



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

“Cambios en las cascadas de señalización implicadas en el sistema hambre-saciedad en el sistema nervioso central de ratones BALB/c relacionados a la ingestión por edulcorantes comerciales”

TESIS

Presenta:

Gerson Gabriel Contreras Chávez

Comité de Tutores

Director: Dra. Irazú Contreras García

Co-Director: Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Asesor: Dra. Ericka Nelly Pompa Mera

Toluca, Estado de México

2020

Aviso de autoría

Yo, **Gerson Contreras Chávez** autor responsable de la presente Tesis, la cual lleva como título “Cambios en las cascadas de señalización implicadas en el sistema hambre-saciedad, en el sistema nervioso central de ratones BALB/c relacionados a la ingestión de edulcorantes comerciales”, y en representación de los coautores:

- a) Ph.D. Irazú Contreras García**
- b) Ph.D. José Antonio Estrada Guadarrama**
- c) Dra. Ericka Nelly Pompa Mera**

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

Índice

Resumen	4
Abstract	
1. Antecedentes	6
1.1. Edulcorantes	6
1.1.1. Sacarosa	6
1.1.2. Sucralosa	7
1.1.3. Glúcidos de esteviol	7
1.2. Sistema hambre-saciedad	8
1.3. Edulcorantes y el sistema hambre-saciedad	9
1.4. Leptina	10
1.5. Vía de señalización JAK/STAT	11
1.6 Vía de señalización MAPK	13
1.7. Vía de señalización ERK 1/2	14
1.8. Vía de señalización JNK	15
2. Planteamiento del problema	18
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	21
5. Justificación	22
6. Material y métodos	23
6.1. Diseño de estudio	23
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	23
6.3. Procedimientos	24
6.3.1. Crianza de ratones BALB/c y suplementación con edulcorantes	24
6.3.2. Sacrificio de ratones y obtención de muestras del tejido cerebral y sangre periférica	24
6.3.3. Extracción de proteínas totales del SNC	25
6.3.4. Análisis de expresión de proteínas por Western blot	25
6.3.5. Análisis de proteínas por ELISA	27
6.4. Variables de estudio	27
6.5. Implicaciones Bioéticas	28
6.6. Análisis estadístico	28
7. Referencias bibliográficas	30
8. Anexos	33
8.1. Carta de envío de artículo	36
8.2. Resumen del artículo	37

Resumen

Los edulcorantes no calóricos proporcionan dulzor a los alimentos, aportando nula o muy poca energía. Estudios recientes demuestran una asociación entre el consumo de edulcorantes no calóricos y alteraciones en vías de señalización implicadas en el sistema hambre saciedad, principalmente en la vía JAK/STAT a nivel hipotalámico. Esta vía de señalización es activada por leptina y está estrechamente relacionada a la regulación de la ingestión de alimentos, gasto energético y conservación del peso corporal.

El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la suplementación dietética con sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol en la expresión de las proteínas STAT5/JAK2, ERK 1/2, JNK y SHP-2 totales y fosforiladas, en el cerebro de ratones. Para este fin, se emplearon 6 ratones hembras y 6 machos BALB/c de 8 semanas de edad, suplementados con los edulcorantes correspondientes, durante 6 semanas. Posteriormente, se utilizaron extractos totales de proteína del cerebro para analizar la expresión de las proteínas mencionadas por medio de western blot. Así mismo, se analizó la concentración sérica de las hormonas leptina y α -MSH por el método de ELISA.

Los resultados mostraron que el consumo de edulcorantes no calóricos produce cambios en las cascadas de señalización en el cerebro, ya que se observó una reducción en la expresión de las proteínas STAT5, pSTAT5, pERK 1/2, SHP-2, JNK y pJNK, en el cerebro de los ratones machos suplementados con glucósidos de esteviol. Así mismo, los ratones machos suplementados con sucralosa presentaron una disminución de la expresión de pSTAT5, mientras que en las hembras del mismo grupo se indujo un incremento en la expresión de las proteínas pSTAT5, pERK y SHP-2.

Estos resultados sugieren que el consumo frecuente de edulcorantes no calóricos, induce cambios en las vías de señalización relacionadas con el sistema hambre-saciedad en el cerebro de ratones de ambos sexos.

Abstract

Non-caloric sweeteners provide food with the sweet taste of sugar, providing little or no energy. Recent studies demonstrated an association between the consumption of non-nutritive sweeteners and alterations in the signaling pathways involved in the hunger-satiety system, mainly in the JAK/STAT pathway at the hypothalamic level. These signaling pathways are activated by leptin and are strongly related to the regulation of food intake, energy expenditure and body weight conservation.

The objective of this study was to determine the effects of dietary supplementation with sucrose, sucralose and steviol glycosides in the expression of total and phosphorylated STAT5/JAK2, ERK 1/2, JNK and SHP-2 proteins in the brain of mice, 8-week-old male and female BALB/c mice were used, which were supplemented with the corresponding sweeteners for 6 weeks, with a total of 6 mice per group, per sex. Subsequently, total brain protein extracts were used to analyze the expression of the aforementioned proteins by western blot. Serum concentrations of leptin and α -MSH were analyzed by the ELISA.

Our results showed that consumption of non-caloric commercial sweeteners produce changes in brain signaling pathways, since there was a reduction in the expression of STAT5, pSTAT5, pERK 1/2, SHP-2, JNK and pJNK in the brains of male mice supplemented with steviol glycosides. Similarly, male mice supplemented with sucralose presented a decrease in the expression of pSTAT5, while in females from the same group there was an increase in the expression of pSTAT5, pERK and SHP-2.

These results suggest that frequent consumption of non-caloric sweeteners induces changes in signaling pathways related to the hunger-satiety system in the brain of mice from both sexes.

1. Antecedentes

1.1. Edulcorantes

Los edulcorantes son aditivos alimentarios capaces de añadir un sabor dulce a alimentos y bebidas. Habitualmente se clasifican como nutritivos y no nutritivos, de acuerdo a la cantidad de energía que aportan. Algunos de ellos son extractos naturales, como azúcares (glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa), glucósidos de esteviol y edulcorantes naturales calóricos (miel, jarabes de palma, arce o coco). Otros son edulcorantes artificiales, como azucares modificados, alcoholes del azúcar, aspartame, sucralosa y acesulfame K (Tabla 1). El empleo de estas sustancias, añadidas a comidas y bebidas, puede tener impacto a nivel metabólico en el consumo de energía y el peso corporal ⁽¹⁾.

Tabla 1. Clasificación de edulcorantes. (Modificado de ⁽¹⁾).

Nutritivo	Azúcares	Sacarosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa.
	Naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco.
	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alta fructosa, caramelo, azúcar invertido.
No nutritivo	Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol, malnitol.
	Naturales no calóricos	Glucósidos de esteviol, taumatina, pentadina.
	Edulcorantes artificiales	Aspartame, sucralosa, sacarina, acesulfame K, neotame y adantame.

1.1.1 Sacarosa

Los azúcares son un tipo de hidratos de carbono (azúcares y almidones), la principal fuente de combustible del cuerpo. La sacarosa se puede encontrar como azúcar de mesa o naturalmente en frutas y verduras. El azúcar de mesa y otros azúcares estrechamente relacionados son hidratos de carbono simples, compuestos de moléculas cortas de carbono, hidrógeno y oxígeno, que aportan 4 kcal/g. Los azúcares son monosacáridos (fructosa,

galactosa o glucosa) o disacáridos (sacarosa, lactosa o maltosa). La sacarosa tiene un índice glucémico moderado-alto ⁽¹⁾.

1.1.2 Sucralosa

La sucralosa es un compuesto organoclorado polar con fórmula química 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-B-D-fructo-furonosil-4-cloro-4-desoxi-a-D-galactopiranosido. La potencia de dulzura de este producto químico es aproximadamente 600 veces mayor que la sacarosa y contribuye con poca o nada de energía a los productos en los que se incorpora. La aprobación de sucralosa para consumo humano se basó en estudios farmacocinéticos que sugirieron que la mayoría de la sucralosa ingerida por vía oral (65-95%) no se absorbía en el tracto gastrointestinal, sino que se excretaba sin cambios. Estudios adicionales concluyeron que la porción de sucralosa ingerida absorbida por el tracto gastrointestinal era excretada sin cambios en la orina como un conjugado glucurónico, sin dechloración o metabolismo degradativo ⁽²⁾.

Se ha demostrado que, en ratas, la sucralosa se metaboliza en compuestos que son menos polares y más lipofílicos que el compuesto original, reteniéndose por más tiempo. Además, la sucralosa se retiene en el tejido adiposo dos semanas después del cese de la ingestión del edulcorante. Estos hallazgos contradicen las afirmaciones presentadas previamente a las agencias reguladoras de que la sucralosa es un compuesto estable que no se metaboliza *in vivo* ⁽²⁾.

1.1.3 Glucósidos de esteviol

Los glucósidos de esteviol son responsables del dulzor de la planta *Stevia rebaudiana*, son identificados como esteviósido, esteviolbiósido, rebaudiósido A, B, C, D, E, F y dulcósido. Estos compuestos se encuentran en las hojas de la planta, alcanzando hasta 15% de su composición ⁽³⁾. Los glucósidos de esteviol son de 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa. Las estimaciones de la exposición dietética a los ingredientes derivados de la estevia se encuentran dentro de la IDA (ingesta diaria admisible) del JECFA (comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivo alimentarios) de 4 mg/kg/día ⁽⁴⁾.

Los glucósidos de esteviol producen una concentración plasmática máxima de 0.2 nM de esteviol, el cual es absorbido completamente en el intestino grueso y excretado por los sistemas renal y biliar. Después de la ingestión oral de glucósidos, el esteviol es el principal metabolito que se encuentra en la circulación sanguínea. Sustituir azúcares con edulcorantes no nutritivos, como los glucósidos de esteviol, puede provocar una disminución de 380 Kcal/día, equivalentes a 1 libra de peso corporal en 9-10 días ⁽⁵⁾.

1.2. Sistema hambre-saciedad

El comportamiento de alimentación es un proceso complejo. Incorpora necesidades homeostáticas, placer hedónico y procesos cognitivos superiores. Los animales comen para satisfacer sus necesidades homeostáticas de energía y seleccionan alimentos para satisfacer sus necesidades de nutrimentos que no pueden ser biosintetizados. En el sistema nervioso central (SNC), los sistemas homeostáticos y hedónicos procesan la información transmitida desde la periferia, que tiene como objetivo satisfacer las necesidades corporales y detectar la naturaleza de los alimentos (ya sean alimentos ingeridos o alimentos para ingerir) y utilizan esta información para controlar la alimentación. Los animales determinan sus comportamientos de alimentación basándose en la integración de señales externas (como el olfato y el gusto), señales internas, que reflejan el estado metabólico interno y las necesidades homeostáticas (como nutrimentos y hormonas), la motivación y la experiencia ^(6, 7).

Una vez que los alimentos ingresan en el tracto gastrointestinal, los efectos post-ingestión están mediados por factores nutricionales y humorales que responden a los nutrimentos digeridos. La información nutricional post-ingestiva se transmite desde el intestino al cerebro a través de dos vías: la neural y la humoral ⁽⁶⁾.

La vía neural está mediada por los aferentes vagales que inervan el tracto gastrointestinal y la vena porta hepática ^(8, 9). Los aferentes vagales son estimulados por nutrimentos, hormonas y el estiramiento mecánico de los intestinos inducido por la comida. Posteriormente, la transmisión neural vagal activa el núcleo del tracto solitario (NTS) en el tronco cerebral, cuya activación es relevante para la saciedad. El NTS se transmite a otros núcleos del SNC, que son importantes para la regulación de la alimentación, como el

núcleo parabrachial (PBN), el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo arqueado (ARC) del hipotálamo ⁽¹⁰⁾.

La vía humoral está mediada por nutrientes y hormonas. Los componentes básicos de los macronutrientes, como la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos, pueden servir directamente como señales nutritivas para el cerebro ⁽¹¹⁾. Los nutrientes también afectan la liberación de varias hormonas que son importantes para la regulación de la alimentación, como la leptina, la insulina y la ghrelina ⁽¹²⁾.

En el hipotálamo, son sintetizados dos neuropéptidos cuyo efecto central resulta ser la regulación del apetito. El neuropéptido Y (NPY) tiene potencial orexígeno, es sintetizado, en el núcleo arqueado. Su acción es en el núcleo paraventricular, donde estimulará y potenciará la ingestión de alimentos y con ello, la ganancia de peso ⁽¹³⁾. La hormona estimulante de los melanocitos alfa (α MSH), es un péptido derivado de la pro-hormona proopiomelanocortina (POMC) ^(13,14). Las neuronas POMC, en el hipotálamo, son importantes en la regulación del metabolismo energético. La actividad de estas neuronas aumenta en condiciones de alimentación, mientras que durante el ayuno, estas neuronas son silenciadas. Las neuronas POMC están reguladas por varias señales circulantes, como las concentraciones de leptina e insulina. La activación de las neuronas POMC por la leptina desencadena la producción y liberación de MSH- α desde las terminales axónicas de POMC, que a su vez activan los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R), que conducen a una supresión en la ingestión de alimentos y un aumento en el gasto energético ⁽¹⁴⁾.

1.3. Edulcorantes y el sistema hambre-saciedad

El consumo de edulcorantes no calóricos es una práctica cada vez más común en la población general, como un medio para disminuir la ingestión de energía de la dieta; sin embargo, la evidencia ha puesto a prueba el supuesto de que los edulcorantes no calóricos favorecen la pérdida de peso y ayudan en el control del apetito en las personas que necesitan reducir el consumo de azúcar. En la actualidad, no existe evidencia suficiente del efecto que puede tener el consumo de estos compuestos y la repercusión en la salud del consumidor, además de su relación con el sistema hambre-saciedad ⁽¹⁵⁾.

Diversos estudios realizados en humanos y en modelos murinos suplementados con edulcorantes muestran resultados opuestos. Estudios en humanos han reportado que la suplementación con aspartame aumenta el consumo energético ⁽¹⁴⁾. En otro estudio de ratones suplementados con sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol, no se encontraron diferencias en los niveles de saciedad y consumo energético, mientras que en ratones se ha descrito que la suplementación con sacarina incrementa el apetito y una ganancia de peso a expensas del tejido adiposo ⁽¹⁵⁾. Así mismo, se reportó que la suplementación con sacarina y aspartame favorece el aumento de peso, sin estar relacionado con el consumo de alimento ⁽¹⁶⁾. Se ha reportado un aumento de peso, triacilglicéridos séricos y la fracción de hemoglobina glicosilada A1c en ratas suplementadas con sucralosa, en comparación con aquellas suplementadas con miel ^(17, 18). El consumo de fructosa se relaciona con el desarrollo de obesidad, dislipidemias, hipertensión arterial, hiperinsulinemia, esteatosis hepática no alcohólica y resistencia a la insulina ⁽²²⁾.

Por otra parte, un estudio realizado con ratas suplementados con sucralosa demostró cambios significativos en la actividad de neuronas positivas para c-Fos en el hipotálamo y el hipocampo ⁽²³⁾. Además, un estudio realizado recientemente por este grupo de investigación en ratones BALB/c, demostró que la ingestión crónica de edulcorantes comerciales provoca cambios en la vía de señalización JAK2/STAT3 (quinasas Janus/transductor de señal y activador de proteínas de transcripción) en el cerebro, la cual está relacionada con el control del apetito y el balance energético. La ingestión de sacarosa indujo un aumento en el peso y la adiposidad, a expensas de un consumo menor de energía en hembras y un incremento en la expresión de pSTAT3 en machos. Los ratones machos suplementados con sucralosa tuvieron un incremento de peso y disminución en el consumo de energía, en comparación con el grupo control. Finalmente, la suplementación con glucósidos de esteviol redujo el consumo energético y el peso en animales de ambos sexos, así como un incremento en la expresión de JAK2 y pSTAT3 ⁽²⁴⁾.

1.4. Leptina

Es una proteína producida en el tejido adiposo. Una vez que es secretada a la circulación, la leptina viaja al cerebro, donde actúa uniéndose y activando el receptor de leptina (ObR), que se expresa principalmente en subconjuntos especializados de neuronas hipotalámicas y

del tallo cerebral. Las funciones en las que está implicada la leptina son: regulación del balance energético, reproducción, hematopoyesis, angiogénesis, ontogénesis e inflamación. La respuesta de la leptina al balance energético está regulada por la vía de señalización JAK2/STAT3 a nivel hipotalámico, la cual se explicará con detalle más adelante ⁽²⁵⁾.

Existen diversos tipos de receptores de leptina en el organismo, los cuales han sido identificados en cerebro, corazón, hígado, intestino, ovarios, páncreas riñones y testículos. Las isoformas del receptor tienen un dominio extracelular idéntico, localizado en el extremo amino terminal, donde la leptina reconoce el sitio de unión. Sin embargo, difieren en su porción carboxiloterminial. Las isoformas a-f poseen dominios transmembranales; únicamente ObRb contiene un segmento intracelular necesario para la activación de cinasas (JAK-2) ⁽²⁵⁾.

En el SNC, a nivel hipotalámico, el núcleo arqueado presenta una expresión mayor de ObRb, el cual es el receptor largo para leptina y es el principal sitio de acción de la leptina. El núcleo arqueado comprende dos poblaciones de neuronas blanco de la leptina: la primera forma parte de la vía orexigénica y está constituida por neuronas NPY y AGRP (proteína r-AGouti). La segunda población de neuronas forman parte de la vía anorexigénica, está formada por neuronas POMC y su sub-producto MSH- α , que libera CART (transcrito regulado por cocaína y anfetamina) ⁽²⁵⁾.

1.5. Vía de señalización JAK/STAT

La vía de señalización JAK/STAT es una cascada pleiotrópica usada para transducir señales para el desarrollo y homeostasis en diversos organismos. Es el principal mecanismo de señalización para un amplio número de factores de crecimiento. La activación de JAK estimula la diferenciación, la proliferación celular, la migración celular y la apoptosis. Estos procesos son críticos para la hematopoyesis, desarrollo celular y adipogénesis ⁽²⁶⁾.

La vía JAK/STAT es estimulada por la interacción de ligandos con sus receptores, causando la activación del receptor y transfosforilación de moléculas JAK asociadas a receptores. Ésta conduce a la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores y la fosforilación de las moléculas de señalización “*downstream*” STATs ^(27, 28, 29). La familia de las JAK está formada por JAK1, JAK2, JAK3 y Tyk2, se han descrito 7 clases de STAT:

STAT1-5, 5A, 5B y STAT6. STAT3 y STAT5 tienen papeles importantes en la regulación del apetito y balance energético ⁽³⁰⁾. En la figura 1 se muestra la representación de la vía de señalización JAK/STAT.

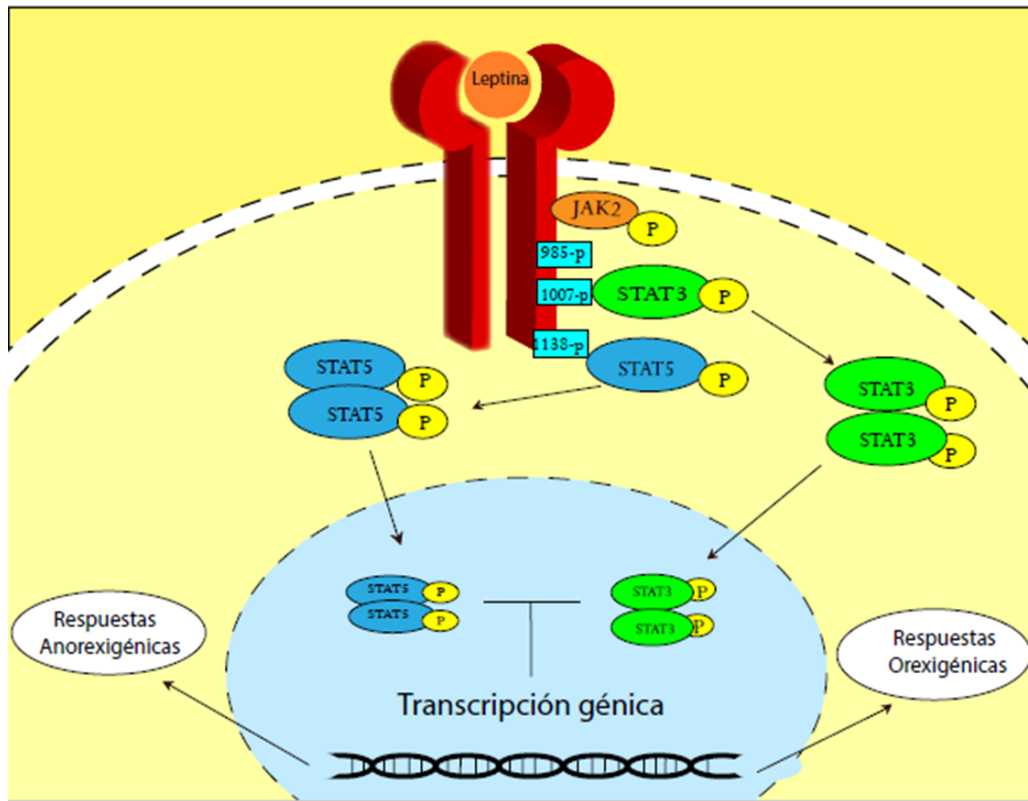


Figura 1. Vía de señalización JAK/STAT. La vía de señalización es estimulada por la interacción de ligandos (citocinas, hormonas u otros factores) con sus receptores, causando la activación del receptor y fosforilación de moléculas JAK asociadas a receptores. Esta conduce a la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores y la fosforilación de las moléculas de señalización STAT (Modificado de ⁽²⁷⁾).

La leptina participa en el sistema hambre-saciedad mediante la vía de señalización JAK/STAT en el hipotálamo. Una vez que la leptina se une con el receptor ObRb, se produce la autofosforilación de JAK2, misma que a su vez se encarga de fosforilar los residuos Tyr985, Tyr1077, Tyr1138, los cuales están asociados a la porción intracelular del receptor ObRb. STAT3 se une al residuo Tyr1138 para ser fosforilado y formar homodímeros, los cuales se traslocarán al núcleo, donde fungen como factores de

transcripción. Estos factores son SOCS3 (Supresor de señal de citocinas 3) y POMC, que a su vez es el precursor de MSH- α , y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) ⁽³¹⁾ (Figura 1).

SOCS3 se encarga de modular la señalización de citocinas mediante un sistema de retroalimentación negativa. Para que se lleve a cabo la expresión SOCS3 es necesaria la fosforilación del residuo Tyr1138, su acción es dependiente del tiempo en el cual se mantienen fosforiladas las proteínas STAT3, esto indica que es necesaria la activación de las STAT3 para su transcripción. SOCS3 se encarga de inhibir la señalización leptina-STAT3, por lo cual, STAT3 modula su propia inhibición al inducir la expresión de SOCS3, que se une al residuo Tyr985 ⁽³²⁾.

La señalización de STAT5 se activa por diversos factores en el cuerpo, entre ellos la leptina ^(33, 34). La señalización de STAT5 en el cerebro se requiere para la regulación normal del balance de energía. Además, STAT5 ha sido sugerido como mediador en los efectos anoréxicos del factor estimulante de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el cual también puede regular la ingestión de alimentos ⁽³⁵⁾.

1.6. Vías de señalización MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos)

Las vías de señalización de MAP cinasas transducen señales extracelulares que regulan respuestas implicadas en la proliferación, diferenciación y muerte celular. Se han identificado tres grupos de MAP cinasas: las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las p38 MAP cinasas y las cinasas c-Jun NH₂-terminales (JNK). En general, ERK se activa mediante mitógenos y señales de diferenciación, mientras que p38 y JNK se activan mediante estímulos de estrés ^(36, 37, 38).

Las vías de las MAP cinasas comparten una estructura común, formada por tres proteínas cinasas de acción secuencial, incluida una MAP cinasa-cinasa (MAP2K o MKK) y una MKK cinasa (MAP3K o MKKK). El mecanismo canónico de la activación de la MAP cinasa está causado por la MAP2K, mediada por la fosforilación de un residuo tirosina ubicado en el bucle T de la MAP cinasa ⁽³⁹⁾. La secuencia de este residuo bucle es una característica particular de las MAP cinasas: Thr-Glu-Tyr (ERK); Thr-Gly-Tyr (p38); y

Thr-Pro-Tyr (JNK). Cada MAP2K, a su vez, se activa mediante la fosforilación de los residuos serina (Ser) o treonina (Thr) en el bucle T de MAP2K por uno o más miembros de la familia de proteínas MAP3K. La especificidad del sustrato de MAP2K y MAP3K, las interacciones de acoplamiento y las proteínas de andamios, definen las diferentes vías de MAPK^(39, 40).

Las MAP cinasas activadas transforman el estímulo externo en las respuestas fisiológicas correctas mediante la fosforilación de sustratos posteriores, incluidos los factores de transcripción, las proteínas del citoesqueleto, las proteínas involucradas en la traducción del ARNm y otras proteínas cinasas que contribuyen a la especificidad, la diversidad y la amplificación de estas cinasas⁽⁴¹⁾.

1.7. Vía de señalización de ERK 1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares)

ERK desempeña un papel importante en la regulación de la ingestión de alimentos y del equilibrio energético mediado por la leptina, y su actividad se limita principalmente a las neuronas POMC en el núcleo arqueado del hipotálamo⁽⁴²⁾. La interrupción de la señalización de ERK a través de la ablación específica de SH2-fosfatasa-2 (SHP-2), podría resultar en un fenotipo obeso y diabético e inducir la resistencia a la insulina, asociada con una mayor ingestión de alimentos, lo que indica que ERK está directamente involucrado en efectos anoréxicos y metabólicos. El bloqueo farmacológico de ERK en el hipotálamo reduce los efectos anoréxicos y reductores de peso de esta hormona, sin inhibir las vías STAT3 y PI3K⁽⁴³⁾.

La fosforilación de ObRb en Tyr985 recluta y activa la fosforilación SHP-2, facilitando la activación de MAPK/ERK^(44, 45). SHP-2 se une a Tyr985, lleva a cabo la fosforilación por JAK2 y se asocia con la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2)^(46, 47). Grb2 está involucrada en la activación de ERK1/2 a través de SOS1. La ruta de ERK también puede activarse mediante la unión directa de JAK2 y SHP-2, lo que sugiere que SHP-2 es necesaria para la activación de ERK mediada por leptina⁽⁴⁸⁾ (Figura 2).

Esta evidencia sugiere que la vía de señalización ERK está involucrada en la regulación del apetito y el metabolismo mediado por la leptina en el cerebro, así como otras funciones, como la reproducción. Sin embargo, es posible que los efectos sobre el metabolismo y la ingestión de alimentos estén mediados por SHP-2, que compite con SOCS3 por la unión con Tyr985^(47, 48) (Figura 2).

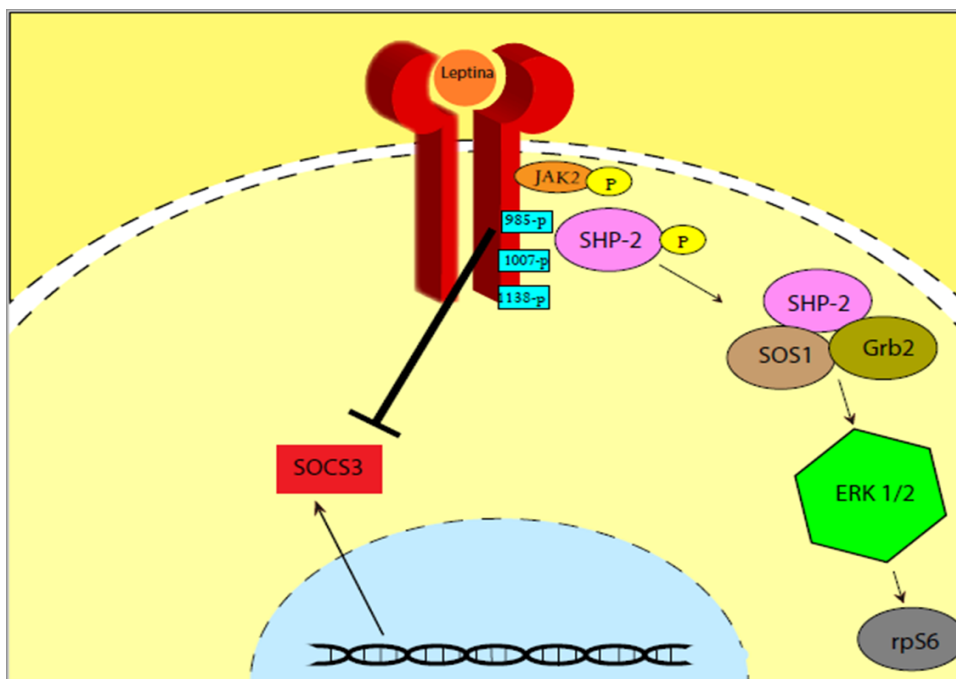


Figura 2. Vía de señalización ERK 1/2. Una vez que la leptina se une al receptor ObRb, promueve la activación de JAK2 y se produce la fosforilación de los residuos de tirosina, los cuales sirven como sitios de acoplamiento. De esta manera, se activan la vía de señalización de ERK. (Modificado de⁽³⁶⁾).

1.8. Vía de señalización de JNK (quinasas Janus)

JNK es una de las tres vías bien caracterizadas de señalización por MAPK. Transduce señales extracelulares para controlar procesos como la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la apoptosis⁽³⁸⁾. Cada una de estas vías MAPK se activa a través de una cascada de reacciones de fosforilación. En el caso de JNK, los miembros de la familia MAP3K fosforilan y activan las enzimas MAP2K (MKK4 y MKK7) que, a su vez, fosforilan y activan JNK. La activación rápida de la vía se ve facilitada por proteínas de

andamio, como la proteína 1 (JIP1), que interactúa con JNK (Figura 3). Por otro lado, la inactivación de la vía de JNK se produce por la defosforilación realizada por un grupo de fosfatasas⁽⁴⁹⁾.

Durante su activación, JNK puede fosforilar residuos de serina y treonina en sustratos de proteínas específicas. JNK deriva su nombre de su capacidad para fosforilar los residuos de serina en las posiciones 63 y 73 en el dominio amino-terminal del proto-oncogén c-Jun. Hay tres genes en la familia JNK (*Jnk1/Mapk8*, *Jnk2/Mapk9*, y *Jnk3/Mapk10*). Las isoformas JNK1 y JNK2 se expresan en la mayoría de las células del cuerpo, incluido el riñón, mientras que la expresión de JNK3 se limita al cerebro, el corazón y los testículos. La eliminación de los genes *Jnk1* y *Jnk2* causa letalidad fetal, mientras que la eliminación de *Jnk1* o *Jnk2* da como resultado ratones viables y sanos. El empalme alternativo del ARNm de estos tres genes da lugar a al menos 10 isoformas de enzimas JNK diferentes, que varían entre 46 y 55 KDa. La vía JNK se activa en respuesta a diversos estímulos^(49, 50).

Recientemente, se ha demostrado que la inhibición de JNK mejora las respuestas anorexigénicas dependientes de la leptina, a través de la activación de STAT3. La inhibición farmacológica de JNK conduce a un aumento de la fosforilación de STAT3 y la regulación a la baja de SOCS3 en ratones. La fosforilación de STAT3 a través de este mecanismo promueve la pérdida de peso en ratones delgados y evita la obesidad en ratones alimentados con una dieta alta en grasas. La exploración adicional del mecanismo molecular de la regulación de STAT3 dependiente de JNK indicó que, además de aumentar la fosforilación de STAT3, la inhibición de JNK también promueve la fosforilación de Akt^(51, 52, 53).

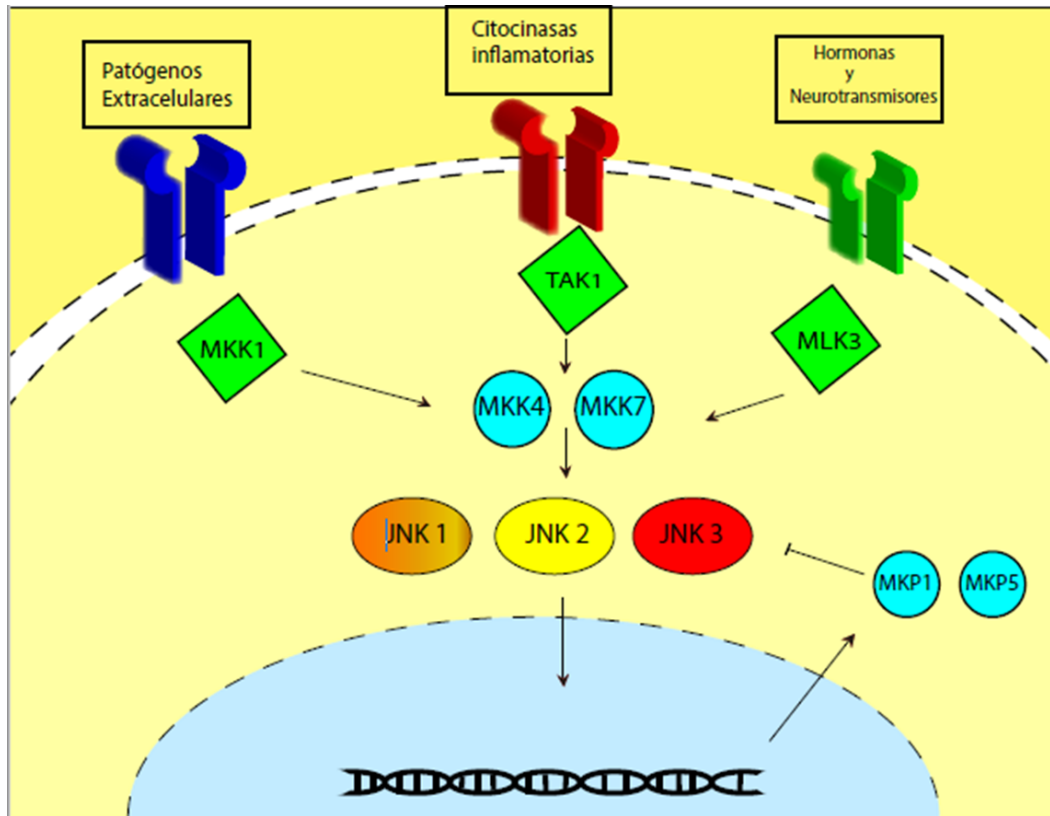


Figura 3. Vía de señalización JNK. La vía de señalización JNK se pueden activar por una amplia variedad de estímulos extracelulares e intracelulares. Estos fosforilan una variedad de sustratos citoplásmicos y nucleares y se involucran en los circuitos de retroalimentación directa (fosforilación de MAP3K) e indirecta (MKP1 y MKP5). [Modificado de ⁽⁵²⁾.]

2. Planteamiento del problema

Los edulcorantes son sustancias que proveen dulzor a los alimentos y bebidas. Se pueden clasificar como extractos naturales (azúcares, glúcidos de esteviol, taumatina), edulcorantes naturales calóricos (miel, jarabes de palma, arce o coco), edulcorantes artificiales (azúcares modificados, alcoholes del azúcar) y edulcorantes no calóricos (aspartame, sucralosa, glucósidos de esteviol y acesulfame K). Los edulcorantes no calóricos son aditivos alimentarios capaces de mimetizar el efecto dulce del azúcar; no aportan energía y no afectan las concentraciones de insulina y glucosa sérica.

Para el año 2003, el azúcar representaba 93.3% del total de consumo de edulcorantes en México; sin embargo, su consumo ha disminuido 2.7% en promedio anual desde 2011. En cambio, el consumo de edulcorantes no calóricos ha aumentado a una tasa anual promedio de 10.7% y actualmente ocupan el 5.5% del consumo total de edulcorantes en el país. El impacto a nivel metabólico y fisiológico que tiene el empleo de estas sustancias añadidas a los alimentos y bebidas es que pueden afectar al consumo de energía y el peso corporal.

Por otra parte, la leptina es una proteína producida en el tejido adiposo con numerosas funciones, incluidas la regulación del balance energético, la reproducción, la hematopoyesis, la angiogénesis, la ontogénesis y la inflamación, entre otras. La respuesta de la leptina al balance energético esta regulada principalmente por la vía JAK2/STAT3 a nivel hipotalámico. Esta vía de señalización es una cascada pleiotrópica usada para traducir señales para el desarrollo y homeostasis en humanos. Es el principal mecanismo de señalización para una gama amplia de citocinas y factores de crecimiento.

La activación de JAK/STAT estimula la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Estos procesos son críticos para la hematopoyesis, el desarrollo, la adipogénesis y la regulación del sistema hambre-saciedad. Estudios realizados por este grupo de investigación han demostrado que los edulcorantes calóricos y no calóricos inducen cambios en la señalización de la ruta JAK2/STAT3; no obstante, no se han estudiado los efectos de estos compuestos sobre otras rutas de señalización que están altamente implicadas en la regulación del hambre y la saciedad. Por ejemplo, ERK 1/2 está

involucrada en esta regulación y desempeña un papel importante en la regulación de la ingestión de alimentos y la regulación del equilibrio energético mediada por la leptina; su actividad se limita principalmente a las neuronas POMC en el núcleo arqueado del hipotálamo. Por otro lado, JNK participa en las respuestas anorexigénicas dependientes de la leptina a través de la activación de STAT3.

Considerando que la principal ruta de señalización involucrada en la regulación del hambre y la saciedad (JAK2/STAT3), se ve modificada por el uso de edulcorantes no calóricos, resulta de gran interés, conocer si las vías de señalización implicadas en el control del metabolismo energético, tales como JAK2/STAT5, ERK 1/2 y JNK, se ven modificadas por el uso de estos aditivos alimenticios. Hasta el momento, no hay estudios que demuestren el efecto del consumo de edulcorantes en estas vías de señalización en el SNC y su relación con el sistema hambre-saciedad, por lo que surge la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación

¿Qué efectos tiene el consumo de sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol en las cascadas de señalización JAK2/STAT5, ERK 1/2 y JNK, implicadas en la regulación del hambre-saciedad, así como en las concentraciones hormonales de leptina y α -MSH?

3. Hipótesis

Ha1. El consumo de sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa disminuye la expresión de JAK2, STAT5, ERK 1/2, SHP-2 y JNK en el SNC de ratones BALB/c.

Ho1. El consumo de sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa no disminuye la expresión de JAK2, STAT5 o ERK 1/2 o SHP-2 o JNK en el SNC de ratones BALB/c.

Ha2. El consumo de sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol está relacionado a un aumento en las concentraciones séricas de leptina y α -MSH de ratones BALB/c.

Ho2. El consumo de sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol no aumenta las concentraciones séricas de leptina y α -MSH de ratones BALB/c.

4. Objetivos

General

Evaluar el efecto de la ingestión de sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol, sobre la expresión de proteínas relacionadas con cascadas de señalización implicadas en el sistema hambre saciedad y sobre las concentraciones de leptina y α -MSH de ratones BALB/c.

Específicos

- Comparar y analizar la expresión de las proteínas totales y fosforiladas JAK2, STAT5, ERK 1/2 y JNK en tejido del SNC de ratones que hayan consumido sucralosa, glucósidos de esteviol o sacarosa por 6 semanas, con respecto a los niveles de expresión mostrados por el grupo control, sin consumo de edulcorantes.
- Comparar y analizar la expresión de SHP-2 en tejido del SNC de ratones que hayan consumido sucralosa, glucósidos de esteviol o sacarosa por 6 semanas, con respecto a los niveles de expresión mostrados por el grupo control, sin consumo de edulcorantes.
- Determinar las concentraciones séricas de leptina y MSH- α en los ratones suplementados con edulcorantes por seis semanas con respecto a los niveles de expresión mostrados por el grupo control, sin consumo de edulcorantes.

5. Justificación

El aumento en el consumo de edulcorantes no calóricos, como sustitutos de azúcar en la dieta, ha incrementado en los últimos años, aunado al incremento en la prevalencia de enfermedades metabólicas tales como obesidad, diabetes *mellitus* tipo II y síndrome metabólico, las cuales están relacionadas a muchos factores, entre los que se encuentran los genéticos, el exceso de consumo de alimentos energéticamente densos, el sedentarismo y los factores ambientales. El empleo de edulcorantes no calóricos añadidos a comidas y bebidas puede tener impacto a nivel metabólico, afectando tanto el consumo de energía como el peso corporal.

Debido a esto, es necesario conocer los efectos que el consumo de edulcorantes comerciales puede tener sobre el comportamiento alimentario en organismos vivos, ya que investigaciones recientes indican que estos compuestos pueden afectar el apetito y el metabolismo energético *in vivo*. Adicionalmente, estudios previos han demostrado que el consumo frecuente de edulcorantes puede afectar la activación de cascadas de señalización implicadas en la regulación de estos procesos fisiológicos en modelos animales, por lo que es de interés el estudiar los efectos del consumo frecuente de edulcorantes sobre las cascadas de señalización JAK/STAT, ERK y JNK, implicadas en el sistema hambre-saciedad. A pesar de que se ha identificado la vía de señalización leptina-JAK2/STAT3 como mecanismo principal para el balance energético, hasta ahora no se tiene suficiente conocimiento sobre los efectos que estos puedan alterar la salud del consumidor.

Esta investigación tiene como fin evaluar el efecto modulador de los edulcorantes comerciales sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol en las vías de señalización JAK2/STAT5, JNK y ERK 1/2, en el SNC, las cuales están estrechamente relacionadas a la regulación del sistema hambre-saciedad mediado por la leptina. Es de especial interés evaluar los cambios a nivel de otras vías de señalización y como afectan la regulación de las respuestas orexigénicas y anorexigénicas en el sistema hambre-saciedad. El conocimiento generado a partir de esta investigación será de gran utilidad para poder emitir recomendaciones mejor sustentadas sobre el uso de estos compuestos que son altamente utilizados por la población en general.

6. Materiales y métodos

6.1. Diseño de estudio

Tipo de estudio

Experimental, comparativo y prospectivo.

6.2. Tamaño de muestra

24 ratones BALB/c machos y 24 ratones BALB/c hembras, de 14 semanas de edad, distribuidos en 4 grupos experimentales (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de la muestra

Grupo control	6 ratones/sexo
Grupo glucósidos de esteviol	6 ratones/sexo
Grupo sucralosa	6 ratones/sexo
Grupo sacarosa	6 ratones/sexo

6.3. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios de inclusión: Ratones machos y hembras BALB/c de 8 semanas de edad, entre 18 y 22 g de peso.

Criterios de exclusión: Ratones que se encontraron por debajo del peso estipulado.

Criterios de eliminación: Ratones que murieron o presentaron alguna enfermedad.

6.4 Procedimientos

6.4.1. Crianza de ratones BALB/c y suplementación con edulcorantes

Se criaron ratones BALB/c en el Bioterio de la Facultad de Medicina, UAEMex, en condiciones de temperatura controlada de 22°C +/- 2 °C, en ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas. Se siguieron las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Los ratones tuvieron acceso libre a agua y alimento. Se formaron los grupos experimentales a las 8 semanas de edad de los ratones, a los cuales se les suplemento el edulcorante correspondiente en su agua durante 6 semanas. Se formaron 4 grupos de estudio, por sexo. Para el grupo control no se emplearon edulcorantes. Para el grupo sacarosa se utilizaron 10 g/100 mL de sacarosa en agua purificada. Para los grupos de sucralosa y glucósidos de esteviol, se emplearon las presentaciones comerciales de 1g/100 mL de cada edulcorante en agua purificada, las cuales contienen 0.012 g de sucralosa y 0.025 g de glucósidos de esteviol, respectivamente. Se evaluaron diariamente y a la misma hora la cantidad de agua y alimento ingeridos por los ratones de cada grupo. El proyecto fue aprobado por el comité de ética en investigación de la Facultad de Medicina de la UAEMex (Anexo I).

6.4.2. Sacrificio de ratones y obtención de muestras de tejido cerebral y sangre periférica

Transcurrido el periodo de suplementación, los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal con 50 µL de pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL) por cada 25 g de peso del ratón. Posteriormente, se extrajo sangre periférica mediante punción cardiaca. Las muestras de sangre se incubaron durante 35 minutos a 37° C. El coágulo sanguíneo se fragmentó mecánicamente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras a 900 G durante 25 minutos para la obtención de suero. Asimismo, se extrajo el cerebro a todos los ratones. Una vez obtenidos el cerebro y el suero separado, se congelaron a -80°C para su conservación y uso posterior.

6.4.3. Extracción de proteínas totales del SNC

La extracción de proteínas totales del SNC se llevó a cabo utilizando 500 µL de buffer de lisis (25 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 % de NP-40 y 5 %

de glicerol). Se homogenizó la muestra con la parte esmerilada de dos portaobjetos de vidrio. Una vez homogenizado el tejido, se agregó buffer de lisis. La muestra se incubó en hielo durante 45 min, agitando en vortex cada 15 min. Una vez transcurridos los 45 min, se centrifugó a 13,000 rpm durante 25 min. Al final, se recuperó el sobrenadante.

Se empleó el método de Bradford para la cuantificación de las proteínas. Para la curva estándar, se utilizó albumina bovina (BSA) (2 mg/mL) en concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mg/mL. Se preparó el reactivo de Bradford con agua destilada a una dilución de 1:4, según las especificaciones del producto; se preparó lo correspondiente a 200 μ L/pozo. En una placa de 96 pozos, se agregaron 5 μ L de los estándares de albumina por duplicado, dejando los dos primeros pozos como blanco. Se agregó 1 μ L de muestra por duplicado y se usó el buffer de lisis como blanco de buffer de lisis. Finalmente, se agregaron 200 μ L de mezcla de Bradford. La absorbancia fue leída a 590 nm en un espectrofotómetro.

Una vez obtenidos los resultados de concentración de proteína de cada muestra de tejido, se ajustó la concentración de proteínas a 4 μ g/ μ L. Se agregó buffer de carga (Anexo I) para completar un volumen de 100 μ L. Las muestras se calentaron durante 5 minutos a 95°C y se incubarán posteriormente 5 minutos en hielo.

6.4.4. Análisis de expresión de proteínas por western blot

El primer paso del método consiste en la preparación de gel de poliacrilamida (Anexo II). En el segundo paso se utiliza la electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Una vez que se ensambla la cámara de electroforesis, se llena con buffer de corrida. Los geles se cargaron en el siguiente orden: en el primer pozo, 5-6 μ L del marcador de peso molecular; en los siguientes pozos, se cargaron 60 μ g de proteína por muestra (previamente desnaturalizadas y centrifugadas).

Se dejó a voltaje constante de 100 V, hasta que el frente de corrida llegó al fondo del gel. Posteriormente, las proteínas separadas se transfirieron del gel a la superficie de una membrana de transferencia de fluoruro de polivinilideno (PVDF). Se hidrató la membrana en metanol absoluto durante 30 segundos y posteriormente se enjuagó con buffer de

transferencia (25 mM Tris, 192 nM glicina, 20% metanol) por 1 o 2 minutos. En la cámara de transferencia (llena con el buffer de transferencia), se colocó una esponja, 2 papeles filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de PVDF, 2 papeles filtro más y finalmente, otra esponja. Se dejó transferir a 60 mA (constante) durante toda la noche a 4°C.

Completada la transferencia, la membrana se enjuagó con buffer de lavado adicionado con Tween-20 (TBS-Tween) 0.1%. Las membranas se bloquearon con leche al 5% (baja en grasa) disuelta en TBS-Tween (5 g de leche por cada 100 mL de TBS-T), por una hora o toda la noche a 4°C, en agitación suave. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo primario específico contra las proteínas de nuestro interés pSTAT5 (CSB-PA877372, Cusabio Technology Llc), STAT5 (660202, Biolegend), pJAK2 (bs-,Bioss Antibodies), JAK2 (bs-2485R, Bioss Antibodies), pJNK (bs-2592R, Bioss Antibodies), JNK (bs-4163R, Bioss Antibodies), pERK 1/2 (675502, Biolegend), ERK 1/2 (686902, Biolegend), SHP-2 (bs-,Bioss Antibodies), en dilución 1:1,000, 1 h a temperatura ambiente o 4°C, en agitación suave, toda la noche. Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con TBS-Tween. Finalmente, las uniones de anticuerpos-proteínas se detectaron usando un anticuerpo secundario anti-rabbit IgG antibody (1:1,000) (31460, Thermo Scientific). Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con TBS-Tween. Por último, la membrana se reveló colocándola en una solución de revelado (150 µL de 3,3-Diaminobencidina (DAB) al 0.5% en PBS 1X y 30 µL de H₂O₂). Se colocó en agitación suave.

El control de carga se realizó con el anticuerpo para β-actina a una dilución 1:1,000, en agitación suave, toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con TBS-Tween. Finalmente, las uniones de anticuerpos-proteínas se detectaron usando un anticuerpo secundario anti-mouse IgG antibody (1:1,000) (Thermo Scientific). Se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno con TBS-Tween. Por último, la membrana se reveló colocándola en solución de revelado (150 µL de 3,3-Diaminobencidina (DAB) al 0.5% en PBS 1X y 30 µL de H₂O₂).

6.4.5. Análisis de proteínas séricas por ELISA Se emplearon reactivos comerciales para la cuantificación de las hormonas leptina y α-MSH en muestras de

suero. Las placas de microtitulación con 96 pocillos fueron recubiertas con anticuerpos anti-leptina o anti- α -MSH. Se agregaron 100 μ L de suero sanguíneo de ratón a los pozos y se incubaron durante 120 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de anticuerpo biotinilado anti-leptina ó anti- α -MSH y se dejó incubar 1 hr a temperatura ambiente. Posterior a esto, cada pocillo se lavó 3 veces con 300 μ L buffer de lavado (ANEXO II). Después, se agregaron 100 μ L estreptavidina-peroxidasa de rábano (HRP) en cada pocillo. La placa se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se realizaron 3 lavados más con 300 μ L de buffer de lavado. Se produjo una reacción enzimática mediante la adición de 100 μ L de tetrametilbenzidina (TMB), en cada pocillo; se incubó 10-15 minutos a temperatura ambiente en agitación constante. El sustrato TMB es catalizado por HRP lo que genera un producto de color azul que cambia a amarillo después de adicionar 50 μ L solución ácida de paro (HCl 0.3M) en cada pozo. Finalmente, la densidad de la coloración amarilla se midió por absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, dentro de los 20 minutos posteriores a la adición de la solución de paro, la cual es cuantitativamente proporcional a la cantidad de anticuerpo biotinilado en el pozo. Las concentraciones de las hormonas se determinaron utilizando la curva estándar que se incluye en cada kit comercial.

6.5. Variables de estudio.

Independientes: Consumo de los edulcorantes.

Dependientes: Expresión de las proteínas JAK2, STAT5, ERK 1/2, JNK, SHP-2, Leptina y

Variable	Definición Conceptual	Definición operativa	Tipo de variable	Escala	Análisis estadístico
JAK2	Proteína implicados en la vía de señalización JAK/STAT.	JAK2 total y fosforilada en el SNC.	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias	Kruskal-Wallis.
STAT5	Proteína implicados en la vía de señalización JAK/STAT.	STAT5 total y fosforilada en el SNC.	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias	Kruskal-Wallis.
ERK 1/2	Proteína implicada en la vía de señalización ERK.	ERK 1/2 total y fosforilada en el SNC.	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias	Kruskal-Wallis.
SHP-2	Proteína implicada en la vía de señalización ERK.	SHP-2 en el SNC.	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias	Kruska-Wallis.
JNK	Proteína implicada en la vía de señalización JNK.	JNK total y fosforilada en el SNC.	Cuantitativa Continua	Unidades arbitrarias	Kruskal-Wallis.
Leptina	Hormona encargada de la regulación del sistema hambre-saciedad.	Concentraciones séricas de Leptina, mediante ELISA	Cuantitativa continua	ng/mL	Kruskal-Wallis.
α -MHS	Hormona estimulante de melanocitos alfa, inhibe el apetito	Concentraciones séricas de α -MHS, mediante ELISA.	Cuantitativa continua	ng/mL	Kruskal-Wallis.

6.7. Análisis estadístico.

Se utilizaron pruebas de Kruskal-Wallis para datos con distribución no normal. Para evaluar diferencias entre grupos, se utilizó la prueba post-hoc Dunn-Bonferroni para datos con distribución no normal. Se emplearon estas pruebas para evaluar las diferencias entre los grupos de estudio, con ayuda de los programas IBM SPSS Statistics 22 y Prisma Graphpad 7.0. Los datos se presentan como mediana y rango intercuartil (Q_3-Q_1). Valores de $p < 0.001$ y $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos

7. Bibliografía

1. García-Almeida J, Casado-Fdez M, García-Alemán J. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*. 2013. 28 (Supl. 4): 17-31.
2. Bornemann V, Werness SC, Buslinger L, Schiffman SS. Intestinal Metabolism and Bioaccumulation of Sucralose in Adipose Tissue In The Rat. *J Toxicol Environ Health A*. 2018. 81(18): 913-923.
3. Gilabert J, Encinas T. De la stevia al E-960: un dulce camino. Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid. *Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos*. 2014. 6: 305-311.
4. González-Moralejo S. An approach to understand a potential natural sweetener, S. rebaudiana Bertoni: production, consumption, and potential demand. *Agroalimentaria*. 2011. 17:57–69.
5. Gupta R, Yadav V, Rastogi M. A review on importance of natural sweetener, a zero calorie plant-Stevia-having medicinal and commercial importance. *Int J Food Nutr Sci*. 2014. 3:89–94.
6. Sasaki T, Matsui S, Kitamura T. Control of appetite and food preference by nmda receptor and its co-agonist d-serine. *Int. J. Mol. Sci*. 2016. 17:E1018.
7. Basiri ML, Stuber GD. Multimodal signal integration for feeding control. *Cell*. 2016. 165:522–523.
8. Andermann ML, Lowell, B. Toward a wiring diagram understanding of appetite control. *Neuron*. 2017. 95: 757–778.
9. Brookes S, Spencer N, Costa M, Zagorodnyuk V. Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2013. 10: 286–296.
10. Sasaki T. Neural and Molecular Mechanisms Involved in Controlling the Quality of Feeding Behavior: Diet Selection and Feeding Patterns. *Nutrients*. 2017. 9 (10):1151.
11. Sasaki T. Age-associated weight gain, leptin, and sirt1: A possible role for hypothalamic sirt1 in the prevention of weight gain and aging through modulation of leptin sensitivity. *Front. Endocrinol*. 2015. 6:109.
12. Friedman J, Halaas, J. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998. 395(6704):763–770.
13. Gonzales E & Schmidt J. Regulation of dietary intake and energy balance; factors and mechanisms involved. *Nutr hosp*. 2012. 27(6):1850-9.
14. D'Agostino G, & Diano S. Alpha-melanocyte stimulating hormone: production and degradation. *Journal of molecular medicine*. 2010. (Berlin, Germany), 88(12), 1195–1201.
15. Sylvetsky AC, Rother KI. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav*. 2016 Oct 1;164(Pt B):446-450.
16. Gao S, Howard S, Lograsso PV. Pharmacological inhibition of c- Jun N-terminal kinase reduces food intake and sensitizes leptin's anorectic signaling actions. *Sci Rep*. 2017. 4:41791.
17. Lavin JH, French SJ, Read NW. The effect of sucrose- and aspartamesweetened drinks on energy intake, hunger and food choice of female, moderately restrained eaters. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997. 21(1): 37-42.

18. Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P., *et al.* Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010. 55(1):37–43.
19. Swithers S, Baker C, Davidson T. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral neuroscience*. 2009. 123(4):772–80.
20. Feijo M, Ballard CR, Foletto KC, Batista BA, *et al.* Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 2013. 60(1): 203-207.
21. Chepulis L. The Effect of Honey Compared to Sucrose, Mixed Sugars, and a Sugar-Free Diet on Weight Gain in Young Rats. *Journal of Food Science*. 2007. 72 (3): S224–S229.
22. Akram M, Hamid A. Mini review on fructose metabolism. *Obesity research & clinical practice*. 2013. 7(2): e89–e94.
23. de-la-Cruz M, Millán-Aldaco D, Soriano-Nava DM, Drucker-Colín R, Murillo-Rodríguez E. The artificial sweetener Splenda intake promotes changes in expression of c-Fos and NeuN in hypothalamus and hippocampus of rats. *Brain Res*. 1700:181-189 Chepulis, L., Starkey, N. (2008). The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and DEXA measurements in rats. *Journal of food science*. 2018. 73 (1):H1–7.
24. Barrios-Correa A, Estrada JA, Martel C, Olivier M, López-Santiago R, & Contreras I. Chronic Intake of Commercial Sweeteners Induces Changes in Feeding Behavior and Signaling Pathways Related to the Control of Appetite in BALB/c. *Mice. BioMed research international*. 2018. 3628121.
25. Allison M, Myers MJr. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 2014. 223(1):T25-35.
26. Rawlings J, Rosler K, Harrison D. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004. 117(Pt 8):1281-1283.
27. Ladyman S, Grattan D. JAK-STAT and feeding. *JAK-STAT*. 2013. 1;2(2): e23675.
28. Richard A, Stephens J. The role of JAK-STAT signaling in adipose tissue function. *Biochim Biophys Acta*. 2014. 1842(3):431-439.
29. Stephens J, Morrison R, Pilch P. The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1996. 271:10441- 4.
30. Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *The American journal of pathology*. 2004. 165(5), 1449-60
31. Ladyman S, Grattan DR. JAK-STAT and feeding. *JAK-STAT*. 2013. 2(2):e23675.
32. Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochemical Journal*. 2006. 393(Pt 1):7-20.
33. Gong Y, Ishida-Takahashi R, Villanueva E, Fingar D, Münzberg H, Myers M. The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms. *J Biol Chem*. 2007. 282, 31019-31027.
34. Hekerman P, Zeidler J, Bamberg-Lemper S, Knobelspies H, Lavens D, Tavernier J, *et al.* Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *Obesity (Silver Spring md.)*. 2005. 272:109-119.

35. Lee J, Muenzberg H, Gavrilova O, Reed J, Berryman D, Villanueva E, *et al.* Loss of cytokine-STAT5 signaling in the CNS and pituitary gland alters energy balance and leads to obesity. *PLoS One*. 2008. 3:e1639.
36. Barrios-Correa A, Estrada J, Contreras, I. Leptin signaling in the control of metabolism and appetite; Lessons from animal models. *J Mol Neurosci*. 2018. 66 (3): 390-402.
37. Nebreda AR, Porras A. p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci*. 2000. 25:257–260.
38. Manning AM, Davis RJ. Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov*. 2003. 2:554–565.
39. Sabio G, & Davis RJ. TNF and MAP kinase signaling pathways. *Seminars in Immunology*, 2014. 26 (3): 237–245.
40. Kyriakis JM, Avruch J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. 2012. 92:689–737.
41. Enslen H, Davis RJ. Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol Cell*. 2001. 93: 5–14.
42. Rahmouni K, Sigmund C, Haynes W, Mark A. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes*. 2009. 58 (3): 536–542.
43. Krajewska M, Banares S, Zhang EE, Huang X, Scadeng M, Jhala US, Feng GS, Krajewski S. Development of diabetes in mice with neuronal deletion of Shp2 tyrosine phosphatase. *Am J Pathol*. 2008. 172(5):1312–1324.
44. Carpenter L, Farruggella TJ, Symes A, Karow ML, Yancopoulos GD, Stahl N. Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95 (11):6061–6066
45. Banks, A., Davis, S., Bates, S., Myers, M. Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor. *J Biol Chem*. 2000. 275(19): 14563–14572.
46. Gualillo O, Eiras S, White DW, Diéguez C, Casanueva FF. Leptin promotes the tyrosine phosphorylation of SHC proteins and SHC association with GRB2. *Mol Cell Endocrinol*. 2002. 190 (1–2): 83–89.
47. Yin T, Shen R, Feng GS, Yang YC. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1997. 272 (2):1032–1037.
48. Qu Y, Chen Q, Lai X, Zhu C, Chen C, Zhao X, Deng R, Xu M, Yuan H, Wang Y, Yu J, Huang J. SUMOylation of Grb2 enhances the ERK activity by increasing its binding with Sos1. *Mol Cancer*. 2014. 13(1): 95.
49. Bode A, Dong Z. The functional contrariety of JNK. *Mol Carcinog*. 2007. 46, 591–598.
50. Avruch J. (2007). MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim. Biophys.* 2007. Acta 1773, 1150–1160.
51. Patterson KI, Brummer T, O'Brien PM, Daly RJ. Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J*. 2009. 418, 475–489.
52. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer*. 2009. 9, 537–549.

53. Zeke A, Misheva M, Reményi A, & Bogoyevitch MA. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. **Microbiology and molecular biology reviews MMBR**. 2016. 80 (3), 793-835.

8. Anexos.

Anexo I. Aprobación del comité de ética en investigación



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Oficio. Folio: 003/19

15 de marzo de 2019

Ph D. IRAZU CONTRERAS GARCIA
INVESTIGADOR PRINCIPAL

Por este medio le envié un cordial saludo, en respuesta a su Solicitud con fecha 25 de enero del año en curso para la evaluación del Protocolo de Investigación:

“CAMBIOS EN LAS CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL SISTEMA HAMBRE SACIEDAD EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATONES BALB/C RELACIONADOS A LA INGESTA DE EDULCORANTES COMERCIALES”

Hago de su conocimiento que al cumplir con las especificaciones requeridas, el *Comité de Ética en Investigación* dictaminó como **APROBADO** el proyecto antes mencionado.

Sin otro particular agradezco su apoyo a la presente y le reitero mi consideración a su labor como investigadora y educadora en bien de nuestra **Facultad de Medicina** dependiente de la **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

M.A.M. RICARDO PAULINO JOSÉ GALLARDO DÍAZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

c.c.p. M EN S.P. SALVADOR LÓPEZ RODRIGUEZ/DIRECTOR DE LA FACULTAD DE MEDICINA
c.c.p. Archivo



www.uaemex.mx

Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza
(01 722) 217 35 52/217 48 31/217 41 42
facmed@uaemex.mx

Anexo II: soluciones y buffers para el western blot

Formula Acrilamida/BIS 30%, 2.67%:

146 g de Acrilamida

4 g de N`N metilene-bis acrilamida

Formula de geles de poliacrilamida

Preparación del gel de corrimiento:

4.8 mL de agua destilada

2.5 mL de Tris 1.5 M pH 8.8

100 µL de SDS 10%

3.3 mL de Acrilamida/bis 30%, 2.67%

100 µL de APS 10%

25 µL de TEMED

Preparación de gel de apilamiento 4%:

6.1 ml de agua destilada

2.5 de Tris 0.5 M pH 6.8

100 µL de SDS 10%

1.33 mL de Acrilamida/bis 30%, 2.67

100 µLAPS 10%

25 µL de TEMED

Buffer de corrida 5X:

15 g de Tris base

72 g de glicina

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

Buffer de corrida 1X:

200 mL de buffer de corrida 5X

10 mL de SDS 10%
790 mL de agua destilada

Buffer de transferencia:

200 mL de Buffer de corrida 5X
200 mL de Metanol
600 mL de Agua destilada

TBS 10X:

80 g NaCl
24.2 g de Tris base
Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar pH a 7.6 con HCl y ajustar a un volumen final de 1L

TBS 1X-tween20

100 mL de TBS 10X
1 mL de Tween20 (0.001%)
899 mL de agua destilada

Tris 1.5 M pH 8.8:

18 g de tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8.8 con HCl y completar a 100 mL con agua.

Tris 0.5 M pH 6.8:

6 g de Tris base, disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y completar a 100mL con agua.

SDS 10%:

10 g de SDS, disolver en 70 mL de agua, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua destilada.

APS 10%:

1 g de persulfato de amonio en 10 mL de agua destilada. Guardar a 4°C.

Anexo III: Carta de aceptación de artículo científico

Fw: Decision on your manuscript #JOMN-D-20-00562R1 - [EMID:0883dcbbdf855d56]

From: em.jomn.0.6ebe42.957126da@editorialmanager.com <em.jomn.0.6ebe42.957126da@editorialmanager.com> on behalf of Journal of Molecular Neuroscience <em@editorialmanager.com>

Sent: Monday, October 19, 2020 9:36 AM

To: Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Subject: Decision on your manuscript #JOMN-D-20-00562R1 - [EMID:0883dcbbdf855d56]

Dear Dr Contreras:

We are pleased to inform you that your manuscript, "Changes in appetite regulation-related signaling pathways in the brain of mice supplemented with non-nutritive sweeteners" has been accepted for publication in Journal of Molecular Neuroscience.

For queries regarding your accepted paper, please click the following link <http://www.springer.com/12031>; then click on "Contacts", and then "Production Editor", complete the query form and click "Submit".

Please remember to always include your manuscript number, #JOMN-D-20-00562R1, whenever inquiring about your manuscript. Thank you.

Best regards,

Illana Gozes
Editor-in-Chief
Journal of Molecular Neuroscience

Anexo IV: resumen de artículo científico

Abstract:

Non-nutritive sweeteners (NNSs) are commonly used to prevent weight gain and development of metabolic diseases associated with consumption of high-energy diets. Although considered safe for human health, recent studies have demonstrated that these compounds may have unwanted detrimental effects under specific circumstances in vivo. In particular, an association between NNS consumption and changes in signaling pathways involved in the hunger-satiety system in the brain has been reported. Nonetheless, the extent of possible alterations in brain signaling pathways associated with frequent consumption of these compounds has not been determined. The objective of this study was to determine the effect of frequent consumption of NNSs on the expression of proteins involved in signaling pathways related to appetite control in the brain in vivo. 8 week-old BALB/c mice were supplemented with sucrose, sucralose or steviol glycosides in their daily drinking water for 6 weeks. Subsequently, total brain protein extracts were used to analyze the expression of total and phosphorylated JAK2, STAT5, ERK1/2, JNK, as well as SHP-2 and POMC, by western blot. Serum concentration of leptin and α -MSH were quantified by ELISA. The results showed that consumption of NNSs promotes significant changes in these signaling pathways, reducing the expression of STAT5, pSTAT5, pERK 1/2, SHP-2, JNK and pJNK in male mice supplemented with steviol glycosides. Similarly, male mice supplemented with sucralose showed decreased expression of pSTAT5. Furthermore, consumption of steviol glycosides induced a decrease in serum concentration of α -MSH in male mice. In contrast, steviol glycosides induced increased expression of pSTAT5, pERK and SHP-2 in females. These data suggest that chronic consumption of NNSs promotes changes in signaling pathways related to the central hunger-satiety system in vivo.

* Artículo aceptado para su publicación en Journal of Molecular Neurosciences. Octubre 2020