



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A CANNABINOIDES CB1 Y CB2
EN LOS ISLOTES PANCREÁTICOS EN UN MODELO DE SÍNDROME
METABÓLICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANTONIO BARAJAS MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS
DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR
DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Al apoyo incondicional de mi familia, que no puedo describir en palabras.

A mis profesores y alumnos, por la rica vida académica que me ha permitido la universidad.

A Karina Bermeo Mora por la enseñanza del modelo de dieta rica en sacarosa y la estimación de la composición corporal mediante bioimpedancia.

A la Dra. Lizbeth de la Cruz por su enseñanza en la técnica de cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos y electrofisiología.

A la Dra. Marina Martínez Vargas por su enseñanza en los métodos de biología molecular.

A Ricardo Martínez Tapia por su apoyo en el laboratorio y en las actividades académicas.

A Carolina Hernández Cruz y Luis Martínez García por su asistencia en el bioterio.

Este trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de Neuroendocrinología y de Biofísica de Membranas del departamento de fisiología de la Facultad de Medicina, que me acogieron como miembro del equipo de trabajo y me facilitaron todo cuanto fue necesario.

Antonio Barajas Martínez es un estudiante dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la beca 596756 del CONACYT. Este trabajo recibió los apoyos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216119, IA210120, IN228320, IG101520, AV100120, IN113619, PAPIME PE103519, FC-2015-2/1093 y CONACyT 255635. Agradecemos a la Escuela Militar de Graduados de Sanidad el acceso al equipo de microscopia multifotónica.

Tabla de contenido

<i>Agradecimientos</i>	2
<i>Índice de Figuras</i>	5
<i>Índice de Tablas</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	6
<i>Resumen</i>	7
<i>Antecedentes</i>	9
El síndrome metabólico	9
El síndrome metabólico en México.....	10
Etiopatogenia del síndrome metabólico	11
Modelos experimentales de síndrome metabólico	13
El sistema endocannabinoide	14
El síndrome metabólico y el sistema endocannabinoide.....	15
Los islotes pancreáticos	16
El sistema endocannabinoide en los islotes pancreáticos	17
Célula beta aislada	17
Célula alfa aislada.....	18
Célula delta aislada	18
Islotes pancreáticos completos.....	22
Efectos de los endocannabinoides en el organismo completo	26
<i>Planteamiento del problema</i>	27
<i>Pregunta de investigación</i>	27
<i>Hipótesis</i>	27
<i>Objetivo General</i>	27
<i>Objetivos Particulares</i>	28
<i>Metodología</i>	28
Inducción de síndrome metabólico	28
Determinación de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre.....	29
Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa	29
Prueba de sensibilidad a la insulina	29
Cuantificación de hormonas y citocinas.....	30
Bioimpedancia	30
Variables derivadas	30
Sistema endocannabinoide del islote pancreático	31
Extracción de islotes pancreáticos y cultivos celulares.....	31
Expresión de proteínas del sistema endocannabinoide	32
Centrifugación diferencial.....	33
Cuantificación de la expresión proteica mediante la técnica de Western-blot	34
Inmunofluorescencia	34
Análisis estadístico	35

Resultados	36
Inducción del síndrome metabólico mediante una dieta rica en sacarosa	36
Consumo de macronutrientes en una dieta rica en sacarosa	36
Cambios en la composición corporal inducidos por una dieta rica en sacarosa	37
Alteración de la regulación de la glucemia en el síndrome metabólico.....	42
Cambios en la expresión del sistema endocannabinoide de los islotes pancreáticos en el síndrome metabólico	44
Presencia de receptores 1 y 2 a cannabinoides. Diferenciación entre membranales y citosólicos	44
Cambios en la expresión de enzimas de síntesis y degradación del sistema cannabinoide	48
Expresión de los receptores CB1 y CB2 en cultivo primario.....	49
Cambios en la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en el síndrome metabólico.....	50
Efectos de la administración de agonistas y antagonistas selectivos CB1 y CB2 en la liberación de insulina de cultivos primarios	54
Discusión	55
Enzimas de síntesis.....	56
Receptores a cannabinoides CB1 y CB2	56
Enzimas de degradación	57
Efecto en la secreción de insulina	58
Participación de los receptores a cannabinoides en el síndrome metabólico	59
Conclusiones	60
Referencias	61

Índice de Figuras

Figura 1. El sistema endocannabinoide y la modulación de su señalización.	15
Figura 2. Modelo de inducción de síndrome metabólico	29
Figura 3. Metodología empleada	31
Figura 4. Consumo en el modelo de inducción de síndrome metabólico	36
Figura 5. Desarrollo temprano de síndrome metabólico	39
Figura 6. Validación de la técnica de bioimpedancia.....	40
Figura 7. Incremento de la adiposidad visceral y estado proinflamatorio.....	41
Figura 8. Alteración de la homeostasis de la glucosa en el síndrome metabólico.....	43
Figura 9. Validación de la técnica de centrifugación diferencial.....	44
Figura 10. Validación del método de normalización con rojo S de Ponceau.....	45
Figura 11. Validación de anticuerpos y método de centrifugación diferencial en tejidos periféricos	46
Figura 12. Medición del diámetro de los islotes y los tipos celulares.....	47
Figura 13. Expresión de la enzima de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD.....	48
Figura 14. Expresión de enzimas de degradación MAGL y FAAH.....	49
Figura 15. Expresión de receptores clásicos a cannabinoides en células aisladas de cultivo primario de islotes pancreáticos	50
Figura 16. Regulación diferencial de la expresión membranar de receptores clásicos a cannabinoides en el síndrome metabólico.....	52
Figura 17. Regulación diferencial de la expresión citosólica de receptores clásicos a cannabinoides.....	53
Figura 18. Efectos en la liberación de insulina de células aisladas en cultivo primario de islotes pancreáticos por agonistas y antagonistas CB1 y CB2.....	54

Índice de Tablas

Tabla 1 Definiciones operacionales de síndrome metabólico.....	12
Tabla 2 Presencia de componentes del sistema endocannabinoide en células aisladas de los islotes pancreáticos	20
Tabla 3 Efectos de los endocannabinoides en la liberación hormonal de células aisladas del islote.....	21
Tabla 4 Presencia de componentes del sistema endocannabinoide en cortes histológicos de islotes pancreáticos	24
Tabla 5 Efecto de los endocannabinoides en la liberación hormonal de los islotes pancreáticos.....	25
Tabla 6 Efectos de los endocannabinoides sobre la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina	26
Tabla 7. Kits de ELISA utilizados.....	30
Tabla 8 Fármacos con acción sobre el sistema cannabinoide	32
Tabla 9. Anticuerpos primarios.....	33
Tabla 10 Anticuerpos secundarios	33
Tabla 11 Mediciones de bioimpedancia	38
Tabla 12 Peso de los tejidos obtenidos por disección	38

Ecuaciones

Ecuación 1. Índice de resistencia a la insulina HOMA.....	30
Ecuación 2.2. Índice de sensibilidad a la insulina McAuley	30
Ecuación 3. Índice de triglicéridos y glucosa.....	31
Ecuación 4. Razón insulina glucagón.....	31
Ecuación 5. Fluorescencia total corregida.....	35

Abreviaturas

2-AG (2-araquidonoilglicerol)

AACE (American Association of Clinical Endocrinologists)

ABC (Área bajo la curva)

AEA (Anandamida)

AHA (American Heart Association)

AMPc (Adenosin monofosfato cíclico)

ATP III (Adult Treatment Panel III)

CB1 (Receptor a cannabinoides tipo 1)

CB2 (Receptor a cannabinoides tipo 2)

cg2-AG (caged 2-araquidonoilglicerol)

DAG (Diacilglicerol)

DAGL (Diacilglicerol lipasa)

DM2 (Diabetes Mellitus 2)

ECNT (Enfermedades crónicas no transmisibles)

ECS (Sistema endocannabinoide)

EGIR (European Group for the Study of Insulin Resistance)

FAAH (Hidrolasa de ácidos grasos amidados)

GSIS (Liberación de insulina estimulada por glucosa)

HDL (Lipoproteína de alta densidad)

IDF (International Diabetes Federation)

IMC (Índice de masa corporal)

IPGTT (Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa)

LPI (Lisofosfatidilinositol)

MAGL (Monoacilglicerol lipase)

NAPE-PLD (N-acetilfosfatidiletanolamida fosfolipasa D)

NCEP (National Cholesterol Education Program)

NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute)

OEA (Oleoiletanolamida)

OGTT (Prueba oral de tolerancia a la glucosa)

OMS (Organización Mundial de la Salud)

PEA (N-palmitoiletanolamida)

PLD-1 (Fosfolipasa D tipo 1)

SM (Síndrome metabólico)

Resumen

El concepto de síndrome metabólico (SM) se refiere a la coalescencia de factores de riesgo que incrementan la probabilidad de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular. En México las enfermedades crónicas no transmisibles causan el 75 % del total de las muertes y el 68 % de los años de vida potencialmente perdidos. Este panorama epidemiológico permite dimensionar la necesidad de completar la comprensión de los mecanismos detrás del desarrollo del síndrome metabólico. Un elemento poco estudiado que podría estar involucrado en el desarrollo del síndrome metabólico es el sistema endocannabinoide (ECS). El sistema endocannabinoide se distribuye ampliamente por todo el cuerpo, incluyendo los órganos y tejidos involucrados en la regulación del control glucémico, como el tejido adiposo, el hígado, el músculo y los islotes pancreáticos.

Para comprender mejor la relación entre el sistema endocannabinoide y el desarrollo del síndrome metabólico, es necesario saber si los receptores a cannabinoides en los islotes pancreáticos sufren cambios en su expresión. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue investigar la expresión de los receptores a cannabinoides tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) en islotes pancreáticos de ratas con síndrome metabólico.

Se empleó un modelo de inducción de síndrome metabólico mediante una dieta rica en sacarosa por 8 semanas en ratas Wistar. Para analizar los cambios en la expresión de los receptores se realizaron dos técnicas de detección mediante anticuerpos, Western blot e inmunofluorescencia.

Como resultado de la dieta hipercalórica y rica en carbohidratos se observó un incremento en los triglicéridos séricos en ayuno, en el peso corporal, en la composición corporal, particularmente la grasa visceral, asociados con un incremento en el estado proinflamatorio. En este cuadro característico de síndrome metabólico se encontró, mediante inmunofluorescencia, que el receptor CB1 disminuyó en los islotes pancreáticos de ratas con síndrome metabólico. Esta disminución se produjo tanto en células β como en células no- β . Por el contrario, para CB2 la cantidad de fluorescencia en el grupo síndrome metabólico aumentó tanto en las células β como en las células no- β . Realizamos centrifugación diferencial para separar las fracciones de proteínas membranales y citosólicas. En el caso de los receptores CB1, la disminución del receptor en la fracción membranal estaba asociada a un incremento en la fracción citosólica. En contraste, el incremento de la presencia del receptor CB2 en la fracción membranal está asociado a un incremento también en la fracción citosólica del receptor.

La modificación del sistema endocannabinoide en el síndrome metabólico podría implicar su participación en el desarrollo de diabetes. Proponemos que esta regulación a la baja de CB1 y la regulación al alza de CB2 facilitan la amplificación de la liberación de insulina durante el desarrollo temprano del síndrome metabólico. Nuestros resultados revelan la posibilidad de una regulación del sistema endocannabinoide bajo alteraciones metabólicas inducidas por una dieta rica en sacarosa. Este trabajo contribuye al avance en la comprensión del papel de la regulación de los receptores CB1 y CB2 en las células β pancreáticas.

Abstract

The term metabolic syndrome (MS) refers to gathering risk factors that increase the likelihood of developing type 2 diabetes and cardiovascular disease. Noncommunicable chronic diseases account for 75 % of all deaths and 68 % of potential years of life lost in Mexico. This epidemiological landscape enables us to understand the need for a complete comprehension of the mechanisms underlying the development of metabolic syndrome. The endocannabinoid system (ECS) is a little-studied element that may play a role in developing of metabolic syndrome. The endocannabinoid system is found all over the body, including organs and tissues involved in glycemic control, such as adipose tissue, liver, muscle, and pancreatic islets.

To better appreciate the relationship between the endocannabinoid system and the development of metabolic syndrome, it is necessary to know whether the expression of cannabinoid receptors in the pancreatic islets changes. As a result, the goal of this study was to measure the expression of cannabinoid receptors type 1 (CB1) and type 2 (CB2) in pancreatic islets of rats with metabolic syndrome.

For 8 weeks, Wistar rats were fed a sucrose-rich diet in order to induce metabolic syndrome. Two antibody-based detection techniques, Western-blot and immunofluorescence were used to examine changes in receptor expression. An increase in fasting serum triglycerides, body weight, and body composition, particularly visceral fat, was observed due to the high-calorie, carbohydrate-rich diet, which was associated with an increase in the pro-inflammatory state.

According to immunofluorescence, the CB1 receptor was found to be decreased in the pancreatic islets of rats with metabolic syndrome. This reduction occurred in both β and non- β cells. In contrast, CB2 fluorescence increased in both β and non- β cells in the metabolic syndrome group. To separate the membrane and cytosolic protein fractions, we used differential centrifugation. For CB1 receptors, a decrease in the membrane fraction was linked to an increase in the cytosolic fraction. In contrast, an increase in CB2 receptors in the membrane fraction is associated with an increase in the receptor's cytosolic fraction. Endocannabinoid system changes in the metabolic syndrome may implicate their participation in the development of diabetes. We hypothesize that CB1 downregulation and CB2 upregulation facilitate the amplification of insulin release during the early stages of metabolic syndrome. Our findings suggest that the endocannabinoid system can be regulated in response to metabolic changes caused by a high-sucrose diet. This study contributes to a better understanding of the role of CB1 and CB2 receptor regulation in pancreatic β cells.

Antecedentes

El síndrome metabólico

El concepto de síndrome metabólico (SM) se refiere a la coalescencia de factores de riesgo relacionados con enfermedad metabólica que incrementan la probabilidad de desarrollar dos enfermedades de alto impacto en la actualidad, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedad cardiovascular (Alberti et al., 2006). Un aspecto central en la definición de SM es que estos factores de riesgo metabólico se presentan más frecuentemente juntos que lo esperado por el azar. Esta aparición simultánea de alteraciones metabólicas orienta a la existencia de una fisiopatología común subyacente (Reaven, 1988).

Actualmente se reconocen cinco biomarcadores tomados en ayuno, para establecer el diagnóstico de SM, la obesidad, la hiperglucemia, los niveles bajos de colesterol HDL, hipertrigliceridemia, y la presión arterial elevada (Alberti et al., 2009). Además de estos biomarcadores, en 2005 la International Diabetes Federation (IDF) nombró los criterios de platino, para abarcar también nuevos biomarcadores de creciente aceptación. Estos biomarcadores incluyen la leptina, la adiponectina, la proteína C reactiva y el fibrinógeno, entre otros y son indicadores de estados protrombóticos o proinflamatorios (Alberti et al., 2006).

El SM tiene 4 pilares fundamentales, la adiposidad visceral, la pérdida de la regulación de la glucosa, la dislipidemia, y el daño endotelial (Huang, 2009). Los primeros dos factores de riesgo están directamente vinculados con DM2, mientras que los otros dos se relacionan con enfermedad cardiovascular. Estas alteraciones que comienzan como cambios incipientes y potencialmente reversibles en sus primeras etapas progresan a lo largo de décadas para desembocar en enfermedades crónicas irreversibles. Justamente, el enfoque del concepto de SM es proveer un marco conceptual para la identificación y tratamiento de un estadio que antecede al establecimiento de enfermedades metabólicas. En función de este objetivo es que el carácter de las definiciones operacionales se encuentra orientado al tamizaje poblacional, seleccionando variables de medición sencilla, económica y de fácil acceso (Tabla 1).

Dos factores causales se han señalado como principales responsables del desarrollo de SM, la ingesta excesiva de calorías y el sedentarismo (González-Muniesa et al., 2017). Un desbalance entre la ingesta y el gasto energético, donde la ingesta supera al gasto, resulta en sobrepeso y obesidad, estrechamente asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina, característica del SM. La adopción de estilos de vida que conjuntan sedentarismo con hábitos dietéticos desfavorables, que combinan una alta ingesta de carbohidratos y lípidos tiene un papel determinante en el incremento de la prevalencia de SM. Esto los convierte en un grave problema de salud pública por su impacto en años de vida ajustados por discapacidad, así como sus elevados costos de atención y tratamiento.

La OMS reporta que la prevalencia de obesidad en los adultos ha incrementado 1.5 veces desde el año 2000, y el sobrepeso ahora afecta a 38.3 millones de menores de cinco años (World Health Organization, 2020). Se considera que el SM es una condición que afecta indiscriminadamente a individuos en cualquier país y estrato socioeconómico. La OMS

reporta que el 85 % de los 15 millones de muertes prematuras son atribuibles a las Enfermedades Crónicas no Transmisibles (ECNT) (World Health Organization, 2020). Las ECNT abarcan enfermedades cardiovasculares, respiratorias crónicas, cáncer y diabetes. El 75 % de muertes anuales en el mundo se debe a las ECNT; 3 de cada 5 muertes son causadas por estas patologías principalmente en los países de ingresos bajos a medios (Alberti et al., 2006).

Entre las causas de mortalidad a nivel mundial 17.5 millones son atribuibles a enfermedades cardiovasculares y 1.5 millones a DM2. La presencia de SM incrementa 5 veces el riesgo de DM2 y 3 veces el riesgo de enfermedad cardiovascular (Alberti et al., 2006). De acuerdo con la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) se estima que 58 % de los adultos dentro de su región tienen obesidad o sobrepeso, pero para Chile, México y Estados Unidos este porcentaje se eleva a más del 70 % de sus poblaciones (OECD, 2019).

El síndrome metabólico en México

Un análisis reciente de la transición epidemiológica en México encontró que las ECNT causaron el 75 % del total de las muertes y 68 % de los años de vida potencialmente perdidos (Dávila-Torres et al., 2015). En países de América Latina, la prevalencia general del SM es de 24.9 % (rango 18.8-43.3 %), y es ligeramente más frecuente en mujeres (25.3 %) que en hombres (23.2 %), siendo el grupo de edad con mayor prevalencia el de los mayores de 50 años (López-Jaramillo et al., 2013). El incremento paralelo de la frecuencia de la obesidad y del SM es un fenómeno mundial y México no es la excepción (Rosas Guzmán et al., 2010).

De acuerdo con la IDF, México es el sexto país con mayor número de personas con DM2 (12.8 [7.2-15.4] millones). De esta población, se estima que el 38.6 % no ha sido diagnosticada aún (4.9 [2.8-5.9] millones). Esto lleva a México al sexto lugar en gasto total en salud relacionado con la DM2 en 2019, con un total de 17 miles de millones de USD (IDF, 2019).

En efecto, de acuerdo con la ENSANUT 2018, el 16.4 % de las causas de consulta en México se debe a las enfermedades del grupo de la DM2, enfermedad cardiovascular y obesidad. Alcanzando en total una prevalencia de 21.9 % (IC95 % 20.6,23.1) de hipertensión arterial sistémica y de sobrepeso y obesidad (IMC ≥ 25 kg/m²) de 76.8 % en mujeres, y 73.0 % en hombres. Para adultos mexicanos mayores a 20 años, el 6.9 % (95 % UI: 5.4–8.5) de la mortalidad por todas las causas se atribuye al consumo de bebidas azucaradas, representando 40,842 muertes en exceso por año (95%UI: 31,950–50,138). Finalmente, se estima que el 19 % (95 % UI: 11.0–26.5) de la mortalidad debida a diabetes, enfermedad cardiovascular y cáncer asociado a obesidad es atribuible a las bebidas azucaradas, representando 37,000 muertes por año (95 % UI: 21,240–51,045) (Shamah-Levy et al., 2020). Este panorama epidemiológico permite dimensionar la necesidad del desarrollo de ciencia básica para completar la comprensión de los mecanismos detrás del desarrollo del SM.

Etiopatogenia del síndrome metabólico

La obesidad se define como la acumulación de tejido adiposo debido a un desequilibrio entre el consumo y el gasto energético. La sinergia entre sedentarismo e ingesta calórica excesiva es uno de los principales promotores de la epidemia actual de obesidad (González-Muniesa et al., 2017). A su vez, una de las causas de ingesta calórica excesiva es el consumo de calorías en bebidas azucaradas. Se ha propuesto que este consumo excesivo se explica en parte debido a una menor respuesta compensatoria en el consumo de alimento frente a las bebidas de alto contenido energético (DiMeggio & Mattes, 2000). Más aún, el índice glicémico de estas bebidas resulta en una respuesta endocrina insuficiente y una progresiva acumulación de las calorías consumidas. Este exceso de carbohidratos se convierte en el hígado en triglicéridos los cuales, posteriormente pueden ser almacenados en los adipocitos (Chong et al., 2007). Un incremento en el volumen del tejido adiposo resulta en áreas isquémicas de los depósitos de grasa, sometidas a un estrés celular que lleva a los adipocitos hipertróficos a la necrosis celular (Fuster et al., 2016).

El tejido adiposo de sujetos obesos se encuentra infiltrado por macrófagos que rodean los adipocitos necróticos formando las características estructuras de corona (Murano et al., 2008). Estos cambios histológicos son más evidentes y se presentan con mayor frecuencia en los depósitos de grasa visceral que rodean los órganos internos (Altintas et al., 2011; Murano et al., 2008). Los macrófagos activados liberan citocinas que inician un proceso de inflamación de bajo grado, el cual ligado con la resistencia a la insulina inducida por la obesidad favorecen el desarrollo eventual de DM2 (Altintas et al., 2011). Finalmente, este estado crónico inflamatorio incrementa el estado protrombótico y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Murano et al., 2008).

Parámetro	OMS (1998)	EGIR (1999)	OMS (1999)	NCEP (2001)	AACE (2003)	ATPIII (2004)	AHA-NHLB (2005)	IDF (2005)	Armonizados (2009)
Resistencia a la Insulina	Intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina o diabetes y al menos 2:	Hiperinsulinemia (Percentil 75) y al menos 2:	Intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina o diabetes y al menos 2:		140-200 mg/dL durante OGTT				
Glucosa en ayuno	>126 mg/dL (diagnóstico de diabetes)	≥ 110 mg/dL			110-125mg/dL	>100 mg/dL	≥100 mg/dL o tratamiento		
Presión arterial	> 140/90mmHg			≥ 130/≥ 85 mmHg			≥ 130/≥ 85 mmHg o tratamiento		
Triglicéridos	>150 mg/dL	>178 mg/dL o tratamiento	>150 mg/dL				≥150 mg/dL o tratamiento		
HDL	<35 mg/dL (H) <39 mg/dL (M)	< 39 mg/dL o tratamiento	<35 mg/dL (H) <39 mg/dL (M)	<40 mg/dL (H) <50 mg/dL (M)				<40 mg/dL (H) <50 mg/dL (M) o tratamiento	
Cintura		≥ 94 cm (H) ≥ 80 cm (M)		>102 (H) >88 (M)	Específico	>102 (H) >88 (M)	> 90 (H) >80 (M) o específico	Específico	
IMC	> 30kg/m ²		> 30 kg/m ²						
Cintura/cadera	> 0.90(H) >0.85(M)		> 0.90(H) >0.85(M)						
Micro-albuminuria	Albúmina urinaria > 20µg/min o albúmina/creatinina > 30mg/g		Albúmina urinaria > 20µg/min o albúmina/creatinina > 30mg/g						

Tabla 1. Definiciones operacionales de síndrome metabólico. Organización Mundial de la Salud (OMS). European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). National Cholesterol Education Program (NCEP). American Association of Clinical Endocrinologists (AACE). Adult Treatment Panel III (ATP III). American Heart Association (AHA) and the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI). International Diabetes Federation (IDF). Oral glucose tolerance test (OGTT). High Density Lipoprotein (HDL). Índice de masa corporal (IMC).

Modelos experimentales de síndrome metabólico

El desarrollo de estrategias exitosas para el diagnóstico y tratamiento del SM requiere de analizar cuidadosamente las variables que están involucradas. Muchas veces esto no es posible de realizar directamente en seres humanos. En consecuencia, para el estudio detallado de los efectos de la alimentación inadecuada y el sedentarismo se emplean diversos modelos en animales. Estos modelos imitan varios aspectos del SM presente en los seres humanos y nos permite comprender su fisiopatología para generar mejores procesos de diagnóstico y tratamiento. Actualmente existen modelos de dietas ricas en carbohidratos y grasas, que se asemejan a la llamada “dieta occidental” humana, que resultan en alteraciones inducidas por la dieta que son similares al SM.

Dentro de los modelos de dietas hipercalóricas podemos encontrar tres tipos principales, dietas ricas en grasas, carbohidratos y combinadas. El objetivo de estos modelos de dieta hipercalórica es imitar el desarrollo de las enfermedades crónicas no transmisibles producto de la mala alimentación. Particularmente, estas dietas buscan el desarrollo de obesidad, hipertensión arterial, alteraciones metabólicas del control de la glucosa, dislipidemia o enfermedad hepática grasa no alcohólica.

Hay una gran heterogeneidad en los protocolos de dietas hipercalóricas para lograr cada uno de estos objetivos. Por ejemplo, las dietas ricas en grasa parecen tener mayor éxito para generar un fenotipo de obesidad rápidamente, pero dietas ricas en carbohidratos permiten el estudio de etapas tempranas del desarrollo de SM sin ganancia de peso evidente (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2020; Rodríguez-Correa et al., 2020)

En el caso de los modelos ricos en carbohidratos, de forma similar a los modelos de dietas ricas en grasas, existen múltiples protocolos reportados en la literatura. Se presta particular atención a los modelos basados en monosacáridos, utilizando glucosa (Korntner et al., 2017) o fructosa (Mamikutty et al., 2014), pero también hay modelos basados en disacáridos como la sacarosa (Velasco et al., 2020). La selección de un carbohidrato específico otorga el beneficio de permitir discernir las consecuencias de las diferencias metabólicas en el manejo de éstos. Particularmente, para la fructosa se ha mostrado tanto un efecto vasopresor como hiperglucémico (Moreno & Hong, 2013).

Además, existen modelos que combinan alguno de estos carbohidratos con una dieta rica en lípidos conocidos como modelos de dieta occidental (Western-diet) (Horne et al., 2020; Ishimoto et al., 2013; Kurita et al., 2019; Moreno-Fernández et al., 2018). Estas dietas combinadas tienen la ventaja de reflejar con mayor fidelidad la complejidad detrás del consumo hipercalórico en seres humanos mostrando la sinergia entre estos macronutrientes. No obstante, esto vuelve más difícil discernir la contribución de los componentes individuales en las manifestaciones fenotípicas particulares.

Una diferencia significativa de los modelos ricos en carbohidratos con aquellos ricos en grasas es la posibilidad de administrar soluciones que contienen azúcares, semejando al consumo de jugos y refrescos que ocurre en la población humana (Larqué et al., 2011). Así, no solamente se escoge un carbohidrato específico sino también una forma de consumo. En efecto, los carbohidratos en forma líquida promueven un balance energético positivo,

mientras que en forma sólida hay una compensación de la ingesta más precisa (DiMeglio & Mattes, 2000).

Actualmente los modelos ricos en sacarosa han resaltado por su capacidad para provocar alteraciones metabólicas importantes en la regulación de la glucosa asociados a cambios de peso en los animales.

En los humanos este fenotipo de individuos con un peso normal pero metabólicamente obesos es objeto de importante interés (Teixeira et al., 2015). Es por este motivo que dietas ricas en carbohidratos permiten examinar cómo, aún en la ausencia de obesidad, es posible desarrollar alteraciones metabólicas características de ésta (Cao et al., 2012).

Otro aspecto destacable de estas dietas es la capacidad para producir alteraciones semejantes a la enfermedad hepática grasa no alcohólica puesto que estos modelos se caracterizan por incrementos en la lipogénesis *de novo* inducida por consumo de carbohidratos (Lima et al., 2016; Souza Cruz et al., 2020). De esta forma, los modelos de alteraciones metabólicas basados en carbohidratos permiten estudiar los cambios que ocurren durante el desarrollo del SM.

El sistema endocannabinoide

Uno de los elementos poco estudiados hasta ahora que podrían participar en el SM es el ECS. Este sistema participa en el metabolismo energético. Se compone de enzimas de síntesis de los endocannabinoides N-acetil fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD) y diacilglicerol lipasa (DAGL), los endocannabinoides mismos, anandamida (AEA) y 2-araquidinoilglicerol (2-AG), las enzimas de degradación hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH) y monoacilglicerol lipasa (MAGL), y los receptores a cannabinoides clásicos tipo 1 (CB1) y tipo 2 (CB2) (Basavarajappa, 2007).

Las enzimas de síntesis producen *in-situ* y a demanda, sustancias de origen lipídico llamadas endocannabinoides que actúan sobre receptores a nivel local (paracrino y autocrino) y que son rápidamente eliminadas por las enzimas de degradación (Di Marzo, 2006).

De forma general, los receptores CB1 y CB2 son funcionalmente similares. Ambos son receptores de siete dominios transmembranales, acoplados a proteína $G_{i/o}$, y su activación resulta en la disminución de los niveles de AMPc por inhibición de la enzima adenilato ciclasa y la reducción del influjo de calcio por inhibición de canales iónicos de Ca^{2+} y activación de canales de potasio (Figura 1). No obstante, varios fenómenos participan de la modulación de los efectos de esta cascada de señalización, incluyendo la existencia de múltiples ligandos endógenos y su selectividad funcional, la homo y heterodimerización de los receptores a cannabinoides, la señalización sesgada y finalmente el quimiotipo celular (Figura 1). Todos estos elementos determinan el resultado global de la activación de este sistema. Por ejemplo, se ha descrito en algunos modelos de estudio que el receptor CB1 inhibe canales de calcio dependientes de voltaje (VGCC) y activa canales de potasio rectificadores (KIR), mientras que el receptor CB2 no tiene estos efectos (Howlett & Abood, 2017).

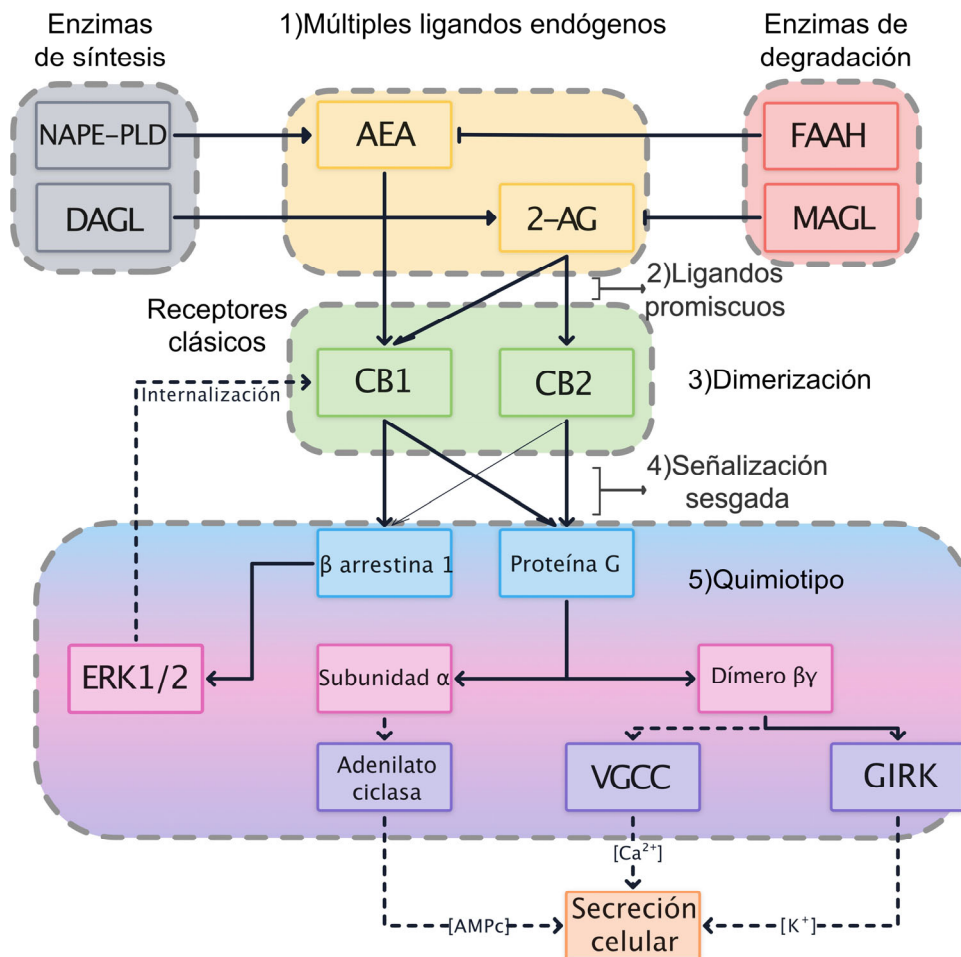


Figura 1. El sistema endocannabinoide y la modulación de su señalización. Se muestra la cascada de señalización clásica del ECS. Se destacan cinco fenómenos que participan en los efectos pleiotrópicos de este sistema: la existencia de múltiples ligandos endógenos, su promiscuidad, la formación de homo y heterodímeros de los receptores, la señalización sesgada del receptor y el quimiotipo celular. Las flechas de cabeza completa representan síntesis de los endocannabinoides. En cambio, las flechas de cabeza trunca muestran degradación. Las flechas de línea continua indican activación y las flechas de línea discontinua corresponden a inhibición. El grosor de la línea representa la señalización preferente por una vía y si la línea es delgada indica que una vía se activa con menor intensidad. La cascada de señalización intracelular está sujeta a variar de acuerdo con el quimiotipo celular. La activación de este sistema resulta en la inhibición de la secreción celular a través de varios mecanismos. La señalización prolongada termina por estimular la internalización de los receptores.

El síndrome metabólico y el sistema endocannabinoide

El ECS se distribuye ampliamente por todo el cuerpo y está presente en varios órganos, incluidos el cerebro, el corazón, el sistema inmunológico y los huesos (Maccarrone et al., 2015). Además, se encuentra en órganos y tejidos involucrados en la regulación del control glucémico, como el hipotálamo en el sistema nervioso central, así como en órganos periféricos, incluyendo el tejido adiposo, el hígado, el músculo, (Jourdan et al., 2016; Matias & Di Marzo, 2007) y el páncreas, específicamente en los islotes pancreáticos (Kim et al., 2011).

De forma global, el ECS proporciona un circuito de retroalimentación negativa que modula las respuestas celulares a los estímulos (Ruehle et al., 2012). Su activación de forma aguda se ha relacionado con una mayor ingesta de alimentos palatables (Koch, 2017), la promoción de la lipogénesis (Osei-Hyiaman et al., 2005) y la disminución de la tolerancia a la glucosa (Bermúdez-Siva et al., 2006). Por el contrario, los antagonistas de cannabinoides muestran efectos opuestos (Schaich et al., 2014). Sin embargo, estudios epidemiológicos anteriores informaron de manera consistente una disminución en la incidencia de DM2 en las poblaciones consumidoras de cannabis (Alshaarawy & Anthony, 2015), incluso después de considerar varios factores de confusión (Imtiaz & Rehm, 2018). Esto destaca la relevancia de los cambios que pueden tener lugar a largo plazo en el sistema ECS. Así, el ECS y el SM convergen en los islotes pancreáticos.

Los islotes pancreáticos

La unidad funcional del páncreas endócrino son los microórganos llamados islotes pancreáticos o de Langerhans que participan en la regulación de la homeostasis de la glucosa (Misler, 2010). De forma general, su función se realiza a través de dos hormonas principales, la insulina, producida por las células β y el glucagón, producido por las células α (Röder et al., 2016).

La insulina es la única hormona que es capaz de disminuir los niveles de glucosa en sangre, mientras que se han descrito muchas hormonas contra reguladoras producidas en diferentes órganos endocrinos, entre las que se incluyen el cortisol, la adrenalina y el glucagón (Sprague & Arbeláez, 2011).

Para mantener los niveles de glucemia dentro de un rango estrechamente controlado, que además debe adaptarse a los requerimientos energéticos que varían con rapidez, y a la composición de los alimentos que se han ingerido, las hormonas que se producen en los islotes pancreáticos están estrechamente reguladas por múltiples sistemas, algunos provenientes fuera del islote, y otros provenientes del mismo islote.

Dentro de los sistemas internos encontramos la regulación paracrina mediante la somatostatina, secretada por las células δ , y el polipéptido pancreático, secretado por las células F (Kim et al., 2014; Strowski et al., 2000).

Los sistemas externos que regulan la función del islote incluyen al sistema nervioso autónomo, a través de su inervación simpática y parasimpática (Begg & Woods, 2013) y al sistema endocrino, a través de hormonas como las incretinas (GLP-1, GIP, ghrelina, gastrina etc.), provenientes del tracto gastrointestinal, que modulan la función de los islotes (Rehfeld, 2018). Dentro de los sistemas internos de regulación del islote pancreático, existen los sistemas paracrino y autocrino. Es decir, los diferentes tipos celulares del islote regulan la liberación de otras hormonas entre sí y sobre sí mismas, a través de varias vías de señalización, que incluyen hormonas como la somatostatina, el glutamato, el GABA y el ATP, así como las hormonas características insulina y glucagón (Caicedo, 2013). Este fenómeno fue observado por primera vez al estudiar las diferencias entre la respuesta secretora de las células α y β de islotes integros y las respuestas de células dispersas en cultivo (Dunbar & Walsh, 1982).

El sistema endocannabinoide en los islotes pancreáticos

El ECS se encuentra presente en los islotes pancreáticos, y se han realizado múltiples revisiones tratando de elucidar su función. Sin embargo, no ha sido tarea fácil (González-Mariscal & Egan, 2018). En parte la falta de homogeneidad en los abordajes experimentales empleados ha desembocado en resultados aparentemente contradictorios, en ocasiones dentro de los mismos grupos de trabajo (Anderson et al., 2013). Primero porque los receptores a cannabinoides poseen selectividad funcional, es decir, agonistas selectivos pueden reclutar vías de señalización específicas de cada fármaco (Ibsen et al., 2017).

En segundo lugar, los endocannabinoides son sustancias promiscuas que no solo actúan sobre CB1 y CB2, sino que activan también a GPR55, GPR119 y TRPVs (Brown, 2007). Mientras que GPR55 y GPR119 son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G, similares a los receptores clásicos a cannabinoides, los canales TRPV son receptores ionotrópicos de endocannabinoides (De Petrocellis & Di Marzo, 2010). Estos receptores se han relacionado con cascadas de señalización diferentes a las clásicamente activadas por CB1 y CB2. Más aún, las hormonas del islote tienen efectos paracrinos sobre la liberación de células α , β y δ , por lo cual los efectos observados en células aisladas por la administración de cannabinoides pueden diferir de aquellos observados en los islotes completos (C. Li et al., 2010).

Adicionalmente, el ECS está involucrado en la conducta alimentaria, el metabolismo hepático de los lípidos, la lipogénesis en el tejido adiposo y resistencia a la insulina y a la leptina (Kunos et al., 2008), por lo que los efectos de los agonistas endógenos a nivel del organismo completo pueden ser diferente a lo esperado si se observa únicamente los islotes. A continuación, describimos los estudios reportados en células aisladas del islote pancreático.

Célula beta aislada

Los receptores clásicos a cannabinoides, CB1 y CB2 se encuentran presentes en células β aisladas, tanto en cultivos primarios como en líneas celulares inmortalizadas de varias especies (Tabla 2). La excepción son las células de cultivos primarios de ratón (Bermudez-Silva et al., 2007; Juan-Picó et al., 2006). En cuanto a las enzimas de síntesis y degradación de 2-AG, la DAGL y MAGL han sido identificadas en células β aisladas (C. Li et al., 2010, 2012; Malenczyk et al., 2013; Matias et al., 2006). Mientras que hay conflicto en cuanto a la presencia de las enzimas de síntesis y degradación de AEA (Malenczyk et al., 2013; Matias et al., 2006).

En la célula β , la liberación de insulina es desencadenada por la glucosa. La glucosa en sangre es acarreada por los transportadores Glut-2 (en los roedores) al interior de la célula β , donde es metabolizada y en este proceso se produce ATP. Los canales de potasio sensibles a ATP se cierran al incrementar la concentración intracelular de ATP, despolarizando la membrana. Esto promueve la apertura de canales de sodio sensibles a voltaje y tipo p de calcio, que despolarizan aún más la membrana hasta que los canales de calcio dependientes de voltaje (L), que son los que tienen una conductancia mayor al calcio se abren y aumenta calcio intracelular. El calcio entrante activa proteínas del complejo SNARE, permitiendo la liberación de la insulina contenida en vesículas adosadas a la

membrana celular (Rorsman & Braun, 2013). Se ha propuesto que en la célula β , esta entrada de calcio activa las enzimas de síntesis de cannabinoides (Kim et al., 2011).

La liberación de insulina es un proceso ricamente modulado a través de los segundos mensajeros, el calcio y el AMPc. Aquí es donde intervienen los sistemas de modulación que hemos mencionado. Los receptores acoplados a proteínas $G_{s/q}$ modulan la producción de segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) y adenosinmonofosfato cíclico (AMPc) e incrementan la liberación de insulina, mientras que los receptores acoplados a proteínas $G_{i/o}$ tienen el efecto contrario. En el primer caso tenemos al glucagón, GLP-1 y otras incretinas, mientras que en el segundo caso tenemos a la adrenalina y la somatostatina (G. A. Rutter et al., 2015).

El ECS clásico se encuentra en el segundo grupo, el resultado de la activación de los receptores a cannabinoides por agonistas endógenos es la disminución de la liberación de insulina. En la célula β los endocannabinoides clásicos AEA y 2-G tienen un efecto inhibitorio sobre la liberación de insulina, mediada por una menor movilización del calcio y menor producción de AMPc (González-Mariscal et al., 2018; Juan-Picó et al., 2006; Spivak et al., 2012).

Los efectos de los endocannabinoides a nivel de las células aisladas semejan lo que se esperaría conociendo las proteínas G a las que están tradicionalmente acoplados cada uno de los receptores estimulados (Tabla 3).

Célula alfa aislada

El ECS se ha estudiado menos en el caso de la célula α , donde se ha reportado la presencia de CB1 y CB2 en células de cultivos primarios y en la línea celular α -TC1 (Bermudez-Silva et al., 2007; Juan-Pico et al., 2009; Kim et al., 2011). La liberación de glucagón no se encuentra tan bien documentada como la de insulina. Sin embargo, aunque se había propuesto que de forma análoga a la célula β los niveles de glucosa en sangre provocan el cierre de canales de potasio y esto permite la despolarización intensa de la célula (Zhang et al., 2013), literatura más reciente muestra que la secreción de glucagón está mediada por la actividad de la glucocinasa (Moede et al., 2020) y las concentraciones intracelulares de AMPc (Yu et al., 2019).

En el caso de la célula α , esto resulta en la inactivación de los canales de sodio, reduciendo la amplitud de los potenciales de acción, y con ello la actividad de los VGCC.

Mientras que en la hipoglucemia la despolarización moderada activa los canales de sodio, que inducen potenciales de acción que abren los VGCC y resultan en la liberación de glucagón (Vieira et al., 2007). De forma similar a la célula β , la regulación producto de los receptores acoplados a proteínas G permite orquestar la modulación en función de las condiciones externas y así ajustar de forma fina diversas respuestas celulares (Müller et al., 2017). El efecto de los endocannabinoides en las células α aisladas es la disminución en las oscilaciones de calcio intracelular (Juan-Pico et al., 2009).

Célula delta aislada

La información sobre el ECS en las células δ aisladas es escasa. Dos estudios han encontrado la presencia de CB1 en las células δ aisladas, uno en una línea celular de somatostatinoma

(Tharp et al., 2008) y otro en cultivo primario de células δ , donde también se describió la presencia del receptor CB2 (Juan-Pico et al., 2009). La liberación de somatostatina ocurre en una forma dependiente de la cantidad de glucosa y se ha propuesto que sucede mediante un mecanismo similar al de las células β en donde el incremento en calcio intracelular resulta en la exocitosis de la hormona (Braun et al., 2009). En estas células los endocannabinoides 2-AG y AEA parecen incrementar las oscilaciones de calcio en al menos la mitad de las células estimuladas (Juan-Pico et al., 2009).

<i>Referencia</i>	<i>Línea celular</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Especie</i>	<i>CB1</i>	<i>CB2</i>	<i>GPR55</i>	<i>GPR119</i>	<i>TRPV</i>	<i>DAGL</i>	<i>MAGL</i>	<i>NAPE-PLD</i>	<i>FAAH</i>
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Cultivo primario	Alfa	Rata	✓	✓							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Cultivo primario	Alfa	Ratón	✓	✓							
<i>Picó et al., 2009</i>	Cultivo primario	Alfa	Ratón	✓	✓							
<i>Kim et al., 2011</i>	α -TC1	Alfa	Ratón	✓								
<i>Odori et al., 2013</i>	α -TC1	Alfa	Ratón				✓					
<i>Sakamoto et al., 2006</i>	α -TC1	Alfa	Ratón				✓					
<i>Malenczyk et al., 2015</i>	α TC1-6	Alfa	Ratón	X	✓	✓		1	✓	✓	✓	✓
<i>McKillop et al., 2013</i>	BRIN-BD1	Beta	Rata			✓						
<i>Moran et al., 2014</i>	BRIN-BD1	Beta	Rata				✓					
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Cultivo primario	Beta	Rata	✓	✓							
<i>Díaz-García et al., 2014</i>	Cultivo primario	Beta	Rata					X				
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Cultivo primario	Beta	Ratón	X	✓							
<i>Picó et al., 2006</i>	Cultivo primario	Beta	Ratón	X	✓							
<i>Chu et al., 2007</i>	HIT-T15	Beta	Hámster				✓					
<i>Akiba et al., 2004</i>	INS-1	Beta	Rata					1				
<i>Tharp et al., 2008</i>	INS-1	Beta	Rata	✓								
<i>Fågelskiöld et al., 2012</i>	INS1-E	Beta	Rata					1				
<i>Malenczyk et al., 2013</i>	INS1-E	Beta	Rata	✓	✓	X		1	✓	✓	X	X
<i>Skrzypski et al., 2013</i>	INS1-E	Beta	Rata					4				
<i>Jourdan et al., 2013</i>	MIN6	Beta	Ratón	✓								
<i>Kim et al., 2011</i>	MIN6	Beta	Ratón	✓								
<i>Li et al., 2010</i>	MIN6	Beta	Ratón	✓	✓				✓			
<i>Li et al., 2012</i>	MIN6	Beta	Ratón			✓						
<i>Li et al., 2012</i>	MIN6	Beta	Ratón							✓		
<i>Lin et al., 2012</i>	MIN6	Beta	Ratón					2				
<i>Liu et al., 2017</i>	MIN6	Beta	Ratón			✓						
<i>Odori et al., 2013</i>	MIN6	Beta	Ratón				✓					
<i>Sakamoto et al., 2006</i>	MIN6	Beta	Ratón				✓					
<i>Laguerre et al., 2021</i>	MIN6	Beta	Ratón	✓	✓							

<i>Gonzalez-Mariscal et al., 2016</i>	MIN6, β TC6	Beta	Ratón	✓					
<i>Ning et al., 2008</i>	MIN6c4	Beta	Ratón						✓
<i>Spivak et al., 2012</i>	R7T1	Beta	Rata	✓					
<i>Ning et al., 2008</i>	RIN-m5F	Beta	Rata						X
<i>Chu et al., 2007</i>	RIN-m5F	Beta	Rata						X
<i>Akiba et al., 2004.</i>	RIN-m5F	Beta	Rata						1
<i>Petrocellis et al., 2007.</i>	RIN-m5F	Beta	Rata	✓	✓				1
<i>Matías et al., 2006</i>	RIN-m5F	Beta	Rata	✓	✓		✓	✓	✓
<i>Kim et al., 2011</i>	β -IRKO, β -IRWT, β -TC6	Beta	Ratón	✓					
<i>Tharp et al., 2008</i>	β TC6	Beta	Ratón	✓					
<i>Picó et al., 2009</i>	Cultivo primario	Delta	Ratón	✓	✓				
<i>Tharp et al., 2008</i>	MSL-G2-Tu6	Delta	Rata	✓					

Tabla 2. Presencia de componentes del sistema endocannabinoide en células aisladas de los islotes pancreáticos. El símbolo ✓ indica que se encontró la presencia del receptor o enzima señalados en las columnas. El símbolo X indica que se documentó la ausencia del receptor o enzima señalados en las columnas. En el caso de los canales TRPV, se señala el tipo de canal encontrado para indicar su presencia.

<i>Referencia</i>	<i>Línea celular</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Especie</i>	<i>EC</i>	<i>Dosis</i>	<i>Antagonista (receptor)</i>	<i>Dosis</i>	<i>Calcio</i>	<i>AMPc</i>	<i>Secreción</i>
<i>Picó et al., 2009</i>	Cultivo primario	Alfa	Ratón	2-AG AEA	10 !M 1 !M	-	-	↓		
<i>Spivak et al., 2012</i>	R7T1	Beta	Rata	2-AG	10.2!M 20 !M	WIN 55,212-2 WIN 55,212-3	1 μM 1 μM	↓		
<i>Picó et al., 2006</i>	Cultivo primario	Beta	Ratón	2-AG AEA	10 !M 1 !M	PTX AM630 (CB2) AM251 (CB1)	100 ng/ml 1 !M 1 !M	↓		↓
<i>Gonzalez-Mariscal et al., 2018</i>	MIN6, "TC6	Beta	Ratón	2-AG AEA	0.1 !M – 1 !M 0.1 !M – 1 !M	AM251 (CB1)	2.5 !M		↓	↓
<i>Liu et al., 2017</i>	MIN6	Beta	Ratón	LPI	5 μM	CBD	1 μM	↑		↑
<i>Laguerre et al., 2021</i>	MIN6	Beta	Ratón	cg2-AG	10 !M	Rimonabant AM630	1 μM 1 μM	CB1↑ CB2↓		CB1↑ CB2↓
<i>Ning et al., 2008</i>	MIN6c4, RINm5f	Beta	Ratón Rata	OEA	10 !M	-	-	↑	↑	↑
<i>McKillop et al., 2013</i>	BRIN-BD1	Beta	Rata	OEA PEA	10 nM – 100 !M 1 !M – 100 !M	CBD	10 !M	↑	↑	↑
<i>Moran et al., 2014</i>	BRIN-BD1	Beta	Rata	OEA PEA	3 !M 1.2 !M	Exendin (9-39)	100 nM	↑	↑	↑
<i>Picó et al., 2009</i>	Cultivo primario	Delta	Ratón	2-AG AEA	10 !M 1 !M	-	-	↑		

Tabla 3. Efectos de los endocannabinoides en la liberación hormonal de células aisladas del islote. Endocannabinoide (EC), Anandamida (AEA), 2-araquidonoilglicerol (2-AG), caged 2-araquidonoilglicerol (cg2-AG), oleoil etanolamida (OEA), N-palmitoil etanolamida (PEA), lisofosfatidilinositol (LPI).

Islotes pancreáticos completos

Dentro de los islotes pancreáticos completos, puede observarse la expresión de los componentes del ECS en el contexto de las interacciones paracrinas. En las células α , una mayoría de estudios describen la presencia de CB1, mientras que hay desacuerdo respecto a la presencia de CB2 (Tabla 4). La enzima de degradación de endocannabinoides descrita con mayor frecuencia en las células α es la MAGL (Kim et al., 2011; C. Li et al., 2012; Malenczyk et al., 2013).

Para las células β se ha descrito la presencia de todos los componentes del ECS, incluyendo a los receptores GPR55 y GPR119 con mayor controversia en la presencia de CB1 en células β de ratón y CB2 en células β de humano (Tabla 4). En las células δ se ha encontrado la presencia del receptor CB2 y la clara ausencia del receptor GPR55, mientras que hay controversia sobre la presencia del receptor CB1 (Tabla 4). Sobre los otros componentes del sistema, la enzima MAGL (Tharp et al., 2008) se han encontrado en los islotes. Como último punto destacable, en las células F del islote, que secretan polipéptido pancreático se ha encontrado la presencia del receptor GPR119 (Moran et al., 2014; Sakamoto et al., 2006).

La secreción hormonal de los islotes pancreáticos se ha modelado de forma tradicional como el resultado de las interacciones entre los tres principales tipos celulares del islote pancreático, y su respuesta a la glucosa en el medio (Watts et al., 2016). En primer lugar, la célula β responde a los incrementos de glucosa en el medio liberando insulina, misma que disminuye la secreción de glucagón e incrementa la secreción de somatostatina (Kawamori & Kulkarni, 2009). En condiciones de baja glucosa se estimula la secreción de glucagón, que a su vez estimula la liberación de insulina y somatostatina (Zhang et al., 2013). Finalmente, la glucosa alta, la insulina y el glucagón estimulan la liberación de somatostatina, que inhibe tanto la liberación de insulina como glucagón (Strowski et al., 2000).

El efecto de los endocannabinoides en el islote pancreático probablemente refleja sus efectos sobre estas interacciones. Mientras que en las células β aisladas los efectos de los endocannabinoides sugieren una disminución en la liberación de insulina, los experimentos llevados a cabo en islotes completos favorecen al incremento en la liberación de insulina como resultado de su administración, tanto en condiciones de baja como alta glucosa (Tabla 5). Solo en dos estudios se observó la secreción de glucagón por administración de endocannabinoides, ambos encontraron un incremento en esta hormona que también incrementa la liberación de insulina (Bermúdez-Silva et al., 2008; Woolcott et al., 2015). Finalmente, la secreción de somatostatina se encuentra incrementada, en respuesta a los incrementos en las otras hormonas del islote (Bermúdez-Silva et al., 2008).

<i>Referencia</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Especie</i>	<i>CBI</i>	<i>CB2</i>	<i>GPR55</i>	<i>GPR119</i>	<i>TRPV</i>	<i>DAGL</i>	<i>MAGL</i>	<i>NAPE-PLD</i>	<i>FAAH</i>
<i>Bermúdez-Silva et al., 2008</i>	Alfa	Humano	✓	✗							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Alfa	Humano	✓	✗							
<i>González-Mariscal et al., 2016</i>	Alfa	Humano	✗								
<i>Kim et al., 2011</i>	Alfa	Humano	✓						✓		
<i>Li et al., 2011</i>	Alfa	Humano	✗								
<i>Liu et al., 2016</i>	Alfa	Humano			✓						
<i>Tharp et al., 2008</i>	Alfa	Humano	✗								✓
<i>Xiaoyan et al., 2018</i>	Alfa	Humano				✓					
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Alfa	Rata	✓	✓							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Alfa	Rata	✓	✗							✗
<i>Flores et al., 2013</i>	Alfa	Rata	✓	✓							
<i>Starowicz et al., 2008</i>	Alfa	Rata	✓								
<i>Vilches-Flores et al., 2010</i>	Alfa	Rata	✓								
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Alfa	Ratón	✓	✓							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Alfa	Ratón	✓	✗							
<i>Kim et al., 2011</i>	Alfa	Ratón	✓						✓		
<i>Li et al., 2011</i>	Alfa	Ratón	✗	✗							
<i>Li et al., 2012</i>	Alfa	Ratón							✓		
<i>Liu et al., 2016</i>	Alfa	Ratón			✗						
<i>Malenczyk et al., 2013</i>	Alfa	Ratón					✓	✓	✓		
<i>Nakata y Yada, 2008</i>	Alfa	Ratón	✓								
<i>Picó et al., 2006</i>	Alfa	Ratón	✓	✓							
<i>Picó et al., 2009</i>	Alfa	Ratón	✓	✓							
<i>Romero-Zerbo et al., 2011</i>	Alfa	Ratón			✗						
<i>Starowicz et al., 2008</i>	Alfa	Ratón	✓	✓				✓		✓	
<i>Odori et al., 2013</i>	Alfa	Humano (Glucagonoma)				✓					
<i>Bermúdez-Silva et al., 2008</i>	Beta	Humano	✓	✗							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Beta	Humano	✓	✗							
<i>González-Mariscal et al., 2016</i>	Beta	Humano	✓								
<i>Kim et al., 2011</i>	Beta	Humano	✓					✓		✓	✓
<i>Li et al., 2011</i>	Beta	Humano	✓	✓							
<i>Liu et al., 2016</i>	Beta	Humano			✓						
<i>Tharp et al., 2008</i>	Beta	Humano	✗								✓
<i>Xiaoyan et al., 2018</i>	Beta	Humano				✓					
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Beta	Rata	✓	✓							
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Beta	Rata	✗	✓				✓	✓		✓
<i>Chu et al., 2007</i>	Beta	Rata				✓					
<i>Petrocellis et al., 2007</i>	Beta	Rata	✓	✓			✓				
<i>Starowicz et al., 2008</i>	Beta	Rata	✓								
<i>Vilches-Flores et al., 2010</i>	Beta	Rata	✓								
<i>Bermúdez-Silva et al., 2007</i>	Beta	Ratón	✗	✓							

<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Beta	Ratón	✓	✓			
<i>Kim et al., 2011</i>	Beta	Ratón	✓			✓	✓ ✓
<i>Li et al., 2010</i>	Beta	Ratón	✓	✓		✓	
<i>Li et al., 2011</i>	Beta	Ratón	✓	✓			
<i>Li et al., 2012</i>	Beta	Ratón					✓
<i>Liu et al., 2016</i>	Beta	Ratón			✓		
<i>Malenczyk et al., 2013</i>	Beta	Ratón	✓			✓ ✓	
<i>Nakata y Yada, 2008</i>	Beta	Ratón	✓	✗			
<i>Picó et al., 2006</i>	Beta	Ratón	✗	✓			
<i>Picó et al., 2009</i>	Beta	Ratón	✗	✓			
<i>Romero-Zerbo et al., 2011</i>	Beta	Ratón			✓		
<i>Spivak et al., 2012</i>	Beta	Ratón	✓				
<i>Starowicz et al., 2008</i>	Beta	Ratón	✗	✓			✓ ✓
<i>Odori et al., 2013</i>	Beta (Insulinoma)	Humano				✓	
<i>Bermúdez-Silva et al., 2008</i>	Delta	Humano	✗	✓			
<i>Bermúdez-Silva et al., 2009</i>	Delta	Humano		✓			
<i>González-Mariscal et al., 2016</i>	Delta	Humano	✗				
<i>Kim et al., 2011</i>	Delta	Humano		✓			
<i>Liu et al., 2011</i>	Delta	Humano			✗		
<i>Tharp et al., 2008</i>	Delta	Humano	✓				✓
<i>Xiaoyan et al., 2018</i>	Delta	Humano				✓	
<i>Tharp et al., 2008</i>	Delta	Rata	✓				
<i>Li et al., 2010</i>	Delta	Ratón	✓				
<i>Liu et al., 2016</i>	Delta	Ratón			✗		
<i>Picó et al., 2009</i>	Delta	Ratón		✓			
<i>Romero-Zerbo et al., 2011</i>	Delta	Ratón			✗		
<i>Moran et al., 2014</i>	PP	Ratón				✓	
<i>Sakamoto et al., 2006</i>	PP	Ratón				✓	
<i>Tharp et al., 2008</i>	PP	Rata	✗				✓

Tabla 4. Presencia de componentes del sistema endocannabinoide en cortes histológicos de islotes pancreáticos. El símbolo ✓ indica que se encontró la presencia del receptor o enzima señalados en las columnas. El símbolo ✗ indica que se encontró la ausencia del receptor o enzima señalados en las columnas.

<i>Referencia</i>	<i>Especie</i>	<i>EC</i>	<i>Dosis</i>	<i>Antagonista (receptor)</i>	<i>Dosis2</i>	<i>Liberación de insulina</i>	<i>Liberación de glucagón</i>	<i>Liberación de STT</i>
<i>Li et al., 2011</i>	Humano	2-AG	10 µM	AM251	10 µM	↑ en baja y alta glucosa		
<i>Li et al., 2010b</i>	Ratón	2-AG	10 µM	AM251	10 µM	↑ en alta glucosa		
<i>Li et al., 2012</i>	Ratón	2-AG	10 µM	-	-	↑ en baja glucosa y alta glucosa		
<i>Woolcott et al., 2015</i>	Perro	AEA	10 µM	Rimonabant	10 µM	↑ en baja y alta glucosa	↑ en baja y alta glucosa	
<i>Flores et al., 2013</i>	Rata	AEA	100-200 µM	-	-	↑ en alta glucosa		
<i>Vilches-Flores et al., 2010</i>	Rata	AEA	1 µM	BAR-1 (CB1)	1 µM	↑ en baja glucosa ↓ en alta glucosa		
<i>Anderson et al., 2013.</i>	Rata	AEA	1 µM	AM 251 (CB1) y AM630 (CB2)	100 nM	↑ en alta glucosa		
<i>Nakata y Yada., 2008</i>	Ratón	AEA	10 µM	-	-	↓ en alta glucosa		
<i>Bermúdez-Silva et al., 2008</i>	Humano	AEA y 2-AG	10,100 µM y 1,10 µM	AM251 (CB1)	100 nM	↑ en baja glucosa ↓ en alta glucosa	↑ en baja glucosa	↑ secundario a glucagón e insulina
<i>Picó et al., 2006</i>	Ratón	AEA y 2-AG	1 µM y 10 µM	PTX (GPCR), AM251 (CB1), AM630 (CB2)	100 ng/ml y 1 µM	↓ en alta glucosa		
<i>McKillop et al., 2013</i>	Ratón	PEA y OEA	100 µM	-	-	↑ en alta glucosa		
<i>Moran et al., 2014</i>	Ratón	PEA y OEA	10 µM a 100 µM	Exendin	100 nM	↑ en alta glucosa		

Tabla 5. Efecto de los endocannabinoides en la liberación hormonal de los islotes pancreáticos. Endocannabinoide (EC), Las flechas indican incremento ↑ o decremento ↓ del parámetro evaluado.

Efectos de los endocannabinoides en el organismo completo

El ECS se encuentra presente en muchos otros tejidos además de los islotes pancreáticos que hemos revisado hasta el momento. Se ha descrito la presencia y participación del ECS en tejidos que regulan el balance energético, como el hipotálamo, el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético (Silvestri & Di Marzo, 2013). Actualmente se considera que el efecto global de este sistema en el balance energético es la preservación y almacenamiento de la energía, favoreciendo el desarrollo de SM y obesidad en un ambiente con amplia disponibilidad de alimentos palatables (Gatta-Cherifi & Cota, 2016).

Hay pocos estudios enfocados a observar el efecto sistémico de los endocannabinoides sobre el metabolismo de la glucosa, principalmente por la rapidez con la que se degradan estas sustancias en la sangre (Ruby et al., 2011). Sin embargo, tanto con la administración de AEA como con la inhibición de su degradación se obtiene una disminución en la tolerancia a la glucosa administrada vía intraperitoneal (Bermúdez-Silva et al., 2006; Ruby et al., 2011; Troy-Fioramonti et al., 2015). Este efecto no se observó con 2-AG a una dosis de 4 mg/kg (Bermudez-Silva et al., 2007). Interesantemente uno de los estudios describe el efecto opuesto, el incremento a la tolerancia a la glucosa, cuando esta se administra vía oral (Troy-Fioramonti et al., 2015) ilustrando que las respuestas endócrinas a la glucosa dependen de la vía de administración.

Finalmente, dos estudios describen la resistencia a la insulina inducida por la administración de endocannabinoides o la falta de su degradación (Ruby et al., 2011; Troy-Fioramonti et al., 2015). Parece entonces que los endocannabinoides administrados por vía sistémica incrementan la resistencia a la insulina y generan intolerancia a la glucosa, excepto cuando esta se administra vía oral (Tabla 6).

Referencia	Especie	EC	Dosis	Antagonista (receptor)	Dosis	Tolerancia a la glucosa	Resistencia a la insulina
Bermúdez-Silva et al., 2007	Rata	2-AG	4 mg/kg	AM630 (CB1)	10 µg/kg	Ninguno	-
Bermúdez-Silva et al., 2006	Rata	AEA	10 mg/kg	AM251 (CB1)	0.2 mg/kg	↓ IPGTT	-
Troy-Fioramonti et al., 2015	Ratón	AEA	10 mg/kg	Rimonabant (CB1) AM630 (CB2)	10 mg/kg	↑ OGTT ↓ IPGTT	↑
Ruby et al., 2011	Ratón	↑ AEA y 2-AG	IDFP (FAAH, MAGL) 10 mg/kg	AM251 (CB1)	10 mg/kg	↓ IPGTT	↑

Tabla 6. Efectos de los endocannabinoides sobre la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. Endocannabinoide (EC). El isopropil dodecilfluorofosfonato (IDFP) es un inhibidor de las enzimas de la hidrolasa de ácidos grasos amidados (FAAH) y la monoacilglicerol lipasa (MAGL), enzimas de degradación de los endocannabinoides. Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (IPGTT), prueba oral de tolerancia a la glucosa (OGTT). Las flechas indican incremento ↑ o decremento ↓ del parámetro evaluado.

En conclusión, las células de los islotes pancreáticos, incluyendo a la célula β , contiene un ECS completo. La activación de este sistema resulta en cambios de la secreción de las células

del islote y con ello modula las interacciones paracrinas, dando resultados netos en la liberación de hormonas del islote al torrente sanguíneo. Este sistema se adapta de forma aguda a retos glucémicos, y se encuentra sujeto a cambios en la expresión, sin embargo, su participación en la hiperinsulinemia presente en el SM no se ha explorado.

Planteamiento del problema

Como hemos visto, se ha reportado que a corto plazo el sistema endocannabinoide modula la función de los islotes pancreáticos a través de los receptores CB1 y CB2 (González-Mariscal & Egan, 2018). A su vez, se ha reportado también que las dietas inductoras de SM alteran la expresión del RNAm de los receptores cannabinoides en el músculo (Crespillo et al., 2011) y en el tejido adiposo (Deveaux et al., 2009). Para comprender mejor la interacción entre el sistema endocannabinoide y el desarrollo del síndrome metabólico, es necesario saber si los receptores a cannabinoides en los islotes pancreáticos sufren cambios en su expresión proteica de forma similar a estos otros tejidos.

En los islotes pancreáticos la administración de forma aguda de glucosa intraperitoneal disminuye la expresión del receptor de cannabinoides CB1 (Vilches-Flores et al., 2010). A más largo plazo, se han encontrado niveles incrementados de endocannabinoides en los islotes pancreáticos de ratones alimentados con una dieta rica en grasa (Starowicz et al., 2008). Sin embargo, se desconocen los cambios en la expresión de los receptores CB1 y CB2 a una vez que se ha desarrollado un síndrome metabólico inducido por una dieta rica en sacarosa. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue investigar la modificación en la expresión de los receptores CB1 y CB2 en islotes pancreáticos de ratas inducida por el SM.

Pregunta de investigación

¿Se afecta la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en el islote pancreático en un modelo de síndrome metabólico?

Hipótesis

Si el síndrome metabólico incrementa la actividad del sistema endocannabinoide, entonces habrá una regulación a la baja de los receptores CB1 y CB2.

Objetivo General

Determinar en un modelo de síndrome metabólico si existe una modificación en los niveles de expresión proteica de receptores CB1 y CB2 en islotes pancreáticos.

Objetivos Particulares

1. Identificar la presencia de los receptores CB1 y CB2 en los islotes pancreáticos en un modelo de síndrome metabólico.
2. Determinar el tipo celular donde se encuentran los receptores CB1 y CB2.
3. Cuantificar en la célula β aislada el efecto en la liberación de insulina por activación de los receptores CB1 y CB2.

Metodología

Se empleó el modelo de inducción de SM por una dieta rica en sacarosa (Larqué et al., 2011; Velasco et al., 2020). Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 8 semanas de edad, con un peso de 250-280 gramos, al inicio del experimento, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales de experimentación permanecieron bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12, a una temperatura de 21-22°C y una humedad relativa del 60 %. Los animales se alojaron por pares, en jaulas de plexiglás. Para ambos grupos se suministró alimento seco Laboratory Rodent Diet 5001 tres veces por semana, junto con sustrato fresco y cambio del agua potable. El tratamiento de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). El protocolo de experimentación fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo el proyecto 080-2011. Todos los procedimientos que pudieran causar dolor se realizaron bajo anestesia con pentobarbital sódico (38 mg/kg), intraperitonealmente. Para la eutanasia de los animales se utilizó una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (120 mg/kg).

Inducción de síndrome metabólico

Se seleccionó un modelo de SM inducido por una dieta rica en sacarosa (Figura 2). Al terminar el periodo de aclimatación, se cuantificó la ingesta de agua y alimento para ambos grupos durante una semana previo al inicio del tratamiento. Tras confirmar que todos los animales tuvieron ingestas similares y una ganancia de peso adecuada, se repartieron aleatoriamente en dos grupos. El grupo control tuvo acceso al agua y alimento *ad libitum*, mientras que en el grupo tratado se sustituyó el agua por una solución de sacarosa al 20 %. Este tratamiento se administró por 8 semanas, durante las cuales se dio seguimiento al peso corporal, ingesta de alimento y agua; cuantificación de triglicéridos, colesterol y glucosa, así como mediciones por bioimpedancia de la composición corporal.

Al concluir el tratamiento se procedió a la extracción en fresco de los islotes pancreáticos para la realización del Western-blot y cultivo celular o se perfundió con paraformaldehído al 4 % para la inclusión del páncreas en parafina y su posterior inmunofluorescencia. Se confirmó la adherencia al modelo de inducción de SM a través de la medición de peso corporal, glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina, glucagón, interleucina 1 β y adiposidad.

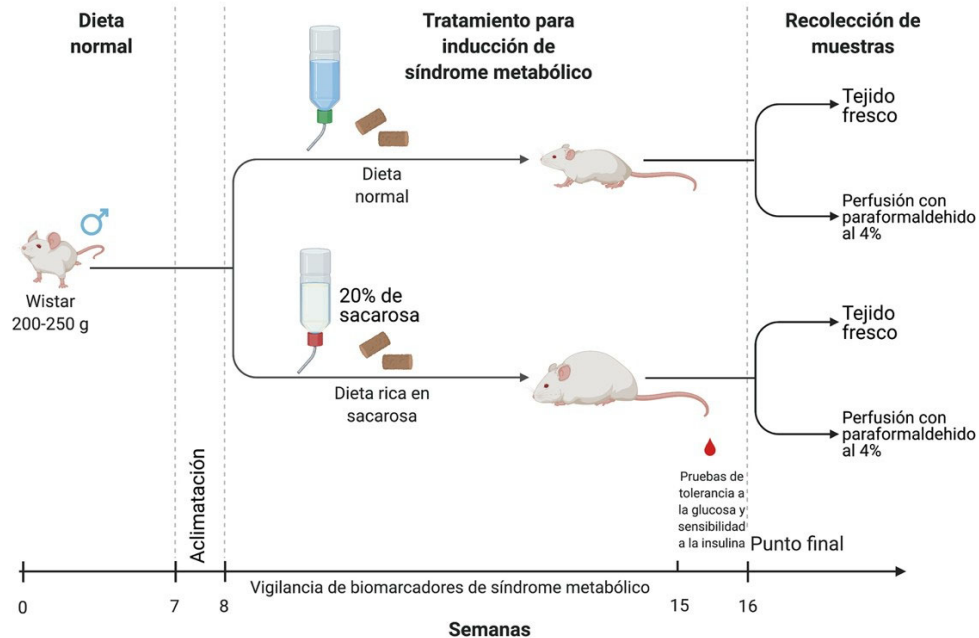


Figura 2. Modelo de inducción de síndrome metabólico.

Determinación de glucosa, triglicéridos y colesterol en sangre.

Previa anestesia con pentobarbital sódico i.p. (38 mg/kg), se obtuvo sangre capilar de la cola mediante una pequeña incisión. Se utilizó el equipo de medición colorimétrico Acutrend Plus System, marca Cobas (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa

Se administró un bolo intraperitoneal de glucosa (1 g/kg) tras 12 h de ayuno. Los niveles capilares de glucosa se midieron en sangre obtenida mediante punción de la vena dorsal de la cola bajo anestesia (pentobarbital sódico 38 mg/kg i.p.). Se recolectaron las muestras en el minuto 0, antes de la administración del bolo, y a los 15, 30, 60 y 120 minutos de la prueba. Se descartaron las curvas con un incremento menor del 85 % sobre el valor basal en el minuto 15, por administración incorrecta del bolo. Se evaluó la hipertrigliceridemia inducida por carbohidratos en respuesta al bolo de glucosa a los 0, 60, 120, 180 y 240 minutos.

Prueba de sensibilidad a la insulina

Se administró una dosis de insulina (0.75 UI/kg i.p.) tras 12 h de ayuno para evaluar la reducción de glucosa. Los niveles capilares de glucosa se midieron en sangre obtenida mediante punción de la vena dorsal de la cola bajo anestesia (pentobarbital sódico 38 mg/kg i.p.). Se recolectaron las muestras en el minuto 0, antes de la administración del bolo, y en los minutos 15, 30, 60 y 120 de la prueba.

Cuantificación de hormonas y citocinas

Previo ayuno por 18 h, se extrajo sangre de vena cava superior, se aisló el plasma mediante centrifugación y se almacenó a menos 70°C para la determinación de insulina, glucagón e interleucina 1β. Se utilizaron los kits de ELISA listados en la Tabla 7 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de absorbancia por espectrofotometría se obtuvieron con un lector de microplacas ELx800 marca BioTek de acuerdo con las especificaciones sugeridas por el fabricante.

ID	BIOMARCADOR	NOMBRE	CATÁLOGO	COMPAÑÍA
E1	Insulina	Rat Insulin ELISA	80-INSRT-E01	ALPCO
E2	Glucagón	Glucagon Quantikine ELISA kit	DGCG0	R & D systems
E3	Il-1β	Rat Il-1β (Interleukin 1β) ELISA kit	E-EL-R0012	Elabscience

Tabla 7. Kits de ELISA utilizados.

Bioimpedancia

Se realizaron mediciones de impedancia bioeléctrica de frecuencias múltiples tras 12 h de ayuno en ratas bajo anestesia (pentobarbital sódico i.p. 38 mg/kg). Este análisis permite estimar cuatro compartimentos, la masa magra, la grasa corporal, el agua corporal total y el agua extracelular (K. Rutter et al., 1998). Brevemente, se colocan dos pares de electrodos subcutáneos en el eje longitudinal de la rata, detrás del cuello y en la base de la cola. Los electrodos estimuladores emplean una corriente de 800 μA con una frecuencia baja de 5 kHz y una frecuencia alta de 50 kHz, para determinar la composición corporal en conjunto con la longitud y peso del animal de acuerdo con ecuaciones validadas en la literatura (Cornish et al., 1992). El aparato empleado se construyó *ad hoc* en colaboración con el Departamento de Ingeniería Eléctrica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Salazar, 2011).

VARIABLES DERIVADAS

El estado metabólico de animales individuales se evaluó mediante los índices HOMA-IR, McAuley, insulina/glucagón y triglicéridos/glucosa. Para las diversas fórmulas, los valores de insulina se convirtieron de ng/mL a μUI/mL de acuerdo con el factor de conversión provisto por el fabricante del kit de cuantificación de Insulina: 1 ng/mL = 24.8 μIU/mL.

La resistencia a la insulina se evaluó mediante el modelo de evaluación de la homeostasis, HOMA, empleando una fórmula específica y validada para ratas Wistar (Cacho et al., 2008).

Ecuación 1. Índice de resistencia a la insulina HOMA.

$$IR_{HOMA} = \frac{Glu \times Ins}{2430}$$

La sensibilidad a la insulina se estimó utilizando el índice McAuley (McAuley et al., 2001).

Ecuación 2.2. Índice de sensibilidad a la insulina McAuley.

$$S_{McAuley} = \frac{100}{\frac{Glu}{Glu_{fast}} \times \frac{Ins}{Ins_{fast}}}$$

El índice triglicéridos y glucosa (TyG) es otra medida subrogada para estimar la resistencia a la insulina (Simental-Mendía & Guerrero-Romero, 2020).

Ecuación 3. Índice de triglicéridos y glucosa.

$$Índice = \frac{\ln \left(\frac{TC}{HDL-C} \right) \times \frac{FBG}{100}}{2}$$

Finalmente, la razón insulina/glucagón se ha propuesto como un indicador del balance energético del organismo (Kalra & Gupta, 2016).

Ecuación 4. Razón insulina glucagón.

$$C_{I/G} = \frac{I}{G}$$

Sistema endocannabinoide del islote pancreático

Los cambios inducidos por el SM en el ECS de los islotes pancreáticos, se evaluaron mediante diferencias en la liberación de insulina de cultivos primarios de células del islote pancreático y la expresión de proteínas de los componentes del ECS (Figura 3).

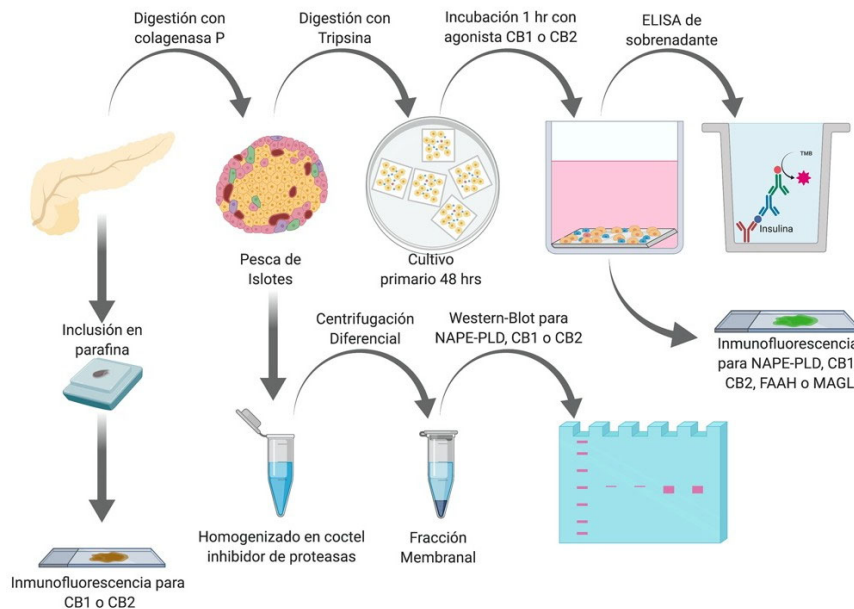


Figura 3. Metodología empleada. Se muestra el flujo de trabajo utilizado para realizar inmunofluorescencia de secciones de tejido, Western-blot de la fracción membranal de islotes completos, inmunofluorescencia de cultivos primarios y cuantificación de la liberación de insulina al sobrenadante por agonistas y antagonistas farmacológicos.

Extracción de islotes pancreáticos y cultivos celulares

La recolección de islotes pancreáticos frescos para cultivos celulares se realizó mediante la técnica descrita por Velasco et al., 2018. Previa anestesia con pentobarbital sódico (38 mg/kg), i.p, se realizó la extracción quirúrgica del páncreas insuflado con Solución Balanceada de Sales de Hanks (HBSS). Se realizó digestión con colagenasa-P (Roche) a una concentración de 4 ug/ml, durante 15 minutos con agitación lateral. Tras lavar la colagenasa

y reemplazar con nueva solución de Hanks, se seleccionaron islotes a mano con micropipeta, obteniendo alrededor de 300 islotes por rata. Para la realización de cultivos celulares, tras obtener una cantidad de 100 islotes limpios de tejido conectivo, se realizó digestión con tripsina por 3 minutos, y se sembraron las células aisladas sobre cristales de 5mm², cubiertos con Poli-L-Lisina. Se cultivaron durante 48 h en RPMI.

Con la finalidad de observar los efectos del ECS en la secreción de insulina de las células β aisladas, se realizó incubación de diversos fármacos en cultivos primarios de islotes disociados. Se incubaron cultivos por una hora con un agonista CB1, CB2 o un antagonista CB1 (Tabla 8). Tras el periodo de incubación (1 h) se recolectó el sobrenadante para cuantificar liberación de insulina al medio mediante ELISA. La viabilidad celular se evaluó utilizando azul de tripano como marcador de células muertas.

ID	FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	EFEECTO	CATÁLOGO	COMPAÑÍA
D1	DMSO	0.1 %	Vehículo	D8418	Sigma-Aldrich
F1	R-1-meta anandamida	10 μ M	Agonista CB1	90070	Cayman chemical
F2	JWH-015	10 μ M	Agonista CB2	J4252	Sigma-Aldrich
F3	AM251	10 μ M	Antagonista CB1	A6226	Sigma-Aldrich

Tabla 8. Fármacos con acción sobre el sistema cannabinoide. Se listan los fármacos y concentraciones empleadas en los experimentos de cultivos primarios incubados por 1 hora

Expresión de proteínas del sistema endocannabinoide

Para analizar los cambios en la expresión de las proteínas se realizaron dos técnicas de detección mediante anticuerpos, Western-blot e inmunofluorescencia. Los anticuerpos utilizados para estos procedimientos se señalan en las Tablas 9 y 10. Para identificar las poblaciones celulares en cultivos primarios se llevaron a cabo pruebas separadas con anticuerpos contra insulina y contra glucagón, identificando células beta y no-beta o células alfa y no-alfa (imágenes no mostradas).

Se llevaron a cabo ensayos de Western-blot de islotes completos extraídos en fresco para evaluar los cambios en la expresión de las proteínas NAPE-PLD, CB1 y CB2 en el SM en las fracciones membranal y citosólica de los homogenados. Se realizaron cultivos de células aisladas de ratas control para determinar mediante doble inmunofluorescencia la ubicación de la enzima de síntesis NAPE-PLD, los receptores CB1 y CB2 y las enzimas de degradación FAAH y MAGL en células β y no- β . También se realizó inmunofluorescencia para observar esta localización en tejido pancreático incluido en parafina, de ratas control y ratas tratadas.

ID	ANTÍGENO	WB	IF	HUÉSPED	CATÁLOGO	COMPAÑÍA
A1	GAPDH	1:1500	-	Ratón	GTX627408	GENETEX
A2	CB1	1:1500	1:500	Conejo	cat 10006590	Cayman Chemical Company
A3	CB2	1:500	1:500	Conejo	sc-25494	Santa-Cruz
A4	NAPE-PLD	1:1000	1:500	Conejo	NB110-80070	Novus Biologicals

A5	FAAH	1:500	1:200	Ratón	ab54615	Abcam
A6	MAGL	1:500	1:200	Cabra	ab77398	Abcam
A7	Insulina	-	1:500	Cabra	sc-25494	Santa-Cruz
A8	Glucagón	-	1:500	Cabra	sc-7780	Santa-Cruz

Tabla 9. Anticuerpos primarios. Los anticuerpos primarios empleados en esta tesis se encuentran enlistados. La columna WB indica las diluciones empleadas para la técnica de Western-blot. La columna IF contiene las diluciones utilizadas para la técnica de inmunofluorescencia.

ID	ANTÍGENO	HUÉSPED	MARCADOR	CATÁLOGO	COMPAÑÍA
B1	IgG cabra	Burro	AlexaFluor 546	A11056	Life Technologies
B2	IgG conejo	Burro	AlexaFluor 488	ab150073	Abcam
B3	IgG cabra	Burro	Texas Red	GTX 26883	GENETEX
B4	IgG conejo	Cabra	DyLight 488	GTX213110	GENETEX
B5	IgG ratón	Cabra	FITC	g2-6511	Invitrogen
B6	IgG cabra	Conejo	Biotina	BA-5000	ZyMax
B7	IgG conejo	Cabra	Biotina	BA-1000	ZyMax
B8	IgG ratón	Cabra	HRP	GTX213111	GENETEX
C1	Estreptavidina	NA	HRP	43-4323	ZyMax

Tabla 10. Anticuerpos secundarios. Los anticuerpos secundarios empleados en esta tesis se encuentran enlistados.

Centrifugación diferencial

Los receptores a cannabinoides pueden tener localización subcelular en la membrana o en el citosol. Se usó una centrifugación diferencial para separar estos componentes celulares previo a realizar la técnica de Western-blot. Se hicieron alícuotas de 300 islotos, las cuales se colocaron en un buffer de Tris-HCl, con inhibidores de proteasas (aprotinina (3 mg/ml), DTT (1M) y PMSF (13.9 mg/ml)). Tras homogeneizar en frío las muestras se realizó una centrifugación diferencial para obtener una fracción membranal y una fracción citosólica. Se compararon 2 métodos de centrifugación diferencial para separar estas fracciones.

Protocolo 1 (Navarro et al., 2003)

Tras homogeneizar la muestra por sonicación en el buffer adicionado con inhibidores de proteasas la muestra se centrifuga a 600 g por 10 minutos a 4°C, se desecha el primer precipitado (P1) y el sobrenadante se centrifuga a 39,000 g por 15 minutos a 4°C para obtener el segundo precipitado (P2) que contiene la fracción membranal y el segundo sobrenadante (S2) que contiene la fracción citosólica.

Protocolo 2 (Lodish et al., 2000)

Tras homogeneizar la muestra por sonicación en el buffer adicionado con inhibidores de proteasas la muestra se centrifuga a 600 g por 5 minutos a 4°C. El primer precipitado (P1) contiene los núcleos celulares y restos de tejido. El primer sobrenadante (S1) se centrifuga a 15,000 g por 5 minutos a 4°C para obtener el segundo precipitado (P2) que contiene mitocondrias. El segundo sobrenadante (S2) se centrifuga a 100,000 g por 1 hora a 4°C para

obtener el tercer precipitado (P3) que contiene la fracción membranal y el tercer sobrenadante (S3) que contiene la fracción citosólica.

Cuantificación de la expresión proteica mediante la técnica de Western-blot

Se llevó a cabo la cuantificación de la concentración proteica de los homogenados, tomando 5 μ l y 2 μ l, de sobrenadante y precipitado, respectivamente, utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951). Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida adicionados con SDS (SDS-PAGE) al 12 %, a 150 V. Se colocaron 60 μ g de proteína por carril. Se transfirió el patrón proteico resultante a una membrana de PVDF (Membrana Immobilon-P de 0.45 micras) a 150 mA, durante 1 hora a 4°C, que se tiñó con Rojo de Ponceau S, para verificar la transferencia, se registró en un fotodocumentador con cámara CCD (Romero-calvo et al., 2010); la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (Tabla 9), por 24 h a 4°C, en PBS 1X-Tween 20 al 0.3 %, leche baja en grasa al 10 % y suero normal de cabra al 2 %, Tras la incubación se lavó la membrana con PBS 1X-Tween 20 al 0.3 % (3X, 5') y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (1:2000) (Tabla 10), Se realizaron 3 lavados con PBS 1X-Tween 20 al 0.3 %, por 5 minutos cada uno y un lavado con PBS 1X durante 5 minutos; se reveló con diaminobencidina (50 mg/ml) en PBS 1X con H₂O₂ al 30 %, por 15 minutos y se detuvo la reacción. Se fotografió la membrana utilizando un fotodocumentador (Bio-Rad) y una cámara CCD. La señal óptica generada por este ensayo se analizó por medio del programa ImageJ 1.52n.

Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia de páncreas completo, tras la anestesia con pentobarbital i.p., se realizó perfusión intracardiaca con solución de paraformaldehído al 4 %, se extrajo el páncreas y se realizó su inclusión en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 7 μ m de grosor y se montaron sobre laminillas silanizadas. Se desparafinaron los cortes y se realizó la recuperación antigénica en buffer de citratos a 90°C por 30 minutos. Para la inmunofluorescencia de células aisladas se tomaron los vidrios sembrados tras el periodo de incubación por 48 h. Se fijaron con paraformaldehído al 4 % por 20 minutos y se lavaron en PBS.

En ambos casos se realizó el bloqueo con 10 % de albúmina en PBS con tritón X100 al 0.03 % por una hora. Tras los lavados se incubó con los anticuerpos primarios para la proteína de interés (Tabla 9) y en todos los casos se añadió el anticuerpo primario de cabra anti-insulina (sc-7839, Santa Cruz Biotechnology) por 24 h a 4°C. Al día siguiente se incubó por 2 h con los anticuerpos secundarios (1:500) (Tabla 10) AlexaFluor 488 anti-conejo (ab150073, Abcam) y AlexaFluor 546 anti-cabra (A11056, Life Technologies) y DAPI 1:30,000. Se montaron las lamillas y se observaron en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600 equipado con una cámara Evolution (MediaCybernetics) para el tejido incluido en parafina, y en microscopio confocal Zeiss LSM 880 para los cultivos celulares. Para la ubicación subcelular de MAGL y FAAH se utilizó el microscopio multifotónico Olympus FVMPE-RS.

Las imágenes se analizaron con el software FIJI, una distribución de ImageJ (NIH), para la determinación de la densidad integrada de las marcas, el área y diámetro de las células. Se calculó la inmunofluorescencia total corregida (Gavet & Pines, 2010).

Ecuación 5. Fluorescencia total corregida.

$$H=I = J. / + 2 < , < 2 / B. \& C. , < , - (\acute{A} C. ,) . ' (' , C \times 8 ' (* C. +) . - /) 2 , 2 / . - + N .) í 8 2) , N C * 9 . - < 2 *)$$

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad para todas las variables utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Las diferencias entre grupos se determinaron utilizando prueba T de Student no pareada para las variables de distribución normal, y prueba U de Mann-Whitney para las variables de distribución no-normal. En los casos que se llevaron a cabo múltiples pruebas se realizó la corrección de Holm-Sidak. Los resultados se muestran como cajas y bigotes de Tukey, que expresan la mediana (línea media), el rango intercuartilar (caja), 1.5 veces el rango intercuartilar (bigotes) y los valores extremos (símbolos aislados). En el caso de las variables seguidas a lo largo del tiempo, o cuando dos diferentes factores entre grupos fueron considerados se realizó ANOVA de dos vías con prueba *post hoc* de Bonferroni. Los resultados se presentan como media \pm SEM. Para evaluar la correlación entre dos variables se utilizó correlación de Spearman en los casos que se buscó una correlación monotónica no necesariamente lineal, y correlación de Pearson cuando se buscó correlación lineal. Estos resultados se presentan como gráficos de dispersión con regresión lineal e intervalo de confianza del 95 %. El nivel de significancia estadística se fijó en $p < 0.05$. Se utilizó el programa Prism 8.3 (GraphPad).

Resultados

Inducción del síndrome metabólico mediante una dieta rica en sacarosa

Consumo de macronutrientes en una dieta rica en sacarosa

Para dar seguimiento a los efectos de la adición de sacarosa al 20 % al agua potable del grupo SM se recolectaron los datos de consumo de agua y alimento (Figura 4). A partir de éstos se calculó el consumo calórico utilizando la información nutrimental provista para el alimento y la sacarosa empleados en este estudio. Debido a que el agua y alimento se proporcionaron *ad libitum*, durante la semana 0 previo al inicio de la adición de sacarosa a la dieta, se corroboró que en ambos grupos el consumo de agua, alimento, calorías y macronutrientes era similar.

A partir de la primera semana de tratamiento hay diferencias entre los grupos en estos cuatro rubros. Las ratas pertenecientes al grupo SM incrementaron su consumo de agua respecto al grupo control, al tiempo que no incrementaron el consumo de alimento (Figura 4 A y B). Esto resultó en una disminución del porcentaje de calorías provenientes del alimento. A pesar de esta reducción relativa de la ingesta de alimento, el consumo calórico se vio incrementado respecto al grupo control, a expensas de un mayor consumo de carbohidratos, con una reducción del consumo de grasas y proteínas en el grupo SM (Figura 4 C y D). Estos cambios sugieren una compensación relativa del consumo calórico a través de la disminución de consumo de alimento, que no logra reducir completamente el consumo calórico.

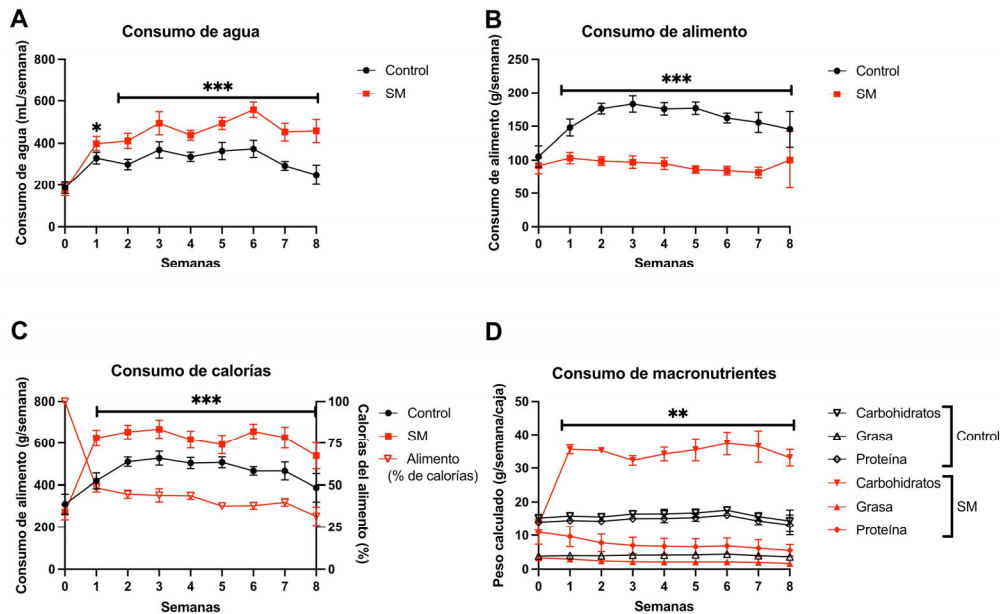


Figura 4. Consumo en el modelo de inducción de síndrome metabólico. Se estudiaron los cambios en la composición de la ingesta como resultado de la adición de 20 % de sacarosa al agua potable durante las 8 semanas que duró el tratamiento de inducción del SM. El panel A muestra el consumo de agua semanal por cada pareja de animales. El panel B muestra el

consumo de alimento semanal por cada pareja de animales. El panel C muestra el consumo calórico total resultado de las dietas del grupo control (círculos negros) y el grupo SM (cuadrados rojos). El porcentaje de calorías proveniente del alimento en el grupo SM (triángulos invertidos rojos) se graficó sobre el eje derecho en el panel C. El panel D muestra el consumo de macronutrientes (carbohidratos en triángulos invertidos, grasa en triángulos, y proteína en rombos) para las ratas del grupo control (negro) y las ratas del grupo con SM (rojo). Las series de tiempo se presentan como media \pm S.E.M. Se utilizó ANOVA de dos vías con una prueba post hoc de Bonferroni para comparar las diferencias semanales entre grupos.

* indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$.

Cambios en la composición corporal inducidos por una dieta rica en sacarosa

Como resultado de la dieta hipercalórica y rica en carbohidratos se observaron cambios en los triglicéridos séricos en ayuno, la ganancia de peso corporal, la composición corporal y la grasa visceral (Figura 5). Desde la semana 2 de tratamiento puede observarse un incremento en los triglicéridos séricos en ayuno para el grupo SM (Figura 5 A). Aunque ambos grupos incrementaron su peso corporal a lo largo del tratamiento, a partir de la sexta semana el grupo SM alcanzó pesos corporales significativamente mayores (Figura 5 B). Esta ganancia en peso ocurrió en función de una mayor cantidad de grasa corporal total estimada por bioimpedancia, sin cambios en masa magra, agua corporal total ni líquido extracelular (Figura 5 C y D).

Al final del tratamiento, tanto la masa magra como la grasa corporal total fueron mayores en el grupo SM. Este incremento de grasa corporal estimada se vio reflejado en un incremento en el peso de los paquetes de grasa periviscerales, tales como la grasa pericárdica, peripancreática, epididimal y retroperitoneal. Para corroborar la estimación obtenida mediante la bioimpedancia, se cuantificó el peso de diferentes componentes corporales tras la disección (Figura 6). Para obtener el componente de tejido adiposo se sumó el peso de la piel y grasa subcutánea con los paquetes de grasa perivisceral. Por otro lado, la masa magra es el peso de la carcasa musculoesquelética y los órganos internos.

Hay correlaciones entre los pesos estimados de la composición corporal mediante bioimpedancia y los pesos medidos directamente tras la disección, exceptuando los paquetes de grasa epididimal y retroperitoneal (Figura 6). Tanto las mediciones estimadas por bioimpedancia como las mediciones finales tras la disección muestran un incremento en la adiposidad en los animales del grupo SM, mientras que las mediciones de agua por bioimpedancia y las mediciones de tejido magro por disección no muestran diferencias (Tabla 11 y 12).

En consecuencia, se muestra que tras las 8 semanas de tratamiento el incremento en el peso final del grupo SM se debió a un cambio en la composición corporal (Figura 7 A y B). Este incremento de grasa corporal se vio reflejado en la cantidad de grasa visceral e interleucina 1β , un marcador de estado proinflamatorio, en el grupo SM, observándose una fuerte correlación positiva entre la cantidad total de grasa corporal y visceral con los niveles de interleucina 1β en suero (Figura 7).

Estimación de la masa por bioimpedancia (g)

	Control media S.E.M	± SM media S.E.M	± Diferencia S.E.	± U de Whitney	Mann- p Value
<i>Pesocorporal total***</i>	362 ± 9	417 ± 10	55 ± 13	298.5	<0.001
<i>Grasa corporal**</i>	149 ± 7	181 ± 7	32 ± 10	336	<0.01
<i>Masa magra**</i>	213 ± 5	236 ± 4	24 ± 6	315	<0.01
<i>Agua extracelular^{ns}</i>	88 ± 5	81 ± 2	-7 ± 6	475	0.96
<i>Agua corporal total^{ns}</i>	247 ± 11	246 ± 9	-1 ± 14	491	0.96

Tabla 11. Mediciones de bioimpedancia.

Mediciones directas del peso de los tejidos (g)

	Control media ± S.E.M	SM media ± S.E.M	Diferencia S.E.	± U de Whitney	Mann- p Value
<i>Cintura (cm)^{ns}</i>	19 ± 0.3	19.4 ± 0.4	0.4 ± 0.5	595	0.34
<i>Grasa corporal total***</i>	90 ± 5	125.8 ± 6.9	8.5 ± 4.2	19	<0.001
<i>Piel y tejido subcutáneo**</i>	88.9 ± 5.5	107.2 ± 5.8	18.3 ± 8	177.5	<0.01
<i>Grasa visceral*</i>	8 ± 0.8	10.8 ± 1	2.8 ± 1.2	185.5	<0.05
<i>Grasa pericárdica**</i>	0.1 ± 0	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	57	<0.01
<i>Grasa peripancreática**</i>	1.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2	362.5	<0.01
<i>Grasa epididimal**</i>	3.4 ± 0.3	5.4 ± 0.4	1.9 ± 0.5	322.5	<0.001
<i>Grasa retroperitoneal***</i>	3 ± 0.3	5.5 ± 0.5	2.5 ± 0.6	192.5	<0.001
<i>Masa magra^{ns}</i>	250.3 ± 9.3	260.4 ± 10.4	10.1 ± 13.9	249	0.22
<i>Carcasa^{ns}</i>	178.8 ± 7.6	184.1 ± 8.4	5.2 ± 11.4	265.5	0.37
<i>Órganos^{ns}</i>	71.5 ± 2.4	76.4 ± 2.8	4.9 ± 3.7	257.5	0.29

Tabla 12. Peso de los tejidos obtenidos por disección.

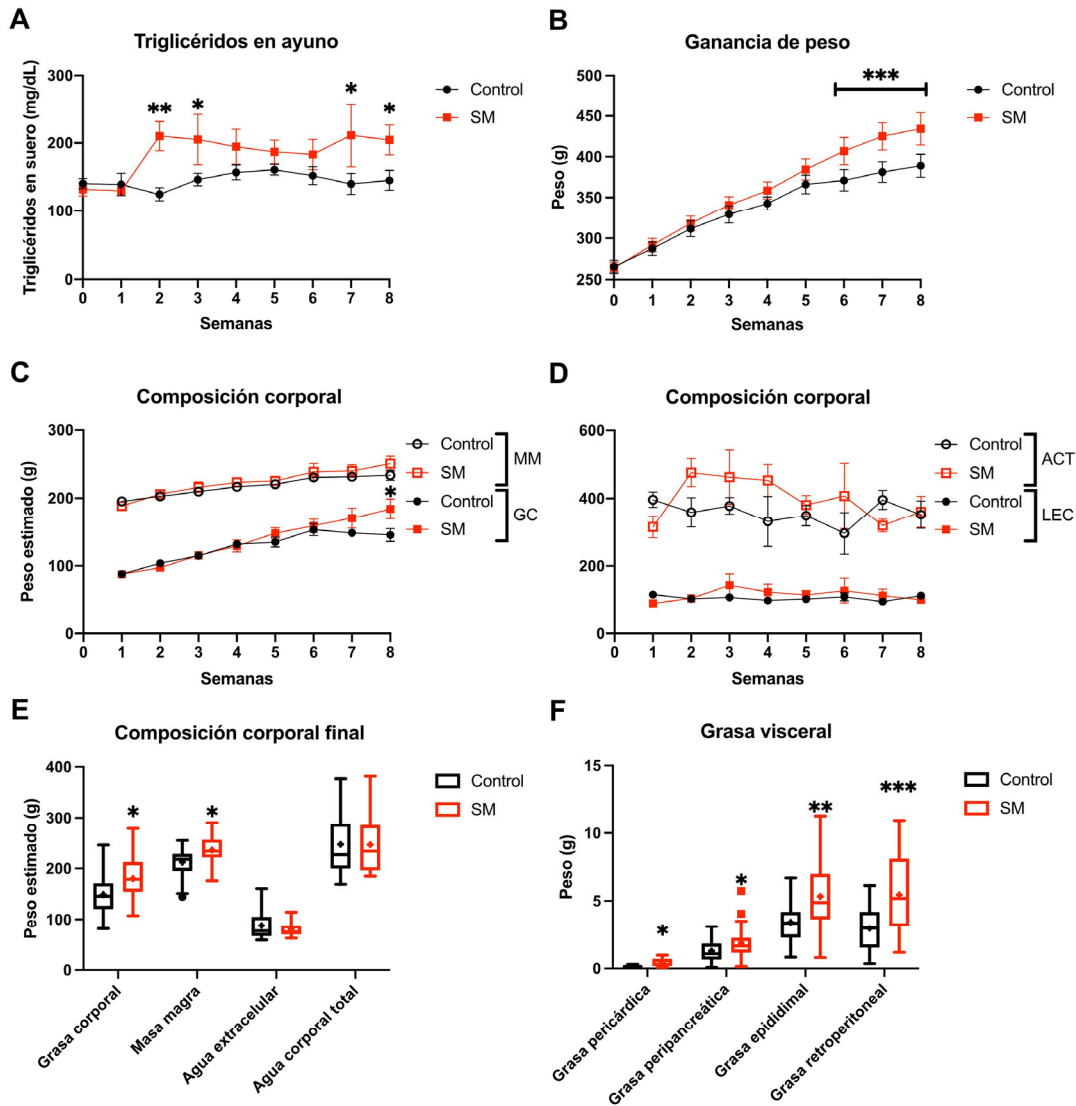


Figura 5. Desarrollo temprano de síndrome metabólico. El panel A muestra los niveles plasmáticos de triglicéridos en ayuno a lo largo del tratamiento. La ganancia de peso corporal a lo largo de las 8 semanas de tratamiento se muestra en el panel B. Los paneles C y D muestran los cambios en la composición corporal estimados a través de la bioimpedancia. En el panel C, los círculos y cuadrados huecos indican el peso estimado de la masa magra (MM), mientras que los círculos y cuadrados rellenos muestran la grasa corporal (GC), para los grupos control (negro) y de SM (rojo), respectivamente. En el panel D, los círculos y cuadrados huecos indican el peso estimado del agua corporal total (ACT) y los círculos y cuadrados rellenos muestran el peso estimado de líquido extracelular (LEC) para los grupos control (negro) y de SM (rojo). El panel E muestra las diferencias en composición corporal en el punto final del protocolo de inducción de SM. Finalmente, el panel F muestra las diferencias de peso de los paquetes de grasa visceral entre las ratas control y las ratas con SM. Las series de tiempo de los paneles A-D se muestran como media \pm S.E.M. y fueron analizadas con ANOVA de 2 vías con prueba post hoc de Bonferroni. La composición corporal y los paquetes de grasa visceral se muestran como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartilar y el rango de los datos. Las comparaciones múltiples en los paneles E y F se realizaron con U de Mann-Whitney y prueba post hoc Bonferroni-Dunn. Los valores p se encuentran representados como * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$.

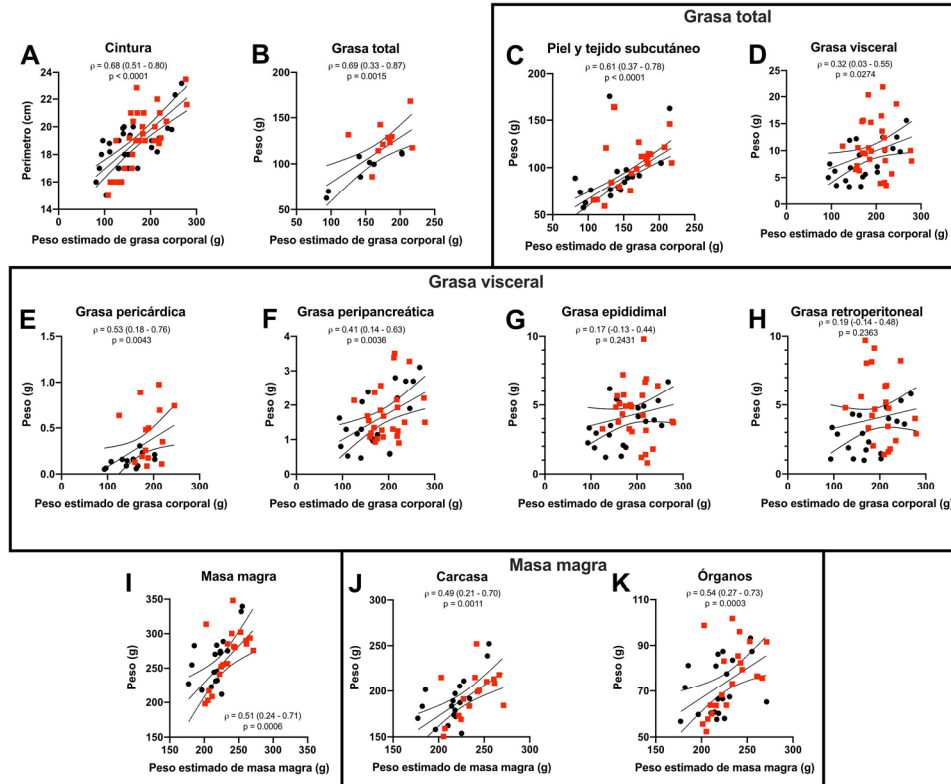


Figura 6. Validación de la técnica de bioimpedancia. Los pesos estimados de grasa corporal y masa magra fueron comparados mediante correlación de Spearman contra la medición directa del peso de los componentes adiposos y magros obtenidos por disección. El panel A muestra la correlación entre el peso estimado de grasa corporal y el perímetro de la cintura. El panel B muestra la correlación entre el peso estimado de la grasa corporal y el peso total de los componentes adiposos por disección. Este peso es el resultado de la suma de la piel y grasa subcutánea, panel C, y la grasa visceral, panel D. A su vez, la grasa visceral es la suma de la grasa pericárdica, panel E, la grasa peripancreática, panel F, la grasa epididimal, panel G y la grasa retroperitoneal, panel H. De igual manera, el panel I muestra la correlación entre el peso estimado de la masa magra y el peso total de los componentes magros por disección. El peso estimado de la masa magra fue comparado con el peso de la carcasa, panel J, y el peso de los órganos intratorácicos e intrabdominales, panel K. En todas las figuras se muestran los valores obtenidos de ratas control en círculos negros y de ratas con SM en cuadrados negros. El mejor ajuste de la regresión lineal se muestra en la línea continua y las líneas punteadas muestran los intervalos de confianza del 95 %. Se muestra ρ , los intervalos de confianza del 95 % y la p de la correlación de Spearman para mostrar la asociación monotónica entre las variables.

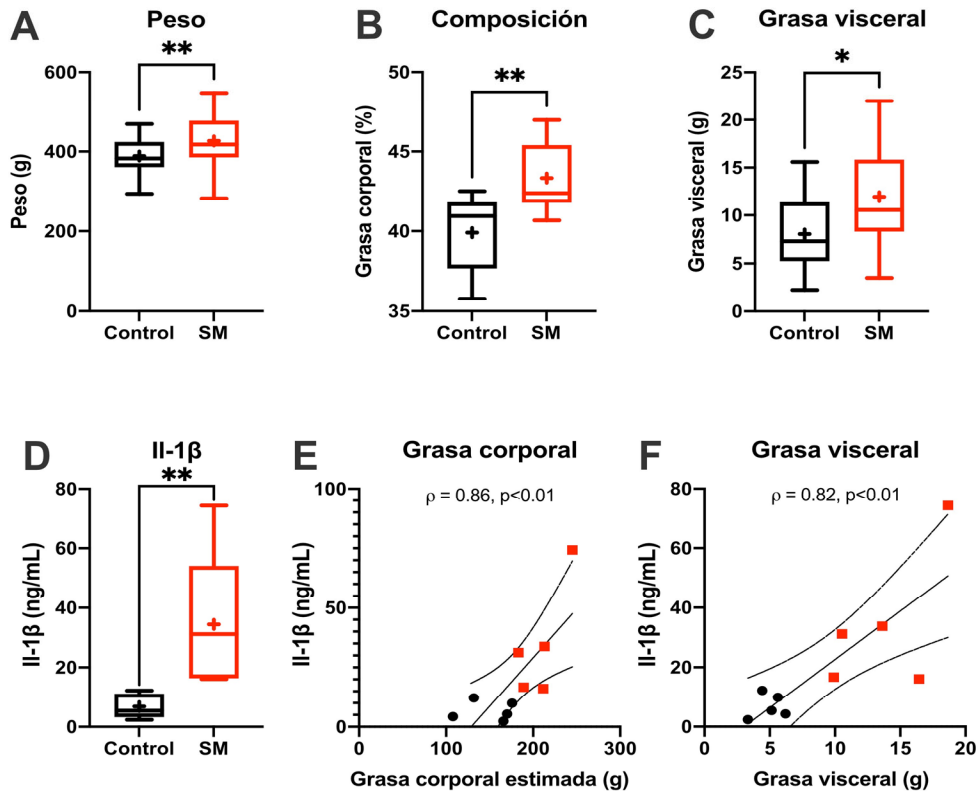


Figura 7. Incremento de la adiposidad visceral y estado proinflamatorio. La asociación entre el incremento de la adiposidad visceral y el biomarcador de estado proinflamatorio Interleucina 1 β (Il-1 β). Las diferencias en peso total al final de las 8 semanas de tratamiento se muestran en el panel A. La composición corporal, expresada como porcentaje de grasa corporal estimado por bioimpedancia se encuentra en el panel B. El peso de la grasa visceral, la suma de los paquetes de grasa pericárdica, peripancreática, epididimal y retroperitoneal, se presenta en el panel C. Las concentraciones séricas de Il-1 β se muestran en el panel D. La correlación positiva de las concentraciones séricas de Il-1 β con la grasa corporal estimada, panel E, y la grasa visceral, panel F, se presentan con la regresión lineal y los intervalos de confianza del 95 %. Las comparaciones entre grupos en los paneles A, B, C y D se realizaron con U de Mann-Whitney. Los valores p se encuentran representados como * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$.

Alteración de la regulación de la glucemia en el síndrome metabólico

En el grupo SM se encuentra alterada la regulación de la glucosa. Aunque los valores de glucosa en ayuno son similares para ambos grupos, la insulina basal para mantener estos niveles se encuentra elevada en el grupo SM (control 1.4 ± 0.2 ng/mL vs. SM 5 ± 0.8 ng/mL, $p < 0.001$, Figura 8 A y B). La curva de tolerancia a la glucosa muestra un mayor pico en los minutos 15 (control 143 ± 3 mg/dL vs. SM 220 ± 18 mg/dL, $p < 0.001$) y 30 (control 129 ± 5 mg/dL vs. SM 169 ± 11 mg/dL, $p < 0.05$) de la prueba, así como una mayor área bajo la curva (Figura 8 C y D). La relación entre glucosa e insulina se emplea para obtener una medida subrogada de resistencia a la insulina, el índice HOMA, que se encuentra elevado en el grupo SM (control 1.8 ± 0.3 a.u. vs. SM 6.4 ± 1.4 a.u., Figura 8 E).

Los niveles de glucagón en ayuno no tienen diferencias significativas entre los grupos, aunque hay una tendencia a mayores valores en el grupo SM, en consecuencia, la razón insulina/glucagón se encuentra equilibrada para ambos grupos (Figura 8 F y G). La prueba de respuesta a la insulina muestra que ambos grupos logran en el minuto 60 una reducción máxima similar de la glucosa por debajo de los niveles iniciales en ayuno (control 67 % vs SM 69 %, Figura 8 H). Acorde con los mayores niveles circulantes de glucagón, el grupo SM regresa a los valores iniciales de glucosa al final de la prueba mientras que el grupo control permanece hipoglucémico. El área bajo la curva de disminución de la glucosa en la sangre en respuesta a la insulina es menor para el grupo SM (Figura 8 I). Esto correlaciona bien con el índice McAuley, un índice subrogado de sensibilidad a la insulina que emplea los valores de triglicéridos en ayuno y la insulina basal (Figura 8 J).

Los niveles de glucosa en ayuno correlacionan fuertemente con la relación insulina/glucagón (Figura 8 K). Aunque los triglicéridos en ayuno ya se encuentran elevados (control 135 ± 7 mg/dL vs. SM 220 ± 11 mg/dL), en el grupo SM hay una mayor hipertrigliceridemia inducida por carbohidratos para el minuto 180 (control 117 ± 9 mg/dL, incremento del 108 % vs. SM 216 ± 28 mg/dL, incremento del 141 %, $p < 0.05$), por lo que el área bajo la curva del porcentaje de incremento de triglicéridos en respuesta a la administración intraperitoneal de glucosa es mayor en el grupo SM (Figura 8 L, M y N). En consecuencia, el índice TyG se encuentra también incrementado en el grupo SM (Figura 8 O).

En suma, tras 8 semanas de una dieta rica en sacarosa (20 % del agua potable), los animales del grupo SM cuentan con un incremento en la adiposidad visceral, dislipidemia, deterioro de la regulación de la glucemia y un estado proinflamatorio, juntando criterios similares para el SM desarrollado por humanos.

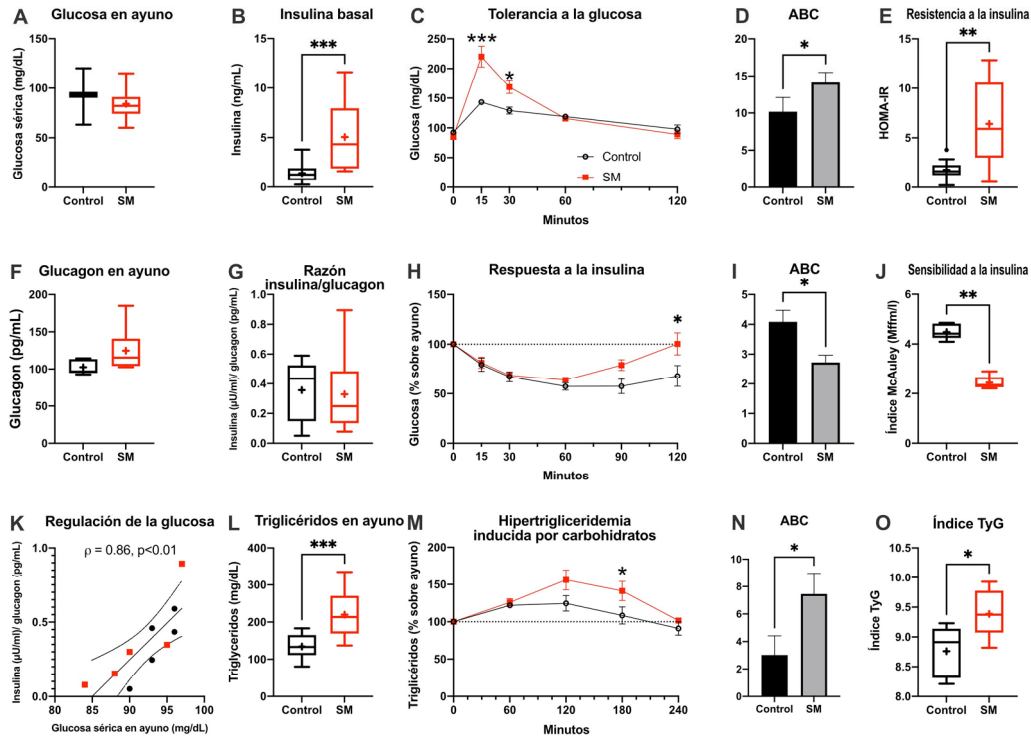


Figura 8. Alteración de la homeostasis de la glucosa en el síndrome metabólico. Se presenta el estado metabólico de los grupos control y con SM al término de las 8 semanas de tratamiento. El panel A muestra las mediciones en ayuno de glucosa capilar, mientras que la insulina basal en plasma se muestra en el panel B. Para la prueba de tolerancia a la glucosa, ésta se administró con una dosis de 1 g/kg de peso por vía intraperitoneal y sus valores plasmáticos se encuentran representados junto con el área bajo la curva (ABC) en el panel C y D. La estimación de la resistencia a la insulina mediante el índice HOMA se presenta en el panel E. Las concentraciones séricas de glucagón en ayuno se muestran en el panel F. La razón insulina (μUI/L) glucagón (pg/mL) se encuentra en el panel G. La prueba de respuesta a la insulina está presentada como el porcentaje de cambio respecto a los niveles de glucosa en ayuno junto con el área bajo la curva en el panel H. La insulina fue administrada vía intraperitoneal con una dosis de 0.75 UI/Kg. El área bajo la curva se midió como el área de descenso de la glucosa por debajo de los niveles iniciales en el panel H. La sensibilidad a insulina se estimó utilizando el índice McAuley empleando los valores en ayuno de triglicéridos e insulina. La correlación entre la razón insulina glucagón y los niveles de glucosa en ayuno se muestra mediante la regresión lineal y los intervalos de confianza del 95 % en el panel J. Los valores de triglicéridos en ayuno se muestran en el panel L. Finalmente la hipertrigliceridemia inducida por carbohidratos correspondiente a la prueba de tolerancia a la glucosa se muestra como porcentaje de cambio respecto a los niveles de triglicéridos en ayuno junto con el área bajo la curva sobre los valores iniciales en los paneles M y N. La resistencia a la insulina también puede estimarse mediante el índice TyG empleando los valores en ayuno de triglicéridos y glucosa, panel O. Las series de tiempo y las variables con distribución normal están presentadas como media \pm S.E.M. y se analizaron con ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Bonferroni y prueba t de student respectivamente. Los valores en ayuno de las distintas variables se presentan como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartil y el rango de los datos y se analizaron con prueba U de Mann-Whitney. Los valores p se encuentran representados como * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$.

Cambios en la expresión del sistema endocannabinoide de los islotes pancreáticos en el síndrome metabólico

Presencia de receptores 1 y 2 a cannabinoides. Diferenciación entre membranales y citosólicos

Para determinar la presencia de receptores a cannabinoides tipo 1 y 2 se utilizaron dos técnicas de inmunomarcado, el Western-blot y la inmunofluorescencia. Con el objetivo de validar la técnica de centrifugación diferencial que permita separar la fracción membranal de la fracción citosólica de un lisado de tejido se contrastaron dos métodos reportados en la literatura (Figura 9 A y B). En ambos métodos se encontró que para hígado la centrifugación diferencial concentra la presencia de ambos receptores en la fracción membranal (P2 en el protocolo 1 y P3 en el protocolo 2) (Figura 9 A y B). Se verificó que el protocolo 1 fue efectivo para concentrar la marca del receptor en el precipitado 2 correspondiente a la fracción membranal (Figura 9).

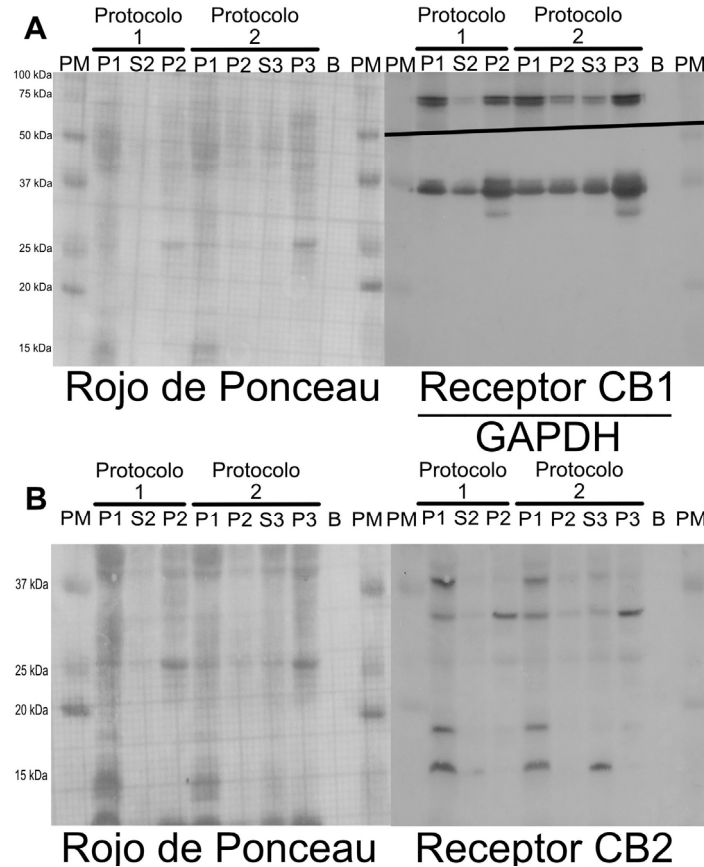


Figura 9. Validación de la técnica de centrifugación diferencial. Se corroboró la ubicación membranal del receptor CB1 panel A. Se comparó nuestro método de centrifugación diferencial de 3 pasos (Protocolo 1) contra otro protocolo validado de centrifugación diferencial en 4 pasos (Protocolo 2) utilizando 100 mg de tejido hepático. Protocolo 1: P1 (fragmentos celulares), S2 (fracción citosólica), P2 (fracción membranal). Protocolo 2: P1 (fragmentos celulares), P2 (fracción mitocondrial), S3 (fracción citosólica), P3 (fracción membranal), B (blanco), PM (marcador de peso molecular). En el panel B izquierdo se muestra la transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF evaluada mediante tinción con Rojo S de Ponceau. En el panel B derecho se muestra la marca de la reacción de la peroxidasa de rábano indicando las bandas donde se localiza el anticuerpo primario a CB1 (arriba) y GAPDH (abajo). La marca correspondiente al receptor CB2 (abajo) se encuentra en el panel B.

La técnica de Western-blot requiere el uso de controles de carga, para normalizar la marca de acuerdo con la cantidad de proteína depositada en el carril y da información semicuantitativa (Aldridge et al., 2008). Se comparó el incremento de la marca dejada por el Rojo S de Ponceau y la HRP en función de la cantidad de proteína depositada por carril (Figura 10). En la primera prueba se colocaron concentraciones decrecientes de proteína, provenientes de un lisado de 300 islotes pancreáticos, de acuerdo con la cuantificación de proteína con el método de Lowry (Figura 10 A).

La intensidad de la marca de HRP disminuyó en función de la cantidad de proteína depositada en el carril para los receptores de interés CB1 y CB2, la proteína de expresión constitutiva GAPDH, así como la marca de Rojo S de Ponceau (Figura 10 B y C). Ambos controles de carga tuvieron una fuerte correlación lineal con la cantidad de proteína depositada por carril. Para la segunda prueba se comparó la intensidad de la marca en un ensayo depositando 60 μg de proteína por carril, provenientes de un lisado de islotes pancreáticos de rata control, y usando la marca de HRP para GAPDH o la marca del Rojo S de Ponceau (Figura 10 D).

En un primer paso, se comparó entre los grupos la cantidad de marca de los controles de carga en la fracción membranal y citosólica (Figura 10 E y F). Luego se compararon los valores normalizados usando ya fuera la marca HRP-GAPDH o el Rojo S de Ponceau (Figura 10 G). Finalmente, el Rojo S de Ponceau mostró una correlación lineal con la cantidad de proteína depositada en el carril y un bajo coeficiente de variación de la medición (Figura 10 H). Se comprobó que tanto la marca total de proteínas por Rojo S de Ponceau como la marca de peroxidasa de rábano para detectar la proteína de expresión constitutiva GAPDH tienen una relación lineal con las concentraciones de proteína depositadas en cada carril, y por lo tanto son efectivas para normalización (Figura 10).

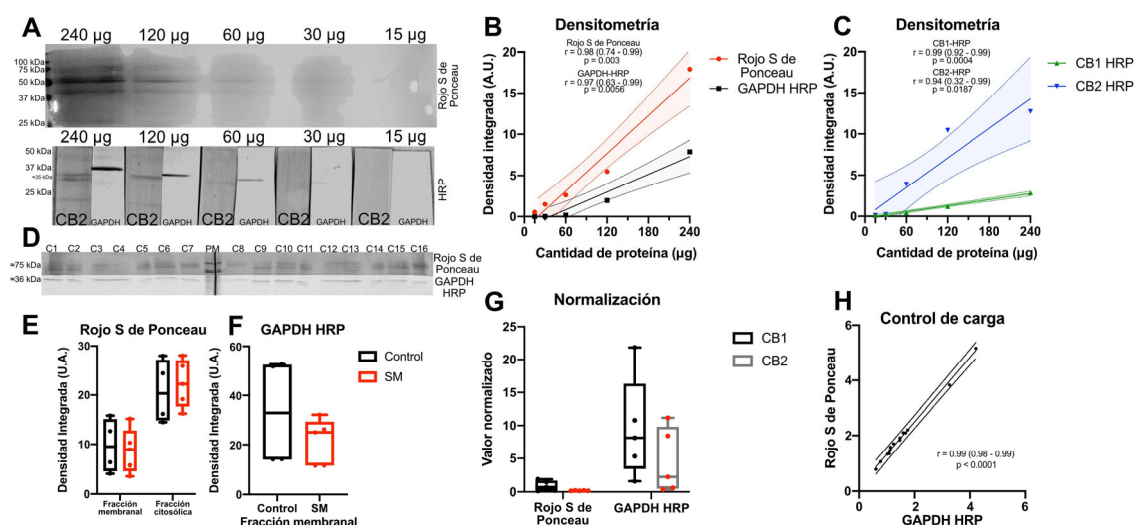


Figura 10. Validación del método de normalización con rojo S de Ponceau. Utilizando un homogenado de 100 islotes pancreáticos, se evaluaron dos métodos de control de carga de proteína por carril, utilizando la tinción de proteínas totales del Rojo S de Ponceau y la marca de la proteína de expresión constitutiva GAPDH. Así mismo se usó la marca de las proteínas de interés, los receptores CB1 y CB2. El panel A muestra los resultados de la tinción con Rojo S de Ponceau (arriba) y el Western-blot para GAPDH, CB1 y CB2 (abajo). La regresión lineal entre la cantidad de proteína cargada por carril,

determinada mediante el método colorimétrico de Lowry, y la densitometría de la marca de los controles de carga del Rojo S de Ponceau (rojo) y la marca de la reacción de la peroxidasa de rábano indicando GAPDH (negro) está en el panel B. Igualmente, la regresión lineal para las marcas de los receptores CB1 (verde) y CB2 (azul) se encuentran en el panel C. Se muestra un control de carga real comparando la densitometría de la marca del Rojo S de Ponceau (arriba) y la marca de GAPDH (abajo) en el panel D. El panel E muestra la comparación de la densitometría de la marca del Rojo S de Ponceau en carriles cargados con fracción membranal y citosólica provenientes de islotes de ratas control y ratas con SM. El panel F muestra la densitometría de la marca de peroxidasa de rábano-GAPDH para carriles cargados con fracción membranal de islotes de ratas control y con SM. El panel G compara los valores normalizados de CB1 y CB2 usando Rojo S de Ponceau y peroxidasa de rábano-GAPDH. Finalmente, en el panel H se muestra la regresión lineal entre la marca de Rojo S de Ponceau y GAPDH. Las correlaciones de los paneles B, C y H muestran la regresión lineal entre los intervalos de confianza del 95 %, así como los resultados de la correlación de Pearson, con sus intervalos de confianza del 95 % y la p correspondiente para cada asociación lineal.

Para probar los anticuerpos se utilizó cerebelo como control positivo de CB1 y negativo para CB2 mientras que se escogió al bazo como control positivo de CB2 y negativo para CB1. A continuación, se comparó la presencia de la marca correspondiente a los receptores CB1 y CB2 en tres tejidos diferentes, hígado, bazo e islotes pancreáticos provenientes de ratas controles (Figura 11). CB1 y CB2 se encuentran en los islotes pancreáticos de ratas control en la fracción membranal (Figura 11 A y B). La banda correspondiente a CB1 se localiza aproximadamente en 60 kDa y se observa en islotes mas no en hígado ni bazo. Por otro lado, el anticuerpo contra CB2 generó distintos patrones de bandeado (Figura 11 A y B). En el bazo donde se reconoce de forma clásica la expresión de CB2 la banda de mayor intensidad se halla en el peso esperado de 35 kDa, inesperadamente, en la fracción citosólica de forma predominante (Figura 11 C-F). Para hígado, la banda predominante se encontró cercana a los 50 kDa, mientras que para los islotes pancreáticos la banda se encontró en los 25 kDa (Figura 11 C-F). En todos los casos la intensidad de la marca incrementó con la concentración de anticuerpo primario.

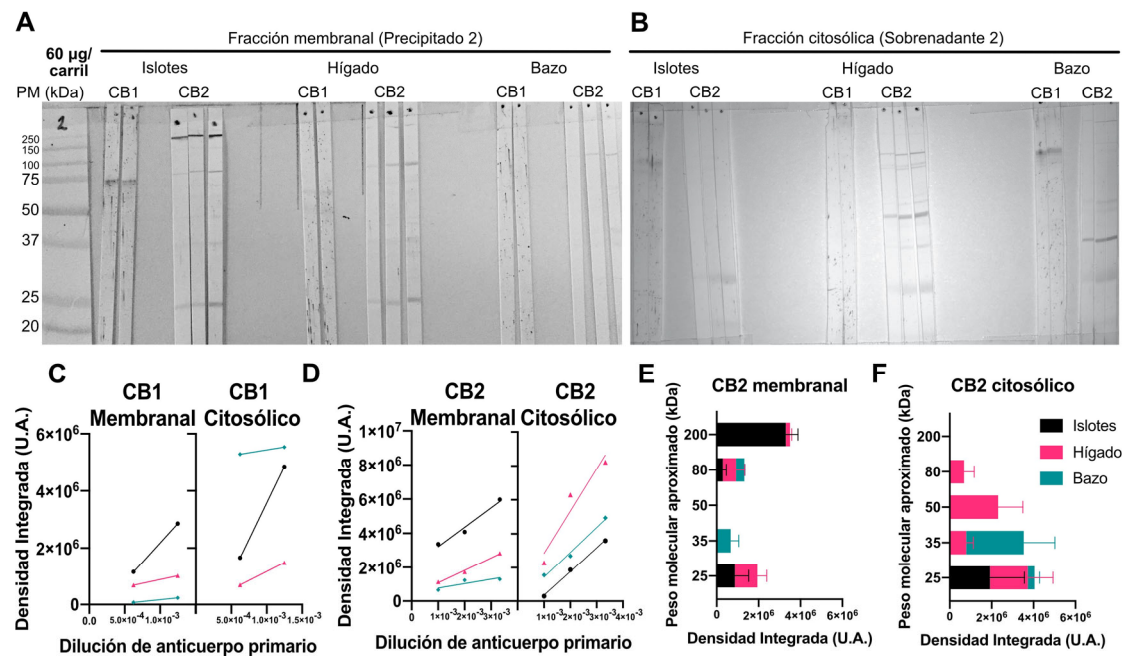


Figura 11. Validación de anticuerpos y método de centrifugación diferencial en tejidos periféricos. Se realizaron pruebas para determinar la dilución de los anticuerpos primarios contra los receptores CB1 y CB2 utilizando 3 tejidos diferentes, islotes, hígado y bazo. Se probaron 2 diluciones para CB1, 1:1600 y 1:800, mientras que para CB2 se probaron 3 diluciones,

1:1000, 1:500 y 1:300. El panel A muestra el resultado del Western-blot para la fracción membranal y el panel B para la fracción citosólica. Los resultados de la densitometría de la marca de CB1 y CB2 se muestran con su regresión lineal en función de la concentración empleada para CB1 en el panel C y para CB2 en el panel D. El desglose de la densidad integrada de las bandas con distinto peso molecular se muestra en el panel E para la fracción membranal y el panel F para la fracción citosólica.

Cambios en las dimensiones de los islotes y de las células pancreáticas en SM

Para determinar si el proceso de fijación y posterior inmunofluorescencia resultaban en una alteración del diámetro celular o de los islotes se compararon mediciones en fresco y en tejido fijado (Figura 12). Tras la digestión del páncreas con colagenasa P se pueden observar los islotes separados del tejido acinar, mientras que en las secciones de páncreas se observan los islotes como conglomerados ovoides rodeados por tejido acinar (Figura 12 A y B). No hubo un incremento significativo en el diámetro de los islotes de ratas con SM en las secciones de páncreas embebido en parafina (Figura 12 C). En los cultivos de células aisladas provenientes de islotes disociados puede observarse el tamaño de las células β y no- β en fresco y tras la fijación (Figura 12 D y E). De igual manera, no hubo diferencias en el diámetro de las células β y no- β pancreáticas de los cultivos celulares y las secciones de páncreas en los grupos control (Figura 12 F). Las células β se encontraron con un diámetro aproximado de 10 μm . Las células β de ratas con SM se encuentran hipertróficas, alcanzando un diámetro significativamente mayor (Figura 12 F).

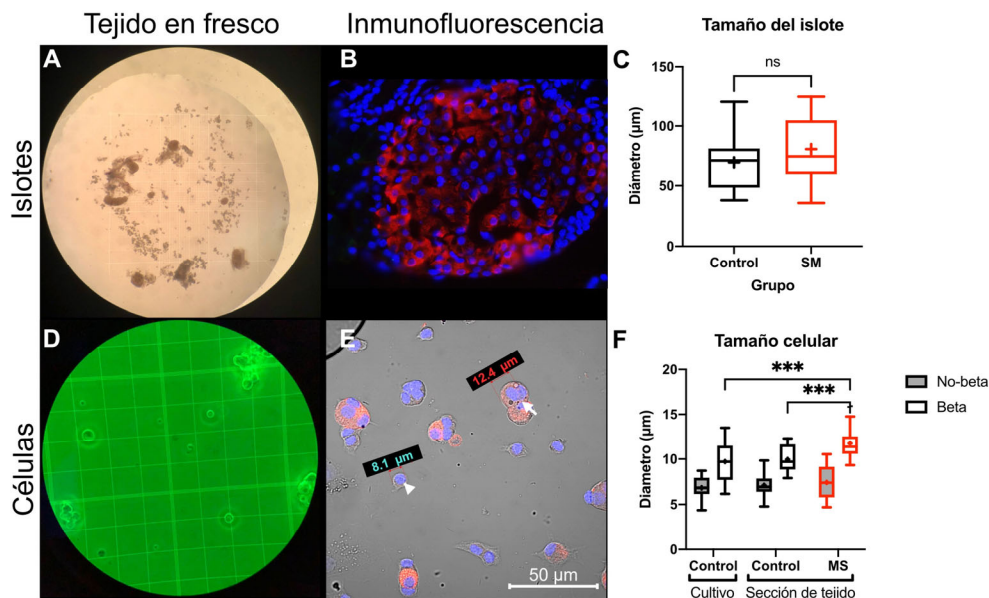


Figura 12. Medición del diámetro de los islotes y los tipos celulares. El tamaño de los islotes y de las células aisladas se midió en fresco con la ayuda de una cámara de Neubauer, panel A y D respectivamente. Se compararon los diámetros celulares antes (panel A y D) y después del proceso de fijación del tejido (panel B y E) midiendo el diámetro de islotes y células por inmunofluorescencia, panel B y E respectivamente. En cian se muestra el diámetro de una célula no-beta del cultivo, mientras que en rojo se indica el diámetro de una célula positiva a insulina (Panel E). Los diámetros de los islotes provenientes de animales control y con SM se muestran en el panel C como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartil y el rango de los datos y se analizaron con prueba U de Mann-Whitney. Las comparaciones entre los diámetros celulares en cultivos primarios de células aisladas de islotes pancreáticos provenientes de ratas control y con SM se muestran en el panel F como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartil y el rango de los datos y se analizaron mediante ANOVA de dos vías con prueba post hoc de Bonferroni. Los valores p se encuentran representados como *** indican $p < 0.001$.

Cambios en la expresión de enzimas de síntesis y degradación del sistema cannabinoide

En cultivo, casi la totalidad de las células β expresan tanto la enzima de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD, como la de degradación MAGL (Figura 13). El 93 % de las células β tiene presencia de NAPE-PLD, mientras que solo el 40 % de las células no β son también positivas (Figura 13 A). A su vez, las células que expresan esta enzima de síntesis de endocannabinoides expresan también la enzima de degradación MAGL (Figura 13 B). La expresión de NAPE-PLD se encuentra aumentada en los islotes de ratas con SM (Figura 13 C y D). Prácticamente todas las células que expresan NAPE-PLD también expresan MAGL, en un porcentaje de 98 %, en cambio, en células negativas para NAPE-PLD esto solo ocurre en 58 % (Figura 13 A y B).

Se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar las enzimas de degradación de endocannabinoides MAGL y FAAH (Figura 14 A). Ambas enzimas se encuentran en el citosol celular y se validó el anticuerpo mediante el peso molecular de su marca por Western-blot (Figura 14 B, C; D y E). Una alta proporción de las células expresa la enzima de degradación de endocannabinoides FAAH, un 89 % de las células β , así como el 52 % de las células no- β (Figura 14 F). Esta enzima de degradación solamente se expresa en células que también expresan MAGL (Figura 14 G). De forma similar, la enzima MAGL se expresa únicamente en células positivas a NAPE-PLD (Figura 14 H) pero no todas las células NAPE-PLD+ expresan MAGL (Figura 14 I).

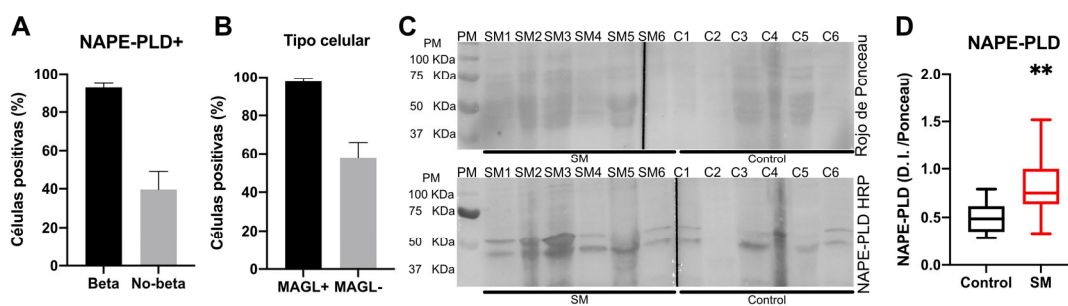


Figura 13. Expresión de la enzima de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD. La expresión de la enzima de síntesis de endocannabinoides NAPE-PLD en cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos se evaluó mediante inmunofluorescencia y Western-blot. El panel A muestra el porcentaje de expresión de NAPE-PLD en células β y no- β . El porcentaje de células que expresan NAPE-PLD en conjunto con MAGL se muestra en el panel B. El panel C muestra los resultados del western-blot de NAPE-PLD de homogeneizados de islotes provenientes de ratas con SM y ratas control. Las diferencias de la expresión de NAPE-PLD entre control y SM se muestran en el panel D como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartil y el rango de los datos; se analizaron con prueba U de Mann-Whitney, ** indica un valor $p < 0.01$.

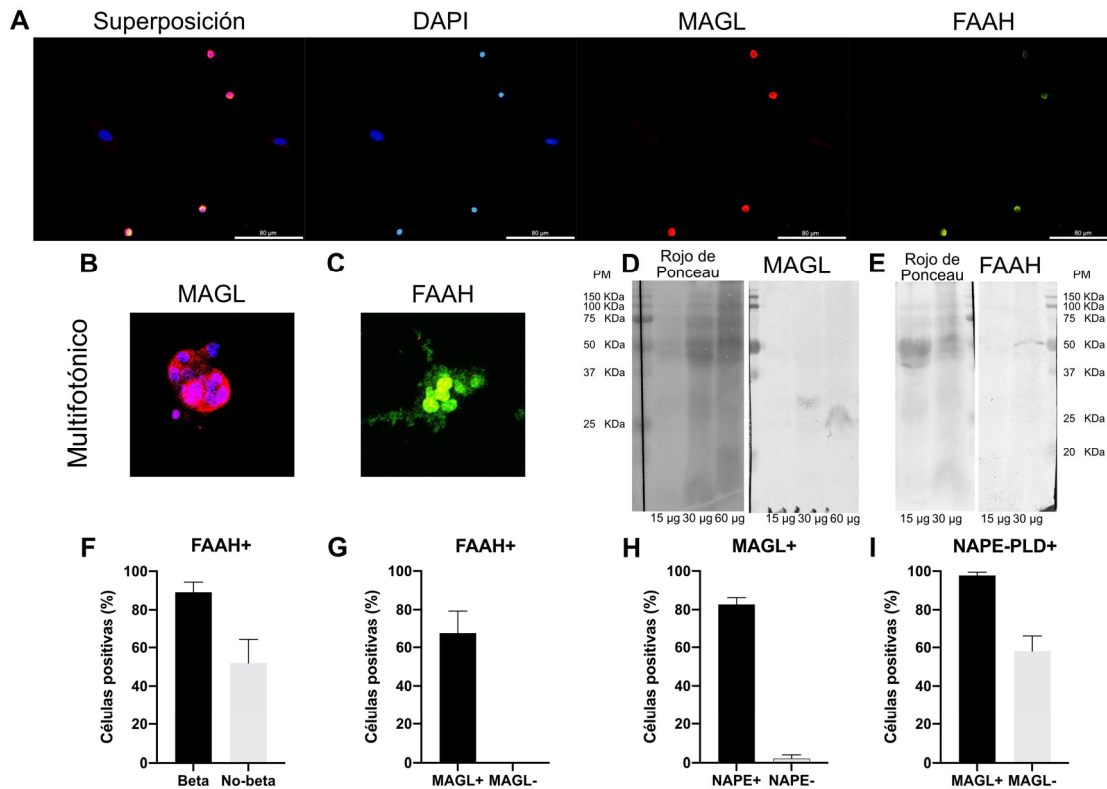


Figura 14. Expresión de enzimas de degradación MAGL y FAAH. La expresión de las enzimas de degradación de endocannabinoides MAGL y FAAH en cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos se evaluó mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos validados mediante Western-blot. El panel A muestra los núcleos celulares marcados con DAPI (azul), las células que expresan MAGL (rojo) y las células que expresan FAAH (verde). Usando un microscopio multifotónico se muestra la ubicación intracelular de las enzimas de degradación MAGL, panel B, y FAAH, panel C. Se observa la presencia de MAGL en el citoplasma y de la FAAH en el núcleo celular. Se presenta la validación de los anticuerpos usados mediante Western-blot identificando bandas del peso molecular reportado en la literatura para MAGL, panel D, y para FAAH, panel E. El panel F muestra el porcentaje de células β que expresan la enzima FAAH. El panel G muestra el porcentaje de coexpresión de las enzimas FAAH y MAGL. Los paneles H e I muestran la coexpresión de la enzima de degradación MAGL con la enzima de síntesis NAPE-PLD.

Expresión de los receptores CB1 y CB2 en cultivo primario

Se llevó a cabo la inmunofluorescencia de un cultivo primario de islotes disociados de ratas control para identificar los tipos celulares que expresan receptores CB1 y CB2 (Figura 15). Las células positivas a insulina fueron las más abundantes en los cultivos primarios de los islotes, representando el 73 % de la población celular total. Las células β pancreáticas tuvieron un diámetro característico de $12 \pm \text{SD } 2 \mu\text{m}$ y citoplasma granular. La mayoría de las células no- β , que representaron el 26 % del cultivo, eran morfológicamente reconocibles como células α . Teniendo un diámetro más pequeño con un promedio de $7.5 \pm \text{SD } 1 \mu\text{m}$ con núcleos redondos, uniformes y cromatina granular. En el cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos disociados, el 89 % de las células β , identificadas como insulina+, son CB1+. Todas las células no- β morfológicamente identificables como células α resultaron positivas para CB1 (Figura 15 C). El 86 % de las células β en cultivo primario fueron positivas para CB2 y el 87 % de las células α (Figura 15 E). También se observaron otras poblaciones de células que no eran ni insulina ni glucagón positivas, como los fibroblastos. Tanto los

receptores CB1 como CB2 estaban presentes en las principales poblaciones de células del islote, tanto células β como no- β (Figura 15 A y B). La marca fluorescente mostró una mayor abundancia de receptores de cannabinoides en las células β en relación con las células no- β , tanto para CB1 (diferencia media de 12 ± 2 AU, $p < 0.001$) como para CB2 (diferencia media de 33 ± 3 AU, $p < 0.001$) en condiciones de cultivo primario (Figura 15 D y F).

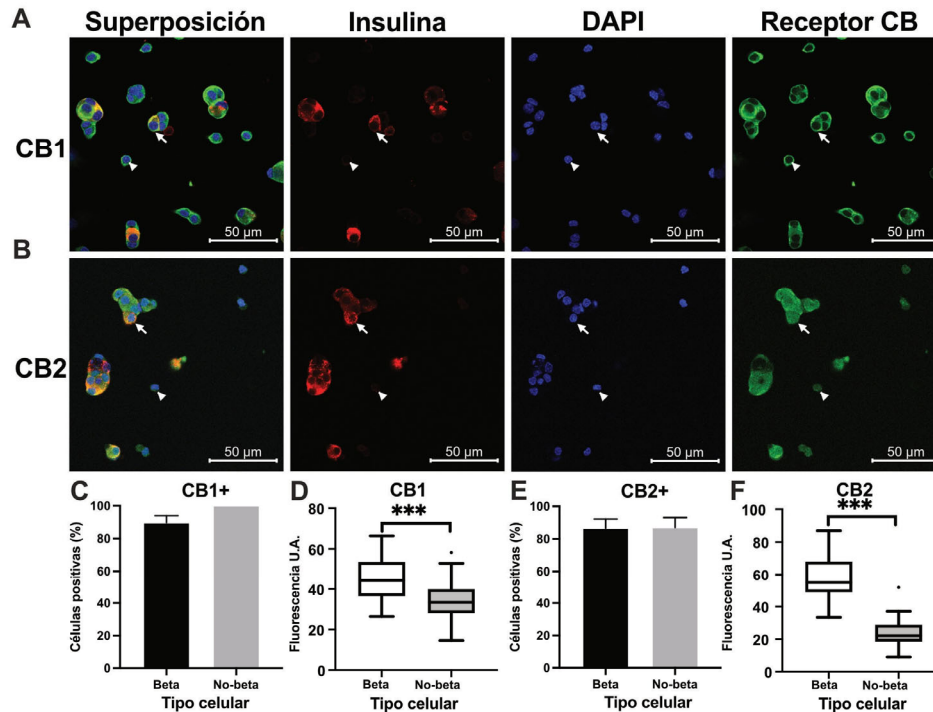


Figura 15. Expresión de receptores clásicos a cannabinoides en células aisladas de cultivo primario de islotes pancreáticos. Se corroboró mediante inmunofluorescencia la presencia de los receptores clásicos a cannabinoides, CB1 y CB2 en cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos. Los paneles A y B muestran las células β pancreáticas identificadas mediante la expresión de insulina (rojo), los núcleos celulares están identificados con DAPI (azul) y los receptores a cannabinoides (verde) CB1, panel A, y CB2, panel B. El porcentaje de células positivas a insulina que coexpresan los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 se muestra en los paneles C y E. La cuantificación de la intensidad de la fluorescencia comparando células β y células no- β se muestra en el panel D para CB1 y en el panel F para CB2 como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartil y el rango de los datos y se analizaron con prueba U de Mann-Whitney. Los valores p se encuentran representados como *** indican $p < 0.001$.

Cambios en la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 en el síndrome metabólico

Para determinar si el SM cambia la densidad de los receptores CB1 y CB2 en los islotes pancreáticos, se llevó a cabo una inmunofluorescencia de secciones pancreáticas. Las células β se encuentran principalmente al centro del islote, mientras que las células α son periféricas. CB1 disminuyó en los islotes pancreáticos de ratas con SM (Figura 16). Esta disminución se produjo tanto en células β (diferencia media -10.5 ± 4 UA, $p < 0.001$) como en células no- β (diferencia media -32 ± 4 UA, $p < 0.001$) (Figura 16 A y B). Por el contrario, para CB2 la cantidad de fluorescencia en el grupo SM aumentó tanto en las células β (diferencia media 7.5 ± 1 AU, $p < 0.001$) como en las células no- β (diferencia media 10 ± 2

AU, $p < 0.001$) (Figura 16 C y D). De manera notable, las células no- β tenían mayores niveles de fluorescencia CB1 que las células β en el grupo de control (diferencia media 21.3 ± 3.5 AU, $p < 0.001$), mientras que las células no- β tenían mayores niveles de fluorescencia CB2 que las células β del grupo SM (diferencia de medias 6 ± 1.4 AU, $p < 0.01$).

A continuación, procedimos a determinar si estos cambios se reflejaban en la cantidad de receptores unidos a la membrana. Para la fracción de proteína membranal de CB1, una diferencia media de -2.6 ± 0.5 A.U. ($p < 0.01$), mientras que para la fracción de proteína CB2 unida a la membrana mostró una diferencia media de 1 ± 0.3 A.U. ($p < 0.05$). Como era de esperar, ambas proteínas dieron como resultado el peso molecular reportado para estos receptores (Figura 16 E y 3F). La cantidad de receptores unidos a la membrana y los receptores totales mostraron tendencias similares. Por tanto, la expresión de CB1 disminuyó mientras que la expresión de CB2 aumentó en el islote pancreático. Además, este cambio se observó tanto para las células β como para las no- β .

Para examinar si los cambios en la expresión de los receptores ocurrían por cambios en el tráfico intracelular, realizamos inmunofluorescencia con microscopía confocal y Western-blot para la fracción citosólica (Figura 17). En el caso de los receptores CB1, se observa que la disminución del receptor en la fracción membranal está asociada a un incremento en la fracción citosólica (Figura 17 A, B, C y D). Esto sugiere una mayor internalización de los receptores. En contraste, el incremento de la presencia del receptor CB2 en la fracción membranal está asociado a un incremento también en la fracción citosólica del receptor (Figura 17 E, F, G y H). Sugiriendo una mayor producción del receptor. Adicionalmente, se observa que la fracción membranal del receptor CB2 tiene un menor peso molecular que la fracción citosólica (Figura 17 F).

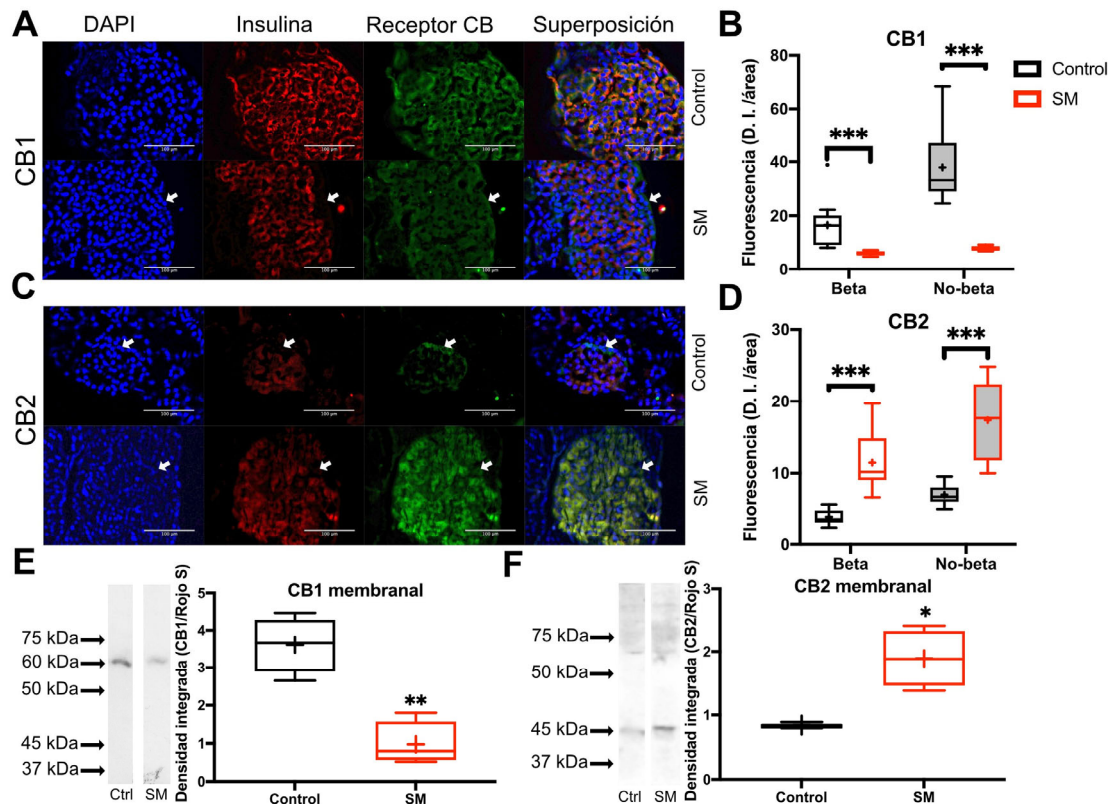


Figura 16. Regulación diferencial de la expresión membranar de receptores clásicos a cannabinoides en el síndrome metabólico. Los cambios en la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 se evaluaron mediante inmunofluorescencia y Western-blot. El panel A muestra los núcleos celulares (azul), las células β (rojo) y el receptor CB1 (verde), para un islote representativo de ratas control (arriba) y ratas con SM (abajo). Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia de las células β y no- β provenientes de islotes control e islotes de ratas con SM se muestran en el panel B como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartilar y el rango de los datos. El panel C muestra los núcleos celulares (azul), las células β (rojo) y el receptor CB2 (verde), para un islote representativo de ratas control (arriba) y ratas con SM (abajo). Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia de las células β y no- β provenientes de islotes control e islotes de ratas con SM se muestran en el panel D como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartilar y el rango de los datos. En los paneles A y C, dos células no- β se encuentran marcadas por la flecha blanca. Los grupos fueron comparados en los paneles B y D mediante ANOVA de 2 vías con prueba post hoc de Bonferroni. El panel E muestra un Western-blot representativo y la diferencia en la expresión de CB1 en la fracción membranar de homogenizados de islotes completos de ratas control y ratas con SM. El panel F muestra un Western-blot representativo y la diferencia en la expresión de CB2 en la fracción membranar de homogenizados de islotes completos de ratas control y ratas con SM. Ambos paneles se muestran como cajas y bigotes indicando la mediana, el rango intercuartilar y el rango de los datos. La diferencia entre grupos se determinó utilizando prueba t de student. Los valores p se encuentran representados como * indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$, *** indica $p < 0.001$.

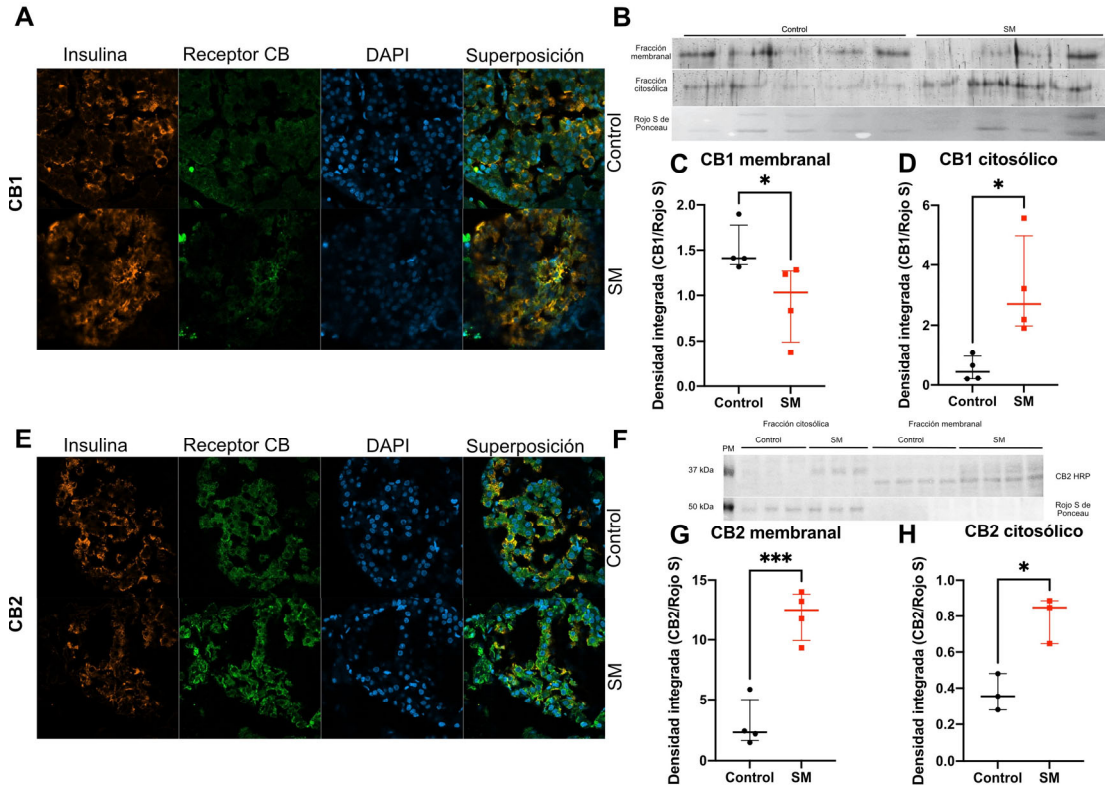


Figura 17. Regulación diferencial de la expresión citosólica de receptores clásicos a cannabinoides. Los cambios en la expresión de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2 se evaluaron mediante inmunofluorescencia y Western-blot. El panel A muestra la imagen de microscopía confocal de las células β (naranja), el receptor CB1 (verde) y los núcleos celulares (azul) para un islote representativo de ratas control (arriba) y ratas con SM (abajo). El panel B muestra los resultados del Western-blot de CB1 de las fracciones membranales (arriba) y citosólicas (abajo) de islotes provenientes de ratas con SM y ratas control. Las diferencias en la expresión de CB1 entre los islotes de ratas control y con SM se muestran para la fracción membranar en el panel C y para la fracción citosólica en el panel D. Los resultados se presentan como mediana \pm rango intercuartilar. Los resultados se analizaron con prueba U de Mann-Whitney. El panel E muestra la imagen de microscopía confocal de las células β (naranja), el receptor CB2 (verde) y los núcleos celulares (azul) para un islote representativo de ratas control (arriba) y ratas con SM (abajo). El panel F muestra los resultados del Western-blot de CB2 de las fracciones citosólicas (izquierda) y membranales (derecha) de islotes provenientes de ratas con SM y ratas control. Las diferencias en la expresión de CB2 entre los islotes de ratas control y con SM se muestran para la fracción membranar en el panel G y para la fracción citosólica en el panel H. Los resultados se presentan como mediana \pm rango intercuartilar. Los resultados se analizaron con prueba U de Mann-Whitney. Los valores p se encuentran representados como * indica $p < 0.05$, *** indica $p < 0.001$.

Efectos de la administración de agonistas y antagonistas selectivos CB1 y CB2 en la liberación de insulina de cultivos primarios

Para examinar los efectos de la activación de los receptores en el cultivo celular, se realizó la incubación de células aisladas con agonistas y antagonistas de los receptores a cannabinoides CB1 y CB2. En el cultivo primario de células aisladas de islotes pancreáticos disociados de ratas con SM podemos observar una menor secreción de insulina al medio con vehículo (Figura 18 A). La administración del agonista selectivo para receptores CB2, JWH-015, resultó en una disminución de la secreción de insulina en el grupo control (Figura 18 B). Por otro lado, la administración del agonista selectivo CB1, R-1-meta-anandamida, resultó en una disminución de la secreción de insulina al medio para el grupo con SM (Figura 18 B). Esto sugiere que en cultivo las células β de ratas control responden a agonistas CB2 mientras que las células provenientes de ratas con SM responden a agonistas CB1.

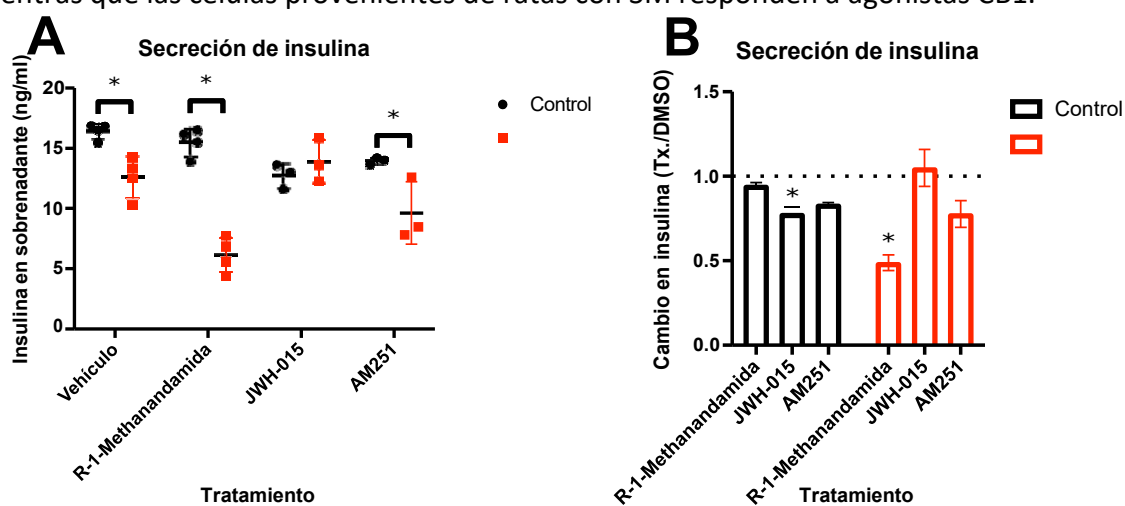


Figura 18. Efectos en la liberación de insulina de células aisladas en cultivo primario de islotes pancreáticos por agonistas y antagonistas CB1 y CB2. Se cuantificó el efecto de agonistas y antagonistas de los receptores a cannabinoides en la insulina liberada al medio de cultivo de células aisladas de islotes provenientes de ratas control y ratas con SM. El panel A muestra la insulina secretada al medio de cultivo con la administración de vehículo (DMSO), agonista CB1 (R-1-methanandamida), agonista CB2 (JWH-015) y antagonista CB1 (AM251). La insulina en el medio de cultivo se cuantificó mediante un ELISA. Los resultados se muestran como mediana \pm rango intercuartil, y se analizaron mediante múltiples pruebas t de student, y los valores p se ajustaron con el método Bonferroni-Dunn para comparaciones múltiples. La fracción de cambio sobre la secreción de insulina basal en el medio con vehículo se presenta en el panel B como media \pm S.E.M. El valor p se encuentra representado como * indicando $p < 0.05$.

Discusión

El ECS ya ha sido blanco terapéutico durante la década pasada. Importantes lecciones sobre la participación de este sistema en la regulación de la homeostasis energética se aprendieron a pesar del fracaso del Rimonabant (Chanda et al., 2019). El Rimonabant (Acomplia) es un fármaco antagonista de los receptores CB1 que mostró un efecto benéfico en los componentes de SM tanto en pacientes diabéticos como no diabéticos, pero que presentaba eventos psiquiátricos adversos, depresión y ansiedad en un 25 % de los pacientes, por lo que fue discontinuado (Burch et al., 2009). Actualmente hay un interés renovado en el estudio de este sistema gracias a la generación de nuevas estrategias farmacológicas, particularmente la creación de fármacos que no atraviesan barrera hematoencefálica. Por otro lado, la creciente legalización de productos que activan este sistema, que podría tener un impacto sobre la salud pública requiere una investigación más detallada. Finalmente, los cambios crónicos resultado de la enfermedad son relevantes para escoger la mejor terapéutica (Di Marzo, 2018). Todo esto requiere una mejor comprensión de la expresión de los componentes del ECS en estados de salud y alteraciones patológicas. Si la expresión de receptores cambia con el SM, será necesario ajustar la terapéutica farmacológica de acuerdo con el perfil alterado que se presente.

Hay evidencia de que el ECS tiene adaptaciones agudas y crónicas al entorno. Por un lado, el consumo de productos derivados de cannabis reduce la incidencia de DM2 (Alshaarawy & Anthony, 2015; Imtiaz & Rehm, 2018). Esto sugiere que la activación del ECS genera modificaciones que afectan al metabolismo energético. Por otro lado, dietas que inducen SM, el principal factor de riesgo para desarrollo de DM2, también alteran al ECS en el sistema nervioso central (Lindqvist et al., 2008), músculo estriado (Crespillo et al., 2011) y tejido adiposo (Deveaux et al., 2009). Esto nos habla de una posible interacción entre el ECS y el metabolismo energético donde las modificaciones ocurren en ambos sentidos. De esta forma, alteraciones en el ECS sufridas por daño previo del metabolismo energético podrían afectar la eficacia terapéutica de fármacos dirigidos a este sistema.

Específicamente en los islotes pancreáticos, uno de los principales órganos involucrados en la homeostasis del metabolismo energético, se han estudiado poco estas alteraciones. Se ha propuesto que en condiciones fisiológicas los receptores a cannabinoides se activan de forma conjunta como un ciclo de retroalimentación negativa de la secreción de insulina de las células β pancreáticas (González-Mariscal & Egan, 2018, Laguerre et al., 2021). A corto plazo, se ha encontrado que la administración aguda de carbohidratos, así como las dietas ricas en carbohidratos modifican la expresión de los receptores CB1 y CB2 en los islotes pancreáticos (Flores et al., 2013; Vilches-Flores et al., 2010). Adicionalmente, en un modelo murino de dieta rica en lípidos de 8 semanas de duración, se observó un aumento de la AEA y del 2-AG en los islotes pancreáticos (Starowicz et al., 2008), aunque sin comprobar el desarrollo de SM. Todo esto apunta a la necesidad de estudiar cuál es el perfil de expresión de los componentes del ECS en condiciones control y en SM.

Enzimas de síntesis

La obesidad se ha vinculado con la aparición de un estado proinflamatorio a través de la infiltración de macrófagos que rodean adipocitos necróticos (Murano et al., 2008). Estos macrófagos activados secretan una serie de interleucinas que inician un proceso de inflamación crónica de bajo grado, vinculada a la resistencia a la insulina y el desarrollo eventual de DM2 (Altintas et al., 2011). En efecto, en nuestro modelo de SM observamos un incremento de la interleucina 1 β en sangre, relacionado con el incremento de adiposidad visceral en las ratas con SM (Figura 7). Este incremento se ha relacionado, en células β pancreáticas de rata, con un incremento en la expresión de fosfolipasa D tipo 1 (PLD-1), que incrementa los niveles de DAG en la célula (Chen et al., 2000). Interesantemente, nosotros mostramos un incremento en la expresión de NAPE-PLD en los islotes de ratas con SM (Figura 13). El incremento de esta enzima de síntesis concuerda con el aumento reportado de AEA en los islotes pancreáticos de ratones en una dieta rica en grasa de 8 semanas (Starowicz et al., 2008), asociado a una inducción de la presencia de NAPE-PLD en células β . Por otro lado, la exposición de los islotes pancreáticos tanto a un medio con concentraciones altas de glucosa como otro medio con concentraciones elevadas de KCl incrementa la síntesis de endocannabinoides (Kim et al., 2011). Esto sugiere que uno de los mecanismos compartidos tanto por las dietas ricas en sacarosa como las dietas ricas en lípidos es un incremento de esta enzima de síntesis de los endocannabinoides en los islotes pancreáticos.

Receptores a cannabinoides CB1 y CB2

En cultivos celulares de ratas control se observa la presencia tanto de CB1 como CB2 en células β y no- β (Figura 15). En el caso de los receptores CB1, la señal fluorescente se encontró con mayor intensidad en la membrana celular mientras que la señal fluorescente de CB2 estaba dispersa en el citosol (Figura 9). Al realizar centrifugación diferencial, ambos receptores se concentraron en la fracción membranal (Figura 9). Esta fracción incluye vesículas membranales que pueden observarse en el compartimento citoplásmico mediante otras técnicas como la inmunofluorescencia. En condiciones control, hay expresión de CB1 tanto en células β como en células no- β en islotes pancreáticos (Figura 16). Esto coincide con lo reportado por Kim et al., 2011 para islotes en humanos y ratones. En contraste con el incremento de RNAm de CB1 observado con una dieta rica en fructosa por 3 semanas (Flores et al., 2013), nuestra dieta crónica de sacarosa por 8 semanas resultó en una disminución de la presencia de la proteína CB1 en la membrana celular (Figura 16 y 17). En el cerebro de ratas Wistar se ha observado que la exposición a agonistas cannabinoides resulta en un incremento transitorio del RNAm de CB1 (Zhuang et al., 1998) y una posterior regulación a la baja de la expresión proteica de este receptor (Breivogel et al., 1999). De forma similar, se observa un incremento en la presencia de CB1 en la fracción citosólica y su disminución en la fracción membranal, sugiriendo la internalización del receptor (Figura 17). Esto muestra el contraste que puede existir entre los efectos agudos de una intervención en el ECS y los cambios crónicos que tienen lugar para adaptar al sistema a la intervención.

En condiciones control la expresión de CB2 se muestra predominantemente en células no- β , similar a lo descrito por Starowicz et al., 2008. A diferencia de lo observado con una dieta rica en lípidos donde no hubo cambios en la expresión de los receptores a cannabinoides (Starowicz et al., 2008), en nuestro modelo de dieta rica en carbohidratos de 8 semanas si observamos cambios en la expresión de las proteínas CB1 y CB2 (Figura 16 y 17).

Similar a lo encontrado por Flores et al., 2013, tanto CB1 como CB2 tuvieron presencia en células periféricas de los islotes pancreáticos de rata, negativas a insulina- No obstante, también se encontró presencia de CB1 en las células β positivas a insulina (Figura 16). Los antagonistas CB1 incrementan la expresión tanto de CB1 y como de CB2 en ratas con dieta rica en fructosa (Flores et al., 2013). En efecto, la activación de los receptores a cannabinoides CB1 puede llevar a su internalización a través de la vía de la β -arrestina (Martini et al., 2007; Noguerras-Ortiz & Yudowski, 2016). El sesgo de señalización de diversos agonistas puede favorecer las cascadas de señalización en uno u otro sentido (Ibsen et al., 2019). Por otro lado, CB1 y CB2 cuentan con modulación diferencial dependiente de las balsas lipídicas (Oddi et al., 2007).

El SM indujo un incremento en la cantidad de la proteína CB2 tanto en la fracción membranal como citosólica en el contexto de la disminución de CB1 en la fracción membranal (Figura 17). Esto sugiere una internalización de los receptores CB1 frente a la sobrestimulación, probablemente asociada con el incremento de NAPE-PLD activada por el incremento de calcio intracelular debido al consumo elevado de carbohidratos. Esta regulación negativa no ocurre con los receptores CB2 que fueron regulados al alza y cuya presencia incrementó tanto para la fracción membranal como la fracción citosólica (Figura 17).

Enzimas de degradación

El estudio de las enzimas de degradación ofrece una ventana para explorar que células participan en la terminación de la señal dada por los endocannabinoides. La inhibición selectiva de enzimas de degradación es una estrategia farmacológica para incrementar la actividad de los endocannabinoides endógenos (Muccioli, 2010). Esta estrategia permite la síntesis a demanda de los endocannabinoides, pero prolongando su tiempo de acción, evitando así los efectos adversos de la administración de agonistas (van Egmond et al., 2021).

Para comprender mejor los posibles efectos de estos fármacos en los islotes pancreáticos es necesario buscar su expresión en las células del islote. Se han encontrado las enzimas de síntesis de los endocannabinoides en las células α de los islotes, mientras que las enzimas de degradación se encuentran en las células β pancreáticas (Starowicz et al., 2008). Con una dieta rica en lípidos los niveles de la enzima de degradación FAAH disminuyen siendo un mecanismo potencial de incremento de los niveles de AEA acoplado al incremento de NAPE-PLD (Starowicz et al., 2008). Experimentalmente se ha mostrado que la inhibición de la MAGL, que eleva los niveles de 2-AG, resulta en una inhibición de la liberación de insulina estimulada por glucosa (GSIS), tanto en células INS-1 como en islotes de rata (Berdan et al., 2016).

En cultivos primarios de islotes pancreáticos de rata, las células β expresan la enzima de síntesis NAPE-PLD, así como la enzima de degradación FAAH, en conjunto con ambos

receptores a cannabinoides CB1 y CB2 (Figuras 13, 14 y 15). Aunque casi todas las células no- β expresan CB1 y CB2 (Figura 15), no todas estas células expresan NAPE-PLD ni FAAH (Figuras 13 B y 14 F). A su vez, las células que expresan NAPE-PLD en su mayoría coexpresan MAGL, pero no todas las células MAGL expresan NAPE-PLD (Figura 14 H e I). Finalmente, las células MAGL negativas, no expresan FAAH (Figura 14 G).

En conjunto esto sugiere que las células β contienen todo el sistema de señalización de endocannabinoides tanto AEA y 2-AG, y mientras que solo algunas células no- β participan del inicio de la síntesis de AEA vía NAPE-PLD, una fracción de células tienen enzimas de degradación MAGL y FAAH. Esta última población serían células receptoras de la señalización paracrina de los endocannabinoides, mientras que las otras poblaciones pueden ser tanto receptoras autocrinas como señalizadoras paracrinas.

Dicho de otra manera, casi la totalidad de las células del islote reciben la señalización de los endocannabinoides a través de CB1 y CB2, una mayoría de las células son capaces de finalizar la señalización de los endocannabinoides a través de las enzimas MAGL y FAAH, pero solo una porción de células puede iniciar la señalización a través de la enzima de síntesis NAPE-PLD. De esta última población las células β constituyen una fracción considerable.

Efecto en la secreción de insulina

A nivel de islotes completos, la administración de AEA estimula la GSIS (Flores et al., 2013). En los cultivos primarios de islotes pancreáticos, las células se encuentran separadas interrumpiendo la comunicación paracrina. En estas condiciones la administración del agonista selectivo CB2 JWH-015 resulta también en una disminución de la liberación de insulina estimulada por glucosa en los cultivos de ratas control, pero no en los cultivos de ratas con SM (Figura 18). Es importante notar que para los cultivos control, tanto las células β como las células no- β tienen expresión de CB1 y CB2 (Figura 15). Esto es similar a lo reportado para cultivos primarios de islotes disociados (Bermudez-Silva et al., 2007; Juan-Pico et al., 2009). Por otro lado, observamos que la administración del agonista CB1, R-1-meta-anandamida, resulta en una disminución de la GSIS en cultivos de ratas SM más no en ratas controles (Figura 18). El antagonista CB1, AM251, no alcanzó un efecto significativo (Figura 18).

Diferente expresión de receptores a cannabinoides en islotes y en células aisladas

Curiosamente, se observa un patrón de expresión de los receptores CB en islotes enteros diferente de células cultivadas a partir de islotes disociados. En islotes enteros, ambos receptores de cannabinoides se expresaron predominantemente en células no- β , CB1 en el control y CB2 en condiciones SM (Figura 16). Por el contrario, aunque los receptores CB1 y CB2 estaban presentes simultáneamente en las células pancreáticas β y no- β , la cantidad de fluorescencia fue mayor en las células β en el cultivo de células primarias (Figura 15).

Los cambios en la expresión de los receptores CB en condiciones de cultivo pueden aclarar algunas discrepancias en la literatura con respecto al tipo celular en el que se encuentran estos receptores. Estas interacciones paracrinas son importantes para modular la liberación

de las hormonas del islote pancreático e incluyen la liberación de GABA por parte de las células β pancreáticas (Gylfe, 2016).

Al eliminar las interacciones paracrinas, las células del islote pancreático cambian su expresión de receptores a cannabinoides. Interesantemente, en sistema nervioso central una producción reducida de GABA resultan en una disminución compensatoria del RNAm de CB1 (Eggan et al., 2012). Esto puede tener implicaciones en los resultados funcionales de la administración de agonistas y antagonistas de cannabinoides en cultivos celulares y de islotes completos, dando como resultado discrepancias en el efecto sobre la liberación de insulina. En modelos animales la administración de agonistas cannabinoides resulta en una menor tolerancia a la glucosa, sugiriendo que la administración aguda resulta en una menor liberación de insulina de los islotes completos (Tabla 6).

Participación de los receptores a cannabinoides en el síndrome metabólico

Aquí, mostramos que la expresión proteica de las enzimas de síntesis y receptores de cannabinoides en el islote pancreático se encuentra regulada al alza en el SM inducido por una dieta alta en sacarosa. Observamos un incremento de la enzima de síntesis de los endocannabinoides NAPE-PLD, acoplado a una disminución del receptor CB1, con mayor presencia de receptor en la fracción citosólica. Esto podría sugerir un incremento en el tráfico celular del receptor, mediado por la activación prolongada del mismo (Fletcher-Jones et al., 2020). Esta regulación a la baja de CB1 con aumento de CB2 concurrente, es mostrada a través de la cantidad de receptores presentes en la fracción membranal y mediante la fluorescencia total de las células (Figura 16 y 17).

Aunque la administración a corto plazo de una dieta rica en fructosa aumenta la expresión de RNAm de CB1 en islotes pancreáticos de ratas (Flores et al., 2013), a largo plazo, con el desarrollo subsiguiente de SM podrían resultar en una respuesta maladaptativa. La regulación del ECS en el SM podría implicar su participación en la disfunción de las células β pancreáticas. También se han reportado cambios en la expresión de CB1 y CB2 en tejidos que expresan ambos tipos de receptores en otras alteraciones, como en la nefropatía diabética y las enfermedades cardíacas (Cappellano et al., 2013; Gruden et al., 2016).

El ECS es un sistema regulador presente en múltiples tejidos y se encuentra detrás del mantenimiento del equilibrio entre señalizaciones contra-reguladoras. En cerebro, se ha encontrado que la activación de los receptores a cannabinoides CB1 mantienen el balance entre los neurotransmisores GABA y glutamato (Ruehle et al., 2012). En el sistema inmune, los receptores CB2 están involucrados en la modulación de las respuestas inflamatorias (Pandey et al., 2009). Finalmente, se reconoce el rol del ECS en la manutención de la homeostasis energética (Silvestri & Di Marzo, 2013).

En efecto, se ha propuesto al ECS como una suerte de regulador universal a partir de sus ventajas características como sistema de retroalimentación, incluyendo su rápida síntesis y degradación (Sallaberry & Astern, 2018). En los islotes pancreáticos la activación conjunta de CB1 y CB2 por su agonista endógeno 2-AG actúa para compensar los niveles de calcio intracelular y la secreción de insulina (Laguerre et al., 2021).

Ambos receptores de cannabinoides, CB1 y CB2, se acoplan principalmente a proteínas G de tipo $i/0$ resultando en una disminución del cAMP sensible a la toxina pertussis. Sin embargo, sólo los receptores CB1 inhiben los canales de calcio de tipo L. Estos canales

participan en el proceso de liberación de insulina en las células β pancreáticas (Gilbert et al., 2008) y resultan en la inhibición de las oscilaciones de calcio en los islotes pancreáticos (Nakata & Yada, 2008). Por el contrario, los efectos dependientes de CB2 incluyen una disminución de cAMP (González-Mariscal et al., 2016), con un aumento en las oscilaciones de calcio y liberación de insulina (C. Li et al., 2010). De esta manera, la disminución de CB1 y el incremento de CB2 en las células β del islote podrían amplificar la liberación de insulina. Esto sería compatible con la presencia de hiperinsulinemia sin una disminución de la respuesta periférica a la insulina, parcialmente compensada por la secreción de glucagón (Figura 8).

En este estudio detectamos la presencia de los dos receptores clásicos a cannabinoides, CB1 y CB2, tanto en las células β como en las células no- β de los islotes pancreáticos. Proponemos que la interacción de la regulación a la baja de CB1 y la regulación al alza de CB2 puede participar en el desarrollo temprano del SM mediante la facilitación de la liberación de insulina. La participación del ECS en el mantenimiento a largo plazo de la normogluceemia abre la posibilidad de blancos terapéuticos que se ajusten a estos cambios en la expresión de los receptores. Nuestros resultados revelan la regulación de ECS bajo alteraciones metabólicas inducidas por una dieta rica en sacarosa y avanzan nuestra comprensión de la regulación de los receptores CB1 y CB2 en las células β pancreáticas.

Conclusiones

- 1.- En los cultivos celulares primarios de islotes pancreáticos de ratas, ambos receptores se expresan en estas dos poblaciones, mientras que en secciones de páncreas de ratas control observamos que CB2 se expresa únicamente en células no- β .
- 2.- En los islotes pancreáticos de ratas con SM disminuye la presencia del receptor CB1 e incrementa la del receptor CB2 en la membrana plasmática.
- 3.- En los cultivos celulares primarios de islotes pancreáticos de ratas control, la administración de un agonista CB2 (JWH-015) disminuyó la liberación de insulina, mientras que en las células provenientes de ratas con SM la administración de un agonista CB1 (R-1-metanandamida) disminuyó la liberación de insulina.

Referencias

- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P. T., Loria, C. M., & Smith, S. C. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International. *Circulation*, *120*(16), 1640–1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, *23*(5), 469–480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
- Aldridge, G. M., Podrebarac, D. M., Greenough, W. T., & Weiler, I. J. (2008). The use of total protein stains as loading controls: An alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *Journal of Neuroscience Methods*, *172*(2), 250–254. <https://doi.org/10/d889sx>
- Alshaarawy, O., & Anthony, J. C. (2015). Cannabis Smoking and Diabetes Mellitus: Results from Meta-analysis with Eight Independent Replication Samples. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, *26*(4), 597–600. doi: 10.1097/EDE.0000000000000314
- Altintas, M. M., Azad, A., Nayer, B., Contreras, G., Zaias, J., Faul, C., Reiser, J., & Nayer, A. (2011). Mast cells, macrophages, and crown-like structures distinguish subcutaneous from visceral fat in mice. *Journal of Lipid Research*, *52*(3), 480–488. <https://doi.org/10.1194/jlr.M011338>
- Anderson, R. L., Randall, M. D., & Chan, S. L. F. (2013). The complex effects of cannabinoids on insulin secretion from rat isolated islets of Langerhans. *European Journal of Pharmacology*, *706*(1–3), 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.034>
- Basavarajappa, B. S. (2007). Neuropharmacology of the Endocannabinoid Signaling System—Molecular Mechanisms, Biological Actions and Synaptic Plasticity. *Current Neuropharmacology*, *5*(2), 81–97. doi: 10.2174/157015907780866910
- Begg, D. P., & Woods, S. C. (2013). Interactions between the central nervous system and pancreatic islet secretions: A historical perspective. *Advances in Physiology Education*, *37*(1), 53–60. <https://doi.org/10.1152/advan.00167.2012>
- Berdan, C. A., Erion, K. A., Burritt, N. E., Corkey, B. E., & Deeney, J. T. (2016). Inhibition of Monoacylglycerol Lipase Activity Decreases Glucose-Stimulated Insulin Secretion in INS-1 (832/13) Cells and Rat Islets. *PLoS ONE*, *11*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149008>
- Bermudez-Silva, F. J., Sanchez-Vera, I., Suárez, J., Serrano, A., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Nadal, A., & Rodríguez de Fonseca, F. (2007). Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *European Journal of Pharmacology*, *565*(1), 207–211.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.02.066>

Bermúdez-Silva, F. J., Suárez, J., Baixeras, E., Cobo, N., Bautista, D., Cuesta-Muñoz, A. L., Fuentes, E., Juan-Pico, P., Castro, M. J., Milman, G., Mechoulam, R., Nadal, A., & Rodríguez de Fonseca, F. (2008). Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia*, *51*(3), 476–487. <https://doi.org/10.1007/s00125-007-0890-y>

Bermúdez-Siva, F. J., Serrano, A., Diaz-Molina, F. J., Sánchez Vera, I., Juan-Pico, P., Nadal, A., Fuentes, E., & Rodríguez De Fonseca, F. (2006). Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. *European Journal of Pharmacology*, *531*(1–3), 282–284. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.016>

Burch, J., McKenna, C., Palmer, S., Norman, G., Glanville, J., Sculpher, M., & Woolacott, N. (2009). Rimonabant for the treatment of overweight and obese people. *Health Technology Assessment* (Winchester, England), *13* Suppl 3, 13–22. <https://doi.org/10.3310/hta13suppl3/03>

Braun, M., Ramracheya, R., Amisten, S., Bengtsson, M., Moritoh, Y., Zhang, Q., Johnson, P. R., & Rorsman, P. (2009). Somatostatin release, electrical activity, membrane currents and exocytosis in human pancreatic delta cells. *Diabetologia*, *52*(8), 1566–1578. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1382-z>

Breivogel, C. S., Childers, S. R., Deadwyler, S. A., Hampson, R. E., Vogt, L. J., & Sim-Selley, L. J. (1999). Chronic Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Treatment Produces a Time-Dependent Loss of Cannabinoid Receptors and Cannabinoid Receptor-Activated G Proteins in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, *73*(6), 2447–2459. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0732447.x>

Brown, A. J. (2007). Novel cannabinoid receptors. *British Journal of Pharmacology*, *152*(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707481>

Cacho, J., Sevillano, J., De Castro, J., Herrera, E., & Ramos, M. P. (2008). Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, *295*(5), E1269-E1276. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90207.2008>

Caicedo, A. (2013). Paracrine and autocrine interactions in the human islet: More than meets the eye. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *24*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.09.007>

Cao, L., Liu, X., Cao, H., Lv, Q., & Tong, N. (2012). Modified High-Sucrose Diet-Induced Abdominally Obese and Normal-Weight Rats Developed High Plasma Free Fatty Acid and Insulin Resistance. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/374346>

Cappellano, G., Uberti, F., Caimmi, P. P., Pietronave, S., Mary, D. A. S. G., Dianzani, C., Micalizzi, E., Melensi, M., Boldorini, R., Nicosia, G., Crosio, E., Chicchetti, A., Aina, F.,

Prat, M., Dianzani, U., Vacca, G., Ariatti, C., & Grossini, E. (2013). Different expression and function of the endocannabinoid system in human epicardial adipose tissue in relation to heart disease. *The Canadian Journal of Cardiology*, *29*(4), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2012.06.003>

Chanda, D., Neumann, D., & Glatz, J. F. C. (2019). The endocannabinoid system: Overview of an emerging multi-faceted therapeutic target. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *140*, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.11.016>

Chen, M.-C., Paez-Espinosa, V., Welsh, N., & Eizirik, D. L. (2000). Interleukin-1 β Regulates Phospholipase D-1 Expression in Rat Pancreatic β -Cells. *Endocrinology*, *141*(8), 2822–2828. <https://doi.org/10.1210/endo.141.8.7608>

Chong, M. F. F., Fielding, B. A., & Frayn, K. N. (2007). Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and de novo lipogenesis. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *66*(1), 52–59. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005290>

Chu, Z.-L., Jones, R. M., He, H., Carroll, C., Gutierrez, V., Lucman, A., Moloney, M., Gao, H., Mondala, H., Bagnol, D., Unett, D., Liang, Y., Demarest, K., Semple, G., Behan, D. P., & Leonard, J. (2007). A role for beta-cell-expressed G protein-coupled receptor 119 in glycemic control by enhancing glucose-dependent insulin release. *Endocrinology*, *148*(6), 2601–2609. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1608>

Cornish, B. H., Ward, L. C., & Thomas, B. J. (1992). Measurement of extracellular and total body water of rats using multiple frequency bioelectrical impedance analysis. *Nutrition Research*, *12*(4), 657–666. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(05\)80035-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(05)80035-1)

Crespillo, A., Suárez, J., Bermúdez-Silva, F. J., Rivera, P., Vida, M., Alonso, M., Palomino, A., Lucena, M. A., Serrano, A., Pérez-Martín, M., Macías, M., Fernández-Llébrez, P., & Rodríguez de Fonseca, F. (2011). Expression of the cannabinoid system in muscle: Effects of a high-fat diet and CB₁ receptor blockade. *Biochemical Journal*, *433*(1), 175 LP – 185. DOI: 10.1042/BJ20100751

Dávila-Torres, J., González-Izquierdo, J. J., & Barrera-Cruz, A. (2015). Obesity in Mexico. *Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *53*(2), 240–249.

De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2010). Non-CB₁, Non-CB₂ receptors for endocannabinoids, plant cannabinoids, and synthetic cannabimimetics: Focus on G-protein-coupled receptors and transient receptor potential channels. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *5*(1), 103–121. <https://doi.org/10.1007/s11481-009-9177-z>

Deveaux, V., Cadoudal, T., Ichigotani, Y., Teixeira-Clerc, F., Louvet, A., Manin, S., Nhieu, J. T.-V., Belot, M. P., Zimmer, A., Even, P., Cani, P. D., Knauf, C., Burcelin, R., Bertola, A., Le Marchand-Brustel, Y., Gual, P., Mallat, A., & Lotersztajn, S. (2009). Cannabinoid CB₂ Receptor Potentiates Obesity-Associated Inflammation, Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *PLOS ONE*, *4*(6), e5844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005844>

Di Marzo, V. (2006). A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(3), 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.01.010>

Di Marzo, V. (2018). New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(9), 623–639. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.115>

Diaz-Garcia, C. M., Morales-Lázaro, S. L., Sánchez-Soto, C., Velasco, M., Rosenbaum, T., & Hiriart, M. (2014). Role for the TRPV1 channel in insulin secretion from pancreatic beta cells. *The Journal of Membrane Biology*, 247(6), 479–491. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9658-8>

DiMeglio, D. P., & Mattes, R. D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: Effects on food intake and body weight. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(6), 794–800. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801229>

Dunbar, J. C., & Walsh, M. F. (1982). Glucagon and Insulin Secretion by Dispersed Islet Cells: Possible Paracrine Relationships. *Hormone Research in Paediatrics*, 16(4), 257–267. <https://doi.org/10.1159/000179510>

Eggan, S. M., Lazarus, M. S., Stoyak, S. R., Volk, D. W., Glausier, J. R., Huang, Z. J., & Lewis, D. A. (2012). Cortical glutamic acid decarboxylase 67 deficiency results in lower cannabinoid 1 receptor messenger RNA expression: Implications for schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 71(2), 114–119. <https://doi.org/10/fgkdts>

Fletcher-Jones, A., Hildick, K. L., Evans, A. J., Nakamura, Y., Henley, J. M., & Wilkinson, K. A. (2020). Protein Interactors and Trafficking Pathways That Regulate the Cannabinoid Type 1 Receptor (CB1R). *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 13,108. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00108>

Flores, L. E., Alzugaray, E., Cubilla, M. A., Mari, P., Zotto, D. H., & Roma, C. L. (2013). *Islet Canabinoid Receptors: Cellular Distribution and Biological Function*. 42(7), 1085–1092. DOI: 10.1097/MPA.0b013e31828fd32d

Fuster, J. J., Ouchi, N., Gokce, N., & Walsh, K. (2016). Obesity-induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 118(11), 1786–1807. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306885>

Gatta-Cherifi, B., & Cota, D. (2016). New insights on the role of the endocannabinoid system in the regulation of energy balance. *International Journal of Obesity (2005)*, 40(2), 210–219. <https://doi.org/10.1038/ijo.2015.179>

Gavet, O., & Pines, J. (2010). Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis. *Developmental Cell*, 18(4), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>

Gilbert, M., Jung, S.-R., Reed, B. J., & Sweet, I. R. (2008). Islet Oxygen Consumption and Insulin Secretion Tightly Coupled to Calcium Derived from L-type Calcium Channels but Not from the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 283(36), 24334–24342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802097200>

Gylfe, E. (2016). Glucose control of glucagon secretion—‘There’s a brand-new gimmick every year’. *Uppsala Journal of Medical Sciences*, 121(2), 120–132. <https://doi.org/10.3109/03009734.2016.1154905>

González-Mariscal, I., & Egan, J. M. (2018). Endocannabinoids in the Islets of Langerhans: The ugly, the bad, and the good facts. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 315(2), E174–E179. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00338.2017>

González-Mariscal, I., Krzysik-Walker, S. M., Kim, W., Rouse, M., & Egan, J. M. (2016). Blockade of cannabinoid 1 receptor improves GLP-1R mediated insulin secretion in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 423, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.015>

González-Mariscal, I., Montoro, R. A., Doyle, M. E., Liu, Q.-R., Rouse, M., O’Connell, J. F., Santa-Cruz Calvo, S., Krzysik-Walker, S. M., Ghosh, S., Carlson, O. D., Lehrmann, E., Zhang, Y., Becker, K. G., Chia, C. W., Ghosh, P., & Egan, J. M. (2018). Absence of cannabinoid 1 receptor in beta cells protects against high-fat/high-sugar diet-induced beta cell dysfunction and inflammation in murine islets. *Diabetologia*, 61(6), 1470–1483. <https://doi.org/10.1007/s00125-018-4576-4>

González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., & Martínez, J. A. (2017). Obesity. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>

Gruden, G., Barutta, F., Kunos, G., & Pacher, P. (2016). Role of the endocannabinoid system in diabetes and diabetic complications. *British journal of pharmacology*, 173(7), 1116–1127. <https://doi.org/10.1111/bph.13226>

Horne, R. G., Yu, Y., Zhang, R., Abdalqadir, N., Rossi, L., Surette, M., Sherman, P. M., & Adeli, K. (2020). High Fat-High Fructose Diet-Induced Changes in the Gut Microbiota Associated with Dyslipidemia in Syrian Hamsters. *Nutrients*, 12(11), 3557. <https://doi.org/10.3390/nu12113557>

Howlett, A. C., & Abood, M. E. (2017). CB1 & CB2 Receptor Pharmacology. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*, 80, 169–206. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>

Huang, P. L. (2009). A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 2(5–6), 231–237. <https://doi.org/10.1242/dmm.001180>

Ibsen, M. S., Connor, M., & Glass, M. (2017). Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor Signaling and Bias. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 2(1), 48–60. <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>

Ibsen, M. S., Finlay, D. B., Patel, M., Javitch, J. A., Glass, M., & Grimsey, N. L. (2019). Cannabinoid CB1 and CB2 Receptor-Mediated Arrestin Translocation: Species, Subtype, and Agonist-Dependence. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00350>

Imtiaz, S., & Rehm, J. (2018). The relationship between cannabis use and diabetes: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. *Drug and Alcohol Review*, *37*(7), 897–902. <https://doi.org/10.1111/dar.12867>

International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas* (9a ed.). International Diabetes Federation. <https://www.diabetesatlas.org>

Ishimoto, T., Lanaspá, M. A., Rivard, C. J., Roncal-Jimenez, C. A., Orlicky, D. J., Cicerchi, C., McMahan, R. H., Abdelmalek, M. F., Rosen, H. R., Jackman, M. R., MacLean, P. S., Diggler, C. P., Asipu, A., Inaba, S., Kosugi, T., Sato, W., Maruyama, S., Sánchez-Lozada, L. G., Sautin, Y. Y., ... Johnson, R. J. (2013). High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *58*(5), 1632–1643. <https://doi.org/10.1002/hep.26594>

Jourdan, T., Godlewski, G., & Kunos, G. (2016). Endocannabinoid regulation of β -cell functions: Implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *18*(6), 549–557. <https://doi.org/10.1111/dom.12646>

Juan-Picó, P., Fuentes, E., Bermúdez-Silva, F. J., Javier Díaz-Molina, F., Ripoll, C., Rodríguez de Fonseca, F., & Nadal, A. (2006). Cannabinoid receptors regulate Ca^{2+} signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell calcium*, *39*(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.10.005>

Juan-Pico, P., Ropero, A. B., Tuduri, E., Quesada, I., Fuentes, E., Bermudez-Silva, F. J., Rodriguez de Fonseca, F., & Nadall, A. (2009). Regulation of glucose-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signals by cannabinoid CB1 and CB2 receptors in pancreatic alpha- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *Obesity and Metabolism-Milan*, *5*(1), 20–28.

Kalra, S., & Gupta, Y. (2016). The Insulin:Glucagon Ratio and the Choice of Glucose-Lowering Drugs. *Diabetes Therapy*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13300-016-0160-4>

Kawamori, D., & Kulkarni, R. N. (2009). Insulin modulation of glucagon secretion: The role of insulin and other factors in the regulation of glucagon secretion. *Islets*, *1*(3), 276–279. <https://doi.org/10.4161/isl.1.3.9967>

Kim, W., Doyle, M. E., Liu, Z., Lao, Q., Shin, Y.-K., Carlson, O. D., Kim, H. S., Thomas, S., Napora, J. K., Lee, E. K., Moaddel, R., Wang, Y., Maudsley, S., Martin, B., Kulkarni, R. N., & Egan, J. M. (2011). Cannabinoids Inhibit Insulin Receptor Signaling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes*, *60*(4), 1198–1209. <https://doi.org/10.2337/db10-1550>

Kim, W., Fiori, J. L., Shin, Y.-K., Okun, E., Kim, J. S., Rapp, P. R., & Egan, J. M. (2014). Pancreatic polypeptide inhibits somatostatin secretion. *FEBS Letters*, *588*(17), 3233–3239. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.07.005>

- Koch, M. (2017). Cannabinoid Receptor Signaling in Central Regulation of Feeding Behavior: A Mini-Review. *Frontiers in Neuroscience*, *11*, 293. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00293>
- Korntner, S., Kunkel, N., Lehner, C., Gehwolf, R., Wagner, A., Augat, P., Stephan, D., Heu, V., Bauer, H.-C., Traweger, A., & Tempfer, H. (2017). A high-glucose diet affects Achilles tendon healing in rats. *Scientific Reports*, *7*(1), 780. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00700-z>
- Kunos, G., Osei-Hyiaman, D., Liu, J., Godlewski, G., & Bátkai, S. (2008). Endocannabinoids and the Control of Energy Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(48), 33021–33025. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800012200>
- Kurita, Y., Ohki, T., Soejima, E., Yuan, X., Kakino, S., Wada, N., Hashinaga, T., Nakayama, H., Tani, J., Tajiri, Y., Hiromatsu, Y., Yamada, K., & Nomura, M. (2019). A High-Fat/High-Sucrose Diet Induces WNT4 Expression in Mouse Pancreatic β -cells. *The Kurume Medical Journal*, *65*(2), 55–62. <https://doi.org/10.2739/kurumemedj.MS652008>
- Laguerre, A., Keutler, K., Hauke, S., & Schultz, C. (2021). Regulation of Calcium Oscillations in β -Cells by Co-activated Cannabinoid Receptors. *Cell Chemical Biology*, *28*(1), 88-96.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.006>
- Larqué, C., Velasco, M., Navarro-Tableros, V., Duhne, M., Aguirre, J., Gutiérrez-Reyes, G., Moreno, J., Robles-Diaz, G., Hong, E., & Hiriart, M. (2011). Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life*, *63*(10), 831–839. <https://doi.org/10.1002/iub.544>
- Li, C., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2010). Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 beta-cells. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *26*(2), 187–196. <https://doi.org/10.1159/000320527>
- Li, C., Vilches-Flores, A., Zhao, M., Amiel, S. A., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2012). Expression and Function of Monoacylglycerol Lipase in Mouse β -cells and Human Islets of Langerhans. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *30*(2), 347–358. <https://doi.org/10.1159/000339069>
- Li, N. X., Brown, S., Kowalski, T., Wu, M., Yang, L., Dai, G., Petrov, A., Ding, Y., Dlugos, T., Wood, H. B., Wang, L., Erion, M., Sherwin, R., & Kelley, D. E. (2018). GPR119 Agonism Increases Glucagon Secretion During Insulin-Induced Hypoglycemia. *Diabetes*, *67*(7), 1401–1413. <https://doi.org/10.2337/db18-0031>
- Lima, M. L. R. P., Leite, L. H. R., Gioda, C. R., Leme, F. O. P., Couto, C. A., Coimbra, C. C., Leite, V. H. R., & Ferrari, T. C. A. (2016). A Novel Wistar Rat Model of Obesity-Related Nonalcoholic Fatty Liver Disease Induced by Sucrose-Rich Diet. *Journal of Diabetes Research*, *2016*, 9127076. <https://doi.org/10.1155/2016/9127076>
- Lindqvist, A., Baelemans, A., & Erlanson-Albertsson, C. (2008). Effects of sucrose,

- glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regulatory Peptides*, 150(1–3), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.06.008>
- Liu, B., Song, S., Ruz-Maldonado, I., Pingitore, A., Huang, G. C., Baker, D., Jones, P. M., & Persaud, S. J. (2016). GPR55-dependent stimulation of insulin secretion from isolated mouse and human islets of Langerhans. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 18(12), 1263–1273. <https://doi.org/10.1111/dom.12780>
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). Purification of Cells and Their Parts. *Molecular Cell Biology*. 4th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21492/>
- López-Jaramillo, P., Sánchez, R. A., Díaz, M., Cobos, L., Parra-Carrillo, J. Z., Lizcano, F., Lanás, F., Sinay, I., Sierra, I. D., Peñaherrera, E., Benderky, M., Schmid, H., Botero, R., Urina, M., Lara, J., Foos, M. C., Márquez, G., Harrap, S., Ramírez, A. J., & Zanchetti, A. (2013). Consenso Latinoamericano De Hipertensión En Pacientes Con Diabetes Tipo 2 Y Síndrome Metabólico. *Revista Med*, 21, 113–135. <https://doi.org/10.18359/rmed.1164>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275.
- Maccarrone, M., Bab, I., Bíró, T., Cabral, G. A., Dey, S. K., Di Marzo, V., Konje, J. C., Kunos, G., Mechoulam, R., Pacher, P., Sharkey, K. A., & Zimmer, A. (2015). Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(5), 277–296. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.008>
- Malenczyk, K., Jazurek, M., Keimpema, E., Silvestri, C., Janikiewicz, J., Mackie, K., Di Marzo, V., Redowicz, M. J., Harkany, T., & Dobrzyn, a. (2013). CB1 Cannabinoid Receptors Couple to Focal Adhesion Kinase to Control Insulin Release. *Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32685–32699. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.478354>
- Mamikutty, N., Thent, Z. C., Sapri, S. R., Sahrudin, N. N., Mohd Yusof, M. R., & Haji Suhaimi, F. (2014). The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed Research International*, 2014, 263897. <https://doi.org/10.1155/2014/263897>
- Martini, Waldhoer, Pusch, Kharazia, Fong, Lee, Freissmuth, & Whistler. (2007). Ligand-induced down-regulation of the cannabinoid 1 receptor is mediated by the G-protein-coupled receptor-associated sorting protein GASP1. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(3), 802–811. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7132com>
- Matias, I., & Di Marzo, V. (2007). Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 18(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.11.006>
- Matias, I., Gonthier, M.-P. P., Orlando, P., Martiadis, V., De Petrocellis, L., Cervino, C., Petrosino, S., Hoareau, L., Festy, F., Pasquali, R., Roche, R., Maj, M., Pagotto, U.,

- Monteleone, P., & Di Marzo, V. (2006). Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *91*(8), 3171–3180. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2679>
- McAuley, K. A., Williams, S. M., Mann, J. I., Walker, R. J., Lewis-Barned, N. J., Temple, L. A., & Duncan, A. W. (2001). Diagnosing insulin resistance in the general population. *Diabetes Care*, *24*(3), 460–464. <https://doi.org/10.2337/diacare.24.3.460>
- McKillop, A. M., Moran, B. M., Abdel-Wahab, Y. H. a., & Flatt, P. R. (2013). Evaluation of the insulin releasing and antihyperglycaemic activities of GPR55 lipid agonists using clonal beta-cells, isolated pancreatic islets and mice. *British Journal of Pharmacology*, *170*, 978–990. <https://doi.org/10.1111/bph.12356>
- Misler, S. (2010). The isolated pancreatic islet as a micro-organ and its transplantation to cure diabetes: Celebrating the legacy of Paul Lacy. *Islets*, *2*(4), 210–224. <https://doi.org/10.4161/isl.2.4.12156>
- Moede, T., Leibiger, B., Vaca Sanchez, P., Daré, E., Köhler, M., Muhandiramlage, T. P., Leibiger, I. B., & Berggren, P.-O. (2020). Glucokinase intrinsically regulates glucose sensing and glucagon secretion in pancreatic alpha cells. *Scientific Reports*, *10*, 20145. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76863-z>
- Moran, B. M., Abdel-Wahab, Y. H. A., Flatt, P. R., & McKillop, A. M. (2014). Activation of GPR119 by fatty acid agonists augments insulin release from clonal β -cells and isolated pancreatic islets and improves glucose tolerance in mice. *Biological Chemistry*, *395*(4), 453–464. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0255>
- Moreno-Fernández, S., Garcés-Rimón, M., Vera, G., Astier, J., Landrier, J. F., & Miguel, M. (2018). High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. *Nutrients*, *10*(10), 1502. <https://doi.org/10.3390/nu10101502>
- Muccioli, G. G. (2010). Endocannabinoid biosynthesis and inactivation, from simple to complex. *Drug Discovery Today*, *15*(11–12), 474–483. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.03.007>
- Müller, T. D., Finan, B., Clemmensen, C., DiMarchi, R. D., & Tschöp, M. H. (2017). The New Biology and Pharmacology of Glucagon. *Physiological Reviews*, *97*(2), 721–766. <https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2016>
- Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., & Cinti, S. (2008). Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *Journal of Lipid Research*, *49*(7), 1562–1568. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>
- Nakata, M., & Yada, T. (2008). Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet β -cells via CB1 receptors. *Regulatory Peptides*, *145*, 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.009>

Navarro, L., Martínez-vargas, M., Murillo-rodríguez, E., Landa, A., Méndez-díaz, M., & Prospéro-garcía, O. (2003). Potential role of the cannabinoid receptor cb1 in rapid eye movement sleep rebound. *Neuroscience*, *120*(3), 855–859. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(03\)00339-7](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(03)00339-7)

Ning, Y., O'Neill, K., Lan, H., Pang, L., Shan, L. X., Hawes, B. E., & Hedrick, J. A. (2008). Endogenous and synthetic agonists of GPR119 differ in signalling pathways and their effects on insulin secretion in MIN6c4 insulinoma cells. *British Journal of Pharmacology*, *155*(7), 1056–1065. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.337>

Nogueras-Ortiz, C., & Yudowski, G. A. (2016). The Multiple Waves of Cannabinoid 1 Receptor Signaling. *Molecular Pharmacology*, *90*(5), 620–626. <https://doi.org/10.1124/mol.116.104539>

Oddi, S., Spagnuolo, P., Bari, M., D'Agostino, A., & Maccarrone, M. (2007). Differential modulation of type 1 and type 2 cannabinoid receptors along the neuroimmune axis. *International Review of Neurobiology*, *82*, 327–337. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)82017-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82017-4)

Odori, S., Hosoda, K., Tomita, T., Fujikura, J., Kusakabe, T., Kawaguchi, Y., Doi, R., Takaori, K., Ebihara, K., Sakai, Y., Uemoto, S., & Nakao, K. (2013). GPR119 expression in normal human tissues and islet cell tumors: Evidence for its islet-gastrointestinal distribution, expression in pancreatic beta and alpha cells, and involvement in islet function. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *62*(1), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2012.06.010>

OECD. (2019). *Health at a Glance 2019*. <https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/4dd50c09-en>

Osei-Hyiaman, D., DePetrillo, M., Pacher, P., Liu, J., Radaeva, S., Bátkai, S., Harvey-White, J., Mackie, K., Offertáler, L., Wang, L., & Kunos, G. (2005). Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation*, *115*(5), 1298–1305. <https://doi.org/10.1172/JCI23057>

Pandey, R., Mousawy, K., Nagarkatti, M., & Nagarkatti, P. (2009). Endocannabinoids and immune regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, *60*(2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.03.019>

Reaven, G. M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, *37*(12), 1595–1607. <https://doi.org/10.2337/diab.37.12.1595>

Rehfeld, J. F. (2018). The Origin and Understanding of the Incretin Concept. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 387. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00387>

Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*, e219. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.6>

- Rodríguez-Correa, E., González-Pérez, I., Clavel-Pérez, P. I., Contreras-Vargas, Y., & Carvajal, K. (2020). Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: What is the best choice? *Nutrition & Diabetes*, *10*(2020),24. <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>
- Romero-calvo, I., Ocón, B., Martínez-moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-augustin, O., & Medina, D. F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Analytical Biochemistry*, *401*(2), 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>
- Rorsman, P., & Braun, M. (2013). Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annual Review of Physiology*, *75*(1), 155–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183754>
- Rosas Guzmán J., González Chávez A., Aschner P., B. R. (2010). Consenso latinoamericano de la asociación latinoamericana de diabetes (ALAD). *Asociación Latinoamericana de Diabetes*, *18*(1), 25–39.
- Ruby, M. A., Nomura, D. K., Hudak, C. S. S., Barber, A., Casida, J. E., & Krauss, R. M. (2011). Acute overactive endocannabinoid signaling induces glucose intolerance, hepatic steatosis, and novel cannabinoid receptor 1 responsive genes. *PloS One*, *6*(11), e26415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026415>
- Ruehle, S., Rey, A. A., Remmers, F., & Lutz, B. (2012). The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *Journal of Psychopharmacology* *26*(1), 23–39. <https://doi.org/10.1177/0269881111408958>
- Rutter, G. A., Pullen, T. J., Hodson, D. J., & Martinez-Sanchez, A. (2015). Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochemical Journal*, *466*(2), 203–218. <https://doi.org/10.1042/BJ20141384>
- Rutter, K., Hennoste, L., Ward, L. C., Cornish, B. H., & Thomas, B. J. (1998). Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats. *Laboratory Animals*, *32*(1), 65–71. <https://doi.org/10.1258/002367798780559356>
- Sakamoto, Y., Inoue, H., Kawakami, S., Miyawaki, K., Miyamoto, T., Mizuta, K., & Itakura, M. (2006). Expression and distribution of Gpr119 in the pancreatic islets of mice and rats: Predominant localization in pancreatic polypeptide-secreting PP-cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *351*(2), 474–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.076>
- Salazar, A. J. A. (2011). *Diseño y construcción de un sistema de impedanciometría para la determinación de grasa corporal en ratas de laboratorio* [M.S.]. Instituto Politécnico Nacional.
- Sallaberry, C. A., & Astern, L. (2018). The endocannabinoid system, our universal regulator. *Journal of Young Investigators*, *34*. <https://doi.org/10.22186/JYI.34.5.48-55>

- Schaich, C. L., Shaltout, H. A., Brosnihan, K. B., Howlett, A. C., & Diz, D. I. (2014). Acute and chronic systemic CB 1 cannabinoid receptor blockade improves blood pressure regulation and metabolic profile in hypertensive (mRen2)27 rats. *Physiol Rep*, 2(8), e12108. <https://doi.org/10.14814/phy2.12108>
- Shamah-Levy, T., Vielma-Orozco, E., Heredia-Hernández, O., Romero-Martínez, M., Mojica-Cuevas, J., Cuevas-Nasu, L., Santaella-Castell, J., & Rivera-Dommarco, J. (2020). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19: Resultados Nacionales*. Instituto Nacional de Salud Pública.
- Silvestri, C., & Di Marzo, V. (2013). The Endocannabinoid System in Energy Homeostasis and the Etiopathology of Metabolic Disorders. *Cell Metabolism*, 17(4), 475–490. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.001>
- Simental-Mendía, L. E., & Guerrero-Romero, F. (2020). The correct formula for the triglycerides and glucose index. *European Journal of Pediatrics*, 179(7), 1171–1171. <https://doi.org/10.1007/s00431-020-03644-1>
- Souza Cruz, E. M., Bitencourt de Morais, J. M., Dalto da Rosa, C. V., da Silva Simões, M., Comar, J. F., de Almeida Chuffa, L. G., & Seiva, F. R. F. (2020). Long-term sucrose solution consumption causes metabolic alterations and affects hepatic oxidative stress in Wistar rats. *Biology Open*, 9(3) bio047282. <https://doi.org/10.1242/bio.047282>
- Spivak, C. E., Kim, W., Liu, Q. R., Lupica, C. R., & Doyle, M. E. (2012). Blockade of β -cell KATP channels by the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.05.042>
- Sprague, J. E., & Arbeláez, A. M. (2011). Glucose Counterregulatory Responses to Hypoglycemia. *Pediatric endocrinology reviews : PER*, 9(1), 463–475.
- Starowicz, K. M., Cristino, L., Matias, I., Capasso, R., Racioppi, A., Izzo, A. a, & Di Marzo, V. (2008). Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(3), 553–565. <https://doi.org/10.1038/oby.2007.106>
- Strowski, M. Z., Parmar, R. M., Blake, A. D., & Schaeffer, J. M. (2000). Somatostatin Inhibits Insulin and Glucagon Secretion via Two Receptor Subtypes: An in Vitro Study of Pancreatic Islets from Somatostatin Receptor 2 Knockout Mice. *Endocrinology*, 141(1), 111–117. <https://doi.org/10.1210/endo.141.1.7263>
- Teixeira, T. F. S., Alves, R. D. M., Moreira, A. P. B., & Peluzio, M. do C. G. (2015). Main characteristics of metabolically obese normal weight and metabolically healthy obese phenotypes. *Nutrition Reviews*, 73(3), 175–190. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu007>
- Tharp, W. G., Lee, Y.-H., Maple, R. L., & Pratley, R. E. (2008). The cannabinoid CB1 receptor is expressed in pancreatic delta-cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 372, 595–600. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.077>

Troy-Fioramonti, S., Demizieux, L., Gresti, J., Muller, T., Vergès, B., & Degrace, P. (2015). Acute activation of cannabinoid receptors by anandamide reduces gastrointestinal motility and improves postprandial glycemia in mice. *Diabetes*, *64*(3), 808–818. <https://doi.org/10.2337/db14-0721>

van Egmond, N., Straub, V. M., & van der Stelt, M. (2021). Targeting Endocannabinoid Signaling: FAAH and MAG Lipase Inhibitors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *61*(1), 441–463. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030220-112741>

Velasco, M., Ortiz-Huidobro, R. I., Larqué, C., Sánchez-Zamora, Y. I., Romo-Yáñez, J., & Hiriart, M. (2020). Sexual dimorphism in insulin resistance in a metabolic syndrome rat model. *Endocrine Connections*, *9*(9), 890–902. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0288>

Vieira, E., Salehi, A., & Gylfe, E. (2007). Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia*, *50*(2), 370–379. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0511-1>

Vilches-Flores, A., Delgado-Buenrostro, N. L., Navarrete-Vázquez, G., & Villalobos-Molina, R. (2010). CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Regulatory Peptides*, *163*(1–3), 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.04.013>

Watts, M., Ha, J., Kimchi, O., & Sherman, A. (2016). Paracrine regulation of glucagon secretion: The $\beta/\alpha/\delta$ model. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *310*(8), E597–E611. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00415.2015>

Woolcott, O. O., Richey, J. M., Kabir, M., Chow, R. H., Iyer, M. S., Kirkman, E. L., Stefanovski, D., Lottati, M., Kim, S. P., Harrison, L. N., Ionut, V., Zheng, D., Hsu, I. R., Catalano, K. J., Chiu, J. D., Bradshaw, H., Wu, Q., & Bergman, R. N. (2015). High-fat diet-induced insulin resistance does not increase plasma anandamide levels or potentiate anandamide insulinotropic effect in isolated canine islets. *PLoS One*, *10*(4), e0123558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131033>

World Health Organization. (2020). *World health statistics 2020: Monitoring health for the SDGs, sustainable development goals* (pp. viii, 77 p.). World Health Organization.

Yu, Q., Shuai, H., Ahooghalandari, P., Gylfe, E., & Tengholm, A. (2019). Glucose controls glucagon secretion by directly modulating cAMP in alpha cells. *Diabetologia*, *62*(7), 1212–1224. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4857-6>

Zhang, Q., Ramracheya, R., Lahmann, C., Tarasov, A., Bengtsson, M., Braha, O., Braun, M., Brereton, M., Collins, S., Galvanovskis, J., Gonzalez, A., Groschner, L. N., Rorsman, N. J. G., Salehi, A., Travers, M. E., Walker, J. N., Gloyn, A. L., Gribble, F., Johnson, P. R. V., ... Rorsman, P. (2013). Role of KATP channels in glucose-regulated glucagon secretion and impaired counterregulation in type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, *18*(6), 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.10.014>

Zhuang, S., Kittler, J., Grigorenko, E. V., Kirby, M. T., Sim, L. J., Hampson, R. E.,

Childers, S. R., & Deadwyler, S. A. (1998). Effects of long-term exposure to delta9-THC on expression of cannabinoid receptor (CB1) mRNA in different rat brain regions. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 62(2), 141–149. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00232-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00232-0)



Cannabinoid receptors are differentially regulated in the pancreatic islets during the early development of metabolic syndrome

Antonio Barajas-Martínez , Karina Bermeo , Lizbeth de la Cruz , Marina Martínez-Vargas , Ricardo Jesús Martínez-Tapia , David Erasmo García & Luz Navarro

To cite this article: Antonio Barajas-Martínez , Karina Bermeo , Lizbeth de la Cruz , Marina Martínez-Vargas , Ricardo Jesús Martínez-Tapia , David Erasmo García & Luz Navarro (2020) Cannabinoid receptors are differentially regulated in the pancreatic islets during the early development of metabolic syndrome, *Islets*, 12:6, 134-144, DOI: [10.1080/19382014.2020.1849927](https://doi.org/10.1080/19382014.2020.1849927)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19382014.2020.1849927>



© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.



Published online: 08 Dec 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 217



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Cannabinoid receptors are differentially regulated in the pancreatic islets during the early development of metabolic syndrome

Antonio Barajas-Martínez ^{a,b}, Karina Bermeo ^{a,b}, Lizbeth de la Cruz ^b, Marina Martínez-Vargas ^a, Ricardo Jesús Martínez-Tapia ^{a,b}, David Erasmo García ^a and Luz Navarro ^a

^aDepartamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México; ^bPrograma de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

ABSTRACT

The endocannabinoid system is found in tissues that regulate the glycemia, including adipose tissue, muscle, and pancreatic islets. Diet-induced metabolic syndrome changes the expression of the CB receptors in muscle, adipose tissue, and liver. However, it is poorly understood whether metabolic syndrome (MetS) affects the expression of CB receptors in pancreatic β cells. We analyzed the expression of CB receptors in pancreatic β cells under chronic high-sucrose diet (HSD)-induced MetS. Wistar rats fed an HSD as a model of MetS were used to investigate changes in cannabinoid receptors. After 8 weeks of treatment, we evaluated the appearance of the following MetS biomarkers: glucose intolerance, hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia, and an increase in visceral adiposity. To determine the presence of CB1 and CB2 receptors in pancreatic β cells, immunofluorescence of primary cell cultures and pancreatic sections was performed. For whole-islet quantification of membrane-bound CB1 and CB2 receptors, western-blotting following differential centrifugation was conducted. Our results revealed that an HSD treatment closely mimics the alterations seen in MetS. We observed that in primary cell culture, CB1 and CB2 receptors were expressed at a higher level in pancreatic β cells compared with non- β cells. MetS resulted in a reduction of CB1 in the islet, whereas abundant CB2 was observed after the treatment. CB1 and CB2 receptors are differentially expressed in pancreatic β cells during MetS development.

ARTICLE HISTORY

Received 12 February 2020
Revised 19 October 2020
Accepted 7 November 2020

KEYWORDS


Metabolic syndrome;
endocannabinoid system;
hyperinsulinemia; insulin
resistance; cannabinoid
receptors

Introduction

The endocannabinoid system (ECS) is widely distributed throughout the body and is present in several locations, including the brain, heart, immune system, and bone.¹ It is found in organs and tissues involved in the regulation of the glycemic control, such as the hypothalamus in the central nervous system, as well as in peripheral organs, including adipose tissue, liver, muscle,^{2,3} and pancreas, specifically in the pancreatic islets.⁴ ECS provides a negative feedback loop that modulates cellular responses to stimuli.⁵ Indeed, cannabis consumption has been linked with increased palatable food intake,⁶ lipogenesis promotion,⁷ and decreased glucose tolerance.⁸ Conversely, cannabinoid antagonists display opposite effects.⁹ However, previous epidemiological studies consistently reported a decrease in the incidence of diabetes in cannabis consuming populations,¹⁰ even after considering several confounding factors.¹¹ This finding highlights the relevance of long-term changes in the ECS system.

In pancreatic β cells, endocannabinoids are synthesized in response to glucose stimulation and membrane depolarization by Ca^{2+} -dependent enzymes.^{4,12} Endocannabinoids have been proposed as an autocrine or paracrine signaling system in the pancreatic islet cells. They activate CB1 and CB2 receptors, which are coupled to $G_{i/o}$ proteins.¹³ This endogenous activation decreases the intracellular cAMP concentration, calcium oscillations, and insulin release.^{12,14} Furthermore, the activation of CB1 inhibits voltage-gated calcium channels.¹⁵ CB1 and CB2 receptor activation decreases calcium oscillations, which in turn diminishes insulin release,^{16,17} causing glucose intolerance.⁸

In order to better understand the interplay between cannabinoids and the development of diabetes, it is necessary to know whether cannabinoid receptors are dysregulated in pancreatic islets. A similar dysregulation could be found in metabolic syndrome (MetS), as a leading risk factor for diabetes development.¹⁸ Several reports about the effects of cannabinoid compounds show short-term

CONTACT Luz Navarro  navarro@unam.mx Departamento de Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México C.P. 04510, México.

© 2020 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, and is not altered, transformed, or built upon in any way.

modulation of pancreatic islet function by CB1 and CB2 receptors.¹⁹ Notably, MetS-inducing diets alter mRNA expression for cannabinoid receptors in muscle,²⁰ and adipose tissue.²¹ In pancreatic islets, the expression of the CB1 cannabinoid receptor is decreased acutely after glucose administration.¹⁶ Furthermore, increased levels of endocannabinoids have been found in pancreatic islets of mice fed with a high-fat diet.²² Nonetheless, CB1 and CB2 receptor changes have not been investigated in a high-sucrose diet (HSD)-induced MetS. Therefore, the purpose of this work was to investigate the expression of CB1 and CB2 receptors in pancreatic islets from rats with MetS.

Results

Glucose dysregulation induced by an HSD

To assess the metabolic status induced in rats after 8 weeks of HSD, several biomarkers of MetS were measured. The weight, body fat, and visceral fat pads were all increased following an HSD regimen (Table 1, Figure 1A). Weight and body composition changes were accompanied by elevations of MetS biomarkers, such as fasting hyperinsulinemia (control 1.4 ± 0.2 ng/mL vs. treatment 5 ± 0.8 ng/mL, $p < .001$) and fasting hypertriglyceridemia (control 135 ± 7 mg/dL vs. treatment 220 ± 11 mg/dL) without differences in fasting glucose (Figure 1B-D). Insulin resistance estimation by HOMA-IR was increased in the HSD group (control 1.8 ± 0.3 A.U. vs. treatment 6.4 ± 1.4 A.U.) (Figure 1E). *In vivo*

glucose homeostasis was assessed by plasma glucose levels after a glycemic challenge (intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT) and an insulin challenge (insulin tolerance test, ITT). Triglyceride levels in response to these challenges were recorded. IPGTT results showed glucose intolerance in the treated group. HSD serum glucose levels were significantly higher at the glycemic peak in the 15 min (control 143 ± 3 mg/dL vs. treatment 220 ± 18 mg/dL, $p < .001$) and 30 min (control 129 ± 5 mg/dL vs. treatment 169 ± 11 mg/dL, $p < .05$) (Figure 1F). Following the insulin tolerance test (ITT), the percentage decrease in the glucose level was the same for both groups, with the lowest value reached 60 min after administration. The control and the treated group reached mean reductions of 67% and 69%, respectively, with no statistically significant difference. However, at the end of the test, the mean glucose reduction reached a plateau at 68% in the control group, while it returned to the original glucose level in the treated group, with an SEM difference of $\pm 2\%$, suggesting a faster recovery from the hypoglycemic condition (Figure 1G). The triglyceride response to the glycemic challenge showed a prolonged response during the third hour of the test (control 117 ± 9 mg/dL, 108% increase vs. treatment 216 ± 28 mg/dL, 141% increase, $p < .05$) (Figure 1H). Fasting hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, accompanied by increased visceral fat pad deposits, are characteristic of MetS. We found that 8 weeks of an HSD impaired glucose tolerance without decreasing insulin sensitivity, as shown by the ITT, with a greater recovery of the glycemia in

Table 1. Body composition changes in MetS induced by HSD.

	Bioimpedance estimated mass (g)			
	Control mean \pm S.E.M.	HSD mean \pm S.E.M.	Difference \pm S.E.	p Value
Body weight**	407.7 \pm 10.7	468 \pm 18.5	60.3 \pm 17.2	<.01
Body fat *	146.2 \pm 8.1	191.4 \pm 8.6	45.2 \pm 15.3	<.05
Fat free mass ^{ns}	218.2 \pm 7.6	248.6 \pm 6.4	30.4 \pm 15.3	.2
Extracellular water ^{ns}	106.2 \pm 15.6	79.4 \pm 7.8	-26.8 \pm 21.1	.3
Total body water ^{ns}	253.8 \pm 36.4	210.5 \pm 13.4	-43.3 \pm 21.1	.2
	Visceral fat pads weight (g)			
	Control mean \pm S.E.M.	HSD mean \pm S.E.M.	Difference \pm S.E.	p Value
Pericardial ^{ns}	0.2 \pm 0.04	0.6 \pm 0.1	0.4 \pm 0.6	.5
Peripancreatic *	0.9 \pm 0.1	2.2 \pm 0.3	1.3 \pm 0.5	<.05
Epididymal ***	2 \pm 0.3	5 \pm 0.5	3 \pm 0.5	<.001
Retroperitoneal ***	2 \pm 0.3	5.6 \pm 0.6	3.6 \pm 0.6	<.001

For comparing differences between diet groups, bioimpedance estimates of body composition are presented above and visceral fat pads weight below. All results are presented as mean \pm SEM, and differences were computed through multiple t-tests with Holm-Sidak correction for multiple comparisons. Significance levels are presented as follows * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. The HSD group had increased weight due to body fat, an increase mostly reflected in the visceral fat pad (Peripancreatic, epididymal, and retroperitoneal fat pads).

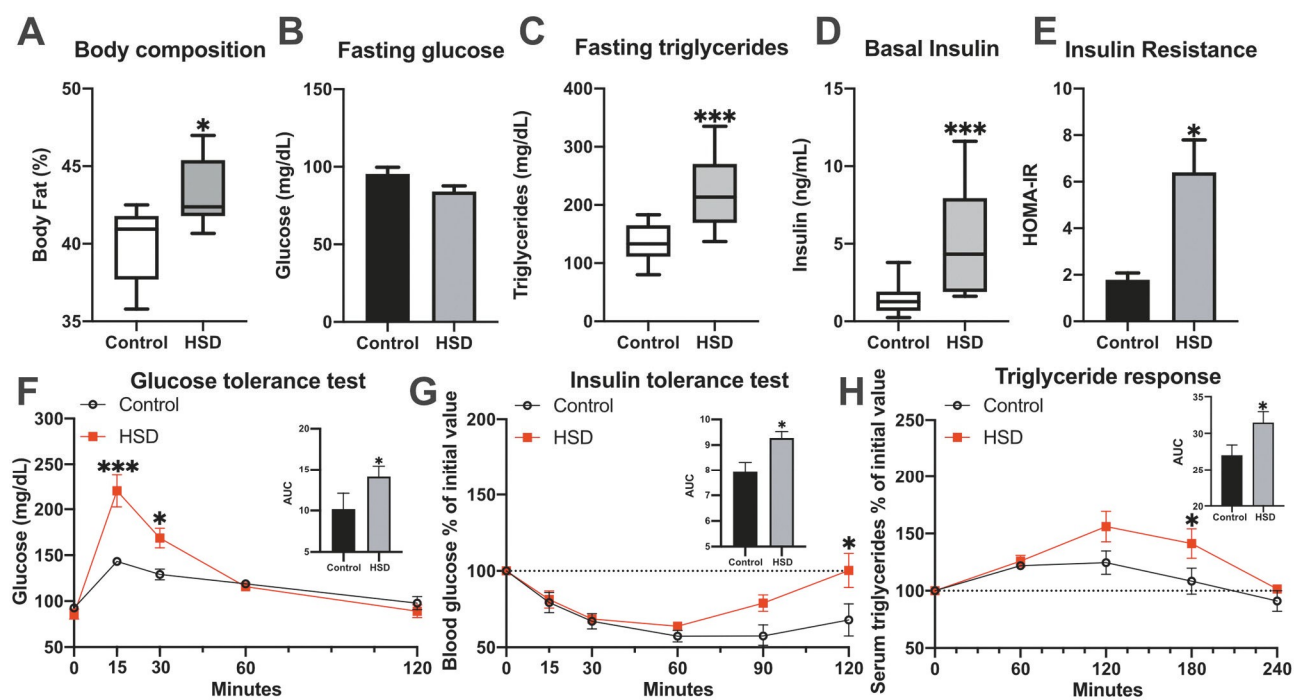


Figure 1. Glucose regulation is altered in the high-sucrose diet model of MetS.

Body fat percentage (A), fasting levels of glucose (B), insulin (C), triglycerides (D), and insulin resistance (E) are shown. (F) shows the intraperitoneal glucose tolerance test differences between groups at 15 and 30 min after the intraperitoneal administration of a 1 g/kg glucose challenge. (G) presents the percentage reduction in fasting glucose levels after insulin administration, with a recovery of glucose levels only observed in the HSD group. The increase in triglyceride response to the glucose challenge is shown in (H). Variables with normal distribution are presented as bars with mean \pm SEM, and were compared with a t-test. Variables with non-normal distribution are presented as Tukey box-plots with median, interquartile range (IQR), and whiskers for the 1.5 IQR range, and were compared with Mann-Whitney tests. Time-dependent variables were compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test. AUC was calculated and compared with t-tests and is presented as mean \pm SEM. Significance levels are presented as follows * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

the treated group and an increased triglyceride response to the hyperglycemic challenge.

Cannabinoid receptor expression in primary culture from dissociated islets

Immunofluorescence of a primary culture from dissociated islets from control rats was carried out to identify the cell populations that expressed CB1 and CB2 receptors. Insulin-positive cells were the most abundant in the islet primary cultures, accounting for 73% of the total cell population. Pancreatic β cells had a distinctive diameter of $12 \pm \text{SD } 2 \mu\text{m}$ and granular cytoplasm. Besides, most of the insulin-negative cells, which represented 26% of the culture, where morphologically recognizable as α -cells. They had a smaller diameter averaging $7.5 \pm \text{SD } 1 \mu\text{m}$ with uniform round nuclei and coarsely clumped chromatin. Other cell populations that were neither insulin- nor glucagon-positive, such as fibroblasts, were also observed. Both CB1 and CB2 receptors were present

in the main cell populations of the islet, both β and non- β cells (Figure 2A,C). The fluorescence signal indicated an increased abundance of cannabinoid receptors in β cells relative to non- β cells, for both CB1 (mean difference of 12 ± 2 arbitrary units (A.U.), $p < .001$), and CB2 (mean difference of 33 ± 3 A.U., $p < .001$) in primary culture conditions (Figure 2B,D).

Cannabinoid receptors in pancreatic islets are dysregulated in MetS

To determine whether MetS changes the density of CB1 and CB2 receptors in the pancreatic islets, immunofluorescence of pancreatic sections was conducted. CB1 was decreased in the pancreatic islets of rats with MetS (Figure 3A). This decrease occurred both in β cells (mean difference -10.5 ± 4 A.U., $p < .001$) and non- β cells (mean difference -32 ± 4 A.U., $p < .001$) (Figure 3B). In contrast, for CB2 the fluorescence amount in the MetS group increased both in β (mean difference 7.5 ± 1 A.U., $p < .001$) and

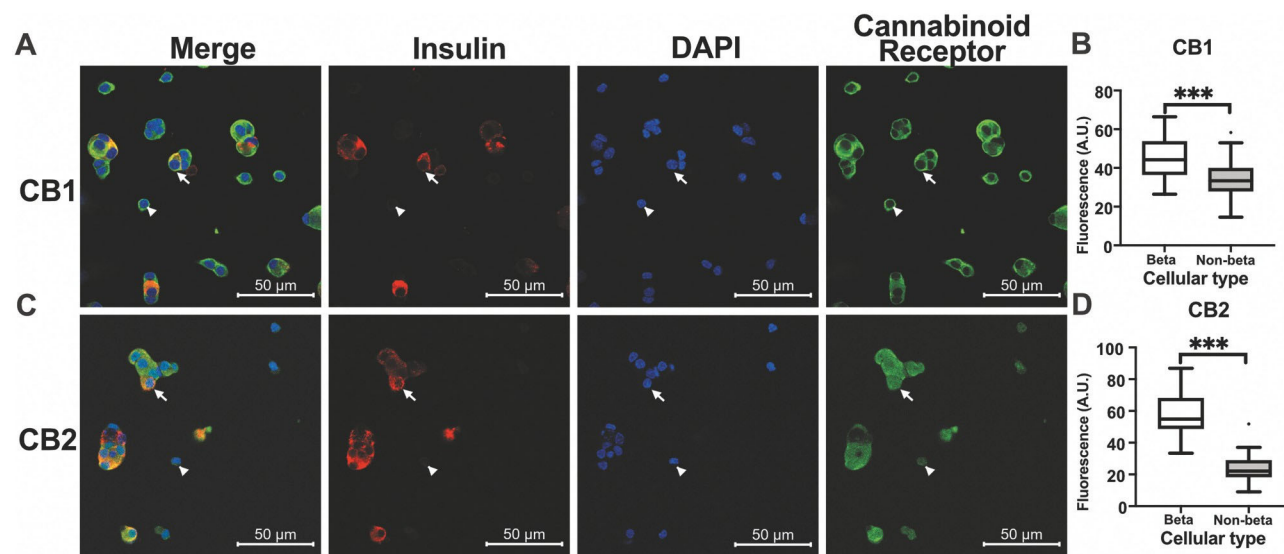


Figure 2. Cannabinoid receptor expression in dissociated primary culture.

Primary islet culture from control islets immunofluorescence showed the presence of cannabinoid in (A) for CB1 and (C) for CB2. The first column shows the merged image. Pancreatic β cells are identified by the insulin presence in red. The cannabinoid receptor is shown in green. For cellular identification, the DAPI-stained nucleus in blue is presented in the third column. Arrows indicate representative β cells, and non- β cells are indicated with arrowheads. Corrected fluorescence (see methods) for CB1 is presented in (B), and for CB2 in (D). Results are presented as Tukey box-plots with outliers and were compared with Mann-Whitney tests. Significant results are shown as *** $p < .001$.

in non- β cells (mean difference 10 ± 2 A.U., $p < .001$) (Figure 3C,D). Markedly, non- β cells had greater levels of CB1 fluorescence than β cells in the control group (mean difference 21.3 ± 3.5 A.U., $p < .001$), while non- β cells had greater levels of CB2 fluorescence than β cells in the HSD group (mean difference 6 ± 1.4 A.U., $p < .01$). Next, we proceeded to determine whether these changes were reflected in the total amount of membrane-bound receptors. For the membranal protein fraction of CB1, a mean difference of -2.6 ± 0.5 A.U. ($p < .01$) was found, whereas for the membrane-bound CB2 protein fraction showed a mean difference of 1 ± 0.3 A.U. ($p < .05$). As expected, both proteins resulted in the molecular weight reported for these receptors (Figure 3E,F). The amount of membrane-bound receptors and the total receptors showed similar trends. Thus, CB1 expression decreased while CB2 expression increased in the pancreatic islet. Furthermore, this change was observed for both β and non- β cells.

Discussion

Cannabinoid receptors and their functional expression have been objects of pharmacological studies as

they might be therapeutic targets for glycemic control. To date, most of the reports were conducted in either cellular cultures or whole-islets. Interestingly, we found a differential expression of CB receptors in whole-islets and cultured dissociated cells. In whole-islets both cannabinoid receptors were predominantly expressed in non- β cells, CB1 in control and CB2 in HSD conditions (Figure 3). In contrast, although both CB1 and CB2 receptors were simultaneously present in pancreatic β and non- β cells, fluorescence amount was greater in β cells in primary cell culture (Figure 2). Presence of both cannabinoid receptors in β and non- β cells is in agreement with previous reports for β ²³⁻²⁵ and α cells^{17,24,26} in rat islets. Expression changes of CB receptors in culture conditions may clarify some discrepancies regarding the cellular type in which these receptors are found. Moreover, this may have implications in functional outcomes of the administration of cannabinoid agonists and antagonists in cellular- and whole-islet cultures. As CB receptors have been found in several cellular types in pancreatic islets, paracrine interactions may also be supported by whole-islet experiments, resulting in contrasting insulin release outcomes reported in the literature.^{12,14,26}

Here, we show that cannabinoid receptors in the pancreatic islet become dysregulated in MetS

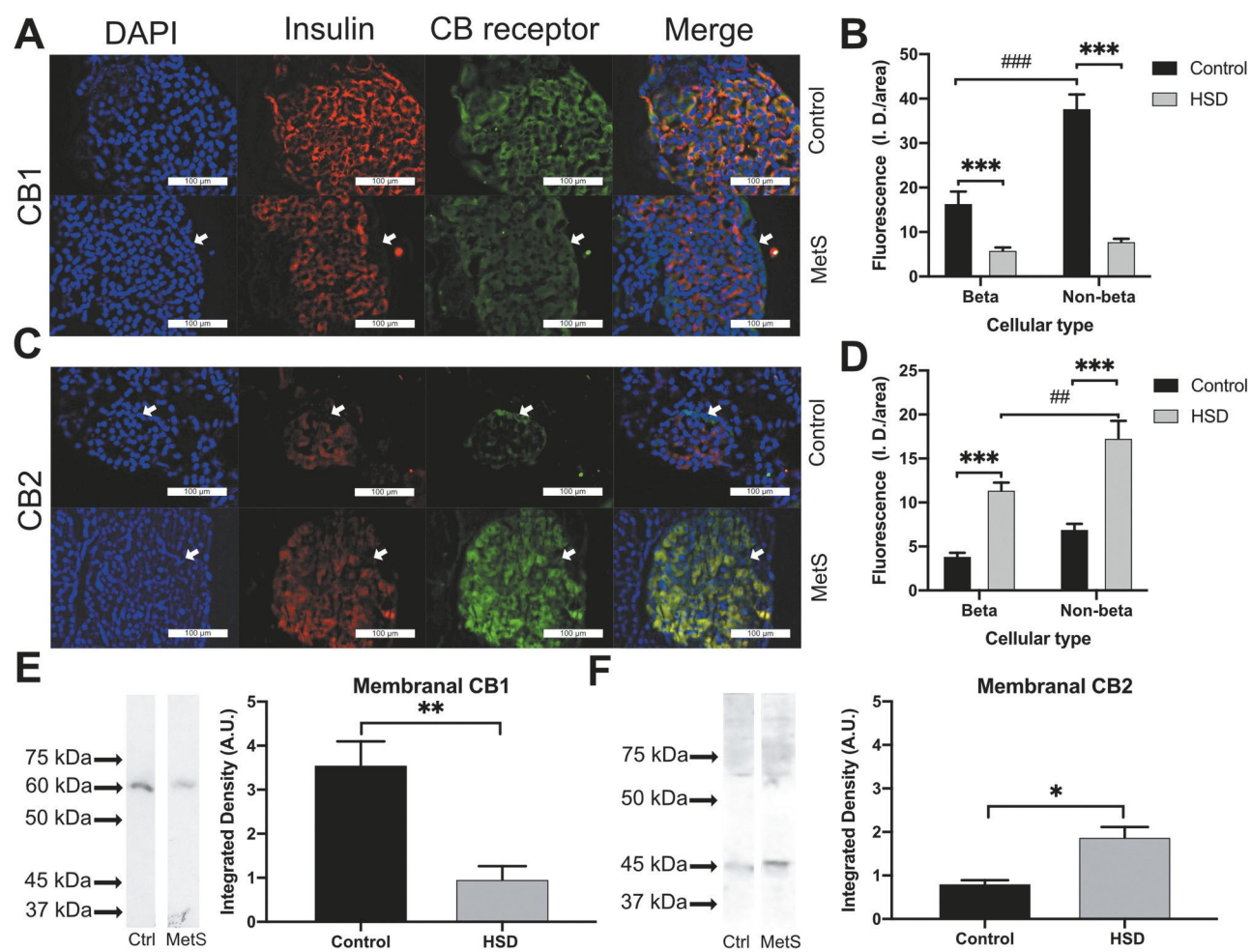


Figure 3. Cannabinoid receptor expression in metabolic syndrome.

The presence of cannabinoid receptors in the control and MetS groups is shown for CB1 in (A) and CB2 in (C). The DAPI-stained cell nuclei are shown in blue in the first column, insulin is shown in red in the second column, and CB receptors in green; the last column shows the merged image. Differences in the intensity of fluorescence between the control and treated groups are shown in (B) for CB1 and (D) for CB2 receptors. (E) shows the difference in the membrane-bound CB1 receptor presence between groups and the molecular weight, control (Ctrl) in the left lane, and MetS in the right lane. (F) shows the difference in the membrane-bound CB2 receptor presence between groups and the molecular weight, control in the left lane, and MetS in the right lane. Arrows highlight the presence of CBs receptors in non- β cells of the periphery of the pancreatic islets. For analysis of the fluorescence differences between groups and cell types, 2-way ANOVA corrected for multiple comparisons with Bonferroni *post hoc* was done. For western blot analysis between groups, unpaired t-tests were done. Results are shown as the mean \pm SEM, differences between treatment groups are shown * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, differences between cellular types within the same treatment group are shown ## $p < .01$, ### $p < .001$.

induced by HSD. Notably, the HSD model we used for this work results in blood pressure elevation in addition to dyslipidemia, glucose intolerance, and visceral fat increase.²⁷ These four indicators constitute the central core of MetS.²⁸ CB1 downregulation with concurrent CB2 upregulation was shown by the number of receptors present on the cellular membrane and by the total fluorescence of the cells (Figure 3). These results suggest that, although short-term administration of a fructose-rich diet increases CB1 mRNA expression in pancreatic rat islets,¹⁷ long-term

exposure to hypercaloric diets and subsequent disease development may result in a maladaptive response. In humans, MetS is associated with pancreatic β cell dysfunction.²⁹ This failure of the pancreatic β cell is associated with changes in receptor expression.³⁰ MetS dysregulation of CB1 and CB2 may implicate the participation of the endocannabinoid system in pancreatic β cell diseases. Beyond the pancreatic islet alterations, CB1 and CB2 expression changes have also been reported in tissues expressing both receptor types, such as in diabetic nephropathy and heart

diseases.^{31,32} Furthermore, in the progression from MetS to diabetes mellitus type 2, CB1 receptors present in macrophages also participate in the inflammatory response that contributes to the islet damage.^{33,34}

In the brain, the CB1 receptor provides retrograde negative feedback in GABAergic and glutamatergic synapses,⁵ while CB2 dampens proinflammatory profiles in microglia.³⁵ Cannabinoid receptors appear to participate in the fine-tuning of the cellular response to stimuli. Both cannabinoid receptors, CB1 and CB2, are coupled to $G\alpha_{i/o}$ -type G proteins, and their cAMP-lowering effects are sensitive to pertussis toxin.³⁶ However, only CB1 receptors inhibit L-type calcium channels.³⁷ These channels participate in the process of insulin release in pancreatic β cells.³⁸ Accordingly, in the pancreatic islet, CB1-dependent effects include a decrease of cAMP,³⁹ stimulation of glucagon secretion,⁴⁰ and calcium oscillation inhibition.^{24,41} In contrast, CB2-dependent effects include a decrease of cAMP,⁴² with an increase in calcium oscillations.³⁹ Thus, CB1 reduction is expected to counteract the negative regulation that the endocannabinoid system exerts in insulin release, while CB2 upregulation could amplify insulin release. This would be compatible with the presence of hyperinsulinemia without a decreased peripheral response to insulin (Figure 1). We propose that the interplay of CB1 downregulation and CB2 upregulation participates in the insulin release during the early development of MetS. Furthermore, it supports the participation of the endocannabinoid system in the long-term maintenance of normoglycemia.

Our results unveil the ECS regulation under metabolic derangements induced by HSD resulting from pancreatic β cell dysfunction. These findings advance our understanding of the regulation of CB1 and CB2 receptors in pancreatic β cells.

Materials and methods

Ethics statement

The treatment of the animals was carried out subject to the Official Mexican Standard of Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Procedures were approved by the Ethics and Research Committees of the Faculty

of Medicine at Universidad Nacional Autónoma de México under project 080-2011.

Experimental animals and husbandry

We used eight-week-old male Wistar rats weighing 250–280 grams. They remained under a 12:12 light-dark cycle, at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$, with a relative humidity of 60%, and were pair-housed in plexiglass cages. Laboratory Rodent Diet 5001 (LabDiet) was provided for both groups, and was replenished three times a week, along with fresh bedding and water. All procedures that caused pain were performed under anesthesia with sodium pentobarbital (38 mg/kg), administered intraperitoneally (IP). A dose of intraperitoneal sodium pentobarbital (120 mg/kg) was used at the endpoint for euthanasia. The sample size was calculated by the “resource equation” method.⁴³ Animals were allocated into groups before treatment, after confirming equal weight gain and caloric ingestion for each animal.

Experimental design and MetS induction

Rats ($n = 24$) were given one week to acclimate to colony conditions. Water and food intake was quantified three times a week. Following acclimation, rats were evenly divided into control and HSD groups. The control group had access to water and food *ad libitum*, while the treated HSD group had food access *ad libitum* and water was supplemented with 20% sucrose. This treatment was administered for eight weeks, after which we assessed several MetS components.²⁷ Capillary blood measurements of fasting glucose, triglycerides, and total cholesterol were determined according to the manufacturer’s instructions by colorimetric assay using Accutrend Plus (COBAS, Roche) equipment. Body composition was evaluated through bioimpedance, using an *ad hoc* device that estimates body fat, fat-free mass, extracellular water, and total body water.^{44,45} IPGTT was performed with a dose of 1 g/kg, and the resulting triglyceride curve was recorded.⁴⁶ The ITT was conducted to assert whether the response to insulin was adequate, with a dose of 0.75 UI/kg. Rats were euthanized by IP pentobarbital administration, and blood was obtained from the superior vena cava and

centrifuged to obtain plasma. Samples were frozen and stored at -70°C until processing. An enzyme-linked immunoassay was performed with a Rat High Range Insulin ELISA Kit (ALPCO) following instructions from the manufacturer. Insulin resistance was estimated as follows: $\text{HOMA-IR} = (\text{Fasting glucose} \times \text{Basal insulin})/2,430$, where basal insulin was in microunits per milliliter, and fasting glucose in milligram per deciliter.⁴⁷ Pericardial, epididymal, retroperitoneal and peripancreatic fat pads were retrieved and weighed to estimate visceral adiposity. The pancreas was extracted using the technique described below, and islets for use in western blots were collected in aliquots of 300 islets each.

Pancreatic islet collection and cell culture

For the pancreatic islet obtention and primary cell cultures, we employed a previously described technique.^{48,49} Briefly, the pancreatic duct was localized and cannulated by insufflation with cold Hanks' Balanced Salts Solution (HBSS) supplemented with bovine serum albumin (Microlab), NaHCO_3 (4 mM), HEPES (15 mM), and 1% 100X Antibiotic-Antimycotic (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific). The pancreas was removed and transferred to a flask containing HBSS supplemented with collagenase P (0.3 g/L) for incubation at 37°C for 12 min with lateral agitation. After enzymatic digestion, the suspension was washed twice with HBSS by centrifugation at $160 \times g$ for 5 min. Then, the tissue was mechanically disrupted, and the islets were handpicked and rinsed in a clean HBSS solution. For cell culture, islets were dissociated with 1 mL of trypsin-EDTA (2.5X) at 37°C for 3 min. The cell suspension was centrifuged at $160 \times g$ for 5 min and washed twice in RPMI 1640 medium (Life Technologies-Thermo Fisher Scientific) supplemented with fetal bovine serum (FBS, 10%), L-glutamine (1%), and 100X Antibiotic-Antimycotic (1%). Cells were plated on glass coverslips of 4×4 mm coated with poly-L-lysine in polystyrene culture dishes and incubated for 48 h in a humidified atmosphere of 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C . Unless otherwise indicated, all reagents were obtained from Sigma-Aldrich.

Tissue preparation for immunofluorescence

Previously anesthetized control and treated rats were perfused intracardially with 200 mL 0.9%

saline phosphate buffer pH 7.4 (PBS 1X) followed by 400 mL 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The pancreas was removed and post-fixed overnight in paraformaldehyde fixative at 4°C and then dehydrated in increasing ethanol concentrations overnight and embedded in paraffin wax. The paraffin-embedded pancreas was cut into serial 5- μm thick slices, which were dewaxed and rehydrated according to standard methods. All sections were incubated in a DIVA Decloaker (BioCare Medical) for 15 min at the boiling point to retrieve antigens.

Immunofluorescence

Dual immunofluorescence was performed by the cocubation of primary insulin antibodies with either a CB1 or CB2 primary antibody, resulting in four groups. Briefly, paraffin-embedded sections and cell cultures were incubated with PBS with 10% bovine serum albumin and 0.3% Triton X100 for 60 min at 20°C . Primary antibodies were incubated overnight at 4°C as follows: CB1 rabbit polyclonal antibody 1:500 (Cayman Chemical Company, cat 10006590), CB2 rabbit polyclonal antibody 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-25494), insulin goat polyclonal antibody 1:500 (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-7839). After washing, secondary antibodies were incubated for 2 h at 20°C , AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit secondary antibody 1:1000 (Abcam, A-21206) and AlexaFluor 546 donkey anti-goat secondary antibody 1:1000 (Abcam, A-11056). Preparations were mounted with FluoroShield (Abcam, ab104139) according to the manufacturer's instructions. As negative controls, we performed immunofluorescence following the protocols mentioned above, omitting either the primary or secondary antibodies in parallel with the standard procedure.

Western blot

To assess the levels of CB1 or CB2 receptor protein expression, whole pancreatic islets were homogenized in buffer containing protease inhibitors and centrifuged at $600 \times g$ at 4°C for 10 min. The supernatant was centrifuged at $39,000 \times g$ at 4°C for 15 min. The resulting supernatant corresponded to the cytosolic protein fraction and the precipitate to the membrane protein fraction. The resuspended fractions of tissue

homogenates (30 µg protein) were mixed 1:1 with Laemmli buffer and heated (95°C, 5 min) before loading onto a 0.75-mm thick gel. The samples were electrophoresed (150 V, 2 h), and protein was transferred onto a PVDF membrane (Immobilon E, Millipore) at 150 mA for 1 h at 4°C. The membrane was stained with Ponceau's S Red and photographed (G12 camera, Canon),⁵⁰ and each lane was then cut for subsequent incubation. The membrane was washed and incubated with PBS 1X - Tween20 0.3%, 10% nonfat dry milk, and 2% goat normal serum for 30 min at 20°C, and then incubated with anti-CB1 (1:1500; Cayman Chemical Company, cat 10006590), or anti-CB2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Inc., sc-25494) overnight at 4°C. The blot was washed with PBS-Tween20, incubated for 1 h at 20°C with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (1:2000), and developed with diaminobenzidine (0.5 mg/mL in PBS plus 0.3 µL/mL 30% H₂O₂).

Image acquisition and analysis

Confocal images were taken with a Confocal Zeiss LSM800 Airyscan microscope, and Zen Blue software, Carl Zeiss Microscopy GmbH, was used. Epifluorescence images were taken with a Nikon Eclipse Ci microscope with Image-Pro Insight with an Evolution, MediaCybernetics camera. To obtain a photographic record of the western blot membrane, a Bio-Rad photodocumenter with a CCD camera was used.⁵¹ FIJI distribution of ImageJ (NIH) was used to assess all images, including the integrated density of staining, area, Ferret diameter, and corrected total fluorescence.⁵² The corrected total fluorescence (CTF) was calculated according to the following formula: CTF = Integrated Density - (Area of selected cell × Mean fluorescence of unspecific background readings).⁵³

Statistical analysis

All data sets were tested for normality with the Shapiro-Wilk test. When suitable, differences between groups were assessed through unpaired t-tests, or when normality assumption was not met Mann-Whitney U tests. For multiple t-tests, Holm-Sidak correction was performed. For comparing time-dependent variables, and when two

factors between groups were considered, two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis for repeated measurements between groups were performed. Results are presented as the mean ± SEM unless otherwise specified. The level of statistical significance was set at $p < .05$ using Prism 8.3 (GraphPad).

Abbreviations

ECS	Endocannabinoid system
HSD	High-sucrose diet
MetS	Metabolic syndrome
CB1	Cannabinoid receptor 1
CB2	Cannabinoid receptor 2
IPGTT	Intraperitoneal glucose tolerance test
ITT	Insulin tolerance test

Disclosure of potential conflict of interest

The authors declare that they have no potential conflicts of interest concerning the work described.

Acknowledgments

We thank Carolina Hernández Cruz and Luis Martínez García for their assistance in the animal care and performance of metabolic tests.

Funding

Antonio Barajas-Martínez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 596756 from CONACYT. This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT IN216119, IA210120, IN228320, and CONACyT 255635.

ORCID

Antonio Barajas-Martínez  <http://orcid.org/0000-0002-5299-0259>
 Karina Bermeo  <http://orcid.org/0000-0003-3274-1412>
 Lizbeth de la Cruz  <http://orcid.org/0000-0003-1243-2276>
 Marina Martínez-Vargas  <http://orcid.org/0000-0002-3729-2161>
 Ricardo Jesús Martínez-Tapia  <http://orcid.org/0000-0003-3460-7065>
 David Erasmo García  <http://orcid.org/0000-0002-3732-8435>
 Luz Navarro  <http://orcid.org/0000-0002-5519-0871>

References

- Maccarrone M, Bab I, Bíró T, Cabral GA, Dey SK, Di Marzo V, Konje JC, Kunos G, Mechoulam R, Pacher P, et al. Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after THC. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(5):277–296. doi:10.1016/J.TIPS.2015.02.008.
- Matias I, Di Marzo V. Endocannabinoids and the control of energy balance. *Trends Endocrinol Metab.* 2007;18(1):27–37. doi:10.1016/j.tem.2006.11.006.
- Jourdan T, Godlewski G, Kunos G. Endocannabinoid regulation of β -cell functions: implications for glycaemic control and diabetes. *Diabetes, Obes Metab.* 2016;18(6):549–557. doi:10.1111/dom.12646.
- Kim W, Doyle ME, Liu Z, Lao Q, Shin Y, Carlson OD, Kim HS, Thomas S, Napora JK, Lee EK, et al. Cannabinoids inhibit insulin receptor signaling in *Diabetes.* 2011;1(13):1–12. doi:10.2337/db10-1550.
- Ruehle S, Rey AA, Remmers F, Lutz B. The endocannabinoid system in anxiety, fear memory and habituation. *J Psychopharmacol.* 2012;26(1):23–39. doi:10.1177/0269881111408958.
- Koch M. Cannabinoid receptor signaling in central regulation of feeding behavior: a mini-review. *Front Neurosci.* 2017;11:293. doi:10.3389/fnins.2017.00293.
- Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bátkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertáler L, Wang L, et al. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1298–1305. doi:10.1172/JCI23057.
- Bermúdez-Siva FJ, Serrano A, Diaz-Molina FJ, Sánchez Vera I, Juan-Pico P, Nadal A, Fuentes E, Rodríguez De Fonseca F. Activation of cannabinoid CB1 receptors induces glucose intolerance in rats. *Eur J Pharmacol.* 2006;531(1–3):282–284. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.016.
- Schaich CL, Shaltout HA, Brosnihan KB, Howlett AC, Diz DI. Acute and chronic systemic CB1 cannabinoid receptor blockade improves blood pressure regulation and metabolic profile in hypertensive (mRen2)27 rats. *Physiol Rep.* 2014;2(8):e12108. doi:10.14814/phy2.12108.
- Alshaarawy O, Anthony JC. Cannabis smoking and diabetes mellitus: results from meta-analysis with eight independent replication samples. *Epidemiology.* 2015;26(4):597–600. doi:10.1097/EDE.0000000000000314.
- Intiaz S, Rehm J. The relationship between cannabis use and diabetes: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions III. *Drug Alcohol Rev.* 2018;37(7):897–902. doi:10.1111/dar.12867.
- Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Baixeras E, Cobo N, Bautista D, Cuesta-Muñoz AL, Fuentes E, Juan-Pico P, Castro MJ, Milman G, et al. Presence of functional cannabinoid receptors in human endocrine pancreas. *Diabetologia.* 2008;51(3):476–487. doi:10.1007/s00125-007-0890-y.
- González-Mariscal I, Montoro RA, Doyle ME, Liu Q-R, Rouse M, O'Connell JF, Santa-Cruz Calvo S, Krzysik-Walker SM, Ghosh S, Carlson OD, et al. Absence of cannabinoid 1 receptor in beta cells protects against high-fat/high-sugar diet-induced beta cell dysfunction and inflammation in murine islets. *Diabetologia.* 2018;61(6):1470–1483. doi:10.1007/s00125-018-4576-4.
- Juan-Picó P, Fuentes E, Bermúdez-Silva FJ, Javier Díaz-Molina F, Ripoll C, Rodríguez de Fonseca F, Nadal A. Cannabinoid receptors regulate Ca(2+) signals and insulin secretion in pancreatic beta-cell. *Cell Calcium.* 2006;39(2):155–162. doi:10.1016/j.ceca.2005.10.005.
- Spivak CE, Kim W, Liu QR, Lupica CR, Doyle ME. Blockade of β -cell KATP channels by the endocannabinoid, 2-arachidonoylglycerol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;423(1):13–18. doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.042.
- Vilches-Flores A, Delgado-Buenrostro NL, Navarrete-Vázquez G, Villalobos-Molina R. CB1 cannabinoid receptor expression is regulated by glucose and feeding in rat pancreatic islets. *Regul Pept.* 2010;163(1–3):81–87. doi:10.1016/j.regpep.2010.04.013.
- Flores LE, Alzugaray E, Cubilla MA, Mari P, Del ZH, Roma CL. Islet cannabinoid receptors: cellular distribution and biological function. *Pancreas.* 2013;42(7):1085–1092.
- Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WPT, Loria CM, Smith SC. Harmonizing the metabolic syndrome: A joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; National heart, lung, and blood institute; American heart association; World heart federation; International. *Circulation.* 2009;120(16):1640–1645. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.
- González-Mariscal I, Egan JM. Endocannabinoids in the Islets of Langerhans: the ugly, the bad, and the good facts. *Am J Physiol Metab.* 2018;315(2):E174–E179. doi:10.1152/ajpendo.00338.2017.
- Crespillo A, Suárez J, Bermúdez-Silva FJ, Rivera P, Vida M, Alonso M, Palomino A, Lucena MA, Serrano A, Pérez-Martín M, et al. Expression of the cannabinoid system in muscle: effects of a high-fat diet and CB1 receptor blockade. *Biochem J.* 2011;433(1):175LP–185. <http://www.biochemj.org/content/433/1/175.abstract>.
- Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, Nhieu JT-V, Belot MP, Zimmer A, Even P, et al. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One.* 2009;4(6):e5844. doi:10.1371/journal.pone.0005844.
- Starowicz KM, Cristino L, Matias I, Capasso R, Racioppi A, Izzo A, Di Marzo V. Endocannabinoid dysregulation in the pancreas and adipose tissue of mice fed with a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(3):553–565. doi:10.1038/oby.2007.106.
- De Petrocellis L, Marini P, Matias I, Moriello AS, Starowicz K, Cristino L, Nigam S, Di Marzo V. Mechanisms for the coupling of cannabinoid receptors

- to intracellular calcium mobilization in rat insulinoma beta-cells. *Exp Cell Res.* 2007;313(14):2993–3004. doi:10.1016/j.yexcr.2007.05.012.
24. Bermudez-Silva FJ, Sanchez-Vera I, Suárez J, Serrano A, Fuentes E, Juan-Pico P, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F. Role of cannabinoid CB2 receptors in glucose homeostasis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;565(1-3):207–211. doi:10.1016/j.ejphar.2007.02.066.
 25. Malenczyk K, Jazurek M, Keimpema E, Silvestri C, Janikiewicz J, Mackie K, Di Marzo V, Redowicz MJ, Harkany T, Dobrzyn A. CB1 cannabinoid receptors couple to focal adhesion kinase to control insulin release. *J Biol Chem.* 2013;288(45):32685–32699. doi:10.1074/jbc.M113.478354.
 26. Pico PJ, Pico PJ, Ropero AB, Ana B, Tuduri E, De RPicó P, Ropero A, Tuduri E, Quesada I, Fuentes E, Bermudez-Silva F, et al. Regulation of glucose - induced [Ca²⁺]_i signals by cannabinoid CB1 and CB2 receptors in pancreatic alpha - and delta - cells within intact islets of Langerhans. *Obesity Metab.* 2009;5(1):20–28.
 27. Larqué C, Velasco M, Navarro-Tableros V, Duhne M, Aguirre J, Gutiérrez-Reyes G, Moreno J, Robles-Diaz G, Hong E, Hiriart M. Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life.* 2011;63(10):831–839. doi:10.1002/iub.544.
 28. Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(5-6):231–237. doi:10.1242/dmm.001180.
 29. Malin SK, Finnegan S, Fealy CE, Filion J, Rocco MB, Kirwan JP. β -Cell dysfunction is associated with metabolic syndrome severity in adults. *Metab Syndr Relat Disord.* 2014;12(2):79–85. doi:10.1089/met.2013.0083.
 30. Medina-Gomez G, Yetukuri L, Velagapudi V, Campbell M, Blount M, Jimenez-Linan M, Ros M, Oresic M, Vidal-Puig A. Adaptation and failure of pancreatic beta cells in murine models with different degrees of metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2(11-12):582–592. doi:10.1242/dmm.003251.
 31. Gruden G, Barutta F, Kunos G, Pacher P. Role of the endocannabinoid system in diabetes and diabetic complications. *Br J Pharmacol.* 2016;173(7):1116–1127. doi:10.1111/bph.13226.
 32. Cappellano G, Uberti F, Caimmi PP, Pietronave S, Mary DASGSG, Dianzani C, Micalizzi E, Melensi M, Boldorini R, Nicosia G, et al. Different expression and function of the endocannabinoid system in human epicardial adipose tissue in relation to heart disease. *Can J Cardiol.* 2013;29(4):499–509. doi:10.1016/j.cjca.2012.06.003.
 33. Jourdan T, Szanda G, Cinar R, Godlewski G, Holovac DJ, Park JK, Nicoloro S, Shen Y, Liu J, Rosenberg AZ, et al. Developmental role of macrophage cannabinoid-1 receptor signaling in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2017;66(4):994–1007. doi:10.2337/db16-1199.
 34. Jourdan T, Godlewski G, Cinar R, Bertola A, Szanda G, Liu J, Tam J, Han T, Mukhopadhyay B, Skarulis MC, et al. Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes. *Nat Med.* 2013;19(9):1132–1140. doi:10.1038/nm.3265.
 35. Malek N, Popiolek-Barczyk K, Mika J, Przewlocka B, Starowicz K. Anandamide, acting via CB2 receptors, alleviates LPS-induced neuroinflammation in rat primary microglial cultures. *Neural Plast.* 2015;2015:130639. doi:10.1155/2015/130639.
 36. Felder CC, Joyce KE, Briley EM, Mansouri J, Mackie K, Blond O, Lai Y, Ma AL, Mitchell RL. Comparison of the pharmacology and signal transduction of the human cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Mol Pharmacol.* 1995;48:443–450.
 37. Qian W-J, Yin N, Gao F, Miao Y, Li Q, Li F, Sun X-H, Yang X-L, Wang Z. Cannabinoid CB1 and CB2 receptors differentially modulate L- and T-type Ca²⁺ channels in rat retinal ganglion cells. *Neuropharmacology.* 2017;124:143–156. doi:10.1016/J.NEUROPHARM.2017.04.027.
 38. Braun M, Ramracheya R, Bengtsson M, Zhang Q, Karanauskaite J, Partridge C, Johnson PR, Rorsman P. Voltage-Gated Ion Channels in Human Pancreatic β -Cells: electrophysiological Characterization and Role in Insulin Secretion. *Diabetes.* 2008;57(6):1618–1628. doi:10.2337/db07-0991.M.B.
 39. Li C, Jones PM, Persaud SJ. Cannabinoid receptors are coupled to stimulation of insulin secretion from mouse MIN6 beta-cells. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(2):187–196. doi:10.1159/000320527.
 40. Bermúdez-Silva FJ, Suárez Pérez J, Nadal A, Rodríguez de Fonseca F, Bermudez-Silva FJ, Suarez Perez J, Rodriguez de Fonseca F. The role of the pancreatic endocannabinoid system in glucose metabolism. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(1):87–102.
 41. Nakata M, Yada T. Cannabinoids inhibit insulin secretion and cytosolic Ca²⁺ oscillation in islet β -cells via CB1 receptors. *Regul Pept.* 2008;145(1-3):49–53. doi:10.1016/j.regpep.2007.08.009.
 42. González-Mariscal I, Krzysik-Walker SM, Kim W, Rouse M, Egan JM. Blockade of cannabinoid 1 receptor improves GLP-1R mediated insulin secretion in mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2016;423:1–10. doi:10.1016/j.mce.2015.12.015.
 43. Charan J, Kantharia N. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013;4(4):303–306. doi:10.4103/0976-500X.119726.
 44. Bermeo K. Indicadores conductuales tempranos en el desarrollo del síndrome metabólico en rata [Thesis]. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2013. <http://132.248.9.195/ptd2013/septiembre/0701079/Index.htmlTextocompleto>.
 45. Rutter K, Hennoste L, Ward LC, Cornish BH, Thomas BJ. Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats. *Lab Anim.* 1998;32(1):65–71. doi:10.1258/002367798780559356.

46. Lomba A, Milagro FI, García-Díaz DF, Marti A, Campián J, Martínez JA. Obesity induced by a pair-fed high fat sucrose diet: methylation and expression pattern of genes related to energy homeostasis. *Lipids Health Dis.* 2010;9(1):60. doi:10.1186/1476-511X-9-60.
47. Cacho J, Sevillano J, De Castro J, Herrera E, Ramos MP. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2008;295(5):5. doi:10.1152/ajpendo.90207.2008.
48. de la Cruz L, Puente EI, Reyes-Vaca A, Arenas I, Garduño J, Bravo-Martínez J, Garcia DE. PIP2 in pancreatic β -cells regulates voltage-gated calcium channels by a voltage-independent pathway. *Am J Physiol Physiol.* 2016;311(4):C630-C640. doi:10.1152/ajpcell.00111.2016.
49. Velasco M, Larqué C, Díaz-García CM, Sanchez-Soto C, Hiriart M. Rat pancreatic beta-cell culture. In: *Methods in molecular biology*. Vol. 1727. Humana Press Inc; 2018. p. 261-273. doi:10.1007/978-1-4939-7571-6_20.
50. Romero-calvo I, Ocón B, Martínez-moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-augustin O, Medina FSD. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem.* 2010;401(2):318-320. doi:10.1016/j.ab.2010.02.036.
51. Gassmann M, Rohde B. Quantifying western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis.* 2009;1845-1855. doi:10.1002/elps.200800720.
52. Arqués O, Chicote I, Tenbaum S, Puig I, Palmer G. Standardized relative quantification of immunofluorescence tissue staining. *Protoc Exch.* 2012 Apr. doi:10.1038/protex.2012.008
53. Gavet O, Pines J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev Cell.* 2010;18(4):533-543. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.013.



Motor learning impairment in rats under a high sucrose diet

Nayely Flores-Fuentes^a, Carolina Hernandez-Cruz^a, Karina Bermeo^a,
Antonio Barajas-Martinez^a, Valeria Nayely Hernandez-Serratos^a,
Erick Mauricio Aceves-Rodriguez^a, Eduardo Martinez-Alonso^a, Hector Castro^a,
Maricela Irel Martinez-Huerta^a, David Elias-Viñas^b, Jeny Salazar-Anguiano^b, Isabel Arenas^a,
David E. Garcia^{a,*}

^a Department of Physiology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), PO Box 70250, C.P. 04510 Mexico City, Mexico

^b Section of Bioelectronics, Department of Electrical Engineering, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, PO Box 14740, C.P. 07000 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Rotarod
Open field test
Elevated plus-maze
Anxiety-like behavior
TNF- α

ABSTRACT

Motor learning skills are reliable indicators of behavioral acquisition and cognitive disorders. The ease with which learning skills are measured disparities the complexity of the interpretation concerning neural plasticity. Conversely, a wealth of information regarding metabolic derangements has long been reported with direct connection to high sucrose diets. However, the impact of excessive sucrose consumption on undergoing cognitive processes has been only scarcely addressed up to now. Therefore, the goal of this work was to describe the associative relationship between high sucrose consumption and changes in motor learning skills acquisition. Motor learning impairments conditioned by central alterations are hypothesized. Rotarod, elevated plus-maze and open field trials, along with metabolic and pro-inflammatory biomarkers tests in Wistar rats under a high sucrose treatment, were performed. Motor learning impairment in high sucrose diet-treated rats was found while spontaneous locomotor activity remained unchanged. Even though, no anxiety-like behavior under high sucrose diet-treatment was observed. Consistently, the worst outcome in the glucose tolerance test was developed, the worst motor learning performance was observed. Furthermore, insulin resistance correlated positively with a pro-inflammatory state and a decreased latency to fall in the rotarod test. Indeed, C-reactive protein and tumor necrosis factor- α serum levels, along with the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), significantly increased in motor learning impairment. Together, these results support behavioral, metabolic and pro-inflammatory changes associated with deleterious changes in central nervous system likely involving crucial motor learning structures. Underlying pro-inflammatory-triggered processes may explain cognitive disorders in advanced states of metabolic derangements.

Abbreviations

AU arbitrary units
AUC area under the curve
CRP C-reactive protein
DA dopamine
ELISA enzyme-linked immunosorbent assay
EPM elevated plus-maze
HOMA-IR homeostasis model assessment of insulin resistance
HSD high sucrose diet

i.p. intraperitoneal
IPGTT intraperitoneal glucose tolerance test
OFT open field test
SB striatum body
TNF- α tumor necrosis factor- α

1. Introduction

High sucrose intake of highly palatable foodstuff has led to metabolic derangements worldwide. Overweighing and obesity are not necessarily

* Corresponding author. Department of Physiology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), PO Box 70250, C.P. 04510 Mexico City, Mexico.

E-mail address: erasmo@unam.mx (D.E. Garcia).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113384>

Received 21 December 2020; Received in revised form 13 February 2021; Accepted 3 March 2021

Available online 5 March 2021

0031-9384/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

associated with excessive sucrose intake. However, it does correlate positively with an altered metabolic status. Furthermore, sugar consumption has been compared to an addiction resulting from recreational drugs [1]. It has been suggested that spontaneous substitution of a standard diet by sucrose solutions can take place in rodent models [1]. Therefore, rat models have been successfully used to investigate metabolic derangements leading to metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus [2].

An increased number of studies have been dedicated to elucidating the mechanisms involved in the altered metabolism caused by prolonged exposure to a high sucrose diet (HSD) [1–4]. However, quite a few of them have undertaken to explore changes in acquired behaviors and motor learning skills [5]. Indeed, cognitive comorbidities linked to a high carbohydrate consumption remain unexplored to date.

Compelling evidence comes from the Ahmed's group [1]. They used proteomic methods to document down regulation of proteins in striatum body (SB) resulting from long-term excessive sucrose intake in Wistar rats. Accordingly, concentration of dopamine (DA) levels was lower in the sucrose group supporting neuroadaptations occurring in the SB [1]. Cumulative evidence suggests that basal ganglia are centrally involved learning processes leading to habit formation or acquisition of skilled behavior [6–12].

Another piece of evidence concerning neuroadaptations occurring in the SB of the rat, arises from the Ogura's group [13]. Interestingly, by assessing a rotarod task, they studied the acquisition of skilled behaviors based on SB function. They proposed the nigrostriatal DA system playing a critical role in motor control and the acquisition of habits and skills. Suitably, their results strongly support the rotarod test as a valuable method to assess acquired behaviors by measuring motor learning skills. Thus, rotarod has been used efficiently to evaluate motor coordination [14–16]. Accordingly, in this study we used the rotarod test to assess motor coordination in rats under a high sucrose treatment.

Studies in rats with HSD have reported consistently an increase in plasma triglycerides levels [2,3] and changes in adipose mass. Coincidentally, they are involved in leptin release and neuronal control of food intake, as shown in previous reports by our group [17]. In addition, it has been shown changes in oral glucose tolerance test, blood pressure, cholesterol, and plasma glucose levels [18–20]. On the other hand, overweighting and obesity have been associated with a reduction in cognitive and motor functions [21], and an increased insulin resistance. However, this observation is inconsistent in all the animals tested. It poses a fundamental question on likely central changes by high sucrose consumption, even in the absence of morphometric alterations.

Furthermore, increased anxiety-like behavior has been associated with metabolic syndrome in non-stressed rats [3]. However, this altered behavior can be observed without changes in plasma corticosterone levels. Even though, obesity has been proposed to be related to emotional reactivity and cognitive dysfunction [22,23]. Although the pathophysiological mechanism triggering anxiety-like behavior remains to be elucidated, it also supports central changes. Therefore, anxiety-like behavior should be considered in this study to disclose motor learning skills acquisition [3].

Therefore, this study was performed to examine the impact of HSD on the acquisition of skilled behaviors. It can be hypothesized central neuroadaptations or deleterious effects on health caused by compulsive behavior towards highly palatable foodstuff. Even though it might be feasible with or without anxiety-like behavior as it should be expected to obey different mechanisms.

Consistently, we find motor learning impairment in the high sucrose-treated group while spontaneous locomotor activity remains unchanged. It correlates well with the worst outcome in the glucose tolerance test. In addition, insulin resistance correlates positively with a likely pro-inflammatory state and a decreased latency to fall in the rotarod test. Increasing consumption of carbohydrates along with a sedentary technology-driven lifestyle nowadays [24], even in the absence of obesity, may lead to unexplored cognitive or behavioral

undergoing changes in the CNS.

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental protocols

Male Wistar rats weighing 200–250 g (8 weeks old) were obtained from the animal breeding facility of the School of Medicine at Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and housed two per cage at 22 ± 2°C, under a 12 h light/dark cycle. All animals were handled according to the guidelines and requirements of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (8th edition), and the Mexican Official Norm for Use, Care and Reproduction of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Experimental protocols were reviewed and approved (identification code: 080/2011) by the Committee of Research and Ethics of the School of Medicine, UNAM.

After an acclimation period of one week, rats were randomly assigned to HSD group for 20 weeks (HSD20) or HSD group for 40 weeks (HSD40). Accordingly, for control groups (Control20 and Control40, respectively). Control20 and Control40 received tap water *ad libitum* while HSD groups received 20% w/v sucrose (Great Value refined sugar, USA) in the drinking water *ad libitum* [2,25]. This sucrose concentration better resembles human soft-drinks and encourages the ingestion of solution [2,26]. All rat groups were fed with standard chow pellet (Purina Rodent Laboratory Chow 5001, Québec, Canada; 28.507% protein, 13.496% fat, 57.996% carbohydrates of calories provided) *ad libitum* (except during fasting periods). Food and water consumption were quantified per cage three times a week; average per week is reported. Body weight was recorded at the beginning of the study and once a week until the end of each feeding period. After 20 weeks of HSD treatment a pre-diabetic state can be reached [25], however, the peak of weight gain cannot be reached until 40 weeks [27]. The number of animals per group in each evaluation is provided in each figure caption.

2.2. Behavioral tasks

Behavioral tasks were performed in an experimental room at the end of the treatment (HSD20 and HSD40 and Controls, respectively). The elevated plus-maze (EPM) and the open field test (OFT) were recorded by a video camera (Microsoft Life Cam HD-6000, Washington, USA). Video recordings were analyzed by two observers previously trained, unaware of the rat treatment group. Concordance correlation coefficient was performed to confirm the consistency of the observations [28].

2.2.1. Rotarod test

Motor learning was evaluated by the rotarod test. We used two equipment, the rotarod OMNIALVA (Mexico City, Mexico) with the rod elevated 25 cm from the floor, and the rotarod Panlab Harvard Apparatus (Barcelona, Spain) with the rod elevated 47 cm from the floor. After an acclimation session, five sessions were performed in five consecutive days. Each session consisted of five trials with an inter-trial interval of 15 min. Rats were placed on the rotating rod at an acceleration from 4 rpm to 40 rpm in 300 s period for each trial. Trials did not end until the rat fell from the rod or remained on the rod for 300 s. This time was recorded as the latency for each trial [13,29].

2.2.2. Open field test

The OFT was used for measuring the locomotor activity and anxiety-like behavior. The apparatus consists of a square field (76 cm × 76 cm) with walls (35.5 cm). It was divided into 16 square sections (18 cm × 18 cm); four squares comprised the central area and 12 squares the perimeter. The OFT was made of PVC plastic and illuminated overhead with a 40-W red light. The rat was placed in the center of the field and allowed to explore for 10 min or 15 min. Total distance and movement time were employed to determine locomotor activity. The number of

entries and time spent in the peripheral and in the central area were quantified as markers for anxiety-like behavior [3,13,30,31].

2.2.3. Elevated plus-maze

The EPM was used to assess anxiety-like behavior. The maze consists of a plus-shaped platform 50 cm above the floor with two open (40 cm × 10 cm, with an edge of 0.5 cm height) and two closed (40 cm × 10 cm × 40 cm height) arms. They are connected by a central square (10 cm × 10 cm). The EPM is made of dark PVC plastic and is illuminated overhead with a 40-W red light. The rat was placed in the central square facing towards an open arm and allowed to explore the EPM for 5 min. Animals that fell from the maze were immediately returned to the central square. Number of entries and time spent in the central square, open and closed arms, as well as the number of grooming and freezing behavior were measured [3,13,30,31].

2.3. Metabolic measurements

2.3.1. Body fat

Bioimpedance was performed in fasted (12 h) and anesthetized rats (45 mg/kg, intraperitoneal (i.p.) sodium pentobarbital). Multiple frequency bioelectrical impedance analysis measures the impedance of the body to the flow of an electrical current at low and high frequencies to estimate four compartments: fat free mass, body fat, total body water, and extracellular water [32]. Two pairs of electrodes were inserted subcutaneously into the subdermal tissue, placed along the longitudinal axis of the rat, behind the neck and at the base of the tail. Stimulating electrodes employed a current of 800 μ A with a frequency range of 5 to 50 kHz, and two measurement electrodes were placed in opposition. Impedance was measured to estimate the body fat mass of the rat following equations previously reported in the literature [33].

2.3.2. Blood triglycerides and glucose quantification

Serum triglycerides and glucose levels after fasting (12 h) and under anesthesia were measured (see above). A colorimetric assay reading device was used for both measurements (Accutrend Plus GCT, Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions.

2.3.3. Intraperitoneal glucose tolerance test

An intraperitoneal glucose bolus (2 g/kg, i.p.) after 12 h fasting was administered. Serum glucose levels were measured in blood from the dorsal vein of the tail at 0 min (before de bolus), and at 10, 20, 30, 60, and 120 min. If blood glucose failed to achieve an increase of 85% above basal levels in the 20 min, measurements were discarded due to incorrect administration.

2.3.4. Enzyme-linked immunosorbent assay

At the end of the treatment period, rats were fasted (12 h) and euthanized with an overdose of i.p. sodium pentobarbital. Blood samples from the superior vena cava were collected in test tubes with heparin for plasma determinations or with spray-coated silica for serum determinations (BD Vacutainer, Ontario, Canada). Serum levels of C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and plasma levels of insulin were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (ALPCO, Salem, New Hampshire, USA, 41-CRPRT-E01, 61-TNART-E01 and 80-INSRTU-E01, respectively).

2.3.5. Homeostasis model assessment of insulin resistance

Insulin sensitivity of individual animals was evaluated using the homeostasis model assessment of insulin resistance. Plasma insulin levels were converted from ng/mL to μ IU/mL following ELISA kit manufacturer's conversion factor: 1 ng/mL = 24.8 μ IU/mL. An adequate formula specific and validated for Wistar rats was employed: HOMA-IR = fasting plasma glucose (mg/dL) × fasting plasma insulin (μ IU/mL)/2.430 [34].

2.4. Statistical analysis

Rotarod data were normalized to eliminate differences between different rotarod apparatus. A normalization procedure was performed for each rotarod machine, the data set of all trials performed by all rats were pooled. The lowest value was normalized to 0 and the mean of the pool was set to 1. Thus, a value above 1 indicates a latency greater than the pool average for each rotarod. The fitting curve of rotarod execution was modeled using an exponential function (Eq. 1: $y = p - e^{-kx}$), where p is plateau speed (p), a is the x -coordinate of highest curvature, and k is the steepness of the curve [35]. Groups were analyzed by D'Agostino-Pearson test to evaluate the normal distribution and by ROUT to identify outliers, $Q=5\%$. Groups with a normal distribution were analyzed by one-way ANOVA with Sidak or Tukey *post hoc* test; in the case of non-normal distribution, Kruskal-Wallis test with Dunn *post hoc* test was applied. For the body weight evolution, intake curves and IPGTT curve, two-way ANOVA were performed to examine time and diet effect, followed by Sidak or Tukey *post hoc* test. For OFT, data were transformed into percentages to eliminate interindividual variations due to different protocols. Pearson correlation test was performed for correlations between HOMA-IR index with CRP, and latency to fall. One-way ANOVA with multiple comparisons and uncorrected Fisher's LSD test was done for serum levels of CRP and TNF- α . GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) was used for the statistical analysis, and Igor Pro-version 6.1.2.1 (WaveMetrics, Portland, Oregon, USA) was used for the fitting curve. Data are presented as mean \pm SEM. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Motor learning impairment in high sucrose diet

Firstly, the impact of HSD in the acquisition of motor learning skills was assessed. To do so, latency to fall at the rotarod test was examined in rats under HSD. Mean latency for each trial was normalized daily over the five training days. Thereafter, experimental data were fitted to Eq.

(1). Both HSD groups exhibited a poor acquisition of the task while control groups showed an improvement in the rotarod performance over successive trials. All groups displayed a continuous increase in the walking time over the training sessions. However, HSD20 exhibited a slowed acquisition of the motor skills, revealed by fitting Eq. (1) to experimental data ($p = 0.9803$ and 2.5757 , $a = 0.42641$ and 0.56554 , $k = -1.1371$ and -0.9897 , for HSD and control, respectively in all cases). These results suggested a motor learning impairment at 20 weeks of treatment, as shown in red (Fig. 1A) for HSD20 compared to Control20 in black. Even though, a delayed learning acquisition was found in HSD40, as shown in Fig. 1A. This result was also confirmed by fitting Eq. (1) ($p = 0.21423$ and 1.1172 , $a = 0.5935$ and 0.40648 , $k = -0.9496$ and -1.0839 , for HSD and control, respectively in all cases). Best fitting is shown in Fig. 1A, green for HSD40 and blue for Control40 group. Together, these results support an impairment for motor learning at 20 and 40 week of HSD treatment.

The first day of training is critical for motor learning acquisition as it is the day with the major changes observed [35,36]. Therefore, Eq. (1) was fitted to the normalized mean of the first day of training. Thus, results revealed a poor acquisition of the task in the HSD groups. Consistently, HSD20 showed a decreased walking time at the rotarod test during the first day of training ($p = 0.637$ and 2.14 , $a = 0.18$ and 0.89 , $k = 0.020$ and 0.099 , for HSD20 and Control20, respectively). Furthermore, HSD40 showed an impairment in the acquisition of the task, confirmed by Eq. (1) ($p = 0.44$ and 0.73 , $a = 0.15$ and 0.56 , $k = -0.077$ and -0.062 , for HSD and control, respectively). The best fitting for every group at 20 and 40 weeks is presented in Fig. 1B. Therefore, a slowed motor skills acquisition revealed an impairment in motor learning behavior, induced by HSD at 20 and 40 weeks of treatment.

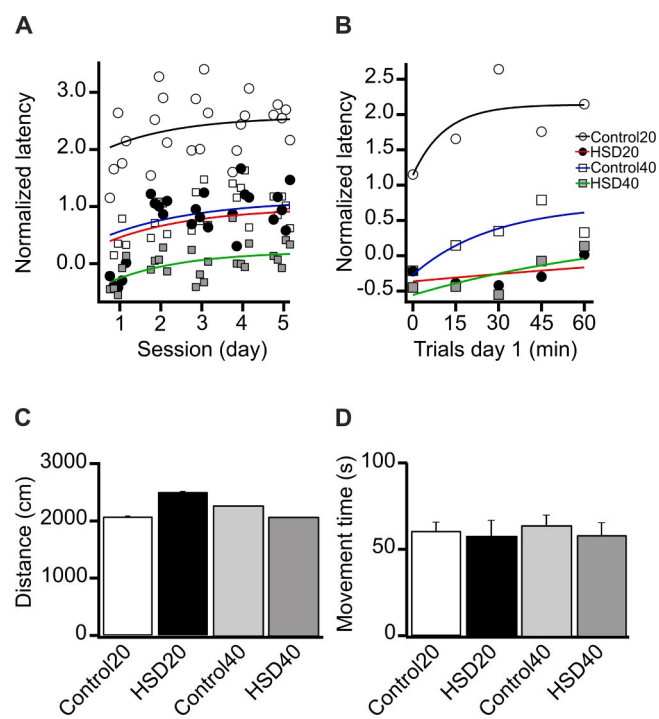


Fig. 1. Motor learning in rats under a high sucrose diet. Motor learning acquisition was examined through rotarod test and spontaneous motor activity was recorded in the OFT. (A) Normalized latency to fall of rotarod execution through five sessions. (B) Normalized latency to fall of rotarod execution through five trials of the first session. Curves in (A) and (B) represent the fitting curve for Control20 (black), HSD20 (red), Control40 (blue), and HSD40 (green) groups. Assessment of locomotor activity through (C) distance travelled and (D) movement time of the OFT. No statistical differences in spontaneous motor activity amongst all the groups was established. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks; OFT, open field test. Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 11$ (one outlier was removed in movement time), Control40 $n = 17$, HSD40 $n = 11$. Data are presented as mean \pm SEM.

To investigate whether motor functions other than the skill acquisition behavior due to peripheral damage were impaired, rats were challenged in the OFT. In order to discard changes in spontaneous motor activity the traveled distance was measured. Mean of this behavior was similar in HSD20 and HSD40 compared to Controls, as shown in Fig. 1C. Distance in HSD20 was 2505 ± 216.7 cm, while for control group 2076 ± 89.49 cm. For HSD40, distance results were 2089 ± 168.7 cm, while control 2423 ± 168.7 cm. No statistical differences were found ($H_3 = 2.55$, $p = 0.46$). Movement over time is also associated with spontaneous motor activity. HSD20 obtained 57.75 ± 9.01 s, while the control group 60.65 ± 5.1 s. For HSD40, this indicator also was quantified and obtained a similar time (58.05 ± 7.42 s and 67.88 ± 6.7 s, for HSD40 and Control40, respectively). Thus, the movement over time showed similar values for all groups with no statistical differences ($F_{3,44} = 0.50$, $p = 0.68$) as shown in Fig. 1D. Taken together, these results discard differences in the rotarod test associated with an inability to move.

3.2. Anxiety-like behavior in high sucrose diet

It has been proposed that anxiety-like behavior is related to the consumption of HSD, therefore anxiety-like behavior was evaluated in all the groups. Groups were challenged in the EPM and measurements were complemented with OFT. Firstly, the time in the open arms of EPM was quantified. Rats spent 43.41 ± 12.75 s for HSD20 compared to 44.05 ± 13.99 s for Control20. Likewise, HSD40 exhibited 56.86 ± 13.56 s compared to 52.62 ± 13 s for Control40. No statistical differences were found ($F_{3,45} = 0.20$, $p = 0.88$), as shown in Fig. 2A. As

another indicator of anxiety, time in closed arms also was measured in EPM and no changes were observed (Fig. 2B). HSD20 stayed 172 ± 22.7 s, Control20 192.6 ± 19.92 s. For HSD40, it obtained 176 ± 19.11 s while 190.5 ± 17.46 s for Control40, with no statistical differences ($F_{3,45} = 0.26$, $p = 0.85$). As additional criteria to measure anxiety, ethological observations were quantified. HSD groups showed differences in ethological markers in closed arms entries in EPM at 20 and 40 weeks ($F_{3,45} = 3.70$, $p = 0.018$), as shown in Table 1. Then, the time in the central area of EPM was also measured. HSD20 spent 84.23 ± 16.01 s, while control group 63.35 ± 12.05 s. HSD40 spent 67.05 ± 9.85 s while Control40 56.32 ± 8.32 s, with no statistical differences ($F_{3,45} = 1.12$, $p = 0.34$), as shown in Fig. 2C. Together, by using the EPM, no significant differences are established at 20 and 40 weeks of HSD treatment compared to Controls, respectively. However, statistical differences can be observed between HSD groups.

Moreover, measurements for anxiety-like behavior from OFT were obtained. Time in the central and peripheral areas was measured as an anxiety-like indicator. The fraction of time in the central area for HSD20 was $7.14 \pm 1.2\%$ and $6.66 \pm 1.49\%$ for Control20. For HSD40 the fraction was $2.55 \pm 0.49\%$, while for Control40 $4.07 \pm 0.63\%$. HSD groups at 20 and 40 weeks showed statistical differences in the time spent in the central area ($H_3 = 10.93$, $p = 0.012$), as shown in Fig. 2D. Fraction spent in the peripheral area at 20 weeks was $92.85 \pm 1.20\%$ for HSD20 while $93.33 \pm 1.49\%$ for Control20. HSD40 achieved $97.46 \pm 0.49\%$ while $95.93 \pm 0.62\%$ for Control40. Statistical differences between HSD groups only in both times of treatment ($H_3 = 10.97$, $p = 0.012$) were obtained. However, these measurements did not show significant differences compared to their control groups in the same period of treatment, as shown in Fig. 2E. Finally, we quantified central ($F_{3,44} = 3.83$, $p = 0.015$) and peripheral area entries ($F_{3,44} = 3.87$, $p = 0.015$). No statistical differences in HSD treated groups at 20 and 40 weeks were observed compared to their Controls, as shown in Table 1. Again, statistical differences can be observed only between HSD groups. Conclusively, these results do not support anxiety-like behavior in HSD groups. Therefore, whatever this process turns out to be it is not influencing the previous results obtained by the motor learning trials.

3.3. Motor learning impairment is associated with metabolic dysregulation

To determine whether diet influences the morphometric and body composition of the animals, the weight and body fat were evaluated. No influence of diet was found in body weight in the HSD20 ($F_{1,19} = 1.60$, $p = 0.22$), however, there was a significant effect of time in this parameter ($F_{20,380} = 277.6$, $p < 0.0001$). Likewise, no statistical differences were found in body weight evolution between groups at 40 weeks ($F_{1,26} = 0.59$, $p = 0.45$), but a significant effect of time was found ($F_{40,984} = 439$, $p < 0.001$). Body weights throughout the experiment are shown in Fig. 3A. Conversely, body fat percentage significantly increased due to diet and age ($F_{3,46} = 5.95$, $p = 0.001$; Fig. 3B). We observed a significant difference in body fat percentage in the HSD20 (HSD $49 \pm 1\%$, control $45 \pm 1\%$). Nevertheless, this difference disappeared with age due to an increase in body fat percentage in the control group by week 40 (HSD40 $50 \pm 0.5\%$, Control40 $49 \pm 0.5\%$). Regarding food and water intake, we observed a significant increase in water consumption in HSD20 ($F_{1,19} = 39.77$, $p < 0.0001$; Fig. 3C). In the same way, the HSD40 consumed significantly more water than Control40 throughout 40 weeks of treatment ($F_{1,26} = 111$, $p < 0.001$; Fig. 3D). In contrast, the HSD20 exhibited less food intake compared to Control20 along the 20 weeks of treatment ($F_{1,19} = 509$, $p < 0.0001$; Fig. 3E). The same pattern was observed between HSD40 and Control40 over 40 weeks ($F_{1,26} = 683$, $p < 0.001$; Fig. 3F).

In order to evaluate whether metabolic dysregulation is present in the groups with motor learning impairment, metabolic biomarkers were assessed: fasting serum triglycerides, basal serum insulin and IPGTT (Fig. 4). Diet resulted in significant differences of triglyceride levels

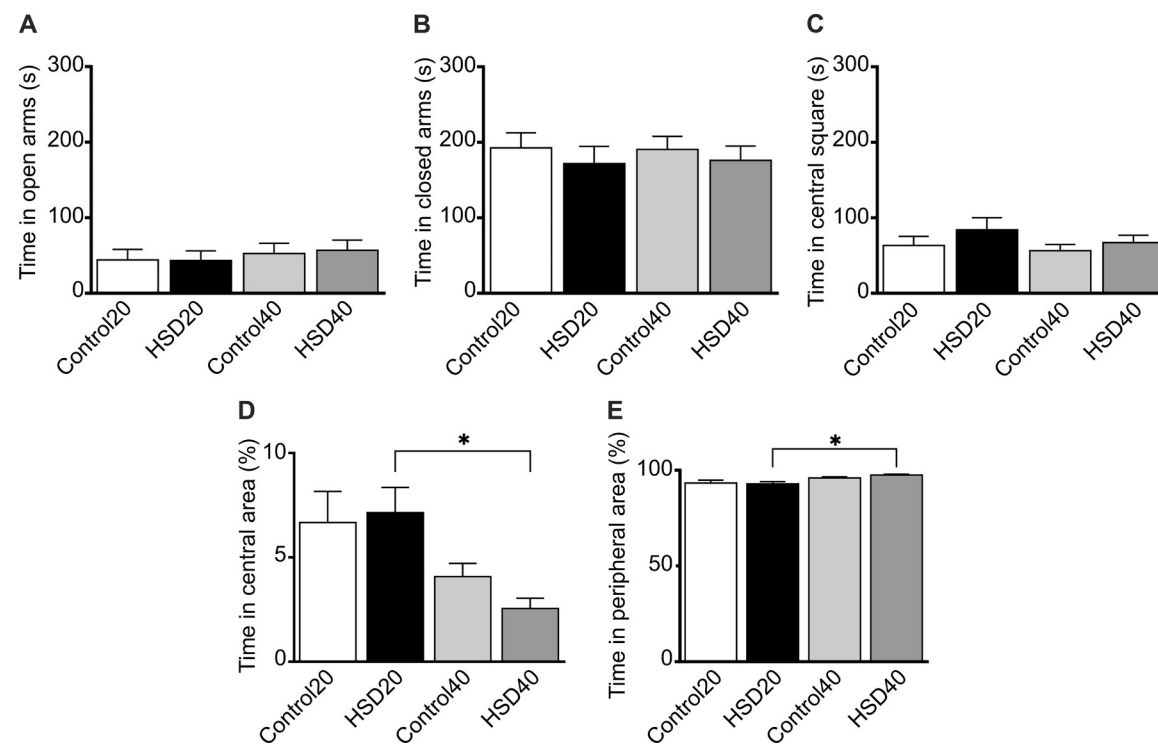


Fig. 2. Anxiety-like behavior in rats under a high sucrose diet. Anxiety-like behavior was examined through the EPM and the OFT. (A) Time spent in open arms, (B) closed arms and (C) central square of the EPM. Percentage of time spent in (D) central area and (E) peripheral area of the OFT. Statistical differences were found in (D) and (E) between HSD20 and HSD40 groups. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks; EPM, elevated plus-maze; OFT, open field test. Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 11$, Control40 $n = 17$, HSD40 $n = 11$. Data are presented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$ versus HSD20.

Table 1

Ethological markers of anxiety-like behavior in rats under a high sucrose diet at 20 and 40 weeks.

Ethological markers	Groups	Control20	HSD20	Control40	HSD40
Elevated plus-maze					
Open arms entries		3.10 \pm 0.92	4.31 \pm 1.17	3.88 \pm 0.94	4.36 \pm 0.90
Closed arms entries		8.95 \pm 0.86	12.05 \pm 1.22	8.79 \pm 0.70	7.90 \pm 0.82
Grooming		1.80 \pm 0.57	1.77 \pm 0.56	2.38 \pm 0.61	2.77 \pm 0.58
Freezing		0.15 \pm 0.10	0.04 \pm 0.04	0.58 \pm 0.19	0.45 \pm 0.28
Open field test					
Central area entries		7.20 \pm 0.10	8.59 \pm 1.50	6.17 \pm 0.97	3.10 \pm 0.56
Peripheral area entries		8.20 \pm 1.10	9.45 \pm 1.44	7.11 \pm 0.95	4.10 \pm 0.56

Data are presented as mean \pm SEM of frequency for each marker. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks. Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 11$, Control40 $n = 17$, HSD40 $n = 11$ (one outlier was removed in central and peripheral area entries).

* $p \leq 0.05$ versus HSD20.

($F_{3,54} = 23.71$, $p < 0.0001$; Fig. 4A). Both HSD groups developed high serum triglycerides levels at week 20 (HSD20 316 ± 32.84 mg/dL, Control20 147.3 ± 14 mg/dL) and at week 40 (HSD40 222.1 ± 15 mg/dL, Control40 152.9 ± 4 mg/dL). While control triglyceride levels did not change with age, there was a tendency to reduce the hypertriglyceridemic levels in HSD40 compared to HSD20. A difference between groups was found in insulin serum levels ($F_{3,37} = 8.06$, $p = 0.04$; Fig. 4B). Furthermore, serum insulin levels echoed the pattern shown by

triglycerides, with a marked tendency to increase serum insulin levels at week 20 (HSD20 5.3 ± 1.8 ng/mL, Control20 2.7 ± 0.5 ng/mL), reaching significant difference at week 40 (HSD40 4.5 ± 0.7 ng/mL, Control40 2 ± 0.5 ng/mL). The physiological challenge of the i.p. glucose administration elicited similar behaviors of capillary glucose elevation in both groups at week 20. However, in HSD40 a glucose peak was reached at 20 and 30 min of the test ($F_{15,215} = 2.24$, $p = 0.006$; Fig. 4C). Moreover, a significant increase of the capillary glucose levels was observed by the AUC (HSD40, $26,354 \pm 1720$ arbitrary units (AU); Control20, $19,697 \pm 938.2$ AU; Fig. 4D). In summary, we observed three patterns. Firstly, body composition differences were noticeable at week 20 which disappeared with age due to an increase in body fat percentage in Control40. Second, triglycerides and insulin were increased in treated groups at both endpoints while control groups values showed no changes attributable to aging (Fig. 4A, 4B). Finally, glucose intolerance noticeably increased only in the treated group at week 40. Overall, the most learning impairment in the HSD group at week 40 (Fig. 1A), the worst outcome in the glucose tolerance test was observed (Fig. 4C, 4D).

3.4. Pro-inflammatory biomarkers in motor learning impairment

To further investigate the possible driving factors behind motor learning impairment, insulin resistance surrogate measures (HOMA-IR) and two pro-inflammatory biomarkers (CRP and TNF- α) were assessed. Insulin resistance was increased in both HSD groups (HSD20, 2.5 ± 0.8 , Control20, 1.2 ± 0.3 ; HSD40, 2.5 ± 0.6 , Control40, 0.8 ± 0.2), although statistical significance was reached only at week 40 ($H_3 = 18.83$, $p = 0.0003$). Regardless the group to which each rat belongs, insulin resistance correlated positively with CRP serum levels, an unspecific inflammation biomarker ($r = 0.55$, $p = 0.015$, linear regression $b = 54.61$, $F_{1,17} = 7.39$, $n = 19$; $p = 0.015$; Fig. 5A). Additionally, insulin resistance correlated negatively with the latency observed in the trial 5 of the first day, the day with the higher improvement in motor skill

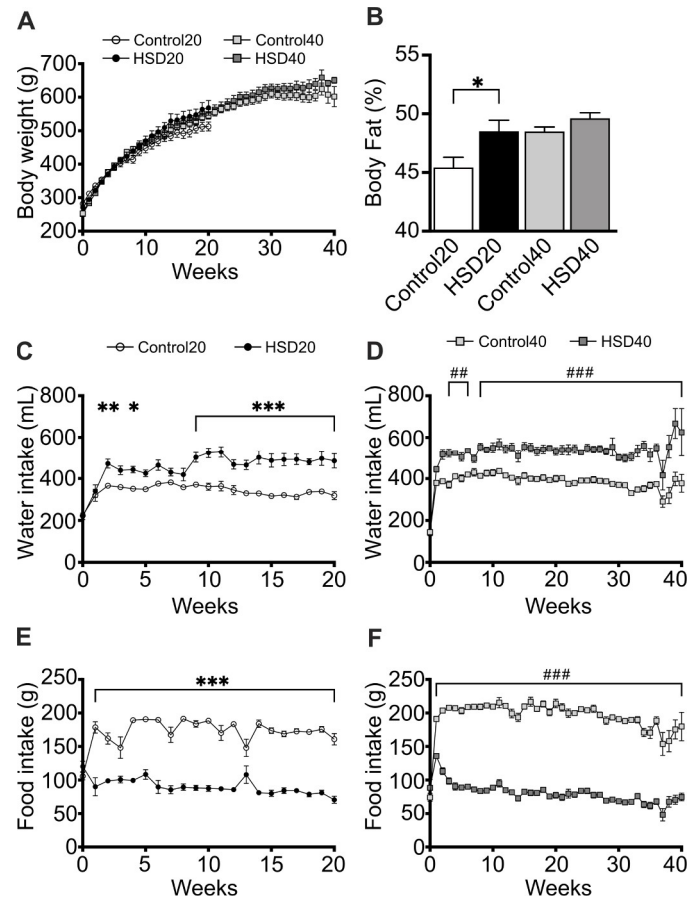


Fig. 3. Body weight, body composition and intake curves in rats under high sucrose diet. (A) Body weight evolution throughout 20 and 40 weeks of treatment, (B) body fat percentage (Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 12$, Control40 $n = 15$, HSD40 $n = 13$), (C) average of water consumption over 20 weeks of treatment, (D) average of water consumption over 40 weeks of treatment, (E) average of food intake over 20 weeks of treatment (F) average of food intake over 40 weeks of treatment. Significant increase of (B) at 20 weeks. Statistical differences were found in (C), (D), (E) and (F) between HSD and control groups at 20 and 40 weeks. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks. Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 11$, Control40 $n = 17$, HSD40 $n = 11$. Data are presented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$ versus Control20, ** $p \leq 0.01$ versus Control20, *** $p \leq 0.001$ versus Control20, ## $p \leq 0.01$ versus Control40, ### $p \leq 0.001$ versus Control40.

acquisition in the rotarod test ($r = -0.32$, $p = 0.038$, linear regression $b = -0.3366$, $F_{1,40} = 4.61$, $n = 42$; $p = 0.03$; Fig. 5B). Thus, insulin resistance was present and associated with an increase in pro-inflammatory biomarkers, such as CRP and TNF- α , and a decreased time to fall latency in the rotarod test. While CRP serum levels are increased in both HSD groups at week 20 (HSD20 1349 ± 559 ng/mL ($n = 4$), Control20 369.8 ± 122 ng/mL ($n = 3$), $F_{1,9} = 2.29$, $p = 0.04$) and week 40 (HSD40 669.7 ± 69 ng/mL ($n = 5$), Control40 464.6 ± 156 ng/mL ($n = 3$), $F_{1,9} = 2.31$, $p = 0.04$). These changes did not track well with the learning impairment (Fig. 5C). Conversely, HSD20 ($n = 5$) developed detectable serum levels of TNF- α while the Control20 did not change ($n = 4$) (Fig. 5D). Although there were no overall differences in TNF- α serum levels amongst all the groups at 20 and 40 weeks ($F_{3,13} = 2.74$, $p = 0.08$), interestingly, HSD40 revealed a significant difference at 40 weeks compared to the interpolated TNF- α serum levels at week 20 of the control group (HSD40, 22.16 ± 4.8 pg/mL ($n = 6$), Control20, 4.79 ± 3.4 pg/mL ($n = 5$); $F_{1,13} = 2.78$, $p = 0.015$; Fig. 5D). Conclusively both, TNF- α serum levels and IPGTT curve, are significantly increased in the group with the worse motor learning performance.

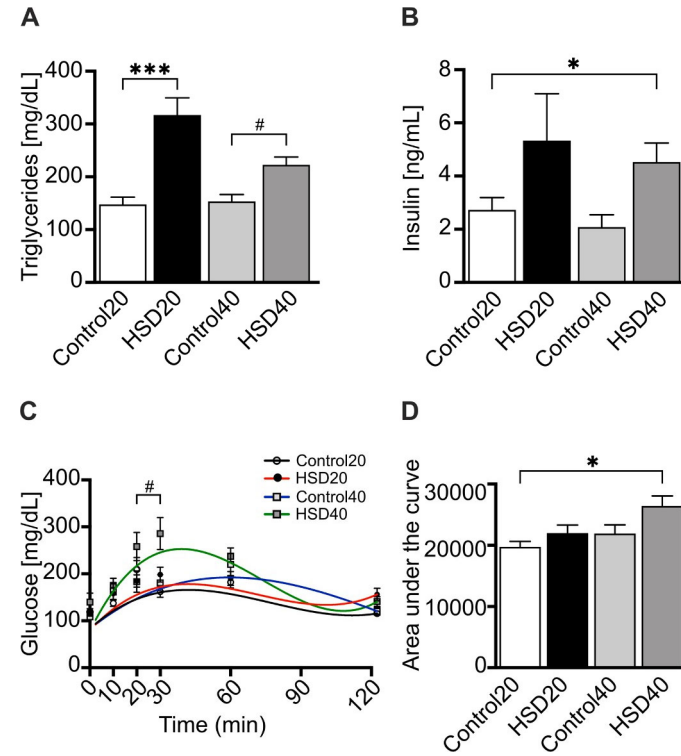


Fig. 4. Metabolic dysregulation in rats under a high sucrose diet. Metabolic changes resulting from HSD are summarized through biochemical parameters and glucose tolerance test. (A) Triglyceride levels (Control20 $n = 12$, HSD20 $n = 12$, Control40 $n = 17$, HSD40 $n = 13$), (B) insulin levels (Control20 $n = 11$, HSD20 $n = 10$, Control40 $n = 10$, HSD40 $n = 11$), (C) IPGTT time course (Control20 $n = 10$, HSD20 $n = 12$, Control40 $n = 13$, HSD40 $n = 12$). Curves in (C) represent the fitting curve for Control20 (black), HSD20 (red), Control40 (blue), and HSD40 (green) groups. Significant increase of (A) in treated group at 20 and 40 weeks was found. Significant increase in (C) in treated group at 40 weeks was found. Statistical differences were found in (B) and (D) between HSD40 and Control20 groups. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks; AUC, area under the curve; IPGTT, intraperitoneal glucose tolerance test. Data are presented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$ versus Control20, *** $p \leq 0.001$ versus Control20, # $p \leq 0.05$ versus Control40.

4. Discussion

This study examines changes in motor learning behavior induced by HSD. As it can be appreciated in Fig. 1, HSD groups performed a poor execution in the rotarod test showing a learning curve flattened and a slowed acquisition of the task. Furthermore, this motor learning impairment occurs in the absence of changes in spontaneous locomotor activity discarding factors as the total body weight (Fig. 3).

It has been shown that the overconsumption of added sugars promotes a general metabolic dysregulation with no increase in the body weight ("metabolically-obese but normal-weight") [37]. We found that insulin, glucose and triglycerides are dysregulated by HSD, as shown in Fig. 4. Taken together these metabolic disruptions are linked with an inflammatory state [38,39]. This state is associated with an increased adiposity, leading to an enhancement in plasmatic concentration of pro-inflammatory molecules, such as TNF- α [37] and CRP [40,41]. As shown in Fig. 5, CRP and TNF- α plasmatic concentrations were higher in rats under HSD. It has been shown that TNF- α can cross the blood brain barrier and impact negatively the central nervous functions [42,43]. On the other hand, it has been established a strong correlation between plasmatic and cerebrospinal fluid levels of CRP, with an impact on CNS

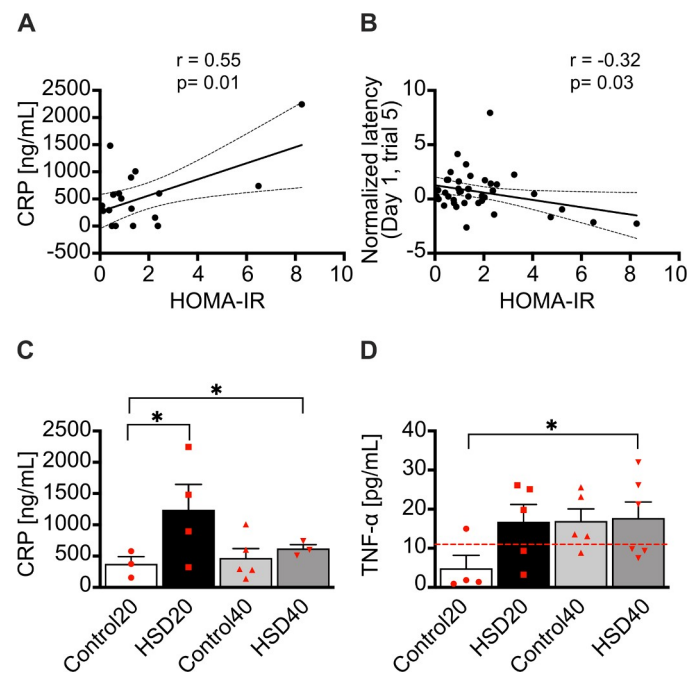


Fig. 5. Motor learning and metabolic inflammation. Insulin resistance Pearson correlation with CRP and motor learning, along with systemic pro-inflammatory biomarkers levels, CRP and TNF- α , in the groups are presented. (A) HOMA-IR and CRP levels correlation ($n = 19$), (B) normalized latency to fall (trial five of first session) of rotarod test and HOMA-IR correlation ($n = 42$), (C) CRP concentration (Control20 $n = 3$, HSD20 $n = 4$, Control40 $n = 5$, HSD40 $n = 3$) and (D) TNF- α concentration (Control20 $n = 4$, HSD20 $n = 5$, Control40 $n = 5$, HSD40 $n = 6$). Linear regression with 95% C.I. is shown for (A) and (B). Sensitivity limit for the TNF- α ELISA kit is shown as a dashed line. Statistical differences were found in (C) between HSD groups and Control20 group. Statistical differences were found in (D) between HSD40 and Control20 groups. HSD20, high sucrose diet at 20 weeks; Control20, control rats at 20 weeks; HSD40, high sucrose diet at 40 weeks; Control40, control rats at 40 weeks; CRP, C-reactive protein; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; TNF- α , tumor necrosis factor- α . Data are presented as mean \pm SEM. * $p \leq 0.05$ versus Control20.

function [44]. In this work, rats under HSD show higher levels of CRP and TNF- α correlating with the worst execution in the rotarod test. These findings can reflect a neuroinflammatory state and may explain the impairment in motor learning.

In fact, while both HSD groups displayed elevated CRP levels, a significant TNF- α increase was reached only at week 40 (Fig. 5C, 5D). Nonetheless, an increase in TNF- α above threshold detection is apparent even in the control group at week 40. Peripheral inflammation produced by diet starts in the visceral fat depots and is detectable by serum levels of CRP, TNF- α , along with various interleukins and cytokines. This process is exacerbated by aging, resulting in an additive effect on low grade chronic inflammation [45]. This convergent process has been called "obesageing" [46] and may also explain our findings.

This study shows an increase in sucrose consumption and a decrease in chow food intake over the treatment. Its results suggest a homeostatic system maintaining a similar caloric consumption despite an increase in carbohydrate intake fraction, as shown in Fig. 3. These results are in good agreement with groups showing a similar intake behavior [1, 47–49]. Moreover, the total body weight was similar in HSD and Control groups (Fig. 3A). This result may be influenced by caloric intake. Present data are in good agreement with previous papers that confirm an isocaloric diet, despite HSD exposure [50, 51], and slightly gain of weight over time in HSD groups. Despite the similar weight in both groups, we found metabolic derangements, such as an increase in triglyceride levels in HSD groups (Fig. 4A) and peripheral insulin

concentrations in HSD groups (Fig. 4B). Therefore, HSD disturbs a wide variety of metabolic markers. These findings are in good agreement with published reports [2].

Association of anxiety-like behavior to HSD is controversial in the literature. Also, it has been established a negative influence of anxiety-like behavior on learning and memory [52]. In addition to motor learning impairment, this work explored anxiety-like behavior using OFT and EPM. Our results do not show anxiety-like behaviors in rats treated with HSD (Fig. 2). Although we did not find any enhancement in anxiety-like behavior in HSD compared with control groups at 20 and 40 weeks, a reduction of time in the central area of the OFT in HSD at 40 weeks is present (Fig. 2D). Similar data were found in rats fed with 10 and 30% sucrose solution [49,53,54] and in mice after 30 days of treatment [55]. In contrast, previous reports have shown that young rats exposed to a HSD increased anxiety-like behavior in the OFT [3,51,54, 55]. Moreover, anxiety-like behavior was found only in stress BALB/c mice fed with a carbohydrate-enriched diet [56]. These discrepancies might be due to differences amongst species, the amount of sucrose consumed, the exposure time and the age of the animals at the beginning of the study.

A wide variety of pathophysiological processes triggered by increased white adipose tissue and inflammatory markers are linked to diet. Potentially they impact cognition negatively [57]. This work evaluates for the first time the effect of HSD on a motor learning task.

5. Conclusions

Together, our results show the development of motor learning impairment under HSD in association with insulin resistance and pro-inflammatory biomarkers, even though, in the absence of anxiety-like behavior. This work shows for the first time, alterations in a non-hippocampal-dependent learning type induced by HSD. Skills behavior deficit supports cognitive alterations. However, central implications should be further addressed in future investigations.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the Alexander von Humboldt Stiftung, Germany to DEG, UNAM-DGAPA-PAPIIT [grant number IN216119], and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 255635]. We thank Ing. Esteban Ruiz Hernández for electronic support. Dr. María De La Luz Navarro from the Department of Physiology, School of Medicine, UNAM, for providing one of the rotarod equipment.

References

- [1] S. Ahmed, M.A. Kashem, R. Sarker, E.U. Ahmed, G.A. Hargreaves, I.S. McGregor, Neuroadaptations in the striatal proteome of the rat following prolonged excessive sucrose intake, *Neurochem. Res.* 39 (2014) 815–824, <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1274-6>.
- [2] C. Larqué, M. Velasco, V. Navarro-Tableros, M. Duhne, J. Aguirre, G. Gutiérrez-Reyes, J. Moreno, G. Robles-Díaz, E. Hong, M. Hiriart, Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models, *IUBMB Life* 63 (2011) 831–839, <https://doi.org/10.1002/iub.544>.
- [3] D. Rebolledo-Solleiro, G. Roldán-Roldán, D. Díaz, M. Velasco, C. Larqué, G. Rico-Rosillo, G.B. Vega-Robledo, E. Zambrano, M. Hiriart, M. Pérez de la Mora,

- Increased anxiety-like behavior is associated with the metabolic syndrome in non-stressed rats, *PLoS ONE* 12 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176554> e0176554.
- [4] R. Gutierrez, E. Fonseca, S.A. Simon, *The Neuroscience of Sugars in Taste*, Gut-reward, Feeding Circuits, and Obesity, Springer International Publishing, 2020, <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03458-2>.
- [5] N. Pitsikas, M. Carli, S. Fidecka, S. Algeri, Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population, *Neurobiol. Aging* 11 (1990) 417–423, [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90008-N](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90008-N).
- [6] A.M. Graybiel, Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia, *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (1995) 733–741, [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80100-6](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80100-6).
- [7] A.M. Graybiel, The basal ganglia and chunking of action repertoires, *Neurobiol. Learn. Mem.* 70 (1998) 119–136, <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3843>.
- [8] B.J. Knowlton, J.A. Mangels, L.R. Squire, A neostriatal habit learning system in humans, *Science* 273 (1996) 1399–1402, <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.1399>, 80.
- [9] R.J. McDonald, N.M. White, A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum, *Behav. Neurosci.* 107 (1993) 3–22, <https://doi.org/10.1037//0735-7044.107.1.3>.
- [10] D.P. Salmon, N. Butters, Neurobiology of skill and habit learning, *Curr. Opin. Neurobiol.* 5 (1995) 184–190, [https://doi.org/10.1016/0959-4388\(95\)80025-5](https://doi.org/10.1016/0959-4388(95)80025-5).
- [11] N.M. White, R.J. McDonald, Multiple parallel memory systems in the brain of the rat, *Neurobiol. Learn. Mem.* 77 (2002) 125–184, <https://doi.org/10.1006/nlme.2001.4008>.
- [12] N.M. White, Mnemonic functions of the basal ganglia, *Curr. Opin. Neurobiol.* 7 (1997) 164–169, [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80004-9).
- [13] T. Ogura, M. Ogata, H. Akita, S. Jitsuki, L. Akiba, K. Noda, S. Hoka, M. Saji, Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease, *Neurosci. Res.* 51 (2005) 299–308, <https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.12.006>.
- [14] M. Jeljeli, C. Strazielle, J. Caston, R. Lalonde, Effects of electrolytic lesions of the lateral pallidum on motor coordination, spatial learning, and regional brain variations of cytochrome oxidase activity in rats, *Behav. Brain Res.* 102 (1999) 61–71, [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00162-4).
- [15] M. Jeljeli, C. Strazielle, J. Caston, R. Lalonde, Effects of centrolateral or medial thalamic lesions on motor coordination and spatial orientation in rats, *Neurosci. Res.* 38 (2000) 155–164, [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00152-8).
- [16] C.C. Joyal, C. Meyer, G. Jacquart, P. Mahler, J. Caston, R. Lalonde, Effects of midline and lateral cerebellar lesions on motor coordination and spatial orientation, *Brain Res* 739 (1996) 1–11, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)00333-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)00333-2).
- [17] K. Bermeo, H. Castro, I. Arenas, D.E. Garcia, AMPK mediates regulation of voltage-gated calcium channels by leptin in orexigenic neurons from arcuate nucleus, *Am. J. Physiol. Metab.* 319 (2020), <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2020>. E1112-E1120.
- [18] A.A. Aguilera, G. Hernández Díaz, M. Lara Barcelata, O. Angulo Guerrero, R. M. Oliart Ros, Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome, *J. Nutr. Biochem.* 15 (2004) 350–357, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.12.008>.
- [19] M. El Hafidi, A. Cuéllar, J. Ramírez, G. Baños, Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities, *J. Nutr. Biochem.* 12 (2001) 396–403, [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00154-1).
- [20] M. Oron-Herman, Y. Kamari, E. Grossman, G. Yeger, E. Peleg, Z. Shabtay, A. Shamiss, Y. Sharabi, Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models, *Am. J. Hypertens.* 21 (2008) 1018–1022, <https://doi.org/10.1038/ajh.2008.218>.
- [21] C. Wang, J.S.Y. Chan, L. Ren, J.H. Yan, Obesity reduces cognitive and motor functions across the lifespan, *Neural Plast* (2016), 2473081, <https://doi.org/10.1155/2016/2473081>, 2016.
- [22] A.-L. Dinel, C. André, A. Aubert, G. Ferreira, S. Layé, N. Castanon, Lipopolysaccharide-induced brain activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase and depressive-like behavior are impaired in a mouse model of metabolic syndrome, *Psychoneuroendocrinology* 40 (2014) 48–59, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.10.014>.
- [23] H. Francis, R. Stevenson, The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain, *Appetite* 63 (2013) 119–128, <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.12.018>.
- [24] B.A. Swinburn, G. Sacks, K.D. Hall, K. McPherson, D.T. Finegood, M.L. Moodie, S. L. Gortmaker, The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments, *Lancet* 378 (2011) 804–814, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60813-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60813-1).
- [25] C.E. van den Brom, C.A. Boly, C.S.E. Bulte, R.F.P. van den Akker, R.F. J. Kwekkeboom, S.A. Loer, C. Boer, R.A. Bouwman, Myocardial perfusion and function are distinctly altered by sevoflurane anesthesia in diet-induced prediabetic rats, *J. Diabetes Res.* (2016), 5205631, <https://doi.org/10.1155/2016/5205631>, 2016.
- [26] A.C. Spector, J.C. Smith, A detailed analysis of sucrose drinking in the rat, *Physiol. Behav.* 33 (1984) 127–136, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90023-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90023-4).
- [27] E. Rodríguez-Correa, I. González-Pérez, P.I. Clavel-Pérez, Y. Contreras-Vargas, K. Carvajal, Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr. Diabetes.* 10 (2020) 24, <https://doi.org/10.1038/s41387-020-0127-4>.
- [28] É. Cortés-Reyes, J.A. Rubio-Romero, H. Gaitán-Duarte, Statistical methods for evaluating diagnostic test agreement and reproducibility, *Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.* 61 (2010) 247–255, <https://doi.org/10.18597/rcog.271>.
- [29] H. Shiotsuki, K. Yoshimi, Y. Shimo, M. Funayama, Y. Takamatsu, K. Ikeda, R. Takahashi, S. Kitazawa, N. Hattori, A rotarod test for evaluation of motor skill learning, *J. Neurosci. Methods.* 189 (2010) 180–185, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026>.
- [30] S. Nakajima, K. Fukasawa, M. Gotoh, K. Murakami-Murofushi, H. Kunugi, Saturated fatty acid is a principal cause of anxiety-like behavior in diet-induced obese rats in relation to serum lysophosphatidyl choline level, *Int. J. Obes.* 44 (2020) 727–738, <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0468-z>.
- [31] M. Rojas-Carvajal, A. Sequeira-Cordero, J.C. Brenes, Neurobehavioral effects of restricted and unpredictable environmental enrichment in rats, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 674, <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00674>.
- [32] K. Rutter, L. Hennoste, L.C. Ward, B.H. Cornish, B.J. Thomas, Bioelectrical impedance analysis for the estimation of body composition in rats, *Lab. Anim.* 32 (1998) 65–71, <https://doi.org/10.1258/002367798780559356>.
- [33] B.H. Cornish, L.C. Ward, B.J. Thomas, Measurement of extracellular and total body water of rats using multiple frequency bioelectrical impedance analysis, *Nutr. Res.* 12 (1992) 657–666, [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(05\)80035-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(05)80035-1).
- [34] J. Cacho, J. Sevillano, J. De Castro, E. Herrera, M.P. Ramos, Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats, *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 295 (2008) 1269–1276, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90207.2008>.
- [35] M.M. Buitrago, J.B. Schulz, J. Dichgans, A.R. Luft, Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm, *Neurobiol. Learn. Mem.* 81 (2004) 211–216, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.01.001>.
- [36] H.H. Yin, S.P. Mulcare, M.R.F. Hilário, E. Clouse, T. Holloway, M.I. Davis, A. C. Hansson, D.M. Lovinger, R.M. Costa, Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill, *Nat Neurosci* 12 (2009) 333–341, <https://doi.org/10.1038/nn.2261>. Dynamic.
- [37] J.J. DiNicolantonio, V. Mehta, N. Onkaramurthy, J.H. O'Keefe, Fructose-induced inflammation and increased cortisol: a new mechanism for how sugar induces visceral adiposity, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 61 (2018) 3–9, <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2017.12.001>.
- [38] K. Luc, A. Schramm-Luc, T.J. Guzik, T.P. Mikolajczyk, Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes, *J. Physiol. Pharmacol.* 70 (2019) 809–824, <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.6.01>.
- [39] F. Jameel, M. Phang, L.G. Wood, M.L. Garg, Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation, *Lipids Health Dis* 13 (2014) 195, <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-195>.
- [40] C. Koebnick, M.H. Black, J. Wu, Y.H. Shu, A.W. Mackay, R.M. Watanabe, T. A. Buchanan, A.H. Xiang, A diet high in sugar-sweetened beverage and low in fruits and vegetables is associated with adiposity and a pro-inflammatory adipokine profile, *Br. J. Nutr.* 120 (2018) 1230–1239, <https://doi.org/10.1017/S0007114518002726>.
- [41] K.W. Della Corte, I. Ferrar, K.J. Penczynski, L. Schwingshackl, C. Herder, A. E. Buyken, Effect of dietary sugar intake on biomarkers of subclinical inflammation: a systematic review and meta-analysis of intervention studies, *Nutrients* 10 (2018) 606, <https://doi.org/10.3390/nu10050606>.
- [42] E.M. Rhea, T.S. Salameh, A.F. Logsdon, A.J. Hanson, M.A. Erickson, W.A. Banks, Blood-brain barriers in obesity, *AAPS J* 19 (2017) 921–930, <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0079-3>.
- [43] W. Pan, A.J. Kastin, TNF α transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice, *Exp. Neurol.* 174 (2002) 193–200, <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.7871>.
- [44] J.C. Felger, E. Haroon, T.A. Patel, D.R. Goldsmith, E.C. Wommack, B.J. Woolwine, N.A. Le, R. Feinberg, M.G. Tansey, A.H. Miller, What does plasma CRP tell us about peripheral and central inflammation in depression? *Mol. Psychiatry.* 25 (2020) 1301–1311, <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0096-3>.
- [45] S. Koenig, G.N. Luheshi, T. Wenz, R. Gerstberger, J. Roth, C. Rummel, Leptin is involved in age-dependent changes in response to systemic inflammation in the rat, *Brain. Behav. Immun.* 36 (2014) 128–138, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.10.019>.
- [46] S. Ghosh, J.K. Sinha, M. Raghunath, Obesity-ageing: linking obesity & ageing, *Indian J. Med. Res.* 149 (2019) 610–615, <https://doi.org/10.4103/ijmr.ijmr.2120.18>.
- [47] P. Rada, N.M. Avena, B.G. Hoebel, Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell, *Neuroscience* 134 (2005) 737–744, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.04.043>.
- [48] N.M. Avena, P. Rada, B.G. Hoebel, Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (2008) 20–39, <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.04.019>.
- [49] T.M. Hsu, V.R. Konanur, L. Taing, R. Usui, B.D. Kayser, M.I. Goran, S.E. Kanoski, Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats, *Hippocampus* 25 (2015) 227–239, <https://doi.org/10.1002/hipo.22368>.
- [50] M. Kanazawa, C.Y. Xue, H. Kageyama, E. Suzuki, R. Ito, Y. Namba, T. Osaka, S. Kimura, S. Inoue, Effects of a High-Sucrose Diet on Body Weight, Plasma Triglycerides, and Stress tolerance, in: *Nutr. Rev., International Life Sciences Institute*, 2003 <https://doi.org/10.1301/nr.2003.may.s27-s33>.
- [51] B.A.S. Pinto, T.M. Melo, K.F.T. Flister, L.M. França, D. Kajihara, L.Y. Tanaka, F.R. M. Laurindo, A.M. de A. Paes, Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats, *Metab. Brain Dis.* 31 (2016) 917–927, <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9830-1>.
- [52] F. Darcet, I. Mendez-David, L. Tritschler, A.M. Gardier, J.-P. Guilloux, D.J. David, Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/

- depression, *Front. Behav. Neurosci.* 8 (2014) 136, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00136>.
- [53] A. Ferreira, J.P. Castro, J.P. Andrade, M.D. Ulce Madeira, A. Cardoso, Cafeteria-diet effects on cognitive functions, anxiety, fear response and neurogenesis in the juvenile rat, *Neurobiol. Learn. Mem.* 155 (2018) 197–207, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.07.014>.
- [54] M.S. Kruse, M.J. Vadillo, A.M.M. Miguez Fernández, M. Rey, B.S. Zanutto, H. Coirini, Sucrose exposure in juvenile rats produces long-term changes in fear memory and anxiety-like behavior, *Psychoneuroendocrinology* 104 (2019) 300–307, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.03.016>.
- [55] D.M. Eudave, M.N. BeLow, E.I. Flandreau, Effects of high fat or high sucrose diet on behavioral-response to social defeat stress in mice, *Neurobiol. Stress.* 9 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1016/j.jynstr.2018.05.005>.
- [56] C.J. Santos, A.V.M. Ferreira, A.L. Oliveira, M.C. Oliveira, J.S. Gomes, D.C. Aguiar, Carbohydrate-enriched diet predispose to anxiety and depression-like behavior after stress in mice, *Nutr. Neurosci.* 21 (2018) 33–39, <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1213529>.
- [57] D.M. Small, Dopamine adaptations as a common pathway for neurocognitive impairment in diabetes and obesity: a neuropsychological perspective, *Front. Neurosci.* (2017) 11, <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00134>.