0015$) (Fig. 4C). Mice under treatment with sucrose and sucralose showed no significant difference compared to the control group (3.0 ± 0.7 and 4.1 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.5 cells/group, $p>0.999$ and $p=0.2246$ respectively).

Comparisons by sex show that males under treatment with steviol glycosides had no significant difference compared to females under the same treatment; however, males under supplementation with sucralose showed a significant increase compared to females under the same treatment (6.9 ± 0.5 vs. 4.1 ± 0.3 cells/group, $p<0.0466$, respectively) (Fig. 4C). A similar effect was observed for males and females under supplementation with sucrose (5.7 ± 0.9 vs. 3.0 ± 0.7 cells/group, $p<0.0001$, respectively) (Fig. 4C).

Results for mean fluorescence intensity (MFI) show that males under sucrose or sucralose supplementation had a significant increase in MFI for CB1 expression, compared to the control group without supplementation (4631 ± 965.5 , and 6154 ± 1241 vs. 3250 ± 152.5 , $p=0.030$ and $p=0.002$, respectively). In contrast, the males under treatment with steviol glycosides showed no significant difference compared

to the control group (3850 ± 195.4 vs. 3250 ± 152.5 , $p=0.3625$) (Fig. 4B). CB1 receptor MFI was significantly higher in males supplemented with sucralose compared to males supplemented with steviol glycosides (6154 ± 1241 vs. 3850 ± 145.4 , $p<0.0001$) (Fig. 4B). In contrast, females under supplementation with sucralose or steviol glycosides showed significantly increased MFI for CB1 expression, compared to the control group (4437 ± 377 and 4905 ± 857.8 vs. 2962 ± 704.8 , $p= 0.033$ and $p= 0.003$, respectively). Mice under treatment with sucrose showed no significant difference compared to the control group (3321 ± 306.4 vs. 2962 ± 704.8 , $p>0.9999$). The MFI for CB1 was significantly higher in females supplemented with sucralose compared to females supplemented with sucrose (4437 ± 377 vs. 3321 ± 306.4 , $p<0.0001$) (Fig. 4B).

CB1 receptor MFI in males under sucrose supplementation was significantly higher compared to females under the same treatment (4631 ± 965.5 vs. 3321 ± 306.4 , $p <0.0125$). Similarly, males under sucralose supplementation showed a significantly increased CB1 expression compared to females in the same group (6154 ± 1241 vs. 4437 ± 377 , $p<0.0001$) (Fig. 4B). In contrast, females under treatment with steviol glycosides showed a significantly higher CB1 MFI compared to males under the same supplementation (4905 ± 857.8 vs. 3850 ± 145.4 , $p <0.0001$) (Fig. 4B).

7.1.7 Discussion

Non-nutritive sweetener consumption is a common practice to reduce the amount of sugar in the diet. Accumulating evidence has challenged the use of non-nutritive sweeteners as an entirely safe tool for the induction of weight loss and appetite control in people who need to reduce dietary sugar intake and there is evidence (24,25) . In humans, it has been revealed that the consumption of artificial sweeteners increases the risk of developing overweight and obesity (26), in addition in murine models it has been proven that the consumption of saccharin, sucralose and aspartame together with a high-fat diet potentiates glucose intolerance, additionally it has been proven that these metabolic changes could be related to the modification in the microbiota as a consequence of the diet (41).

Studies on the effects of frequent or chronic non-nutritive sweetener consumption on the nervous system have just begun to unravel the physiological mechanisms involved. Previous research in *Drosophila* has demonstrated that sucralose may affect feeding behavior by modifying insulin, catecholamine, neuropeptide Y and AMPK-dependent signaling in the nervous system, increasing appetite and calorie consumption through a pathway involving taste receptors, that signal a lack of correlation between the sweetness of food and its caloric content, activating a compensatory response that alters taste sensitivity and feeding behavior accordingly (30). In turn, it has been shown that the frequent consumption of artificial sweeteners in BALB / c mice modifies pathways related to the regulation of appetite, evidenced by an increase in the phosphorylation of JAK2 and STAT3, associated with a modification in the expression of ObRb, Leptin receptor, hormone implicit in anorexigenic signals (36).

Similarly, research in mice has revealed that CB1 regulates either excitatory or inhibitory inputs to orexigenic neurons in the hypothalamus depending on the lean or obese phenotype of the experimental animals, with these cells receiving mostly excitatory signals through mechanisms involving enhanced endocannabinoid-

mediated inhibition of presynaptic neurons, an effect that appears to be involved in promoting hyperphagia and hormonal imbalances in obese animals and which may be reversed by leptin administration, which is corroborated by evidence demonstrating an inverse correlation between serum concentrations of leptin and endocannabinoids, so that after food intake, increased leptin concentrations reduce the production of endocannabinoids, inhibiting orexigenic neurons and promoting satiety (27,28) .

The results presented herein demonstrate significant increases in CB1 expression in brain tissue of non-nutritive sweetener-supplemented mice, particularly in male animals from the sucralose group, as well as both male and female animals from the steviol glycosides group. There was a significant increase in the consumption of non-caloric sweetener beverages in both females and males, explicitly the females showed higher consumption of drink supplemented with sucralose compared to the control group, however, the males increased this consumption compared with the same. These results correspond to increased weight gain in non-nutritive sweetener-supplemented groups, compared to un-supplemented controls and which, contrary to common expectations, promoted similar weight gains to those observed in the sucrose-supplemented group. Thus, the expression CB1 receptor was significantly modified in males with treatment with sucralose compared to females, however, the increase CB1 receptor expression in astrocytes increased in females and males under treatment with steviol glucosides compared to control, results that resemble the increase in the total expression CB1 receptor in brain tissue. These findings are parallel to those reported in a study conducted in CBA/CA mice, where supplementation with saccharin, cyclamate, acesulfame K and aspartame, non-caloric sweeteners, contributed to weight gain, however, no change was found in the food intake, which could be related to pathways involved in homeostatic processes of energy regulation, however, at the metabolic level, there are no precise data indicating that the intrinsic properties of non-caloric sweeteners with energy modifications (42).

These alterations were also related to modifications in feeding behavior, where the results showed non-significant but evident trends for increased food and water intake in sweetener-supplemented animals, compared to un-supplemented controls. Significant differences were found only for water intake in both the sucrose and sucralose groups, which may be related to the palatability of the drinking solutions used in the experimental setup. In C57BL/6J mice and Sprague-Dawley rats, under choice tests, a preference for beverages with sucralose or acesulfame K (43-44) was evidenced, likewise, it has also been demonstrated that BALB / c mice show robust responses to conditioning of sweet drinks (45).

Interestingly, these differences were observed only in female animals. Therefore, it is possible to suggest that increased CB1 expression in sweetener-supplemented animals may be promoting alterations in feeding behavior, which relate to increased appetite and weight gain in these mice, compared to animals without supplementation.

Increased brain CB1 expression in non-nutritive sweetener-supplemented mice also corresponded with higher numbers of CB1⁺ astrocytes in the same groups, as well as increased mean fluorescence intensity for CB1 receptors, particularly in the sucralose group. As mentioned before, astrocytes are in constant communication with neurons via neurotransmitters and other soluble factors, including endocannabinoids, which are released in response to synaptic activity, exchanging information with neurons to maintain an appropriate balance of excitatory and inhibitory signals to coordinate neuronal homeostasis and functions (29). Increased CB1 expression in astrocytes could be a consequence of the modifications to caloric intake caused in animals under non-nutritive sweetener supplementation; however, since all animals had free access to food as a source of energy, it is not possible to properly ascertain this hypothesis. On the other hand, it has been shown that when the sensory sweetness of food does not match the caloric content during a sustained period, a compensatory response is activated that alters taste sensitivity and feeding behavior accordingly (30). Following this idea, increased

CB1 expression in astrocytes from both male and female mice under treatment with sucralose and steviol glycosides suggests a response to non-nutritive sweetener intake that might also be related to taste, rather than energy content, since sweeteners are known to act on reward pathways in the central nervous system.

Interestingly, there were significant differences between male and female mice from the same experimental group, regarding the observed increase in CB1 expression in the brain, as well as the number of CB1+ astrocytes and means fluorescence intensity for CB1, particularly in the sucralose group. These differences may be a product of hormonal processes that could activate anorexigenic signaling pathways, negatively regulating activation and therefore expression of the CB1 receptor, although it is true, the role of sex hormones on the endocannabinoid system and energy regulation is not clearly defined, however, it is believed that sex hormones, such as estrogen, regulate important genes in the endocannabinoid pathway (46). Alterations in sex-dependent endocannabinoid concentrations in mice with caloric restriction are findings that corroborate our results (24). It is important to highlight that the sex-dependent mechanisms that can be associated with modifications in the endocannabinoid system have not yet been established, despite this, it has been shown that modifications in the diet can alter progesterone plasma concentrations by altering the gene expression of endocannabinoid receptor and the enzymes involved in the synthesis of endocannabinoids (47).

Adequate levels of leptin are essential for proper development of the hypothalamic feeding circuits and their action is inversely related to the activation of the ECS (31). Altered leptin signaling has been associated with excessive activation of the central ECS and contributes to the development of obesity (32). There is evidence demonstrating that frequent consumption of non-nutritive sweeteners may affect signaling pathways implicit in hunger/satiety circuits, as are the signaling pathways JAK2/STAT3, the expression of leptin receptor (ObRb) and negative regulators of

these pathways (SOCS3) (33), and given that in this study, mice under supplementation with steviol glycosides and sucralose showed a greater number of CB1+ astrocytes with an significantly higher mean fluorescence intensity and total CB1 expression in brain, these data suggests that changes in CB1 receptor expression may be due not only to intrinsic endocannabinoid-dependent signaling, but also to signals from peripheral systems implicit in energy homeostasis and since the role of astrocytes in the regulation of food has become important because it is well established that they are the endothelial cells that constitute the blood-brain barrier and keep the periphery in communication with the central nervous system, which involves anorexigenic signals regulated mainly by the leptin and modifications in these pathways due to the consumption of sweeteners (36), modify the feeding behavior and weight gain. Since this equilibrium is possible energetic is given thanks to the coordination between different tissues, ranging from the central nervous structures to the periphery, it could be inferred that the sensory and mechanical systems could be involved and altered by changes in the diet.

It is important to note that the supplementation protocols used in this study implemented commercial presentations for the case of sweeteners without caloric intake, that is how different additives added to the sweetener itself were administered during the supplementation period of the experimental animals and despite the fact that the results behave in a similar way compared to several studies in murine models where they used pure caloric sweetener (32-34,41), the sweeteners own action on the changes in CB1 receptor expression in astrocytes and in the brain could not be fully assured, however, the modifications evidenced without doubt are the consequence of a modification in the diet.

Collectively, the results presented in this study provide evidence showing that frequent dietary supplementation with commercially available non-nutritive sweeteners, even in a relatively short 6-week supplementation period, affects the expression of CB1 receptors from the endocannabinoid system in the brain as a

whole and in astrocytes in particular, with increased expression of CB1 relating to greater food intake and weight gain in supplemented animals. As the functions of the endocannabinoid system relate to the control of appetite and energy balance in the organism, the observed changes may be relevant for the health of living organisms, as indiscriminate consumption of non-nutritive sweeteners is a common practice among human populations. Our study gives rise to new research that opens the understanding to an additional role for astrocytes in energy homeostasis *in vivo*.

7.1.8 References

1. Beaglehole R, Yach D. Globalization and the prevention and control of non-communicable disease: the neglected chronic diseases of adults. *The Lancet Rev.* 2003; 362 (1): 903-08.
2. Unwin N, Alberti K. Chronic non-communicable diseases. *Journal annals of tropical medicine & parasitology.* 2006; 100 (5):455-64.
3. Linder K. Non-nutritive sweetening agents. *Forum Nutr. Basel.* 1980 (3); 29:82-88.
4. Díaz D. Position of the American dietetic association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association.* 2004; 104 (2):255-75.
5. Deepak J, Pulkit C, Aggarwal H. Non nutritive sweeteners - current perspective. *Journal of Romanian society of diabetes nutrition and metabolic diseases.* 2017; 24 (1):57-64.
6. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity?. *The Nutrition society.* 2005; 18 (1):63-76.
7. Swithers S. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2013; 24 (9):431-41.
8. Kiyah J, Lyn M, Linda V, Jacobs D, Popkin B. Dietary patterns matter: diet beverages and cardiometabolic risks in the longitudinal Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2012; 95 (9):909-15.
9. Crespi E, Unkefer M. Development of food intake controls: Neuroendocrine and environmental regulation of food intake during early life. *Hormones and behavior.* 2014; 66 (1):74-85.
10. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2008; 18 (2):158–68.
11. Steven T. The Endocannabinoid System. *Journal of Pharmacotherapy.* 2006; 26 (12): 218-21.

12. Yuhki K, Kashiwagi H, Kojima F, Ushikubi F. Endocannabinoid system. *Journal of Clinical Medicine Japanese*. 2011; 3: 331–5.
13. Bisogno T, Ligresti A, Marzo V. The endocannabinoid signalling system: Biochemical aspects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005; 81 (2):224–38.
14. Marsicano G, Kuner R. Cannabinoids and the Brain. *The Scientific World Journal*. 2008; 2(1):632-48.
15. Bajic D, Monory K, Conrad A, Maul C, Schmid RM, et al. Cannabinoid Receptor Type 1 in the Brain Regulates the Affective Component of Visceral Pain in Mice. *Neuroscience*. 2018; 384 (1):397–405.
16. Frider E. The endocannabinoid-CB receptor system: Importance for development and in pediatric disease. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004; 25 (1): 24–30.
17. Cota D. CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes Metabolism Res Rev*. 2007; 23 (7):507–17.
18. Sofroniew M, Vinters H. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010; 119 (4):7–35.
19. Frankowski H, Gu Y-H, Heo J, Milner R, Zoppo G. Astrocytes. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*. 2012; 32 (5): 122-34.
20. Reguero A. Arquitectura subcelular del sistema endocannabinoide en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratón. *Journal Vasco Neurofisiologia*. 2014; 1 (1): 1-134.
21. Navarrete M, Díez A, Araque A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions Royal Soc Lond B Biological Sci*. 2014; 369 (1654): 1-7.
22. Blazquez C. Cetogénesis en astrocitos: caracterización, regulación y posible papel citoprotector. *Dialnet*. 2001; 1:1-6.
23. Li G-QQ, Wang Z, Zhao T, Dai S-XX, Liu J-MM, et al. Role of cannabinoid receptor type 1 in rostral ventrolateral medulla in high-fat diet-induced hypertension in rats. *J Hypertens*. 2018; 36 (4):801–8.

24. Ramírez M, Vázquez M, Lomazzo E, Hofmann C, Blanco R, et al. A moderate diet restriction during pregnancy alters the levels of endocannabinoids and endocannabinoid-related lipids in the hypothalamus, hippocampus and olfactory bulb of rat offspring in a sex-specific manner. *Plos one*. 2017; 23 (1): 1-20.
25. Kim J, Carlson M, Kuchel G, Newman J, Watkins B. Dietary DHA reduces downstream endocannabinoid and inflammatory gene expression and epididymal fat mass while improving aspects of glucose use in muscle in C57BL/6J mice. *Int J Obes (Lond)*. 2016; 40(1):129–37.
26. Burgio E, Lopomo A, Migliore L. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. *Molecular Biology Reports*. 2015; 42 (4):799–818.
27. Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(8):1894–900.
28. Feijó F, Ballard C, Foletto K, Batista B, Neves A, Ribeiro M, et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 2013;60(1):203–7.
29. Swithers S, Martin A, Davidson T. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & Behavior*. 2010;100 (1):55–62.
30. Wang Q-P, Lin Y, Zhang L, Wilson Y, Oyston L, Cotterell J, et al. Sucralose Promotes Food Intake through NPY and a Neuronal Fasting Response. *Cell Metabolism*. 2016; 24(1):75–90.
31. Cristino L, Busetto G, Imperatore R, Ferrandino I, Palomba L, Silvestri C, et al. Obesity-driven synaptic remodeling affects endocannabinoid control of orexinergic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(24):E2229–38.
32. Yang Q. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience 2010*. *Yale J Biol Med*. 2010; 83(2):101–8.
33. Duarte B, Ginez I, Reboredo T, Ruiz J, Galicia S, et al. Regulación de la ingesta de alimento: una aproximación al sistema endocannabinoide. *Dialnet*. 2015; 61 (1):1-10.

34. Rogers PJ, Carlyle JA, Hill AJ, Blundell JE. Uncoupling sweet taste and calories: comparison of the effects of glucose and three intense sweeteners on hunger and food intake. *Physiol Behav.* 1988;43(5):547–52.
35. Nicholson J, Azim S, Rebecchi MJ, Galbavy W, Feng T, Reinsel R, et al. Leptin levels are negatively correlated with 2-arachidonoylglycerol in the cerebrospinal fluid of patients with osteoarthritis. *PLoS ONE.* 2015 ;10(4):e0123132.
36. Barrios-Correa AA, Estrada JAA, Martel C, Olivier M, López-Santiago R, Contreras I. Chronic Intake of Commercial Sweeteners Induces Changes in Feeding Behavior and Signaling Pathways Related to the Control of Appetite in BALB/c Mice. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:3628121.
37. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013;17(4):475–90.
38. Prenderville JA, Kelly ÁMM, Downer EJ. The role of cannabinoids in adult neurogenesis. *Br J Pharmacol.* 2015;172(16):3950–63.
39. De Cosmi V, Scaglioni S, Agostoni C. Early Taste Experiences and Later Food Choices. *Nutrients.* 2017;9(2):E107.
40. Swithers S, Davidson T. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behavioral Neuroscience.* 2008; 122(1):161-73.
41. Polyák Ę, Gombos K, Hajnal B, Bonyár-Müller K, Szabó S, Gubicskó-Kisbenedek A, Marton K, Ember I. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiologica Hungarica,* 2010;97 (4):401–407.
42. Suez J, Korem T, Zeevi D. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature,* 2014; 514 (7521): 181-186.
43. Sclafani A, Ackroff K. Advantame Sweetener Preference in C57BL/6J Mice and Sprague-Dawley Rats. *Chemical Senses,* 2015; 40(3): 181–186.
44. Alexander A, Bachmanov, Michael G, Tordoff, Gary K. Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem Senses,* 2001; 26(7): 905–913.
45. Kraft T, Huang D, Lolier M, Warshaw D, LaMagna S, Natanova E, Bodnar, R. J. BALB/c and SWR inbred mice differ in post-oral fructose appetite as revealed

by sugar versus non-nutritive sweetener tests. *Physiology & Behavior*, 2016; 153: 64–69.

46. Drehmer M, Muniz Y, Marrero A, Löfgren. Gene Expression of ABHD6, a Key Factor in the Endocannabinoid System, Can Be Modulated by Female Hormones in Human Immune Cells. *Biochemical Genetics*. 2018. Epub ahead of print.

47. Abolghasemi A, Dirandeh E, Ansari pirsarae Z., Shohreh B. Dietary conjugated linoleic acid supplementation alters the expression of genes involved in the endocannabinoid system in the bovine endometrium and increases plasma progesterone concentrations. *Theriogenology*, 2016; 86(6): 1453–145.

7.1.9 Figure and Legends

Figure 1. Feeding behavior in sweetener-supplemented mice. Average weekly intake of water (**A** and **B**) and food (**C** and **D**) in male and female mice, respectively, from all experimental groups. n=6 females and 6 males per group. Data is expressed as mean \pm SD. *p<0.05: sucrose and sucralose compared to control group; **p<0.05: sucrose, sucralose and S. glycosides compared to control group; ***p<0.05: sucralose and S. glycosides compared to control group; +p<0.05 sucrose and S. glycosides compared to control group; ++p<0.05: sucrose compared to control group; +++p<0.05: S. glycosides compared to control group.

Figure 2. Weight gain in sweetener-supplemented mice. Mean values for body weight gain for male (**A**) and female (**B**) animals. n=6 females and 6 males per group. Data is expressed as mean \pm SD. *p<0.05: sucrose, sucralose and S. glycosides compared to control group; **p<0.05: sucrose and S. glycosides compared to control group; +p<0.05: sucrose and sucralose compared to control group.

Figure 3. CB1 receptor expression in brain tissue sections of sweetener-supplemented mice. Western-blot analysis of CB1 receptor expression in male (**A**) and female (**B**) mice. β -actin was used as a loading control. n=4 males and 4 females per group. One representative experiment of four is shown. **C**) and **D**) Densitometry analysis for CB1 expression, normalized to β -actin. Data is expressed as mean \pm SD. Arbitrary units. *p<0.05 compared to control group. S.G. (steviol glycosides).

Figure 4. CB1 receptor expression in the brain of sweetener-supplemented mice. **A**) 5 μ m sagittal brain slices from male and female mice were stained for GFAP and CB1, counterstained for DAPI and analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar=10 μ m. **B**) Mean fluorescence intensity (MFI) for CB1 in 100 cells analyzed per mice, per group. **C**) Mean number of CB1⁺ astrocytes per field

analyzed. n=6 male and 6 female mice per group. Data is expressed as mean \pm SD. *p<0.05 compared to control group; **p<0.05: male compared to female. S.G. (steviol glycosides).

Figure 1

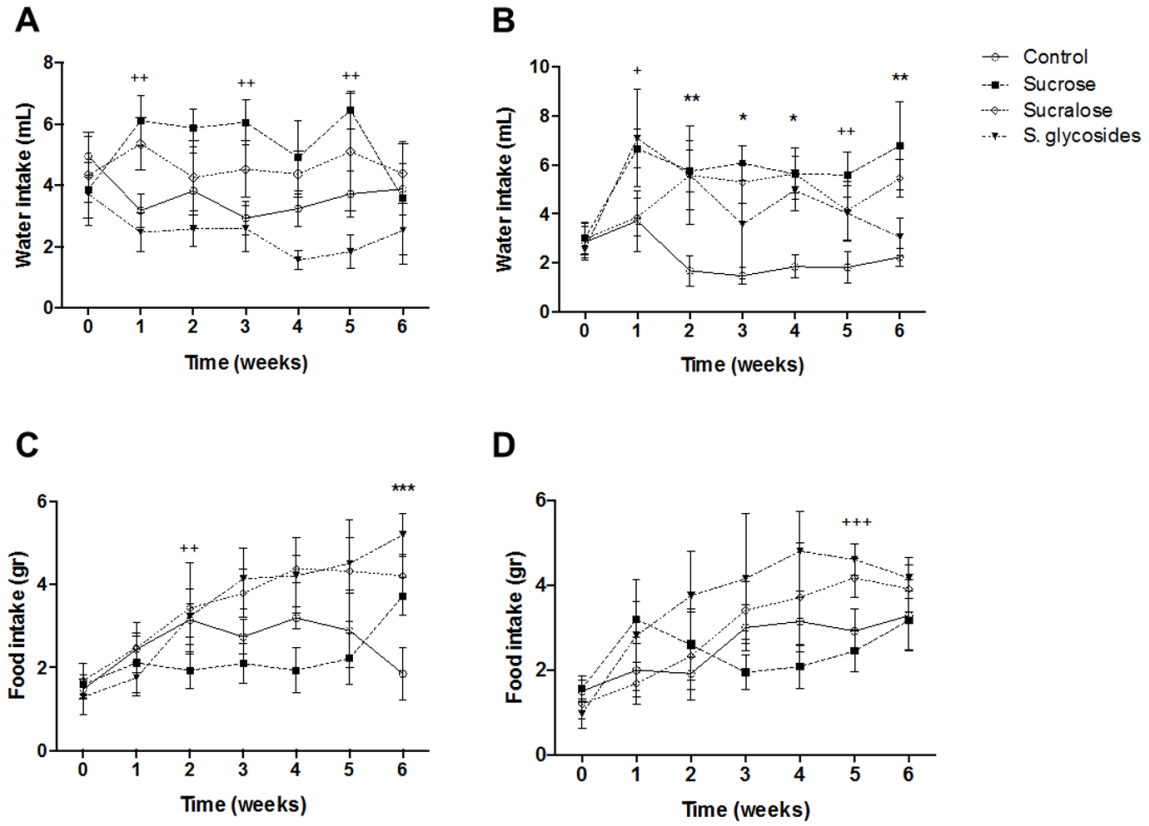


Figure 2

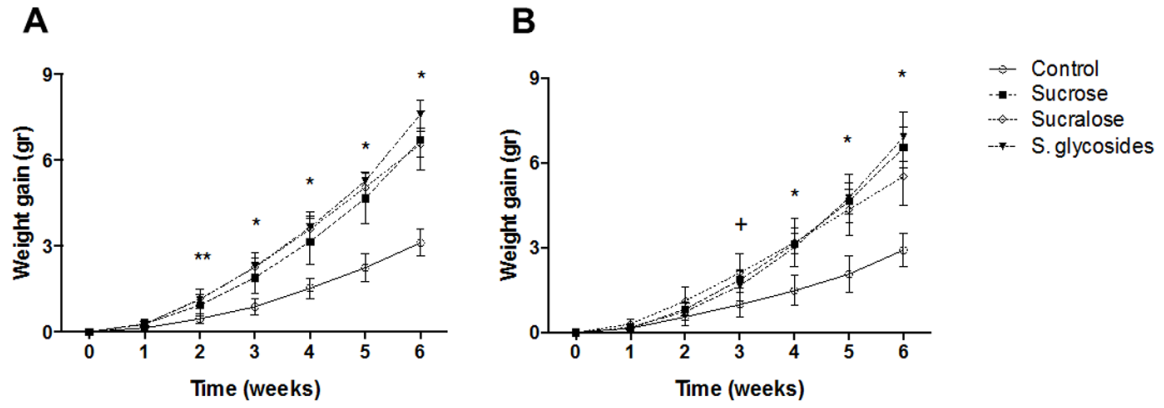


Figure 3

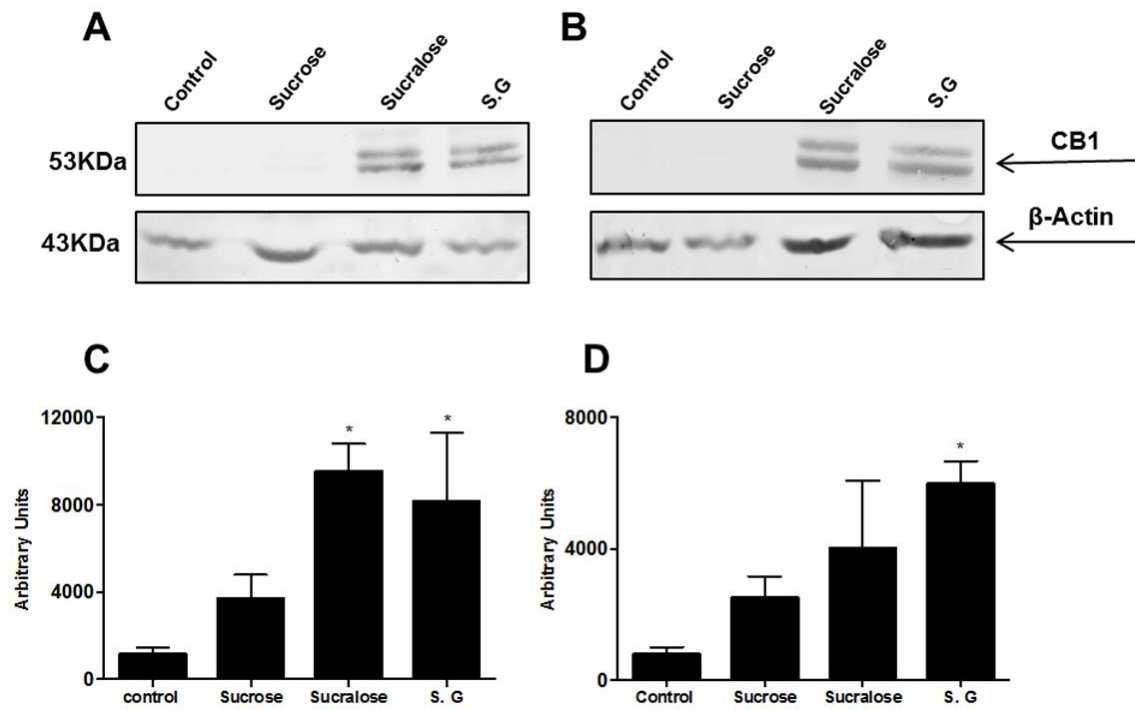
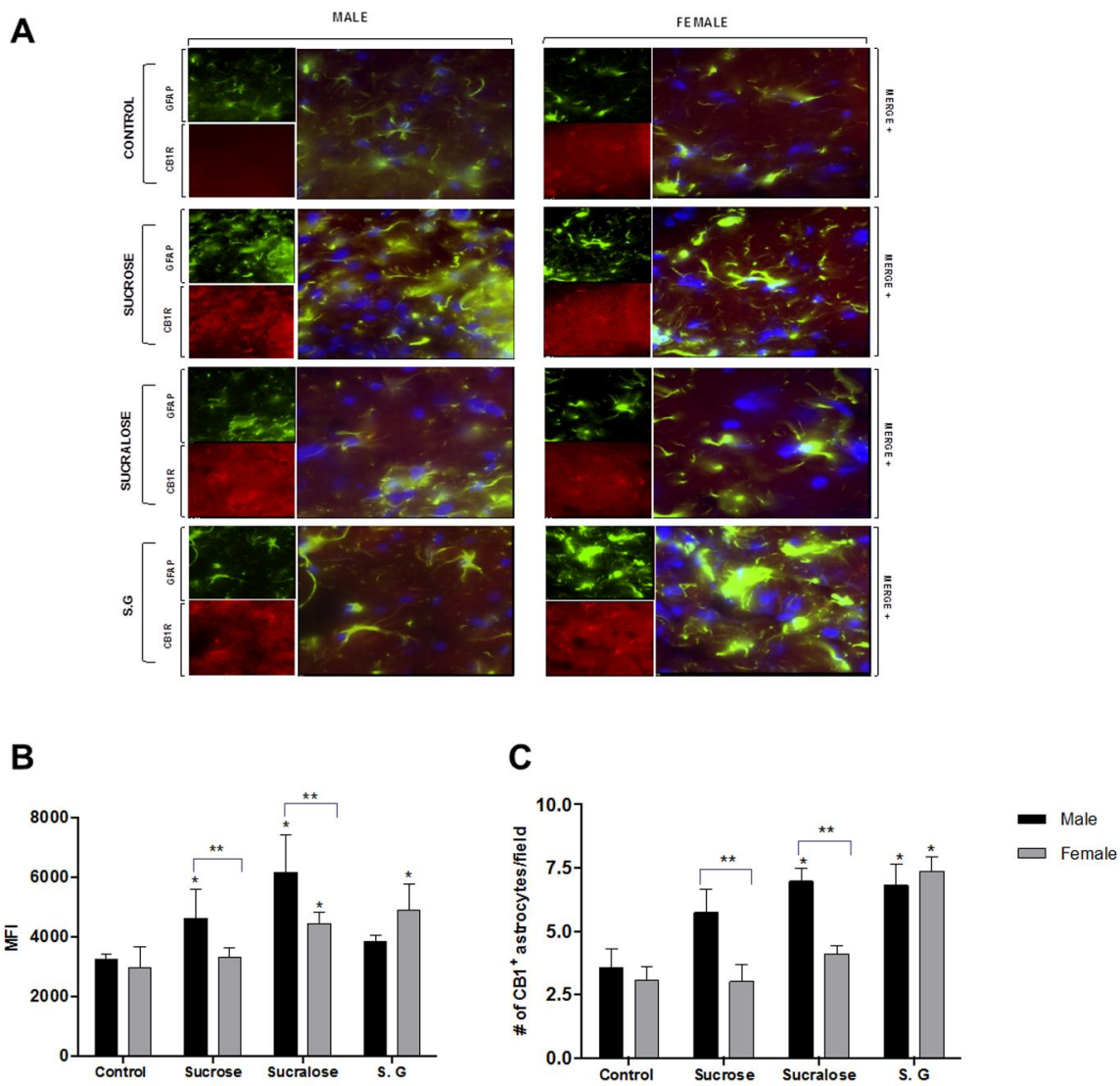


Figure 4



8. CONCLUSIONES GENERALES

8.1 Conclusiones

- La expresión del receptor CB1 fue mayor en los machos bajo la suplementación con sucralosa comparada con el control, a su vez, la ganancia de peso fue mayor comparada con el grupo control. Por otro lado, la señal del receptor CB1 para las hembras fue mayor en el grupo suplementado con glucósidos de esteviol; del mismo modo, se observa que la ganancia de peso fue mayor comparada con el grupo control a lo largo del periodo de suplementación.
- Aproximadamente el 40% de los astrocitos en las muestras del grupo control y sacarosa expresan el receptor CB1, el 50 % para el grupo suplementado con sucralosa y el 60 % para los grupos bajo tratamiento con glucósidos de esteviol.
- Estos datos permiten suponer que la frecuencia en el consumo de edulcorantes modifica la expresión del receptor en astrocitos, lo cual podría tener un efecto negativo en el comportamiento alimenticio alterando vías de señalización orexigénicas y anorexigénicas.

8.2 Limitantes

Dado que el uso de los edulcorantes no fue netamente puro no se puede determinar a ciencia cierta el efecto directo de los mismo a nivel del sistema nervioso central, sin embargo, si se puede aseverar que hubo cambios en el mismo.

8.3 Recomendaciones

La posibilidad de evaluar el efecto de los edulcorantes a nivel clínico en el sistema nervioso central podría correlacionarse con estudios previos. Se recomendaría usar técnicas aplicadas al reconocimiento de marcadores celulares en tejido vivo.

9. REFERENCIAS

1. Córdova J, Barriguete J, Lara A, Barquera S, Rosas M, et al. Chronic non-communicable diseases in Mexico: epidemiologic synopsis and integral prevention. *Journal Salud publica Mexico*. 2008; 50:419-427.
2. Mannucci E. Principles of Diabetes Mellitus. *Journal Medical News & Perspectives*. 2010; 1:117-127.
3. Reynolds K, Jiang H. Epidemiology of the Metabolic Syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2005; 330:273-279.
4. Blackburn H. Nutritional and metabolic bases of cardiovascular disease. *Journal nutrition, metabolic & cardiovascular diseases*. 2012; 22:160-161.
5. Chockalingam A. Nutritional and Metabolic Bases of Cardiovascular disease. *Journal circulation*. 2005; 113:898-918.
6. Romero M, Shamah T, Cuevas L, Méndez I, Gaona E, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio camino 2016. Instituto Nacional de Salud Publica. 2016; 59:1-120.
7. Aguilar V, García L. Screening of metabolic syndrome in the perimenopause. *Ginecología y obstetricia de México*. 2009; 77:123-127.
8. Giese J. Sweeteners: Alternatives and bulking agents. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1999; 1:1-98.
9. Schiffman S, Gatlin C. Sweeteners: State of knowledge review. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993; 17:313-345.
10. Saito M, Hori Y, Nakajima K. Artificial Sweeteners and Glucose Metabolism: A Review of the Literature Published Since 2000. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi Rev*. 2013;1:69–75.
11. Stellman S, Garfinkel L. Artificial sweetener use and one-year weight change among women. *Preventive Medicine*. 1986;15:195–202.
12. Roberts J. The Paradox of Artificial Sweeteners in Managing Obesity. *Current Gastroenterology Reports*. 2015; 17:423-428.

13. Porikos K, Koopmans H. The effect of non-nutritive sweeteners on body weight in rats. *Appetite rev.* 1988; 11:12-15.
14. Blundell J, Green S. Effect of sucrose and sweeteners on appetite and energy intake. *journal of the International Association for the Study of Obesity.* 1988; 20:12-17.
15. Morris J. Sweetening agents from natural sources. *Lloydia rev.* 1976; 39:25-38.
16. Rojan M, Howard T. Sweeteners. *Food additives rev.* 2016; 12:13-20.
17. Riobó S, Sierra P, Soldo J. Low and no calorie sweeteners (LNCS); myths and realities. *Nutrition Hosp.* 2014; 30:49-55.
18. Sławomir B, Wiktoria R. Sugars as a metabolic regulator of storage protein mobilization in germinating seeds of yellow lupine (*Lupinus luteus L.*). *Acta Physiologiae Plantarum.* 2002; 24:425-434.
19. Birch G, Dziedzic S, Shallenberger R, Lindley M. Structural functions of the sweet pharmacophore. *Journal of pharmaceutical sciences.* 1981; 70: 277-280.
20. Búzas G. Fructose and fructose intolerance. *Orvosi hetilap rev.* 2016; 12:1708-1716.
21. Agüero S, Dávila J, Escobar M, Rojas D, Costa J. Noncaloric Sweeteners in Children: A Controversial Theme. *BioMed Research International.* 2018; 2018: 407-503.
22. Goyal S, Samsher M, Goyal R. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2009; 61:1-10.
23. Savita S, Sheela K, Sunanda S, Shankar A, Ramakrishna P, et al. Health Implications of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Human Ecology.* 2017; 15:191-194.
24. Momtazi A, Seyed E, Abdollahi E, Sahebkar B, Amirhossein J. A Review on the Pharmacology and Toxicology of Steviol Glycosides Extracted from *Stevia rebaudiana*. *Current pharmaceutical design.* 2016; 23: 1616-1622.
25. Patel R, Sarma R, Grimsley E. Popular Sweetner Sucralose as a Migraine Trigger. *Headache: The Journal of Head and Face Pain.* 2006; 46:1303-1304.
26. Ma J, Belton M, Wishart J, Young R, Blackshaw L, et al. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy

subjects. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1009; 296:735-739.

27. Fernstrom J, Navia J. Workshop Summary. *J Nutrition*. 2012;142:1170-1172.

28. Candela C, Palma S. A critical, updated overview of the role of sugar in our diet. *Nutricion Hospitalaria*. 2013; 28:1-4.

29. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity?. *Nutr Res Rev*. 2005; 18:63-76.

30. Schwitzer T, Schwan R, Angioi K, Giersch A, Laprevote V. The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications. *Neural Plast*. 2016; 2016:1-10.

31. Feijó F, Ballard C, Foletto K, Batista B, Neves A, et al. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 2013; 60:203-207.

32. Goyal, Samsher, Goyal. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*. Taylor & Francis; 2009; 61:1–10.

33. Stephen D, Corby K, Hongmei H, Coulona S, Cefalu W, et al. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010; 55:37-43.

34. Richard J, Mark S, Sautin Y, Nakagawa T, Feig D, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2007; 86:899-906.

35. Martos G, Barrios V, Argente J. Mecanismos reguladores del metabolismo energético. *An Pediatr*. 2006; 64:53–58.

36. Maldonado R. Sistema endocannabinoide: nuevas perspectivas en el tratamiento global de los factores de riesgo cardiometabólico. *Med Clin rev*. 2008;130:615-622.

37. Garcia A, Gomez E, Bellocchio L, Marsicano G. Cannabinoid receptor type-1: breaking the dogmas. *Research rev*. 2016; 1:1-9.

38. Hanuš L, Abu-Lafi S, Fride E, Breuer A, Vogel Z, et al. 2-Arachidonoyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. *PNAS rev.* 2001; 98:3662-3665.
39. Izzo A, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther.* 2010;126:21–38.
40. Leggett J, Aspley S, Beckett S, D'Antona A, Kendall D, et al. Oleamide is a selective endogenous agonist of rat and human CB1 cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol.* 2004;141:253–62.
41. Lu H, Mackie K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol Psychiatry.* 2016;79:516–25.
42. Ferreira T, Bastos C, Pereira G, Moreira F, Massensini A. A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice. *Hippocampus.* 2014 ; 24:79–88.
43. Walter L, Stella N. Endothelin-1 increases 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) production in astrocytes. *Glia.* 2003; 44:85–90.
44. Xing-Hua J, Yasuo O, Morishita J, Tsuboi J, Tonai T, et al. Discovery and Characterization of a Ca²⁺-independent Phosphatidylethanolamine N-Acyltransferase Generating the Anandamide Precursor and Its Congeners. *J Biol Chem.* 2007; 282:3614–23.
45. Mechoulam R, Hanus L. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 2000; 108:1–13.
46. Oudin M, Hobbs C, Doherty P. DAGL-dependent endocannabinoid signalling: roles in axonal pathfinding, synaptic plasticity and adult neurogenesis. *European Journal of Neuroscience.* 2011;1634–46.
47. Basavarajappa B. Critical enzymes involved in endocannabinoid metabolism. *Protein Peptide Lett.* 2007;14:237–46.
48. Sastre C. Estudio neuropatológico y funcional del sistema endocannabinoide glial en procesos neuroinflamatorios. *Complutense rev.* 2010; 1:1-134.
49. Pertwee R. Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. *Life Sciences.* 1999; 1:597–605.

50. Herkenham M, Lynn A, Johnson M, Melvin L, Costa B, et al. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1991; 11:563–583.
51. Russo P, Strazzullo P, Cappuccio F, Tregouet D, Lauria F, et al. Genetic Variations at the Endocannabinoid Type 1 Receptor Gene (CNR1) Are Associated with Obesity Phenotypes in Men. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2007; 92:2382–6.
52. DiPatrizio N, Astarita G, Schwartz G, Li X, Piomelli D. Endocannabinoid signal in the gut controls dietary fat intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 11:12904–12908.
53. Reguero A. Arquitectura subcelular del sistema endocannabinoide en el núcleo ventromedial del hipotálamo de ratón. *U. Pais Vasco*. 2014; 1: 1-134.
54. Nogueiras R, Rohner F, Woods S, Tschöp M. The endocannabinoid system and the control of glucose homeostasis. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20:147–151.
55. Díaz I, Ruiz L. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2005; 5:619–30.
56. Perry B, Wang Y. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. *Nutrition Diabetes*. 2012; 2:26-30.
57. Williams G, Bing C, Cai X, Harrold J, King P, et al. The hypothalamus and the control of energy homeostasis Different circuits, different purposes. *Physiology & Behavior*. 2001; 74:683–701.
58. Ravinet C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrié P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004; 28:640–8.
59. Blüher M, Engeli S, Klöting N, Berndt J, Fasshauer M, et al. Dysregulation of the Peripheral and Adipose Tissue Endocannabinoid System in Human Abdominal Obesity. *Nestle Nutr Works Se*. 2006; 55:3053–3060.
60. Sofroniew M, Vinters H. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 2010; 119:7–35.
61. Chen Y, Swanson R. Astrocytes and Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2002; 23:137–149.

62. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci.* 2009; 32:421–431.
63. Jaramillo J. Metabolismo cerebral. *Rev Mex Anest.* 2013; 36:183-185.
64. Blazquez C. Cetogénesis en astrocitos: caracterización, regulación y posible papel citoprotector. *Dialnet.* 2001; 1:1-6.
65. Bittar P, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti P. Selective Distribution of Lactate Dehydrogenase Isoenzymes in Neurons and Astrocytes of Human Brain. *J Cereb Blood Flow Metabolism.* 1996;16:1079–1089.
66. Gómez M, Fernandez M, Martínez R, Mederos S, Hernández A, et al. Neuron-astrocyte signaling is preserved in the aging brain. *Glia.* 2017; 65:569–580.
67. Navarrete M, Díez A, Araque A. Astrocytes in endocannabinoid signalling. *Philosophical Transactions Royal Soc.* 2014; 369:678-688.
68. Córdova J, Barriguete J, Lara A, Barquera S, Rosas M, et al. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud publica de Mexico.* 2008; 50:419-427.
69. Alveim A, Malde M, Osei-Hyiaman D, Lin Y, Pawlosky R, et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obes Silver Spring Md.* 2012; 20:1984–1994.
70. Barquera C, Campos I, Rojas R, Rivera J. Obesidad en México: epidemiología y políticas de salud para su control y prevención. *Gac Med Mex.* 2010; 146:397-407.
71. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss C, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014; 514:181–186.
72. Gotteland M. El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo-2. *Rev. chil. endocrinol. Diabetes.* 2013; 6: 134-140.
73. Valenzuela C, Cruz G. Sistema endocanabinoide y tratamiento de la obesidad: perspectivas farmacológicas. *Soc farm Chile.* 2014; 7:26-32.

10. ANEXOS

Anexo 1. Soluciones amortiguadoras y otras soluciones.

EXTRACCION DE PROTEINAS

Solución amortiguadora de lisis:

10 mL de Tris 0.5 M pH 6.8

50 μ L de EDTA 0.2 M pH 8.0

200 μ L de EGTA 50 mM pH 7.9

102 μ L de β -mercaptoetanol

1 mL de IGEPAL

Completar a 100 mL de agua destilada, guardar la solución en un frasco ámbar o envuelto en papel aluminio a 4°C. La solución es estable por un mes aproximadamente si se mantiene en condiciones adecuadas. Completar con inhibidores de proteasas al momento de usar.

Inhibidores de proteasas:

20 μ L/mL de IP50X

20 μ L/mL de PMSF

20 μ L/mL de Na_3VO_4

100 μ L/mL de NaF

CUANTIFICACION Y DOSIFICACION DE PROTEINAS

Estándares de BSA:

Concentración (mg/ml)	Albumina (2mg/mL)	Agua destilada
0.1	50 μ L	950 μ L
0.2	100 μ L	900 μ L
0.4	200 μ L	800 μ L
0.6	300 μ L	700 μ L
0.8	400 μ L	600 μ L

1.0	500 μ L	500 μ L
1.2	600 μ L	400 μ L

Simple loading buffer 4X (SLB):

3.8 mL de agua destilada

1 mL de tris 0.5 M pH 6.8

0.8 mL glicerol

0.4 mL de azul bromofenol

1.6 mL de SDS 10%

Alicuotar 950 μ L de la mezcla en tubos de 1.5 mL y guardarlos a -20°C . Antes de su uso, completar con 50 μ L por tubo de β -mercaptoetanol. El tubo con mercaptoetanol se almacena a 4°C .

PREPARACION DE GELES DE ACRILAMIDA

Acrilamida/Bis 30%, 2.67%

146g de Acrilamida

4g de N'N metilene-bis acrilamida

Disolver en 300 mL de agua, cuando esté disuelta completar a 500 mL y filtrar con gasa. Guardar a 4°C en un frasco ámbar o frasco envuelto en papel aluminio.

Gel corrimiento 10% (running gel)

4.8 mL de agua destilada.

2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8

100 μ L de APS 10%

25 μ L de TEMED

Gel de apilamiento (Stacking gel) 4%

6.1 mL de agua destilada

2.5 mL de Tris 0.5 M pH 6.8

100 μ L de SDS 10%

1.33 mL de acrilamida/bis 30% 2.67

100 μ L de APS 10%

25 μ L de TEMED

Solución amortiguadora de corrida (running buffer) 5X:

15g de Tris base

72g de glicina

Disolver en 700 mL de agua destilada y completar a 1L. filtrar con gasa.

Almacenar a temperatura ambiente.

TRANSFERENCIA DE PROTEINAS A MEMBRANA PVDF

Solución amortiguadora de transferencia:

48 mM Tris

39 mM glicina

20% metanol

0.04% SDS

Tris 5.81g, glicina 2.93 g

TBS 10X:

80 g de NaCl

24.2 g de Tris base

Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.6 con HCl y ajustar volumen final a 1L.

TBS 1X- tween20:

100 mL de TBS 10X

1 mL de tween 20 (concentración final 0.01%)

899 mL de agua destilada