Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios Avanzados
Maestría en Ciencias de la Salud

Expresión de los receptores de endocanabinoides CB1 y CB2 en leucocitos de ratones suplementados con edulcorantes comerciales

TESIS

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

Presenta:
L.N. Brenda Montserrat González Dorasco

Comité de Tutores:
Tutor Académico: José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D.
Tutor Interno: Irazú Contreras García, Ph.D.
Tutor Externo: D.C.S. Esmeralda Morales González

Toluca, Estado de México 2019

ÍNDICE

Resumen 4

Abstract 5

1. Antecedentes 6

1.1 El Sistema endocanabinoide 6

1.1.1 Receptores canabinoides 7

1.1.2 Receptor CB1 8

1.1.3 Receptor CB2 8

1.2 Regulación de la homeostasis por los endocanabinoides 10

1.2.1 El sistema endocanabinoide y el sistema inmunológico 10

1.2.2 El sistema endocanabinoide y las modificaciones dietéticas 12

1.3 Edulcorantes 14

1.3.1 Clasificación de los edulcorantes 14

1.3.2 Sacarosa 16

1.3.3 Glucósidos de esteviol 16

1.3.4 Sucralosa 17

1.4 Edulcorantes y sistema inmunológico 17

2. Planteamiento del problema 19

3. Hipótesis 21

4. Objetivos 22

5. Justificación 23

6. Material y método 24

6.1 Diseño de estudio 24

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación 24

6.3 Variables de estudio 25

6.3.1 Operacionalización de las variables 26

6.4 Procedimientos 27

6.4.1 Suplementación con edulcorantes 27

6.4.2 Extracción de bazo y timo 28

6.4.3 Preparación de muestras para cortes histológicos 28

6.4.4 Inmunofluorescencia 28

6.5 Recolección de datos 30

6.6 Análisis estadístico 30

6.7 Implicaciones Bioéticas 30

7. Resultados 32

7.1 Título del artículo 32

7.1.1 Página frontal del manuscrito 33

7.1.2 Carta de envío del artículo 34

7.1.3 Abstract 35

7.1.4 Introduction 36

7.1.5 Materials and methods 38

7.1.6 Results 39

7.1.7 Discussion 41

7.1.8 Compliance with ethical standards 43

7.1.9 Conflict of interests 44

7.1.10 References 44

7.1.11 Tables 47

7.1.12 Figures and legends 48

8. Resultados adicionales 51

8.1 Peso 51

8.2 Consumo de agua y alimento 51

8.3 Linfocitos T $CD3^+$ positivos para los receptores CB1 y CB2 55

9. Conclusiones generales 58

9.1 Conclusiones 58

9.2 Limitaciones 59

10. Referencias 60

11. Anexos 65

11.1 Anexo 1. Carta de aceptación del proyecto de investigación por el comité de bioética 65

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad ocasionados por consumo excesivo de alimentos con alto contenido energético es uno de los principales problemas de salud que afectan a la sociedad actualmente. Estas patologías están ligadas a alteraciones del sistema inmunológico que inducen inflamación crónica de bajo grado, que a su vez promueve alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina y el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles. Una consecuencia de la inflamación crónica es la liberación de moléculas de señalización que inhiben los efectos negativos de la inflamación y regresan al organismo a la homeostasis. Entre ellas, la señalización dependiente de endocanabinoides es esencial para la regulación del metabolismo energético y el funcionamiento del sistema inmunológico, principalmente por la señalización a través de los receptores específicos para endocanabinoides CB1 y CB2. Los receptores CB se localizan en múltiples tipos de células y tejidos, incluyendo el cerebro y los órganos linfoides primarios y secundarios. En años recientes, ha habido un interés mayor en analizar las consecuencias de las modificaciones dietéticas sobre el sistema inmunológico, debido a su papel como el principal sistema de defensa del organismo. Igualmente, ha habido interés en determinar la utilidad de las modificaciones nutricionales para modular funciones fisiológicas relevantes, incluyendo la producción de endocanabinoides y su señalización en diversos tejidos. El objetivo de este estudio fue analizar las diferencias en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en el bazo y timo de ratones adultos BALB/c, machos y hembras, suplementados con edulcorantes nutritivos y no nutritivos durante 6 semanas. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de receptores CB1 en el bazo de ratones hembras suplementados con sucralosa, mientras que los ratones machos del mismo grupo muestran una disminución en la expresión de este receptor, comparados con controles sin suplementación. En contraste, la expresión de CB2 se incrementó en ratones machos suplementados con sacarosa, pero no en las hembras. La expresión de CB1 en el timo mostró un descenso significativo entre los grupos de sucralosa y glucósidos de esteviol en machos, pero no se observaron diferencias en las hembras. Finalmente, la expresión de CB2 en el timo fue más variable, con la sacarosa y sucralosa causando una disminución en la expresión de CB2 en machos y la sacarosa incrementando su expresión en hembras, comparados con los controles. Nuestros resultados muestran que el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos tiene efectos diferenciales dependientes del sexo sobre la expresión de los receptores CB1 y CB2 en el bazo y timo, lo que puede implicar alteraciones en las funciones del sistema inmunológico.

ABSTRACT

Overweight and obesity caused by excessive consumption of high-energy content food is one of the main health problems presently afflicting society. These pathologies are linked to dysregulation of the immune system, leading to chronic low-grade inflammation, which promotes in turn metabolic alterations like insulin resistance and development of chronic non-transmissible disease. A consequence of chronic inflammation is the release of different signaling molecules that counteract the negative effects of inflammation and return the organism to homeostasis. Among these, endocannabinoid-dependent signaling is essential for the regulation of energy metabolism and immune system functions mainly by signaling through the endocannabinoid-specific receptors CB1 and CB2. CB receptors are located in multiple cell types and tissues, including the brain and primary and secondary lymphoid organs. In recent years, there has been increased interest in analyzing the consequences of dietary modifications on the immune system due to its role as the main defense system for the organism. Similarly, there has been interest in determining the usefulness of nutritional modifications for the modulation of physiologically relevant functions, including endocannabinoid production and signaling in different tissues. The objective of this study was to analyze differences in the expression of CB1 and CB2 endocannabinoid receptors in the spleen and thymus of male and female adult BALB/c mice supplemented with nutritive and non-nutritive commercial sweeteners for 6 weeks, Our results show increased CB1 receptor expression in the spleen of female mice supplemented with sucralose, while male mice show decreased CB1 expression in the same group, compared to unsupplemented controls. In contrast, CB2 receptor expression was significantly increased in the spleen of male, but not female, mice supplemented with sucrose. Thymus CB1 expression only showed a significant decrease between the sucralose and steviol glycosides groups in male mice, with no differences observed in female animals. Finally, CB2 expression in the thymus was more variable, with both sucralose and sucrose inducing decreased expression of CB2 in male animals, and sucrose increasing CB2 expression in females, compared to controls. Our results show that frequent consumption of non-nutritive sweeteners has differential sex-dependent effects on expression of CB1 and CB2 receptors in the spleen and thymus, which may imply alterations in immune system functions.

1. ANTECEDENTES

1.1 El sistema endocanabinoide

El sistema endocanabinoide es un complejo de señalización central y periférica constituido por receptores, ligandos y enzimas de síntesis y degradación[1]. Está involucrado en la conducta alimentaria, en la nocicepción, en la regulación de la memoria reciente, en el control del movimiento y en la neuroprotección. También presenta efecto antiproliferativo en células inmunológicas, modulación de la secreción hormonal e interviene en la respuesta inflamatoria[2].

En 1990 se estableció la identidad del primer receptor para el Δ9-Tetrahidrocanabinol (Δ9-THC), el principal ingrediente psicoactivo en *Cannabis sativa*, en tejido cerebral y fue nombrado CB1. Tres años más tarde, un grupo de investigadores en Inglaterra identificó un receptor periférico para canabinoides, el CB2[3].

Después de la identificación de receptores capaces de reconocer con alta afinidad compuestos de *Cannabis*, se inició una búsqueda de los ligandos endógenos para estos receptores. La identificación del N-araquidonil etanolamina (anandamida, AEA) y el 2-araqudinil glicerol (2-AG) como ligandos endógenos para los receptores plantearon dudas sobre el rol de los endocanabinoides en el mantenimiento de la homeostasis y en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso e inmunológico[3].

El 2-araqui- donil glicerol o 2-AG, a diferencia de la AEA que tiene afinidad por los dos receptores canabinoides, se une con mucho mayor afinidad al CB1 que al CB2[3]. La síntesis de AEA y 2-AG se lleva a cabo a partir de la ruptura de precursores de fosfolípidos presentes en las membranas de neuronas, glía y otras células, en respuesta a un aumento de los niveles de calcio intracelular. Este aumento puede estar dado por diferentes procesos, entre los que se incluyen la estimulación neuronal por procesos sinápticos y la activación directa de receptores

glutamatérgicos y nicotínicos, entre otros. El 2-AG se sintetiza a partir del diacilglicerol[4].

1.1.1 Receptores canabinoides

Los efectos de los endocanabinoides son principalmente mediados por los receptores CB1 y CB2 junto con algunos otros tales como PPARs, por sus siglas en inglés, (receptores activados por proliferadores peroxisomales) alfa y gama y canales TRP (receptores de potencial transitorio) que también son capaces de mediar algunas de las acciones de los endocanabinoides, especialmente de las aciletanolamidas[4].

Actualmente los receptores de endocanabinoides mejor estudiados son CB1 y CB2, mismos que difieren, en cierta forma, en su localización y su activación.

Estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores que se unen a proteínas fijadoras de nucleótido de guanina y atraviesan la membrana celular 7 veces (receptores heptahelicos). Los receptores de endocanabinoides contienen un dominio extracelular N-terminal que posee sitios de glicosilación, un dominio C-terminal intracelular acoplado a un complejo de proteínas G y 7 segmentos hidrofóbicos transmembranales conectados por anillos extra e intracelulares[5]. Como tales, su activación inhibe la adenil ciclasa y ciertos canales de calcio dependientes de voltaje, así como activa varias MAP cinasas (proteínas cinasas activadas por mitógenos); esto con algunas variaciones dependiendo del tipo de célula en el que se encuentren. Así la activación de los receptores CB ejerce diversas consecuencias en la fisiología celular, incluyendo función sináptica, transcripción genética, motilidad celular, entre otras[4].

Los receptores canabinoides se distribuyen ampliamente en el organismo en diversas regiones; CB1 se expresa mayoritariamente en cerebro, tejido adiposo, miocardio, endotelio vascular, terminaciones nerviosas simpáticas, páncreas, músculos del aparato gastrointestinal e hígado, aunque investigaciones recientes

sugieren que también podría expresarse en células del sistema inmunológico, en menor cantidad [6,7,8].

Por su parte, el receptor CB2, se localiza primordialmente en células del sistema inmunológico: linfocitos B, células NK, monocitos, neutrófilos, linfocitos T y macrófagos[9].

1.1.2 Receptor CB1

El receptor canabinoide CB1 fue clonado molecularmente de cerebro de conejo en 1990[10] Forma parte de la familia de receptores acoplados a proteínas G en la membrana celular[11]. Su señalización ocurre por inhibición de los canales de calcio sensibles al voltaje y la adenilil ciclasa, al tiempo que activa los canales de potasio y la señalización por las cinasas MAPK[12].

Este receptor es más abundante en cerebro, sin embargo, también está presente a nivel periférico. De esta forma se han encontrado receptores CB1 en el bazo y las amígdalas, corazón, próstata, útero, ovario y a nivel presináptico en terminales nerviosos simpáticos[13].

El receptor CB1 está muy conservado entre especies, siendo la homología de secuencia entre humano - ratón del 91% y entre humano - rata del 90%. Se han identificado variantes de CB1 por procesamiento alternativo con niveles bajos de expresión: CB1A en rata y humano, más recientemente, CB1B sólo en humano. También se han detectado mutaciones y polimorfismos en el gen del receptor CB1 (CNR1) relacionados con el abuso de sustancias, derivando esto a mayor susceptibilidad a padecer esquizofrenia y obesidad[13].

1.1.3 Receptor CB2

Este receptor se identificó por homología de secuencia en 1993. Se encuentra principalmente en las células y órganos inmunitarios entre ellos los leucocitos, el bazo y las amígdalas[14].

Una de las funciones de los receptores CB2 en el sistema inmunitario es la modulación de la liberación de las citocinas responsables de la inflamación y la regulación del sistema inmunológico. Puesto que los compuestos que activan selectivamente los receptores CB2 (los agonistas de los receptores) no causan efectos psicológicos, este receptor se ha convertido cada vez más en blanco de la investigación de las aplicaciones terapéuticas de los canabinoides, por ejemplo, como analgésico, antiinflamatorio y antineoplásico[15].

El receptor CB2 también inhibe la adenilato ciclasa a través de su interacción con proteínas Gi/o. Los canabinoides pueden modular también la ruta de las MAPK/ERK (cinasas reguladas por factores extracelulares) vía CB2, a través de la activación de PI3K/PKB (fosfoinositol 3-quinasa/proteína quinasa B), que en este caso induce la translocación de Raf-1 a la membrana y la fosforilación de p42/p44 MAPK. La estimulación del receptor también incrementa los niveles de Ca^{2+} intracelular a través de la activación de fosfolipasa C y la consiguiente liberación de Ca^{2+} de los reservorios sensibles a inositol trifosfato[13]. En la figura 1 se puede observar la estructura de los receptores CB1 y CB2.

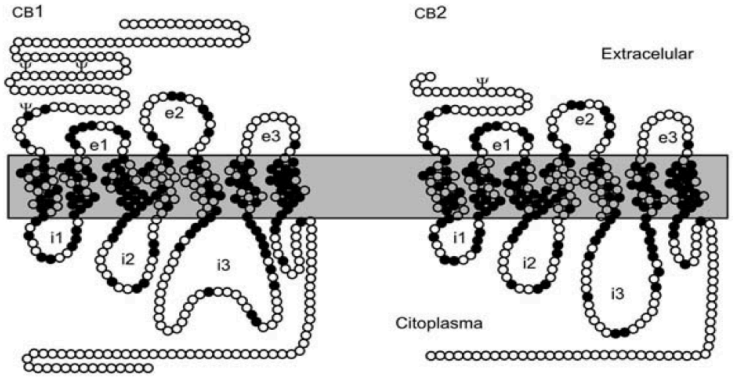


Figura 1: Estructura de los receptores de endocanabinoides CB1 y CB2[16].

1.2 Regulación de la homeostasis por los endocanabinoides

1.2.1 El sistema endocanabinoide y el sistema inmunológico

El receptor CB2 está ampliamente distribuido en los varios tipos células del sistema inmunológico; siendo las células que más lo expresan los linfocitos B, células NK, monocitos/macrófagos y sus diferentes tipos (osteoclastos, osteositos, microglia y células de Kupffer), neutrófilos, linfocitos T CD8 y TCD4[17],[18]; sin embargo se ha detectado también la presencia del receptor CB1 en células dendríticas[19] lo que confirma que podría tener una participación en el desarrollo de la respuesta inmune.

Debido a la presencia de los endocanabinoides en las células del sistema inmunológico, se puede suponer que tienen un papel importante en como moduladores en respuestas inflamatorias[20]. La activación de ambos receptores a través de sus ligandos comienza una serie de transducción de señales que convergen a nivel transcripcional para regular la migración celular y la producción de citocinas y quimiocinas[19].

Algunos de los efectos que son mediados por este receptor sobre diferentes células se mencionan en la tabla 1[21].

Tipo de célula	Especie	Endocanabinoide	Efectos
Astrocitos	Rata	AEA	↓ TNF alfa
Células dendríticas	Humano	AEA	↓ IL-6, IL-12 e IFN-alfa
Microglia	Ratón	AEA	↓ Oxido nítrico
	Ratón	AEA	↑ IL-10
Células T (en general)	Humano	AEA	↓ Proliferación celular
Células TCD4$^+$	Humano	AEA	↓ IL-17, IFN-gamma y TNF-alfa
Células TCD8$^+$	Humano	AEA	↓ INF-gamma y TNF-alfa

Tabla 1. Efectos de los endocanabinoides sobre células inmunológicas mediados por CB2[21].

Los canabinoides exhiben propiedades inmunosupresoras al interferir con la inmunidad humoral y la inmunidad celular. Estudios *in vitro* sugieren que los canabinoides inhiben la mitogénesis de células T y la producción de IL-2 por linfocitos; esta interleucina regula la proliferación de las células T, NK y células B. Una de las observaciones más importantes, ha sido que la expresión del receptor CB2 depende del estado de activación de las células, expresándose en más proporción en estados pro-inflamatorios[17].

Por otro lado, en más estudios realizados *in vitro* se ha mostrado que la estimulación de macrófagos y células dendríticas con lipopolisacárido bacteriano incrementa la producción y liberación de AEA y 2-AG limitando el daño tisular producido por la inflamación, con esto afirmando que los canabinoides son agentes con una elevada actividad antiinflamatoria a través de 3 mecanismos: inducción de la apoptosis e inhibición de la proliferación celular, inhibición de síntesis de citosinas y modulación de la actividad de las células T[3].

Con todo lo anterior, se sugiere que existe un rol fisiológico del sistema endocanabinoide en las funciones de la inmunidad innata y adaptativa como se explica a continuación: las células presentadoras de antígeno (APC) reconocen patógenos o PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) a través de receptores de reconocimiento de patrones, como por ejemplo, los receptores tipo Toll (TLR), conduciendo al aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras y de las moléculas del MHC clase I y II. Las APC expresan receptores CB1 y CB2 y su activación por agonistas canabinoides selectivos interfieren con la presentación de antígenos en MHC, inhiben la generación de citocinas proinflamatorias (IL-1beta, TNF-alfa, e IL-12), e incrementan la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10). Debido a que IL-12 contribuye a la diferenciación de células T vírgenes a células activadas ayudadoras (Th1), los canabinoides podrían entonces disminuir la respuesta Th1; así mismo podrían jugar un papel importante en la inducción de una respuesta Th2 activando la generación de IL-4[17,22]. En la figura 2 se puede esquematizar dicho mecanismo.

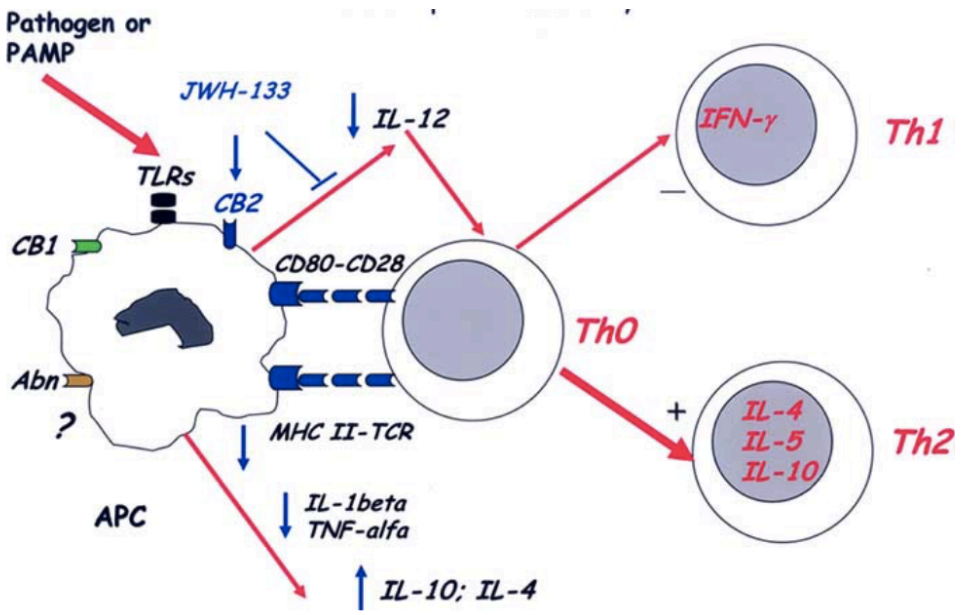


Figura 2: Posible acción de los canabinoides sobre la inmunidad innata y adaptativa[17]

1.2.2 El sistema endocanabinoide y las modificaciones dietéticas

Existe amplia evidencia que apoya la teoría de que existe una contribución del sistema endocanabinoide en la modulación del balance energético, controlando la ingestión de alimento a través de mecanismos centrales y periféricos[23]. Éste controla la ingesta de comida de dos formas: refuerza la motivación de consumir alimentos con alta densidad energética e induce el apetito regulando los niveles y acciones de los mediadores orexigénicos y anorexigénicos. Este efecto se encontró cuando se inyectó AEA en ratas para estimular sobrealimentación en ratas previamente saciadas de alimento, situación que fue revertida mediante un bloqueo del receptor CB1 con su antagonista SR141716[24].

Las investigaciones realizadas sobre el sistema endocanabinoide han sido encaminadas en la terapéutica de la obesidad y la regulación del apetito para optar por una medida de control para la obesidad o el síndrome metabólico, tal es el caso de la creación de Rimonabant, medicamento antagonista del receptor

CB1[25]; mismo que fue retirado del mercado en 2008 debido a sus efectos adversos de tipo psiquiátrico[26]. Mucho se ha debatido sobre el efecto que tiene el receptor CB1 en el tejido adiposo. Se habla por ejemplo de que tiene un efecto hipofágico, lo que lo condiciona como un adyuvante al tratamiento de la obesidad[17], por ejemplo, en un estudio realizado en ratones *knock out* para CB1 por Ruiz de Azua y cols[27], se sugiere que es la falta de expresión de este receptor la que condiciona a un incremento en la actividad de reserva de los adipocitos, culminando en un estado de obesidad y por lo tanto, inflamación, con lo cual se habla de una manera "alterna" de la activación de los macrófagos. Por otro lado, estudios realizados en ratones alimentados con sacarosa y leche condensada se encuentra una disminución del receptor CB1 hasta de un 50% en el hipocampo[28]. Con lo cual se observan cambios en la expresión de este receptor en diversos tejidos y que son totalmente dependientes de las modificaciones dietéticas específicas. En general, debido a la activación a nivel hipotalámico de los receptores CB1, se considera como un fuerte estimulante del apetito, preferentemente de alimentos ricos en grasa. A nivel hepático, incrementa la lipogénesis, síntesis de novo de ácidos grasos y promueve el aumento de peso[29].

Recientemente se ha demostrado que las dietas ricas en ácidos grasos, como el linoleico que es precursor del ácido araquidónico, puede generar un aumento en la síntesis de endocanabinoides[30] condicionando así al desarrollo de la obesidad.

Por otro lado, se expone que el receptor CB2 tiene un efecto antiinflamatorio cuando está expresado en las células del sistema inmunológico. Es así como se realizaron experimentos en ratones alimentados con una dieta a base de aceite de oliva y se demostró que este factor activa el receptor CB2, asociándolo con un efecto antiinflamatorio en el tejido adiposo[31].

En un estudio realizado con ratones alimentados con fructosa y un grupo con alimento regular para ratones, se encontró que en los ratones alimentados con fructosa disminuye la expresión de los receptores CB1 y CB2 en la vejiga[32]. Con base a los resultados de estos estudios se puede inferir que los cambios en la

expresión de los receptores CB1 y CB2 relacionados con las modificaciones dietéticas pueden diferir en los sitios anatómicos investigados, así como puede haber variaciones en cada tipo, se ha encontrado que no todos cambian de la misma manera, aun cuando los experimentos se realizan en la misma especie animal[33].

1.3 Edulcorantes

El término edulcorante equivale a endulzante, “lo que endulza”. Se le da el nombre de edulcorantes a las sustancias que son capaces de despertar la sensación que la mente califica como “dulce”, permitiendo su uso a los consumidores, disfrutar de este sabor con poca o ninguna ingesta de energía o respuesta glucémica cuando se emplean edulcorantes no nutritivos o sin calorías[34].

1.3.1 Clasificación de los edulcorantes

En cuanto a su clasificación global y ante la gran variedad de tipos existentes, los edulcorantes se pueden agrupar en función de su contenido calórico (calóricos o acalóricos), según su origen (natural o artificial) o incluso según su estructura química[35]. En la tabla 2 se muestra la clasificación básica de los edulcorantes.

Calóricos	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, Naturales galactosa y trehalosa, tagatosa.
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco y jarabe de sorgo.
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertida.
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol maltitol, isomaltulosa, lactitol, Glicerol.
No calóricos	Naturales	Siraitia grosvenorii, estevia, taumatina, pentadina, monelina.	
	Artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, nehosperidina DC, alitamo, advantamo.	

Tabla 2. Clasificación general de los edulcorantes[36].

1.3.2 Sacarosa

La sacarosa es un disacárido producido por la condensación de glucosa y fructosa, con una fórmula empírica C_{12}-H_{22}-O_{11}. En la naturaleza se encuentra en un 20% del peso en la caña de azúcar y en un 15% del peso de la remolacha azucarera, de las que se obtiene el azúcar de mesa, como es comúnmente conocida. Es el endulzante calórico más consumido en todo el mundo, misma situación que lo coloca como un factor de riesgo para desarrollar obesidad en todas las edades. Su metabolismo inicia con la hidrólisis por la enzima sacarosa, que hidroliza el enlace α (1>B2) y libera un monosacárido de glucosa y de fructosa. La glucosa se asimilará en las células del intestino gracias a los glucotransportadores SGLT-1 y GLUT2 y la fructosa a través del GLUT-5[37].

1.3.3 Glucósidos de esteviol

La *Stevia rebaudiana* es una planta originaria del sudeste de Paraguay, miembro de la familia de las asteráceas, conocida como “hoja dulce”[38]. Se le atribuyen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, reguladoras de la glicemia e hipertensión y además se usaba como endulzante de los medicamentos en las regiones de Brasil y Paraguay[34,35].

Los estudios realizados sobre esta planta y sus derivados han demostrado que tiene poca o ninguna toxicidad y su consumo crónico representa poco riesgo para la salud. Es comúnmente encontrada en el mercado como “glucósidos de esteviol”, que son una mezcla de componentes de la estevia de diferentes pesos moleculares, y tiene un sabor 300 veces más dulce que el azúcar[39]. Ha tenido mucho auge en los últimos años ya que se presenta como una opción “más natural” para sustituir el azúcar de mesa y gracias a las propiedades antes mencionadas, es muy común su uso en la industria alimentaria.

El organismo absorbe los glucósidos de esteviol y estos pasan a través del tracto gastrointestinal superior, incluyendo el estómago y el intestino delgado, completamente intactos. Luego la vena porta absorbe el esteviol, el cual es

metabolizado principalmente por el hígado, formando glucorónido de esteviol, y posteriormente excretado en la orina[38].

1.3.4 Sucralosa

Es un edulcorante artificial descubierto en 1976 compuesto de 1,6 dicloro–1,6 dideoxy-β- D-fructofuranosil–4-cloro–4 deoxy-αD–galactopiranósido, obtenido por la halogenación selectiva de la molécula de sacarosa. Es entre 500 a 700 veces más dulce que el azúcar, no contiene aporte energético, es muy soluble en agua y estable bajo condiciones normales de proceso y es capaz de retener su dulzor cuando se somete a altas temperaturas.

Los estudios recientes han demostrado que su consumo es seguro, incluso para niños y mujeres embarazadas[39]. Al ser altamente soluble en agua y no ligarse a las proteínas plasmáticas es eliminada por vía renal sin decloración en 24 horas a su consumo sin efecto osmótico alguno. Su forma comercial más común es la Splenda®, y es de los edulcorantes más consumidos por toda la población[39].

1.4 Edulcorantes y sistema inmunológico.

La inmunomodulación es un proceso que altera el sistema inmunológico de un organismo, interfiriendo con sus funciones. Esta interferencia resulta en inmunoestimulación o inmunosupresión. Un inmunomodulador es cualquier sustancia que ayuda a regular el sistema inmunológico, esta regulación es un proceso de normalización, así, este ayuda a optimizar la respuesta inmune de manera positiva o negativa[40].

De acuerdo a la literatura, una de las principales caracteristicas de los edulcorantes es su nulo efecto sobre el organismo[41,42]; sin embargo, son cada día más abundantes las investigaciones que afirman lo contrario, pudiendo ser este efecto benéfico o perjudicial. En el caso particular del sistema inmunológico, en relación con la estevia, se ha percibido que tiene un efecto inmunoestimulador, evidenciado por un incremento en las respuestas humorales y de hipersensibilidad

tardía, mediada por células B y T respectivamente. También se ha demostrado que mejora la función de los macrófagos y modula la proliferación de de las células T y B[41]. Adicionalmente, se sabe que en monocitos inhibe la secreción de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF-alfa e IL-1beta[42].

Por otro lado, se ha demostrado que la sucralosa, reduce significativamente los niveles de IL-10 en cultivos de sangre estimulados con LPS *in vitro*, sugiriendo así la regulación de la respuesta humoral contra patógenos extracelulares, contraria a lo que se observa con la sacarosa y otros endulzantes nutritivos, que parecen provocar reacciones más favorables en la defensa contra patógenos intracelulares[41].

El reciente incremento en el consumo de edulcorantes no calóricos ha sido una consecuencia del constante cambio de hábitos alimenticios con el fin de erradicar las enfermedades crónico degenerativas, y con ello ha crecido el estudio sobre los efectos que éstos tienen sobre el organismo. Como se menciona anteriormente el sistema endocanabinoide está relacionado con el metabolismo y la inflamación, basado en esto existen investigaciones que sugieren que la activación de los receptores CB bajo ciertas condiciones, tales como diabetes o dislipidemias, enfermedades que condicionan a inflamación crónica, está ligada a la disminución de la resistencia a la insulina y un aumento en la tasa de lipólisis[43].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El consumo de edulcorantes se extiende desde siglos atrás, sin embargo, su consumo para diferentes fines se ha hecho popular en las últimas décadas. Con este incremento, se han buscado nuevas estrategias a nivel industrial para que estén disponibles en toda la población, esto incluye nuevas mezclas de edulcorantes, su inclusión en productos comerciales con alta demanda o, simplemente, publicidad más atractiva para atraer al consumidor.

Debido a lo anterior, el consumo de estas sustancias no puede ser del todo controlado y debido a este uso indiscriminado en todas las edades, ha sido motivo de investigación a nivel mundial tratar de conocer los posibles efectos que estas sustacias tienen en la salud humana

Diversos estudios han relacionado el uso de edulcorantes con cambios específicos en el sistema inmunológico. Estudios *in vitro* han demostrado que los edulcorantes artificiales, tales como sucralosa o sacarina, suprimen la producción de IL-6, sugiriendo que los edulcorantes artificiales son incapaces de producir una respuesta inflamatoria frente a patógenos; al contrario de los edulcorantes naturales, como el azúcar de caña, que promueve la producción de la misma interleucina e incrementa la actividad inflamatoria y produce una respuesta inmune más eficiente[43], por otro lado, se ha demostrado que los glucósidos de esteviol, también presentan propiedades anti-inflamatorias al inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias en monocitos[42] sugiriendo que, a nivel inmonlógico si se encuentran cambios relacionados con su uso[41].

Investigaciones recientes sugieren que las modificaciones dietéticas en cantidad y calidad alteran el funcionamiento del sistema endocanabinoide. Por ejemplo, una dieta enriquecida con grasas poliinsaturadas, como aceite de oliva, incrementa la expresión del receptor CB2 y del gen codificante para NOS1 en tejido adiposo de ratones programados para padecer tumores; está comprobado que la sobre expresión de las formas constitutivas de NOS (NOS1 y NOS3) previene la obesidad y regula inflamación en tejido adiposo[44,45]. Por otra parte, una dieta a

base de azúcar disminuye la expresión del receptor CB1 y su ligando 2-AG en ratones[32].

Existen diversas consecuencias del consumo energético inadecuado sobre el organismo. Una de las más graves es la obesidad en todas las edades, misma que trae consigo un estado de inflamación crónica que desenboca en un funcionamiento inadecuado del sistema inmunológico. Como se ha mencionado, el sistema endocanabinoide es capaz de regular la homeostasis a través de la expresión de los receptores CB que funcionan como mediadores de la inflamación cuando su expresión promueve la liberación de citocinas anti inflamatorias o siendo capaces de regular el apetito. Una de las principales modificaciones dietéticas que realiza la población en general es la sustitución de la sacarosa por endulzantes que aporten menos calorías pero más sabor a los alimentos, de acuerdo con cifras de la SAGARPA y el CONADESUCA (comite nacional para el desarrollo sustentable de la caña de azúcar), el consumo de edulcorantes no calóricos ha incrementado a una tasa anual promedio de 10.7% para 2017, siendo los más usados el aspartame, la sucralosa, el acesulfame K, los glucósidos de esteviol, la sacarina, alitame y neotame, siendo estos dos ultimos usados casi exclusivamente a nivel industrial, debido a su potencia de dulzor y a sus ventajas frente a la caña de azúcar[47]. Derivado de esto es que se necesita investigar cuáles son las consecuencias del uso prolongado de estas sustancias, sean benéficas o perjudiciales.

Es así que, con base en los planteamientos sugeridos y la investigación hecha tanto en receptores CB como en edulcorantes en general, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué efecto que tiene la suplementación de edulcorantes comerciales sobre la expresión de los receptores de endocanabinoides CB1 y CB2 en leucocitos de ratón?

3. HIPÓTESIS

H_1

La suplementación con edulcorantes naturales glucósidos de esteviol y sacarosa incrementan la expresión de receptores CB1 y CB2 en leucocitos de bazo y timo en ratones, mientras que el edulcorante artificial sucralosa disminuye la expresión de dichos receptores, en comparación con los grupos control.

H_0

La suplementación con edulcorantes naturales glucósidos de esteviol y sacarosa no incrementan la expresión de receptores CB1 y CB2 en leucocitos de bazo y timo en ratones, mientras que el edulcorante artificial sucralosa aumenta la expresión de dichos receptores, en comparación con los grupos control.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

- Identificar cambios en la expresión de los receptores de endocanabinoides CB1 y CB2 en leucocitos de bazo y timo de ratones suplementados con edulcorantes comerciales calóricos y no calóricos.

Objetivos específicos:

- Comparar la expresión de los receptores CB1 y CB2 en leucocitos de ratones suplementados con edulcorantes no calóricos contra la de ratones suplementados con sacarosa y la de los ratones sin suplementación.
- Comparar la expresión de receptores CB1 y CB2 en ratones de diferente sexo de todos los grupos experimentales.
- Determinar si las diferencias en la expresión de receptores CB1 y CB2 están relacionadas con cambios en el peso o consumo de alimento de los ratones suplementados.

5. JUSTIFICACIÓN

Existen consensos, normas, e instituciones, de expertos que regulan el consumo de los edulcorantes tanto naturales como artificiales y su uso en productos alimenticios comerciales desde sus orígenes, mismos que se han encargado de exponer el nulo daño que estos provocan en el organismo humano; por ejemplo, el comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, es cada vez más la investigación que sugiere que, a pesar de ser sustancias que no se metabolizan, inducen a cambios metabólicos, hormonales, fisiológicos, entre otros[35].

Dado que la activación de los receptores CB2 y CB1 está relacionada con diferentes modificaciones dietéticas, es de vital importancia examinar la relación que estos dos factores tienen con las células del sistema inmunológico. Es bien sabido que, a pesar de que no muestran ningún grado de toxicidad, los edulcorantes interfieren con distintas vías de señalización celular que modifican algunos efectos a nivel orgánico.

Debido a esto, es posible una dieta con edulcorantes artificiales puede condicionar la respuesta inflamatoria, donde los receptores CB1 y CB2 se expresan en células activadas para modular las respuestas inflamatorias. Por lo tanto, el consumo crónico de edulcorantes podría provocar una capacidad de respuesta inmunológica alterada ante diversos retos antigénicos.

Es ahí donde recae la importancia de aportar estudios que apunten a las posibles secuelas que trae este consumo, ya sean benéficas o perjudiciales, y así tener una base que permita tomar acciones encaminadas a una mayor regulación de estos comestibles, de igual forma expandir el campo de investigación de los receptores antes mencionados y crear bases para su futura aplicación en el área de la investigación en ciencias de la salud.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño de estudio.

- Tipo de estudio: Experimental, prospectivo, comparativo.
- Universo de trabajo: Ratones machos y hembras de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad.
- Tamaño de la muestra: Se formaron grupos de 6 ratones hembras y 6 ratones machos de 8 semanas de vida para cada edulcorante: sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa; además de un grupo control (agua).

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión:

- Ratones de la cepa BALB/c criados en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la UAEM.
- Hembras y machos de 8 semanas de edad que fueron suplementados con sacarosa, sucralosa, glucósidos de esteviol y agua como grupo control.
- Hembras y machos con un peso entre 18 y 22 gramos de peso.

Criterios de exclusión:

- Ratones fuera del rango de edad o peso establecidos
- Hembras lactantes o gestantes.
- Animales enfermos

Criterios de eliminación:

- Ratones que presentaron alguna alteración fisiológica durante el estudio que no fuera atribuible al tratamiento empleado.
- Ratones que enfermaron o murieron durante el periodo de estudio.

6.3 Variables de estudio

Independientes

- Consumo de agua

- Sexo

- Peso

- Consumo de agua

Intervinientes

- Consumo de edulcorantes

Dependientes

- Expresión de los receptores CB1 y CB2

6.3.1 Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala de medición
Expresión del receptor CB1	Receptor cannabinoide expresado particularmente en células del sistema nervioso central. Conocido por regular el apetito y participar en las conexiones entre las neuronas.	Determinación de la expresión del receptor CB1 por análisis de intensidad media de fluorescecia y número de células positivas para por inmunofluorescencia, empleando anticuerpos anti-CB1.	Cuantitativa continua	Intensidades relativas de emisión de fluorescencia detectadas por inmunofluorescencia. Escala arbitraria.
Expresión de receptor CB2	Receptor cannabinoide expresado particularmente en células del sistema inmunológico y se caracteriza por ser un mediador de la inflamación.	Determinación de la expresión del receptor CB2 por análisis de intensidad media de fluorescecia y número de células positivas para por inmunofluorescencia, empleando anticuerpos anti-CB2.	Cuantitativa continua	Intensidades relativas de emisión de fluorescencia detectadas por inmunofluorescencia. Escala arbitraria.
Suplementación con edulcorantes	Aditivos que proporcionan sabor dulce a los alimentos o bebidas.	Cantidad de edulcorante agregada en 100 ml de agua purificada proporcionada en bebederos, disponible para el consumo de los animales experimentales.	Cuantitativa continua	Gramos/mililitro
Peso	Masa que posee un cuerpo.	Masa total del ratón, medida en balanza granataria.	Cuantitativa continua	Gramos
Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas.	Determinación del sexo del ratón por la distancia existente entre el ano y sus genitales.	Cualitativa nominal	Macho/Hembra
Consumo de alimento	Acción de ingerir alimentos.	Cantidad total de Rat Chow Purina ^{MR}. consumida en un día medida en balanza granataria.	Cuantitativa continua	Gramos/día
Consumo de agua	Acción de ingerir líquidos.	Cantidad total de agua ingerida en 24 horas.	Cuantitativa continua	Mililitros/día

6.4 Procedimientos

Los ratones de la cepa BALB/c fueron criados en las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México bajo condiciones reguladas de temperatura 22ºC ± 1ºC y con ciclo de luz oscuridad 12:12 horas.

Se inició con un pie de cría de ratones BALB/c para cruzar y obtener la población necesaria. Una vez nacidas las crías, éstas fueron destetadas a los 25 días de su nacimiento y posteriormente separados por género en diferentes cajas, con un máximo de 3 ratones por cada caja, misma que fue provista con alimento (Laboratory Rodent Diet 5001) y agua purificada a libre demanda. Después del destete, se inició alimentación regular con el mismo alimento y agua *ad libitum*.

A la octava semana de vida se seleccionaron grupos de ratones y quedaron distribuidos de la siguiente manera:

- 12 ratones BALB/c, 6 machos y 6 hembras, con suplementación a base de sucralosa.
- 12 ratones BALB/c, 6 machos y 6 hembras, con suplementación a base de glucósidos de esteviol..
- 12 ratones BALB/c, 6 machos y 6 hembras, con suplementación a base de sacarosa.
- 12 ratones BALB/c, 6 machos y 6 hembras, controles sin suplementación.

El registro de consumo de agua y alimento se realizó diariamente en un mismo horario (10:00 am), además se registró peso semanal de cada ratón.

6.4.1 Suplementación con edulcorantes

Se realizó la suplementación a los ratones con los edulcorantes no calóricos: 1 sobre de 1 g de sucralosa (conteniendo 0.012 g de sucralosa) diluidos en 100 mL de agua purificada, 1 sobre de 1g de glucósidos de esteviol (conteniendo 0.025 g de glucósidos de esteviol) diluidos en 100 mL de agua purificada, un grupo de

sacarosa suplementado con 10 g en 100 mL de agua purificada y un grupo control con la misma cantidad de agua sin edulcorante durante 6 semanas.

6.4.2 Extracción de bazo y timo

Después de las 6 semanas de tratamiento se sacrificó a los ratones con 50 µL de pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL) de la marca CHEMINOVA (Reg. SAGARPA Q-7048-044). Una vez que se corroboró la pérdida total de reflejos del ratón, se fijó boca arriba a una placa de disección, se limpió la zona y se cortaron las capas de la piel en el área del abdomen, para después localizar la vena cava y cortar; una vez cortada, se procedió a perfundir el corazón del ratón con PBS 1X (solución salina amortiguadora de fosfatos) para eliminar la sangre.

6.4.3 Preparación de muestras para cortes histológicos

Se extrajo bazo y timo para posteriormente incluirlos en bloques de OCT (*optimal cutting temperature*) y congelarlos a -70ºC por 15 minutos. Después de este tiempo se realizaron cortes de 5 micras en el criotomo a una temperatura de -15º a -23º C siendo ésta la óptima para que el corte se hiciera de manera correcta. Los cortes se fijaron en portaobjetos y almacenaron a -20ºC hasta su tinción.

6.4.4 Inmunofluorescencia

La tinción de las muestras se llevó a cabo con los anticuerpos a continuación mencionados:

1. Anti CD3 (145-2C11, BD Pharmingen, EUA)
2. Anti CB1 (ab136410, abcam, EUA)
3. Anti CB2 (ab3650, abcam, EUA)
4. Anti IgG Alexa Fluor 647 (ab195884, abcam, EUA)
5. Medio de montaje (*Vectashield antifade mounting medium with DAPI*, Vector H-1500, EUA)

Para llevar a cabo el análisis de la intensidad media de fluorescencia se analizaron 20 campos por ratón de cada grupo de suplementación; en cada campo se analizaron de 5 a 10 células positivas en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti a objetivos 20X y 60X mediante el software del mismo microscopio *NIS-elements AR*.

El protocolo de tinción se describe a continuación:

1) Fijar las laminillas con acetona en un tubo de 50 mL por 20-30 minutos a temperatura ambiente.
2) Dejar secar las laminillas y hacer un borde con el barniz fijador alrededor de la muestra cuidando de no tocar el tejido.
3) Lavar con PBS 1X + T20 durante 10 minutos a temperatura ambiente.
4) Retirar PBS con la pipeta de 100 µL
5) Agregar 100 µL de solución bloqueadora al 5% (50 mg de leche baja en grasa en 10 mL de PBS 1X + T20 al 0.01%) y dejar en agitación por 1 hora.
6) Retirar bloqueador y lavar con PBS 1X + T20, dejar en agitación por 5 minutos y repetir lavado 2 veces.
7) Añadir anticuerpos primarios (anti CB1: ab136410, abcam, EUA; anti CB2 ab3650, abcam, EUA; anti CD3: 145-2C11, BD Pharmingen, EUA) en una dilución 1:200 en PBS 1X + T20 y dejar incubando a 4ºC durante la noche a 4ºC.
8) Lavar con PBS 1X + T20 3 veces durante 15 minutos cada una con agitación suave y repetir 3 veces.
9) Agregar anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 (ab195884, abcam, EUA) en dilución 1:200 en PBS 1X+ T20 e incubar por 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación media.
10) Colocar 50 µL de medio de montaje con DAPI en cada muestra, cubrir con un cubreobjetos cuidando de no levantar el tejido. Sellar con barniz y dejar 2-5 minutos en la oscuridad.

11) Leer al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti con el programa *NIS-elements* AR con objetivos 20X y 60X.

6.5 Recolección de datos

Durante la suplementación con edulcorantes, las cifras de consumo de agua, alimento y peso corporal y, una vez terminada la etapa de experimentación, la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada receptor fueron recabados en bases de datos de Excel para su consecuente análisis estadístico.

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis de las variables se realizó un ANOVA de una vía para la comparación entre todos los grupos. Los valores de $p<0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos se presentan en media ± desviación estándar (D.E.). Los datos se analizaron en el programa Graphpad Prism versión 8.0.

6.7 Implicaciones Bioéticas

El presente proyecto de investigación está basado en la "NOM 062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" que especifica lo siguiente: "que es función de la SAGARPA fomentar la producción, el cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio"[48].

Con la publicación de la Norma para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio se les proporciona a los investigadores mexicanos una importante ayuda para el buen éxito de su actividad científica[49].

Además, el proyecto fue aprobado por el comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 1).

7. RESULTADOS

7.1 Título del artículo

Expression of CB1 and CB2 receptors in splenic and thymic cells from mice supplemented with non-nutritive sweeteners

7.1.1 Página frontal del manuscrito

Expression of CB1 and CB2 receptors in splenic and thymic cells from mice supplemented with non-nutritive sweeteners

Brenda M. González-Dorasco, Irazú Contreras and José A. Estrada*

Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autonoma del Estado de Mexico.

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

7.1.2. Carta de envío del artículo

IMRE-D-19-00345 - Submission Notification to co-author

em.imre.0.6735d5.121fb344@editorialmanager.com
on behalf of
Immunologic Research (IMRE) <em@editorialmanager.com>
Mon 11/11/2019 13:38
To: José Antonio Estrada Guadarrama <jaestradag@uaemex.mx>

Re: "Expression of CB1 and CB2 receptors in splenic and thymic cells from mice supplemented with non-nutritive sweeteners."
Full author list: Brenda M González-Dorasco, Bsc; Irazú Contreras, Ph.D; José A Estrada, Ph.D

Dear Dr Estrada,

We have received the submission entitled: "Expression of CB1 and CB2 receptors in splenic and thymic cells from mice supplemented with non-nutritive sweeteners." for possible publication in Immunologic Research, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Dr. Dr Irazú Contreras who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Immunologic Research

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at https://www.springernature.com/production-privacy-policy. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: https://www.editorialmanager.com/imre/login.asp?a=r). Please contact the publication office if you have any questions.

7.1.3 Abstract

Although considered harmless, previous studies have shown that intake of non-nutritive sweeteners may have detrimental effects on human health under specific circumstances, although their mechanisms of action are still being studied. The endocannabinoid system participates in the modulation of multiple physiological processes, including neurotransmission, energy metabolism and the immune response, via signaling through its specific receptors, CB1 and CB2. This system is susceptible to manipulation through nutritional modifications such as intake of diets with high energy content; nonetheless, its characteristics under chronic intake of non-nutritional sweeteners have not been determined. The objective of this study was to analyze changes in the expression of endocannabinoid receptors in the spleen and thymus of adult mice supplemented with commercially available non-nutritive sweeteners containing sucralose or steviol glycosides in their daily diet for 6 weeks. After supplementation the organs were obtained and analyzed for changes in the expression of CB1 and CB2 receptors by immunofluorescence. Results show no significant differences in the number of CB1 or CB2 positive cells in either organ; however, CB1 fluorescence intensity was increased in the spleen of sucralose-supplemented female mice and decreased in male mice from the same group, while sucrose decreased CB1 expression in females and increased CB2 expression in males. In the thymus, no significant differences were observed for CB1 expression compared to control groups, but sucralose decreased CB2 expression in male mice, whereas sucrose increased CB2 expression in female animals and decreased it in males. Between sexes comparison showed increased expression of CB1 in the spleen of female mice supplemented with steviol glycosides and sucralose, compared to males from the same groups, whereas CB2 expression was higher in males supplemented with steviol glycosides and sucrose than females. The results suggest that frequent sweetener consumption promotes sex-specific changes in the expression of CB1 and CB2 receptors in lymphoid tissue that may be relevant for immune system functions *in vivo*. It would be important to determine whether these effects are also present in humans due to their possible impact on health.

Key words: non-nutritive sweeteners, endocannabinoids, CB1, CB2, spleen, thymus.

7.1.4 Introduction

Non-nutritive sweeteners (NNSs) have been in use for a long time due to their capacity to provide sweet taste with low or null energy intake, thus making them an attractive alternative for the prevention of metabolic diseases related to intake of high energy content diets. In consequence, the food industry has increased their use in everyday products, making their use widespread in the human population and emphasizing the need to determine the possibility of unwanted side effects derived from their chronic, frequent use.

Human consumption of NNSs is considered safe as long as ingestion does not exceed concentrations defined by numerous regulatory agencies worldwide. Nevertheless, recent studies have shown that some sweeteners, like sucralose, may promote fat accumulation and upregulate expression of genes involved in adipogenesis, inflammation and antioxidant pathways, even at physiologic concentrations [1]. Studies performed in human and animal models have shown that use of saccharine, sucralose or aspartame might enhance the risk of glucose intolerance due to changes in microbiota composition and functions [2]. Alterations to gut microbiota are one of the factors that contribute to development of obesity [3]. The association between obesity and NNS intake is another issue under investigation. Studies in humans have demonstrated that consumption of artificially sweetened beverages is related to a greater body mass index in toddlers [4]. Contrasting with these results, an investigation performed in healthy adults who consumed pure forms of sucralose and aspartame for 2 weeks showed no effect on glucose metabolism or insulin sensitivity [5], suggesting that consequences of frequent and/or chronic NNS consumption may not be detected immediately and greatly depend on the experimental setup used.

In addition, sweeteners derived from *Stevia rebaudiana* have been reported to have antihypertensive, antitumor and anti-inflammatory effects [6]. Studies in animal models treated with intragastric steviosides have found reduced levels of TNF-alpha, IL-1-beta and IL-6 and a decrease in total numbers of leukocytes, neutrophils and macrophages [6]. Reports from LPS-stimulated THP-1 cells, have also shown that steviosides significantly decrease production of TNF-alpha and IL-1-beta [7]. However, other studies have found increased frequencies of $CD3^+$ and $CD8^+$ lymphocytes in Peyer's patches after consumption of sucralose and stevia, along with higher levels of IL-6 and IL-17 [8], contradicting previous research that associates stevia with anti-inflammatory responses, but still demonstrating that sweetener intake is related to changes in the immune system.

Regarding dietary regulation of physiological functions, the endocannabinoid system (ECS) has gained relevance due to its role in the modulation of energy metabolism and systemic homeostasis, as well as immune functions, through two major specific endocannabinoid receptors: CB1, with significant expression throughout the organism and the central nervous system in particular and; CB2,

located mainly in immune system cells and tissues [9]. It has been demonstrated that nutritional changes are able to alter ECS functions. For example, calorie restriction promotes significant changes in the levels of the two major endocannabinoids, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and anandamide (AEA), on pregnant rats [10]. Moreover, diets enriched with linoleic acid are able to increase endocannabinoid synthesis and may be related to induction of obesity under specific circumstances [11]. Furthermore, activation of CB1 receptors may induce hyperphagia and weight gain in rats, demonstrating the effect of endocannabinoid signaling in the control of feeding behavior [12, 13]. The ECS controls food intake by reinforcing the motivation to find and consume food with high energy value and by regulating levels and actions of orexigenic and anorexigenic mediators derived from multiple sources within the organism [14].

An accumulating body of evidence suggests that endocannabinoids and cannabinoid receptors type 1 and 2 (CB1, CB2) play a significant role in physiologic and pathologic processes, including immune system functions [15]. CB2 receptors are expressed by all immune cells, but expression levels vary among cell populations and activation states. In humans, highest to lowest CB2 expression in immune cells is observed in B cells, NK cells, macrophages, polymormonuclear cells, $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells [16]. CB1 is also expressed at low levels in peripheral tissues, including heart, testis and immune system organs [17]. Research on the endocannabinoid system has focused in finding activation triggers for these receptors. Thus, it has been found that CB2 expression in macrophages depends on their state of activation, being higher when there is a state of inflammation [18]. Additional evidence indicates that local production of endocannabinoids is transient in an inflammatory response, due to their fast degradation [19]. CB2 receptors have also been reported to regulate other specific immune cells functions; including immunoglobulin class switching in mouse B cells from IgM to IgE [15]. Stimulation of macrophages or dendritic cells with LPS increases production and release of the main endocannabinoid ligands, AEA and 2-AG. Hence, endocannabinoid production might contribute to limit tissue damage, possibly acting as an anti-inflammatory counterpart for the inflammatory response. In general, cannabinoids perform their immune effects trough four main actions: inhibition of cytokine synthesis, induction of apoptosis, inhibition of cell proliferation and modulation of leukocyte activation and effector functions [20].

As the ECS is susceptible to manipulation through nutritional modifications, particularly the energy content of diet, and as NNSs have been shown to have significant physiologic effects related to energy homeostasis under specific circumstances, including modulation of immune system functions like inflammation, the objective of this study was to evaluate the possibility of alterations in CB1 and CB2 expression in the spleen and thymus related to frequent intake of NNSs *in vivo*.

Although there is evidence that supports the role of the ECS in immune functions, it is yet unknown if there is an association between sweetener intake and expression of its receptors in immune cells or tissues. Therefore, the main objective of this study was to evaluate changes in the expression of CB1 and CB2 receptors in cells from lymphoid organs such as thymus and spleen.

7.1.5 Material and methods

The study was performed in compliance of international ethics standards for studies with animals. The protocol was approved by the Ethics Committee of the authors' institution.

Experimental animals and sweetener supplementation

Female and male BALB/c mice were raised at the facilities of the authors' institution, under standard conditions: 22 ± 1°C ambient temperature, 12:12 h light-dark cycles, fed with standard mouse diet (Rodent Chow 5001, LabDiet) and access to purified water on demand. At three weeks old, the animals were weaned and separated by sex, 3 animals per cage, and allowed to develop for an additional 5 weeks. Supplementation started at 8 weeks of age. Mice were randomly chosen from their respective sex group to form the experimental groups (n=6 mice per sex/group) as follows: Control, without sweetener supplementation; sucralose, supplemented daily with 1 packet of commercially available sucralose (0.012 g of sucralose diluted in 100 mL of purified water); steviol glycosides, supplemented daily with 1 packet of commercially available steviol glycosides (0.025 g diluted in 100 mL of purified water) and; sucrose, supplemented daily with 10 g of refined table sugar in 100 mL of purified water. Rodent chow was available on demand to all groups. The supplementation regime was maintained for 6 weeks. Water and food intake and weight gain were monitored daily throughout the study period.

Immunofluorescence analysis for CB1 and CB2 expression in thymus and spleen

At the end of the supplementation period, the animals were sacrificed by intraperitoneal injection of a lethal dose (0.05 mL) of 6.3% sodium pentobarbital (Cheminova). Once sensitivity was completely lost, animals were perfused transcardially with phosphate buffered saline solution (PBS) to remove blood from circulation. Afterwards, spleens and thymus were removed and preserved in sample freezing medium (Tissue-tek O.C.T. compound, Fisher Healthcare) and frozen at -70 °C for posterior use. 5 µm histological cuts were obtained using a cryostat (Leica, CM1510-1), placed in pre-cleaned glass slides and stored at -20 ºC until staining. The samples were fixed with for 25 minutes in acetone at -20 °C. After fixation, samples were re-hydrated with PBS solution containing 0.1% tween 20 (PBS-T20) for 10 minutes and blocked with milk (solution at 5%) in PBS-T20 for 2 hours in a sample shaker at 65 rpm at room temperature. Subsequently, slides

were washed (3x5 minutes, each) with PBS-T20. Primary antibodies against mouse CB1 (ab136410, Abcam) and CB2 (ab3650, Abcam) receptors were added and incubated with mild shaking at 4ºC overnight, in the dark. After incubation, samples were washed to remove unbound antibody and secondary fluorocrome-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Alexa fluor 647, ab195884, Abcam) was used for the detection of primary antibodies. Samples were incubated at room temperature for 2 hours in an orbital shaker at 70 rpm. All antibodies were used at the dilutions recommended by the manufacturer. Cell nuclei were detected using antifade mounting medium with DAPI (Vector H-1500). Slides were analyzed in a Nikon Ti fluorescence microscope at 60X magnification using the NIS-Elements AR 4.50.00 software to obtain mean fluorescence intensity (MFI) values. Analysis included areas with 5-10 cells per field and 20 fields per sample were analyzed. Numbers of receptor positive cells were determined by counting the cells in the 20 fields selected for analysis. Mean fluorescence intensity was determined by analyzing the fluorescence in the "red" channel (647 nm detector) for each receptor positive cell, individually, in every field analyzed, using the NIS-Elements software.

Statistical analysis

Analysis was performed with repeated measures ANOVA for multi-group comparisons; $p<0.05$ was considered statistically significant. Data is presented as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.3.0 software.

7.1.6 Results

Expression of CB1 and CB2 receptors in the spleen and thymus of sweetener-supplemented mice

In order to determine the presence of alterations in CB1 and CB2 expression in the spleen of sweetener-supplemented animals, we analyzed the number and mean fluorescence intensity of $CB1^+$ and $CB2^+$ cells in spleen and thymus of animals from each experimental group. Analysis included 20 fields including at least 5-10 positive cells per sample, per group (Tables 1 and 2). Representative photographs of $CB1^+$ and $CB2^+$ cells in the spleen and thymus are presented in figures 1A and 2A. No significant differences were detected in the number of CB receptor positive cells either among groups or between sexes, although there is a trend for increased CB1 or CB2 receptor expression in the spleen of female compared to male mice in the control group (Figures 1B, 1E and 2B, 2E).

Regarding CB receptor MFI in the spleen, our results showed that males from the sucralose group had a significant decrease in CB1 expression in the spleen compared to the control and sucrose groups (89,995 ± 47,279 *vs.* 106,242

± 55,377 and 118,257 ± 54,266, respectively; p=0.0001). Likewise, males in the steviol glycosides group presented a decreased CB1 expression compared to the sucrose group but not to the control group (94,083.3 ± 56,962 *vs.* 118,257 ± 54,266; p=0.0001) (Figure 1C). In female mice, we found increased CB1 MFI in the sucralose group compared to the control, sucrose and steviol glycosides groups (152,318 ± 79,485 *vs*. 120,928 ± 56,804, 106,632 ± 51,275 and 121,896 ± 67,813, respectively; p= 0.0001). The female sucrose group showed a significant decrease in CB1 expression compared to the control group (106,632 ± 51,275 *vs*. 120,928 ± 56,804; p=0.0351), whereas the female steviol glycosides group showed a significant increase compared to the sucrose group (121,896 ± 67,813 *vs*. 106,632 ± 51275; p=0.0294) (Figure 1C). Higher expression of CB1 was observed in the spleen of female mice compared to male mice from the steviol glycosides (94,083 ± 56,962 *vs.* 121,896 ± 67,813; p=0.0001, male and female respectively) and sucralose groups (89,995 ± 47,279 *vs.* 152,318 ± 79485; p=0.0001) (Figure 1C).

MFI analysis for CB2 expression in the spleen showed a significant increase in CB2 MFI in sucrose-supplemented male mice compared to the control group (83,936.1 ± 38,234 *vs.* 585,893 ± 35,917; p=0.0001), whereas the steviol glycosides and sucralose groups presented a significant decrease in CB2 MFI compared to the sucrose, but not to the control, group (58,616 ± 36,787 and 51,117 ± 27,613 *vs.* 585,893 ± 35917, respectively; p=0.0001) (Figure 1F). As shown in figure 1F, the highest expression of CB2 in female was seen on the sucrose group. Despite this, no significant differences were found among groups (p>0.005). CB2 receptor expression in the spleen was significantly higher in male animals from the sucrose and steviol glycosides groups, compared to females from the same groups (83,936 ± 38,234 *vs.* 53,005 ± 39,162; p= 0.001 and; 58,616 ± 36,787 *vs.* 47,484 ± 31,241; p= 0.0232).

Results for thymic expression of CB1 showed no significant differences among groups compared to controls, either in male or female mice; nonetheless, a significant difference was observed in CB1 MFI between the sucralose and steviol glycosides groups in male mice (109,258 ± 76,247 *vs.* 148,202 ± 285,256; p=0.0082) (Figure 2C). Furthermore, CB1 expression was higher in male animals supplemented with steviol glycosides compared to females from the same group (148,202 ± 285,256 *vs.* 101,887 ± 57,849; p=0.0001).

Thymic expression of CB2 showed a significant difference in CB2 MFI in the male sucralose group compared to all other groups (65,015 ± 50,168 *vs.* 80,925 ± 51,098 control, 48,525 ± 50,726 sucrose, 85,777 ± 61,299 steviol glycosides; p=0.0001; p= 0.0018; p=0.0001). In turn, the male sucrose group showed a significant decrease in CB2 MFI compared to controls (48,525 ± 50,726 *vs.* 80,925 ± 51,098; p=0.0001). In female groups, only the sucrose group presented a higher significant expression of CB2, compared to both the control and steviol glycosides groups (69,758 ± 44,887 *vs.* 54,183 ± 39,604 and 59,620 ± 48,296; p=0.0009). The

female steviol glycosides group had decreased expression of CB2 compared to sucrose (59,620 ± 48,296 *vs.* 69,758 ± 44,887; p=0.0302). CB2 expression showed significant differences between males and females from the same groups, including the control (80,925 ± 51,098 *vs.* 54,183 ± 39,604; p= 0.0001), sucrose (48,525 ± 50,726 *vs*. 69,758 ± 44,887; p=0.0001) and steviol glycosides groups (85,777 ± 61,299 *vs.* 59,620 ± 48,296; p=0,0001). Overall, the results show that the sweetener supplementation regime used in this study promotes alterations to CB1 and CB2 expression in the spleen and thymus of adult male and female mice.

7.1.7 Discussion

Population growth, changes to human lifestyle and health considerations have made it necessary to improve the characteristics of food products, increasing their shelf life and improving their safety while maximizing palatability. In consequence, the food industry has managed to include non-nutritive sweeteners in almost every kind of food product available with the idea of helping reduce the incidence of obesity and other chronic metabolic disorders associated with consumption of high energy diets, leading to frequent, chronic and sometimes unsuspected intake of these compounds. Despite ample evidence supporting the absence of detrimental effects on health stemming from consumption of NNSs, recent studies have suggested that these compounds may indeed have negative effects on human health under specific circumstances; therefore, researchers have highlighted the importance of research to determine whether or not NNSs are potentially negative for human health if used incorrectly.

Multiple studies have demonstrated that both nutritive and non-nutritive sweeteners are capable of causing alterations in the activation of immune system cells. For example, supplementation with cane sugar increases the pro-inflammatory activity of leukocytes in response to LPS stimulation [21]. Contrary to steviosides, that seems to enhance anti-inflammatory and anti-tumor properties [7], this last study supported by Besler [22] who reported that Splenda and Stevia possess valuable potential as carcinopreventive agents. Most studies focus on changes on cell activity *in vitro* when sweeteners are present; our study demonstrates relevant consequences of frequent intake of non-nutritive sweeteners *in vivo*.

Leukocyte activation in response to a variety of stimuli is modulated in part by endocannabinoid signaling via CB1 and CB2 receptors. CB receptor-dependent activation of immune system functions does not happen only under inflammatory or pathologic conditions, as this system is important for the maintenance of systemic homeostasis. Nevertheless, the presence of chronic inflammatory states, such as that in obesity, is considered to increase CB receptor expression on leukocytes, particularly that of CB2, which is known to have a higher expression in immune

system tissue [23], thus supporting their role in the modulation of leukocyte activity under inflammatory conditions [24].

As obesity is a pathology that occurs usually as a consequence of systemic energy imbalance, commonly derived from high calorie intake from diet, and due to the relevance of the endocannabinoid system for the regulation of energy balance and immune system functions, the possibility of modulating the expression of CB receptors in lymphoid tissue by supplementation with specific sweeteners is intriguing. Regarding the relationship between the endocannabinoid system and obesity, studies in $CB1^{-/-}$ and $CB2^{-/-}$ mice fed with high fat diets have demonstrated that these animals did not become obese [24], which supports the idea that diet-induced obesity is related to the expression of these receptors and that dietary modifications may affect the functions of the endocannabinoid system. Other studies have reported that mice under treatment with steviol glycosides show no weight gain compared to those under a regimen of sucrose or sucralose, which could be related to decreased expression of CB2 receptors in steviol glycosides-supplemented animals [25]. Likewise, it has been reported that the prolonged use of sweeteners such as sucralose or sucrose promotes hyperinsulinemia, an effect not observed with steviol glycosides, brown sugar or honey [26]. Furthermore, it has been shown that endocannabinoid-dependent functions are altered differentially by sex in mice under calorie restriction [7], a premise that is supported by the results obtained in this study, where there are clear differences in CB1 and CB2 expression in the spleen and thymus of male and female mice under supplementation with non-nutritive sweeteners. In adult rats differences in the endocannabinoid system are strongly influenced by hormonal factors, particularly derived from circulating levels of estradiol, resulting in higher overall production of endocannabinoids in female rats [27]. Moreover, stress exposure is another factor that enhances changes in endocannabinoid and corticosterone levels and it has a more pronounced effect in males [27].

Results from the present study show that, although there were no significant differences in the number of CB1+ or CB2+ cells in the spleen and thymus among experimental groups, there was a trend for increased expression of both receptors in the spleen of female mice, compared to male animals. Increased numbers of CB receptor positive cells on female mice could be related to differences in production of hormones, inflammatory status, stress or changes in eating behavior related to differences in energy metabolism and fat accumulation. Nevertheless, these changes are not related to sweetener consumption, since the highest amount of positive cells was seen in control groups.

Regarding the expression of these receptors as measured by their mean fluorescence intensity, there are significant differences in animals supplemented with non-nutritive sweeteners compared to unsupplemented controls. Sucralose promoted an increase in CB1 expression in the spleen of both male and female

animals. In contrast, sucrose supplementation showed differential effects, decreasing CB1 expression in the spleen of female mice but increasing CB2 expression in male animals.

Research performed in humans has shown gender-related differences in expression of CB1 in different physiological situations, but the one thing these studies have in common is a state of obesity or adipose tissue accumulation [28]. Accordingly, our results from sucralose-supplemented animals suggest that non-nutritive sweeteners like sucralose indeed promote weight gain or adipose tissue increase in female mice. Although the analysis of weight changes or expression of CB receptors in adipose tissue were not objectives of this study, it would be interesting to follow up on these questions in subsequent investigations.

Interestingly, non-nutritive sweetener supplementation had different effects in the thymus. Sweetener supplementation appeared not to have significant effects in the expression of CB1 receptors in this organ. In contrast, sucralose supplementation induced a decrease in CB2 expression in male animals, whereas sucrose increased CB2 expression in both male and female animals. Previous research suggests that activation of CB2 receptors triggers migration of immune cells from primary to secondary organs [30]. Furthermore, recent studies show a relationship between apoptosis and sweetener intake, specifically for sucralose and steviol glycosides, which appeared to promote leukocyte apoptosis *in vitro*, suggesting that steviol glycosides performed this activity in order to promote anti-inflammatory responses [30].

Overall, the results suggest that frequent intake of non-nutritive sweeteners cause differential, sex-dependent alterations in the expression of CB1 and CB2 receptors in the spleen and thymus *in vivo*, even in relatively short periods of time. Interestingly, even though there were changes in CB1 and CB2 MFI among groups, the number of CB receptor positive cells did not change significantly. CB2 receptors in the spleen had higher expression in sucrose groups in male animals, suggesting a possible modulatory situation regulating inflammation due to sugar consumption, which has been previously reported in animal models and humans. However it would be necessary to analyze concentrations of inflammatory markers to establish a real relationship with this process.

It will be necessary to determine the specific cell types responsible for the observed changes to CB receptor expression as that is relevant to understand their possible physiological effects. This study represents a first approach to comprehend the effects of frequent non-nutritive sweetener intake on immune tissue and their possible consequences for human health.

7.1.8 Compliance with ethical standards

All experiments were performed with the international ethical standards and approved by the ethics committee of the authors' institution.

7.1.9 Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

7.1.10 References

[1] Rother K, Conway E, Sylvetsky A. How Non-nutritive Sweeteners Influence Hormones and Health. Trends in endocrinology and metabolism. 2018. 29(7): 455-467. 10.1016/j.tem.2018.04.010

[2] Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thanis CA, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature. 2014. 514**:** 181–186. 10.1038/nature13793

[3] Pearlman M, Obert J, Casey L. The association between artificial sweeteners and obesity. Curr Gastroenterol Rep. 2017. 19: 64. 10.1007/s11894-017-0602-9

[4] Azad MB, Sharma AK, de Souza RJ, et al. Association Between Artificially Sweetened Beverage Consumption During Pregnancy and Infant Body Mass Index. JAMA Pediatr. 2016. 170 (7): 662–670. 10.1001/jamapediatrics.2016.0301

[5] Ahmad SY, Friel JK, MacKay DS. The effect of the artificial sweeteners on glucose metabolism in healthy adults: a randomized double-blinded crossover clinical trial. Appl Physiol Nutr Metab. 2019. Epub ahead of print. 10.1139/apnm-2019-0359

[6] Yingkun N, Zhenyu W, Jing L, Xiuyun L, Huimin Y. Stevioside protects LPS-Induced acute lung injury in mice. Inflammation. 2013. 36(1): 242-250. 10.1007/s10753-012-9540-8

[7] Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. J Agric Food Chem. 2006. 54:785−789. 10.1021/jf0523465

[8] Rosales-Gómez CA, Martínez-Carrillo BE, Reséndiz-Albor AA. Chronic Consumption of Sweeteners and Its Effect on Glycaemia, Cytokines, Hormones, and Lymphocytes of GALT in CD1 Mice. BioMed Research International. 2018. e 1345282.10.1155/2018/1345282

[9] Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, et al. CB2 receptors in the brain: role in central immune function. British Journal of Pharmacology. 2008. 153(2): 240-251. 10.1038/sj.bjp.0707584.

[10] Ramírez-López M, Vázquez M. 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. 12(3): e0174307. 10.1371/journal.pone.0174307

[11] Alvheim A, Malde M, Osei-Hyiamad D, Lin Y, Pawlosky R, et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and indices obesity. Obes Silver Spring Md. 2012. 20(10): 1984-1994. 10.1038/oby.2012.38

[12] Watkins B, Kim J. The endocannabinoid system: directin eating behavior and macronutrient metabolism. 2015. 5:1506. doi: 10.3389/fpsyg.2014.01506
[13] Williams C. M, Kirkham T. C. Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. Psychopharmacology (Berl.) 1999 143 (3): 315–317. 10.1007/s002130050953
[14] Di Marzo V., Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. Nat. Neurosci. 2005. 8: 585–589. doi: 10.1038/nn1457
[15] Rom S, Persidsky Y, Cannabinoid receptor 2: Potential role in immunomodulaion and neuroinflammation. J Neuroimmune Pharmacol. 2013. 8:608. 10.1007/s11481-013-9445-9
[16] Basu S, Ditel B. Unraveling the complexities of cannabinoid receptor 2 (CB2) Immune regulation in health and disease. Immunol Res. 2011. 51(1): 26-38. 10.1007/s12026-011-8210-5.
[17] Boabula M, Rinaldi M, Carayon P, Carrillon C, Delpech B, et al. Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. Eur J Biochem. 1995. 232; 54-61. 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17910.x
[18] Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. Int Immunopharmacol. 2002. 2(1): 69–82. 10.1016/S1567-5769(01)00147-3
[19] Canabinodes y sistema inmune. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/55116/Claudia_Gonzalez.pdf
[20] Cervantes-Villagrana RD, Gonzalez-Espinosa C, Cruz-Martín del Campo S. Endocannabinoides e inflamación. Residente. 2011. 5(2): 127-135.
[21] Rahiman F, Pool J. The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. J. Immunoassay and Immunochem, 2013. 35:1, 26-36, 10.1080/15321819.2013.784197
[22] Bessler H, Djaldetti M. The impact of three commercial sweeteners on cytokine expression by mononuclears impelled by colon carcinoma cells. Int J Food Sci Nutr. 2019. 70(8): 970-76. 10.1080/09637486.2019.1605337
[23] Turcotte C, Blanchet M-R, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. Cell. Mol. Life Sci. 2016. 73(23): 4449-4470. 10.1007/s00018-016-2300-4
[24] Ruiz de Azua I, Cota D, Lutz B. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. J Clin Invest. 2017.127(11): 4148-4162. 10.1172/JCI83626
[25] Ting CH, Chi CW, Li CP, Chen CY, Differential modulation of endogenous cannabinoid CB1 and CB2 receptors in spontaneous and splice variants of ghrelin-induced food intake in conscious rats. Nutrition. 2015. 31(1): 230-235. 10.1016/j.nut.2014.06.008.

[26] Sánchez-Tapia M., Martínez-Medina J., Tovar-R A., Torres N., Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated Inflammatory pathways in adipose tissue of rats. Nutrients. 2019. 11(14): 880. doi.org/10.3390/nu11040880
[27] Craft R, Marusich J, Wiley J. Sex differences in cannabinoid pharmacology: A reflection of differences in the endocannabinoid system? Life Sci. 2013. 92(8-9): 476-481. 10.1016/j.lfs.2012.06.009
[28] Côté M, Matias I, Lemieux I, Petrosino S, Almerás N. et al. Circulating endocannabinoid levels, abdominal adiposity and related cardiometabolic risk factors in obese men. Int J Obes. 2007. 31(4): 692-699. 10.1038/sj.ijo.0803539
[29] Rieder-Amcaoglu S, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. Immunobiology. 2010. 215(8): 598-605. 10.1016/j.imbio.2009.04.001
[30] Stephens-Camacho NA, Valdez-Hurtado S, Lastra-Zavala G, Felix-Ibarra LI. Consumo de edulcorantes no nutritivos: efectos a nivel cellular y metabólico. Perspect Nutr Humana. 2018. 20:185-202. 10.17533/udea.penh.v20n2a06

7.1.11 Tables

Group	No. of spleen cells analyzed per group		No. of spleen cells analyzed per sample		No. of thymus cells analyzed per group		No. of thymus cells analyzed per sample	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Control	224	313	37.33 ± 5.88	51.0.± 18.48	343	264	57.17 ± 13.56	44.0 ± 18.68
Sucrose	215	274	36.0 ± 5.40	45.67 ± 6.34	389	301	64.50 ± 11.50	50.17 ± 7.57
Sucralose	212	239	35.33 ± 5.98	39.83 ± 12.25	327	306	54.50 ± 10.82	51.0 ± 5.59
Steviol glycosides	200	263	33.17 ± 8.03	43.83 ± 10.83	361	304	60.17 ± 14.77	50.67 ± 9.91

Table 1. Number of CB1 positive cells in spleen and thymus. Data is presented as mean ± S.D. n=6 mice/group/sex. M=male; F= female.

Group	No. of spleen cells analyzed per group		No. of spleen cells analyzed per sample		No. of thymus cells analyzed per group		No. of thymus cells analyzed per sample	
	M	F	M	F	M	F	M	F
Control	221	257	36.83 ± 11.44	51.0 ± 18.73	330	225	55.0 ± 5.47	37.67 ± 8.45
Sucrose	196	214	32.67 ± 5.75	35.67 ± 3.77	334	222	55.67 ± 6.89	37.0 ± 7.51
Sucralose	201	232	33.5 ± 3.73	38.67 ± 5.71	270	237	45.0 ± 8.44	39.50 ± 12.08
Steviol Glycosides	192	220	32.0 ± 2.45	36.67 ± 7.73	332	233	55.33 ± 11.38	38.83 ± 9.36

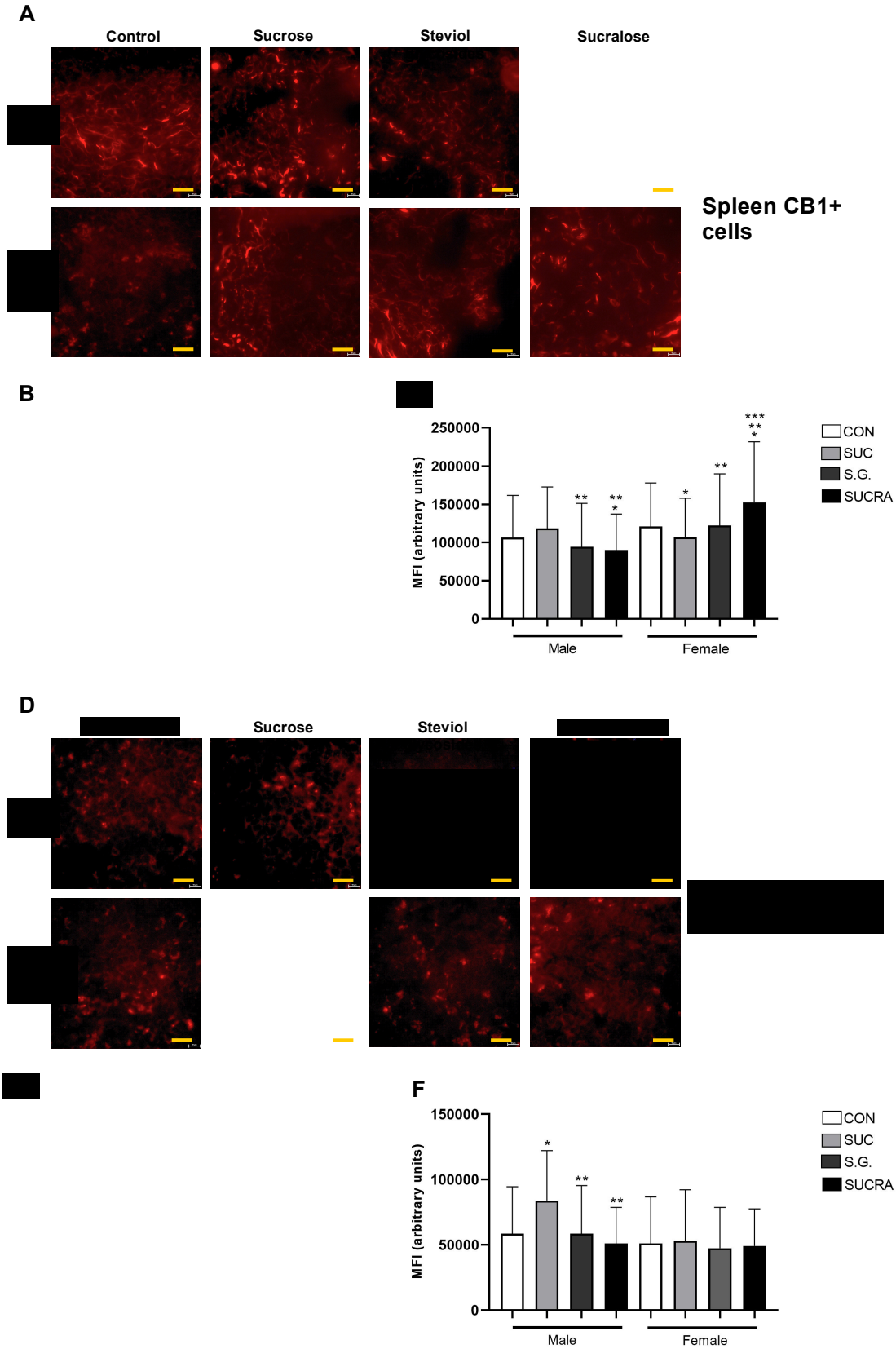
Table 2. Number of CB2 positive cells in spleen and thymus. Data is presented as mean ± S.D. n=6 mice/group/sex. M=male; F= female.

7.1.12 Figures legends and figures

Figure 1. CB1 and CB2 receptor expression in the spleen of sweetener-supplemented mice. A and D, Representative micrographs of 5 µm thick tissue sections stained for CB1 receptors, analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar=10 µm. **B and E,** Mean numbers of $CB1^+$ and $CB2^+$ cells observed per sample. **C and F,** Mean fluorescence intensity (MFI) for CB1 and CB2 receptors in all receptor positive cells analyzed. Data is presented as mean ± SD. n=6 mice/group/sex. *p<0.05 compared to control; **p<0.05 compared to sucrose; ***p<0.05 compared to steviol glycosides. CON=control; SUC=sucrose; S.G.=steviol glycosides; SUCRA= sucralose.

Figure 2. CB1 and CB2 receptor expression in the thymus of sweetener-supplemented mice. A and D, Representative micrographs of 5 µm thick tissue sections stained for CB1 receptors, analyzed by fluorescence microscopy. Scale bar=10 µm. **B and E,** Mean numbers of $CB1^+$ and $CB2^+$ cells observed per sample. **C and F,** Mean fluorescence intensity (MFI) for CB1 and CB2 receptors in all receptor positive cells analyzed. Data is presented as mean ± SD. n=6 mice/group/sex. *p<0.05 compared to control; **p<0.05 compared to sucrose; ***p<0.05 compared to steviol glycosides. CON=control; SUC=sucrose; S.G.=steviol glycosides; SUCRA= sucralose.

Figure 1.


A
Control
Sucrose
Steviol
Sucralose
Spleen CB1+ cells
B
MFI (arbitrary units)
250000
200000
150000
100000
50000
0
Male
Female
CON
SUC
S.G.
SUCRA
D
Sucrose
Steviol
F
MFI (arbitrary units)
150000
100000
50000
0
Male
Female
CON
SUC
S.G.
SUCRA

8. RESULTADOS ADICIONALES

8.1 Peso

Los resultados del análisis del peso de los animales experimentales muestran que tanto machos como hembras tuvieron una ganancia de peso constante durante toda la suplementación, situación que se encontró más acentuada en animales bajo tratamiento con sacarosa. La mayoría de los grupos de ratones machos presentó cambios significativos semana a semana (por ejemplo: semana 1: control 23.1 g ± 0.277 *vs.* glucósidos de esteviol 20.8 g ± 1.204; p=0.0188, y sucralosa 21.63 g ± 0.786; p= 0.0245). En la semana 4 del tratamiento se pueden observar cambios significativos en todos los grupos de ratones macho bajo tratamiento con edulcorantes, en comparación con el grupo control (control 24.2 g ± 0.2730 *vs*. sacarosa 25.26g ± 0.533; p=0.0169, glucósidos de esteviol 22.4 g ± 0.884; p=0.0153, y sucralosa 23.13 g ± 0.617; p= 0.0307). Para el término de la semana 6 estos cambios en el peso se mantuvieron estadisticamente significativos en los grupos bajo tratamiento de glucósidos de esteviol y sucralosa, comparados con el control (22.53 g ± 1.20; 23.56 g ± 0.483 *vs.* 24.96 g ± 0.370; p=0.0158 y p=0.0018 respectivamente). Asimismo, se observaron cambios significativos en el grupo suplementado con sacarosa (25.46 g ± 0.458) en comparación con los grupos de glucósidos de esteviol y sucralosa, pero no con el control (p=0.0070 y 0.0002, respectivamente) (Figura 3A).

En contraste, el peso de los ratones hembra no presentó cambios estadísticamente significativos entre grupos; sin embargo, si mantuvo la ganancia progresiva de peso esperada, como se puede observar en la figura 3B.

8.2 Consumo de agua y alimento

Como era esperado, existieron cambios en el patrón de alimentación de todos los ratones machos y hembras. En la primer semana de tratamiento se encontró una disminución del consumo de alimento en los animales macho que bebieron agua con sacarosa, demostrando significancia estadística en

comparación con el grupo control (2.23 g ± 0.569 *vs.* 2.85 g ± 0.573; p=0.0001) (Figura 3C). Los grupos suplementados edulcorantes no nutritivos igualmente presentaron variaciones en su alimentación, siendo visible una disminución en la semana 3 en el grupo sucralosa, comparado con el control (3.55 g ± 0.022 *vs.* 3.80 g ± 0.012; p=0.0001) (Figura 3C). Para el fin de tratamiento (semana 6) el grupo de sacarosa mantuvo un menor consumo de alimento comparado con el grupo control y el grupo de sucralosa (2.13 g ± 0.711 *vs.* 3.61 g ± 0.455; p= 0.019 y 3.80 g ± 0.068; p=0.0107) (Figura 3C).

En las hembras, los cambios se dieron de manera similar, siendo la semana 2 donde se encontró diferencia significativa entre los grupos control y glucósidos de esteviol comparados con el grupo de sacarosa (4.11 g ± 0.690 y 4.02 g ± 0.446 *vs.* 2.50 g ± 0.532; p=0.0075 y p=0.0017, respectivamente) (Figura 3D). Esta conducta que se mantuvo hasta el final del tratamiento (3.92 g ± 0.557 y 4.43 g ± 0.228 *vs.* 1.93 g ± 0.490; p=0.0004 y p=0.0001) (Figura 3D). Igualmente, esta disminución se mantuvo en los animales bajo tratamiento de sucralosa comparados con el grupo de sacarosa (4.23 g ± 0.797; p=0.0017) (Figura 3D).

Con relación al consumo de agua, contrario a lo anterior, el consumo incrementó en aquellos grupos suplementados con sacarosa, tanto en hembras (4.18 mL ± 1.29 control *vs.* sacarosa 10.87 mL ± 2.97; p= 0.0076) como en machos (2.92 mL ± 0.756 control *vs.* 8.87 mL ± 3.147 sacarosa; p= 0.0201). Estos cambios se mantuvieron durante todo el periodo de tratamiento (Figuras 3E y 3F).

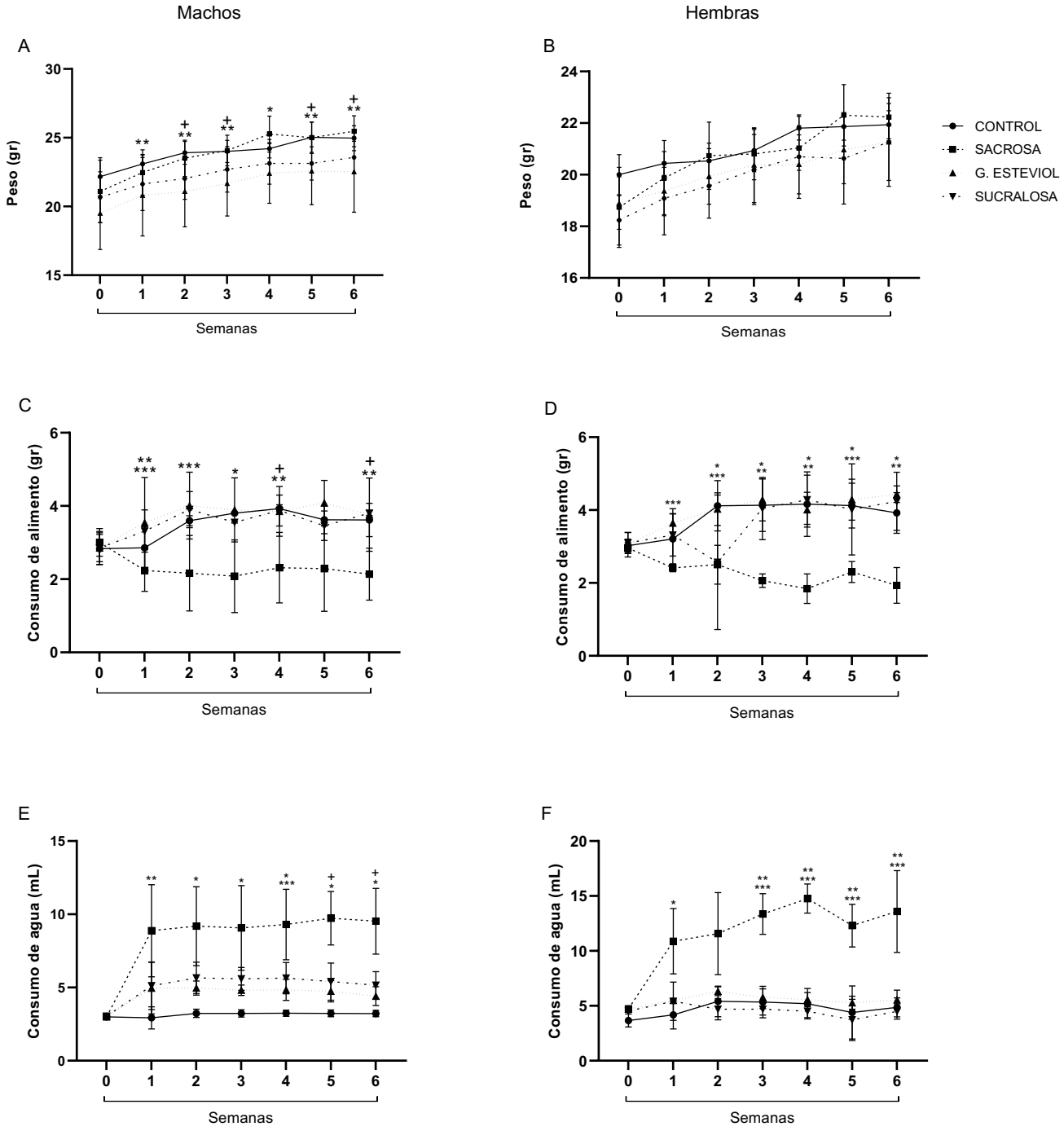

Machos
Hembras
A
B
C
D
E
F
Peso (gr)
Consumo de alimento (gr)
Consumo de agua (mL)
Semanas
CONTROL
SACROSA
G. ESTEVIOL
SUCRALOSA

Fig. 3 Cambios en el peso, consumo de agua y consumo de alimento en ratones suplementados con edulcorantes. A) *Cambios semanales en peso de ratones machos*. **B)** *Cambios semanales en peso de ratones hembras.* **C)** *Consumo de alimento de ratones machos.* **D)** *Consumo de alimento en ratones hembra. E) Consumo de bebida en ratones machos.* **F)** *Consumo de bebida en ratones hembra.* Los datos están expresados como media ± D.E. n= 6 ratones por grupo/sexo. *p<0.05 sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa comparados con el grupo control; **p<0.05 sucralosa y glucósidos de esteviol comparados con el grupo control; ***p<0.05 sacarosa y glucósidos de esteviol comparados con el grupo control; $^{+}$p<0.05 sucralosa y glucósidos de esteviol comparados con sacarosa; $^{++}$p<0.05 sucralosa y sacarosa comparados con el grupo control.

8.3 Ecpresión de receptores CB1 y CB2 en linfocitos CD3+.

Al analizar la expresión de los receptores CB1 y CB2 en células CD3^{+} positivas en el bazo y timo, se encontró que un número muy pequeño de células CD3+ mostraban co-localización con los marcadores seleccionados. Los resultados se muestras en las tablas 3 y 4.

	CONTROL	SACAROSA	G. ESTEVIOL	SUCRALOSA
No. de Linfocitos T CD3^{+}	**Machos**			
CB1^{+}	3	1	1	0
CB2^{+}	0	2	0	0
Hembras				
CB1^{+}	1	1	2	0
CB2^{+}	0	0	0	2

Tabla 3. Número de linfocitos T CD3^{+}/CB1^{+} o CD3^{+}/CB2^{+} en bazo de ratones machos y hembras suplementados con edulcorantes. Resultados del análisis por inmunofluorescencia para CD3 y CB1 o CB2 en 15-20 campos por muestra. Únicamente se tomaron en cuenta células que mostraran co-localización de ambos marcadores. Los datos están expresados como media. n= 6 ratones por grupo/sexo.

	CONTROL	SACAROSA	G. ESTEVIOL	SUCRALOSA
No. de Linfocitos T CD3$^+$	**Machos**			
CB1$^+$	8	6	1	8
$^+$CB2$^+$	9	6	9	0
Hembras				
CB1$^+$	1	0	1	2
CB2$^+$	1	8	5	1

Tabla 4. Número de linfocitos T CD3$^+$/CB1$^+$ o CD3$^+$/CB2$^+$ en timo de ratones machos y hembras suplementados con edulcorantes. Resultados del análisis por inmunofluorescencia para CD3 y CB1 o CB2 en 15-20 campos por muestra. Únicamente se tomaron en cuenta células que mostraran co-localización de ambos marcadores. Los datos están expresados como media. n= 6 ratones por grupo/sexo.Los datos están expresads en media. n= 6 ratones por grupo/sexo.

Adicionalmente, en las figuras 4 y 5 se pueden observar microfotografías representativas de cortes de bazo y timo de las células T CD3$^+$ positvas para los dos receptores.

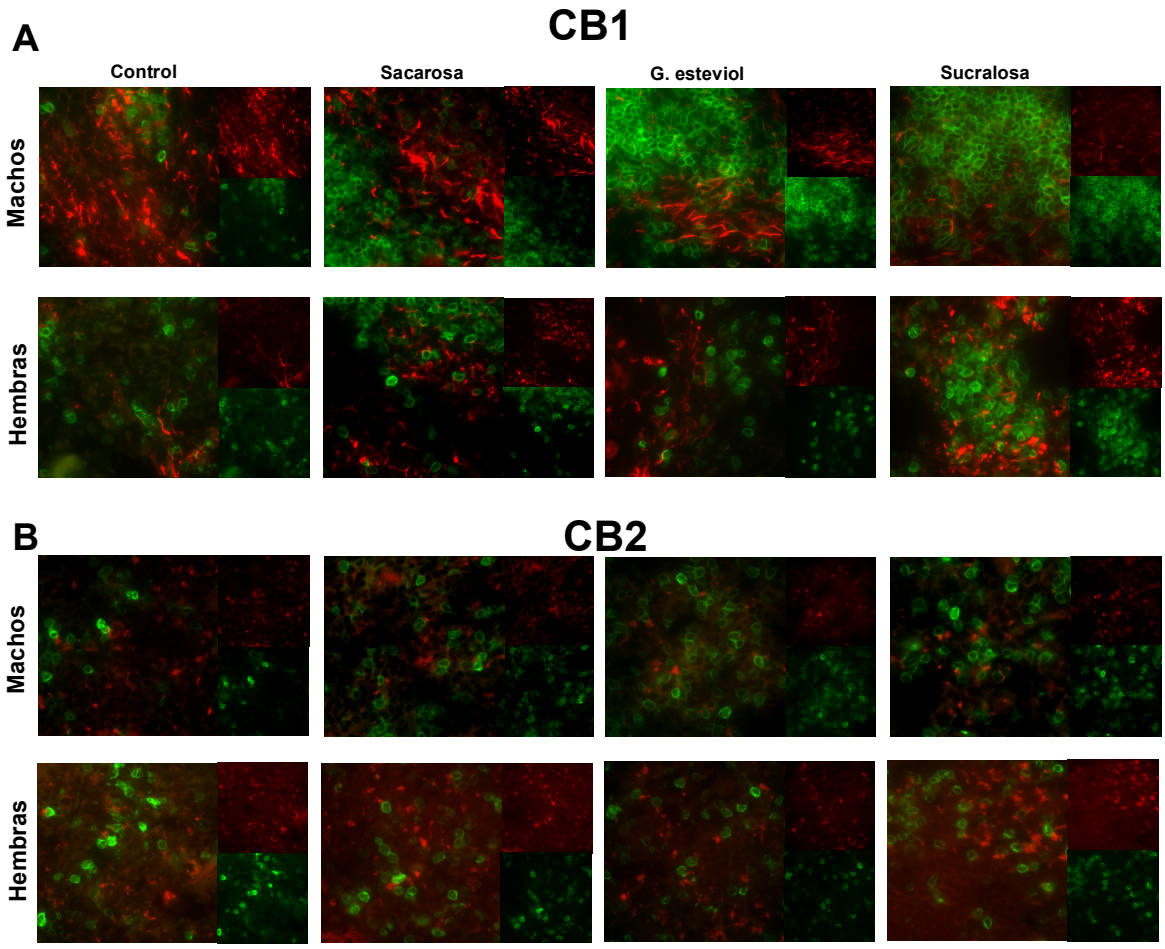


Figura 4. Tinción por inmunofluorescencia para células CD3$^+$ y receptores CB1 y CB2 en bazo de ratones suplementados con edulcorantes. A) Microfotografías representativas de la tinción para células CD3$^+$ (FITC, verde) positivas para el receptor CB1 (Alexa Fluor 647, rojo). **B)** Células CD3$^+$ (FITC, verde) positivas para el receptor CB2 (Alexa Fluor 647, rojo). Una fotografía representativa por grupo/sexo de cortes de bazo. Secciones de 5 µm de espesor. Objetivo 60X. 15-20 campos analizados por muestra.

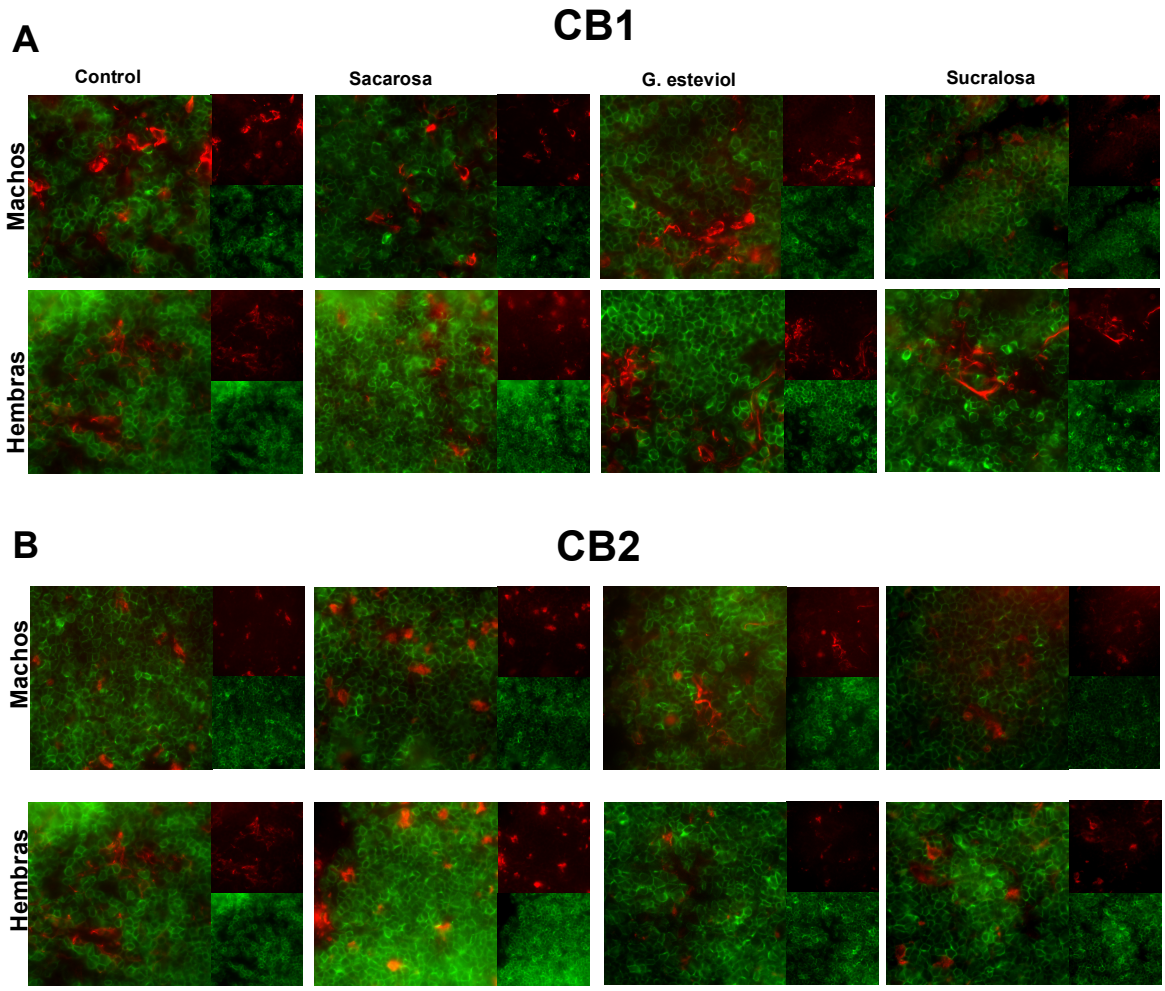


Figura 5. Tinción por inmunofluorescencia para células CD3$^+$ y receptores CB1 y CB2 en timo de ratones suplementados con edulcorantes. A) Microfotografías representativas de la tinción para células CD3$^+$ (FITC, verde) positivas para el receptor CB1 (Alexa Fluor 647, rojo). **B)** Células CD3$^+$ (FITC, verde) positivas para el receptor CB2 (Alexa Fluor 647, rojo). Una fotografía representativa por grupo/sexo de cortes de bazo. Secciones de 5 µm de espesor. Objetivo 60X. 15-20 campos analizados por muestra.

9. CONCLUSIONES GENERALES

9.1 Conclusiones

- Los ratones hembra suplementados con sucralosa mostraron una mayor expresión del receptor CB1 en bazo, mientras que en los machos este mismo grupo presentó menor expresión, comparados con los grupos control y los suplementados con glucósidos de esteviol.
- El grupo de ratones hembra bajo régimen de sacarosa mostró menor intensidad media de fluorescencia para el receptor CB1 en bazo en comparación con el grupo control y el grupo de glucósidos de esteviol, contrario a lo ocurrido con los machos, dónde el grupo de sacarosa mostró mayor intensidad de fluorescencia de dicho receptor comparado con el grupo de glucósidos de esteviol, pero no comparado con el control.
- La expresión del receptor CB2 fue de más alta en los grupos de ratones macho suplementados con sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol, en comparación con las hembras.
- En timo, la expresión del receptor CB2 fue igualmente mayor en machos de los grupos de glucósidos de esteviol y sacarosa, comparados con el grupo control.
- Los cambios de peso más significativos se dieron en los grupos de sacarosa, hembras y machos, mientras que los grupos de glucósidos de esteviol fueron más estables y sin fluctuaciones importantes.
- Los ratones que más edulcorante consumieron fueron aquellos en los grupos de sacarosa, hembras y machos; sin embargo, el consumo entre estos últimos fue mayor en hembras que en machos, mientras que los que menor bebida tomaron fueron los ratones machos suplementados con glucósidos de esteviol y las hembras suplementadas con sucralosa.
- Finalmente, el menor consumo de alimento se encontró en las hembras y machos bajo régimen de sacarosa, mientras que el mayor consumo se observó en machos y hembras bajo glucósidos de esteviol.

- Nuestros resultados sugieren que los edulcorantes pueden inferir tanto en la expresión de los receptores de endocanabinoides como en los patrones de alimentación y cambios de peso en un modelo murino.

9.2 Limitaciones

El hecho de que el consumo de agua y alimento sea *ad libitum* y se mantengan hasta 3 ratones en cada caja, condiciona a no saber con exactitud qué cantidad de alimento ingiere cada ratón por separado.

Por otra parte, los efectos que tiene la forma comercial del edulcorante sobre los animales de experimentación podrían ser distintos a los causados en modelos humanos, debido a la cantidad y forma en la que se ingieren.

Finalmente, se sugeriría utilizar técnicas más precisas para poder cuantificar de manera más certera la expresión de los receptores antes mencionados y así, poder inferir en las posibles consecuecias del uso de edulcorantes a nivel molecular.

10. REFERENCIAS

1. Cortes-Romero CE, Báez-Duarte BG, Zamora-Ginez I, Bilbao-Reboredo T, Cebada-Ruíz J, et al. Regulación de la ingesta de alimento: una aproximación al Sistema endocannabinoide. *VITAE.* 2015; 61(1):1-10.
2. https://www.fundacion-canna.es/sistema-endocannabinoide.
3. Cervantes-Villagrana R.D, González Espinosa C, Cruz Martín del Campo S.L. Endocannabinoides e inflamación. *Residente.* 2011; 5(2): 127-135.
4. Lu HC, Mackie K. An introduction to the endogenous cannabinoid system, *Biol Psychiatry.* 2016; 79(7): 516-25.
5. Svíženská I, Dubový P, Šulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures. A short review. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 90(4): 501-511.
6. Berdishev EV. Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids.* 2000; 108(1-2): 169–190.
7. Hanus L, Breuer A, Tchilibon S, Godenberg D, Horowtz M, et al. HU-308: A specific agonist for CB2, a peripheral cannabinord receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96(25): 14228-14233.
8. Bosier B, Muccioli GG, Hermans E, Lambert DM. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: therapeutic implications and opportunities. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(1): 1-12.
9. Kaplan BL. The role of cb1 immune modulation by cannabinoids. *Pharmacol Ther.* 2013; 137(3): 365-374.
10. Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish *J Am Chem Soc*. 1997; 93(1): 217-224.
11. Vázquez A. El sistema endocannabinoide como diana para reducir el riesgo cardiometabólico y la obesidad. *Clin Invest Arterioscl.* 2009; 21:151-156.
12. Matsuda L.A, Lolait SJ, Brownstein M. J, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990; 346 (6248): 561–564.

13. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 2002; 54(2): 161–202.
14. Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, et al. Expresion of central and periphereal cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur.J. Biochem.* 1995; 232(1): 54-61.
15. Malfitano AM, Basu S, Maresz K, Bifulco M, Dittel BN. What we know and do not know about the cannabinoid receptor 2 (CB2). *Semin immunol*. 2014; 26(5): 369-379.
16. Sastre B. Estudio neuropatológico y funcional del sistema endocannabinoide glial en procesos neuroinflamatorios. *Tesis Doctoral*. 2010 https://eprints.ucm.es/10761/.
17. Correa F, Mestre L, Molina-Holgado E, Árevalo-Martín A, Docagne F, et al. The Role of Cannabinoid System on Immune Modulation: Therapeutic Implications on CNS Inflammation. *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5(7): 671-675.
18. Bihua B, Jiang W, Foss-FJ, Naguib M. An overview of the cannabinoid type 2 (CB2) receptor system and its therapeutic potential. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2018; 31(4): 407–414.
19. Cabral GA, Ferreira GA, Jamerson M. Endocannabinoids and the immune system in health and disease. En: Pertwee RG Editor. Endocannabinoids. Springer 2015. pp 193-195.
20. Pandei R, Mousawy K, Nagarkatti P. Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacol Res* 2009; 60(2): 85-92.
21. Turcotte C, Blanchet MR, Laviolette M, Flamand N. The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cell Moll Life Sci.* 2016; 73(23): 4449-4470.
22. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 2(365): 61–65.
23. Grotenhermen F. Mini revisión: Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids.* 2006; 1(1):10-14.

24. Watkins BA, Kim J. The endocannabinoid system: directing eating behavior and macronutrient metabolism. *Front Pshychol.* 2016; 5:1506.
25. https://www.vademecum.es/principios-activos-rimonabant-a08ax01.
26. Londoño-Lemos ME. Tratamiento farmacológico contra la obesidad. *Rev Colomb Cien Quim Farm.* 2012; 41(2): 217-261.
27. Ruiz de Azua I, Cota D, Lutz B. Adipocyte cannabinoid receptor CB1 regulates energy homeostasis and alternatively activated macrophages. *J Clin Invest*. 2017; 127(11): 4148-4162.
28. Derocq JM. Genomic and Functional Changes Induced by the Activation of the Peripheral Cannabinoid Receptor CB2 in the Promyelocytic Cells HL-60 Possible Involvement Of The Cb2 Receptor In Cell Differentiation. *J Biol Chem*. 2000; 275(21): 15621-15628.
29. Scherma M, Fattore L, Castelli MP, Fratta W, Fadda P. The Role of the Endocannabinoid System in Eating Disorders: Neurochemical and Behavioural Preclinical. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(13): 2089-2099.
30. Alvheim A, Malde M, Osei-Hyiaman D, LinY, Pawlosky R et al. Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obes Silver Spring Md*. 2012; 20:1984-1994.
31. Harrold JA, Elliot JC, King PJ, Widdowson PS, Williams G. Downregulation of cannabinoid-1 (CB-1) receptors in specific extrahypothalamic regions of rats with dietary obesity: a role for endogenous cannabinoids in driving appetite for palatable food? *Brain Res.* 2002; 952(2): 232-238.
32. Chen IH, Cheng JT, Tong YC. Metabolic Syndrome Induced Bladder Cannabinoid Receptor Changes in the Fructose-Fed Rats. *Low Urin Tract Symptoms.* 2018; 10(2): 198-203.
33. Huerta-López J, Ortega-Martell JA, Vargas-Campuzano E, Alvrado-Velazquez IG. Cannabinoides: desde la ciencia a la controversia. *Alerg Asma Inmunol Pediatr.* 2017; 26(1): 16-20,
34. http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/edulcorantes_0.pdf.

35. García-Almeida JM, CasadoFdez-Gracia M, García-Alemán J. Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutr Hosp*. 2013; 28(l4):17-31.
36. Aldrete-Velasco J, López-García R, Zuñiga-Guajardo S, Riobó-Serván P. Análisis de la evidencia disponible para el consumo de edulcorantes no calóricos. Documento de expertos. *Med Int Méx.* 2017; 33(1): 61-83.
37. Feduchi E, Romero C, Yáñez E. *Bioquímica, conceptos esenciales*. Editorial Médica Panamericana. 2da Edición. 2015.
38. Durán S, Rodríguez MP, Cordón K, Record J. Estevia (stevia rebaudiana) edulcorante natural y no calórico. *Rev Chil Nutr.* 2012; 39(4): 203-206.
39. Durán S, Cordón K, Rodríguez MP. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Rev Chil Nutr.* 2013; 40(3): 309-314.
40. Yingkun N, Zhenyu W, Jing L, Xiyun L, Huimin Y. Stevioside Protects LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation* 2013; 36(1): 242-250.
41. Boonkaewwan C, Toskulkao C Vongsakul M. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(3): 785-789.
42. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of Stevioside and Rebaudioside A from Stevia Rebaudiana extracts by Human Microflora, *J. Agric Food Chem.* 2003; 51(22): 6618-6622.
43. Lavalle-González F. Metabolismo de los edulcorantes no calóricos, seguridad en su uso. http://www.enfasis.com/Presentaciones/FTSMX/2012/Summit/Mesa-Panel-Reduccion-Azucares-Fernando-Lavalle.pdf.
44. Sidibeh C, Pereira MJ, Börjesson L, Kamble P, Skrtic S, et al. Role of cannabinoid receptor 1 in human adipose tissue for lipolysis regulation and insulin resistance. *Endocrine.* 2017; 55(3): 839-852.
45. Notarnicola M, Tutino V, Tafaro A, Bianco G, Guglielmi E, et al. Dietary olive oil induces cannabinoid CB2 receptor expression in adipose tissue of ApcMin/+ transgenic mice. *Nutr Healthy Aging.* 2016; 4(1): 73–80.

46. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256427/B_sico-Ca_a_de_az_car.pdf.
47. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf.
48. De Aluja A. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) *Gac Méd Mex.* 2002; 138(3): 295-298.

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1. Carta de aceptación del proyecto de investigación por el comité de bioética

25 de noviembre de 2018

DR. JOSÉ ANTONIO ESTRADA GUADARRAMA
INVESTIGADOR PRINCIPAL

PRESENTE

Por este medio le envió un cordial saludo, y en respuesta a su Solicitud con fecha del 8 de Enero del año en curso de la Evaluación del Protocolo de Investigación **"EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE ENDOCANANABINOIDES CB1 Y CB2 EN LEUCOCITOS DE RATONES SUPLMENETADOS CON EDULCORANTES COMERCIALES"**, hago de su conocimiento que al cumplir con todas la especificaciones éticas, el Comité de Ética en Investigación dictamina como **APROBADO** el proyecto antes mencionado.

Sin otro particular agradezco su apoyo a la presente y le reitero mi atenta y distinguida consideración.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2018, Año del 190 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

M.A.M. RICARDO PAULINO JOSE GALLARDO DIAZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION

c.c.p. M. en S.P. Salvador Lopez Rodriguez/Director de la Facultad de Medicina
c.c.p. Archivo/JALA/DRM