



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Cuantificación de las poblaciones leucocitarias en tejido  
adiposo de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes  
comerciales”**

**TESIS**

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

Presenta:

L.N. Ana Lilibeth Díaz Arizmendi

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. Irazú Contreras García

Tutor Interno: Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Tutor Externo: Dra. Martha Moreno Lafont

Toluca, Estado de México

2017

<i>RESUMEN</i> .....	4
<i>ABSTRACT</i> .....	5
1. ANTECEDENTES.....	6
1.1. EDULCORANTES.....	6
1.2. ANTECEDENTES DE LOS EDULCORANTES. ....	6
1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS EDULCORANTES. ....	6
1.3.1. Sucralosa.....	7
1.3.2. <i>Stevia rebaudiana</i> .....	8
1.3.3. Sacarosa .....	8
1.4. TEJIDO ADIPOSO. ....	9
1.4.1. Morfología y distribución del tejido adiposo blanco.....	9
1.4.2. Morfología y distribución del tejido adiposo pardo o marrón.....	10
1.4.3. El tejido adiposo como órgano endocrino .....	12
1.4.4. Porcentajes de tejido adiposo .....	13
1.5. GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	15
1.5.1. Inmunidad innata.....	15
1.5.2. Inmunidad adaptativa o adquirida.....	15
1.5.3. Células del Sistema Inmunológico.....	17
1.7. TEJIDO ADIPOSO Y EL SISTEMA INMUNOLÓGICO .....	21
1.8. EPIDEMIOLOGIA DE LA OBESIDAD .....	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS .....	27
5. JUSTIFICACIÓN .....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
6.1. DISEÑO DE ESTUDIO .....	29
6.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN .....	29
6.3. PROCEDIMIENTOS .....	29
6.4. VARIABLES DE ESTUDIO .....	31
6.5. IMPLICACIONES BIOÉTICAS.....	33
6.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	34
7.0. RESULTADOS.....	35
7.1. TÍTULO DEL ARTÍCULO ENVIADO .....	35
7.2. PÁGINA FRONTAL DEL MANUSCRITO .....	36
7.3. CARTA DE ENVÍO .....	37
7.4. RESUMEN: .....	38
7.5. INTRODUCCIÓN.....	39
7.6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	41

7.7. RESULTADOS.....	43
7.8. DISCUSIÓN .....	46
7.9. <i>CONCLUSIONES</i> .....	49
7.10. FIGURAS .....	50
7.11. REFERENCIAS .....	55
7.12. RESULTADOS ADICIONALES.....	57
8.0. CONCLUSIONES GENERALES .....	69
8.1. <i>CONCLUSIONES</i> .....	69
8.2. LIMITACIONES .....	71
8.3. RECOMENDACIONES .....	71
9.0. <i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	72
10.0. <i>ANEXOS</i> .....	78

## **Resumen**

**Introducción:** Se ha evidenciado como principales contribuyentes a la creciente epidemia de obesidad, al exceso de consumo de alimentos energéticamente densos y la reducción de la actividad física, entre las medidas de prevención y tratamiento se considera la implementación de edulcorantes no calóricos para este propósito.

**Objetivos:** Caracterizar poblaciones leucocitarias del tejido adiposo gonadal de ratones consumidores de edulcorantes comerciales, y cuantificar las poblaciones leucocitarias de: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>) y sus subpoblaciones CD4 y CD8, macrófagos (CD14<sup>+</sup>) y linfocitos B (CD19<sup>+</sup>) con marcadores de superficie MHC I, MHC II.

**Metodología:** Se trabajó con tejido adiposo de ratones BALB/c de 14 semanas de edad, machos y hembras, suplementados con edulcorantes comerciales durante 6 semanas y clasificados en grupos de 6 ratones por edulcorante (sucralosa, estevia, sacarosa y control, por sexo). Se obtuvo el tejido adiposo gonadal y se cuantificaron las diferentes poblaciones celulares y los marcadores de superficie MHC-I y MHC-II empleando la técnica de citometría de flujo.

**Resultados:** El aumento de peso en los grupos de tratamiento fue significativamente mayor que el grupo control, el consumo de edulcorantes fue mayor en el grupo sacarosa hembras (40 mL/semana) y machos (47.3 mL/semana), mientras que el consumo de alimento fue mayor en el grupo sucralosa hembras (27.4 g/semana) y machos (32.1g/semana). Se manifestó un incremento en la frecuencia de células CD45<sup>+</sup> en hembras con sucralosa (66.1 ± 3.4%), estevia (63.8 ± 5.0%) y sacarosa (67.7 ± 4.9%) en contraste con ratones macho las diferencias se encontraron en sacarosa (68.4 ± 6.0%) y estevia (67.1 ± 3.4%). Para el marcador CD14<sup>+</sup> los datos muestran que los grupos de hembras con sacarosa (21.3 ± 4.3%) y sucralosa (22.2 ± 3.3%) presentan una frecuencia mayor de células, los ratones machos muestran diferencias en el grupo sacarosa (19.6 ± 1.4%). El análisis de la frecuencia de células CD19<sup>+</sup> en hembras muestra diferencias en sucralosa (69.4 ± 5.7%), los resultados en ratones macho mostraron diferencia en los grupos sacarosa (38.1 ± 2.6%) y estevia (36.8 ± 4.1%).

**Conclusiones:** El consumo crónico de edulcorantes artificiales puede tener efectos en las modificaciones de las poblaciones de leucocitos totales, macrófagos y linfocitos B en el tejido adiposo.

**Palabras clave:** edulcorantes comerciales, tejido adiposo, poblaciones leucocitarias.

## ***Abstract***

**Introduction:** The main contributors to the growing obesity epidemic are considerate the excess consumption of energy-dense foods and the reduction of physical activity; among the prevention and treatment measures for this is the use of non-caloric sweeteners.

**Objectives:** To characterize leukocyte populations in gonadal adipose tissue from commercial sweetener consuming mice and to quantify leukocyte populations of: CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, macrophages CD14<sup>+</sup> and B-lymphocytes CD19<sup>+</sup> with MHC-I and MHC II surface markers.

**Methods:** 14-week-old BALB/c mice, male and female were supplemented with commercial sweeteners for 6 weeks, and classified in groups of 6 mice (sucralose, stevia, sucrose and control, by sex). Gonadal adipose tissue was subsequently obtained to isolate leukocytes and identify populations using flow cytometry.

**Results:** The weight gain in the treatment groups is significantly higher than in the control group, the sweetener intake is higher in the sucrose group females (40 mL / week) and males (47.3 mL / week); food consumption is higher in sucralose females (27.4g / week) and males (32.1g / week). An increase in the frequency of CD45<sup>+</sup> cells in sucralose (66.1 ± 3.4%), stevia (63.8 ± 5.0%) and sucrose (67.7 ± 4.9%) was found, in contrast, male mice showed differences in sucrose (68.4 ± 6.0 %) and stevia (67.1 ± 3.4%). For the CD14<sup>+</sup> marker, the data show that female groups of sucrose (21.3 ± 4.3%) and sucralose (22.2 ± 3.3%) presented a higher frequency of CD14<sup>+</sup> cells, male mice show differences in the sucrose group (19.6 ± 1.4%). The analysis of the frequency of CD19<sup>+</sup> cells in females shows differences in sucralose (69.4 ± 5.7%), on the other hand, results in male mice showed difference in the sucrose (38.1 ± 2.6%) and stevia (36.8 ± 4.1%) groups.

**Conclusions:** Chronic consumption of artificial sweeteners may have effects on the changes in total leukocyte, macrophages and B lymphocyte populations in adipose tissue.

**Key words:** commercial sweeteners, adipose tissue, leukocyte populations.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Edulcorantes

Hace referencia a aquel aditivo que es capaz de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que habitualmente aporta menor cantidad de energía<sup>1</sup>.

### 1.2. Antecedentes de los edulcorantes.

El empleo de edulcorantes no calóricos como sustitutos del contenido en azúcares de comidas y bebidas ha tenido su máxima expresión en los últimos 35 años<sup>2</sup>. Mientras que las empresas de la industria alimentaria buscan producir y comercializar con éxito los productos que tienen un alto contenido de azúcar y grasa, ahora existe una tendencia a la elaboración de productos alimenticios que son más saludables y que pueden conferir beneficios específicos a la salud. En los últimos años, un gran número de alimentos y bebidas han incluido una variedad de edulcorantes comerciales, como el aspartamo, glucósidos de esteviol, y sucralosa. Estas sustancias se consideran, en general, seguras y no tóxicas, a pesar de la falta evidencia contundente acerca de las propiedades de edulcorantes antes mencionados<sup>3</sup>.

### 1.3. Clasificación de los edulcorantes.

De acuerdo a su clasificación, los edulcorantes se pueden agrupar en función de su contenido calórico (calórico o no calórico), según su origen (natural o artificial) o incluso de acuerdo a su estructura química. El origen natural del edulcorante no implica una mayor seguridad o validez y en este sentido, existe poca información por parte del consumidor al respecto. Contamos con multitud de sustancias con poder edulcorante, la clasificación de los principales edulcorantes se presenta en la tabla 1.

Calóricos	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructuosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco y jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritriol, maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol
No-calóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo han guo, estevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeina
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo.

Fuente (García)<sup>2</sup>.

### 1.3.1. Sucralosa

La sucralosa se produce a partir de sacarosa, por un proceso que sustituye 3 átomos de cloro por 3 grupos hidroxilo de la molécula de sacarosa. Pese a que la sucralosa se obtiene del azúcar, el cuerpo humano no lo reconoce como un azúcar y no lo metaboliza; por lo tanto, no proporciona calorías. Es aproximadamente 600 veces más dulce que el azúcar y es estable al calor durante la cocción. Puede ser utilizado en una amplia variedad de alimentos y bebidas. La sucralosa ha aumentado su consumo por poseer las siguientes características: no calórica, insípida, estable a altas temperaturas y en medio ácido, no se hidroliza ni siquiera durante la digestión o el metabolismo en virtud de la extrema estabilidad de sus enlaces cloro-carbono, y es hidrofílica, con un 25% solubilidad; presenta la característica importante de no interactuar químicamente con otros alimentos; es estable en presencia de etanol y que se pueden almacenar durante más de un año mientras se mantiene 99% de su sabor original<sup>4</sup>.

Sin embargo, estudios en modelos animales han demostrado que la ingestión de sucralosa aumenta la expresión del transportador de flujo de P-glicoproteína (P-gp) y citocromo P-450 (CYP), que son componentes clave del sistema de desintoxicación pre-sistémico involucrado en el metabolismo de fármacos de primer paso. En ratas, la sucralosa altera la composición microbiana en el tracto gastrointestinal, con reducción de las bacterias benéficas. La sucralosa y uno de sus productos de hidrólisis resultaron ser mutagénicos en elevadas concentraciones en varios métodos de prueba. Cocinar con sucralosa a altas temperaturas fue reportado para generar cloropropanoles, una clase de compuestos potencialmente tóxicos<sup>5</sup>.

F. Rahiman y colaboradores, investigaron los efectos de los edulcorantes artificiales (aspartame, sacarina, sucralosa) y los edulcorantes naturales (azúcar morena, azúcar blanco y melaza) sobre el sistema inmunológico. Leucocitos aislados de sangre se incubaron con diversos edulcorantes y se estimularon *in vitro* con fitohemaglutinina. Sobrenadantes cosechados fueron seleccionados para determinar la citotoxicidad y liberación de citocinas. Los resultados mostraron que ninguno de los edulcorantes artificiales o naturales demostró ser citotóxico, lo que indica que no se indujo la muerte celular *in vitro*. La melaza de caña de azúcar, aumentó los niveles del biomarcador de inflamación, la interleucina (IL) 6, mientras que todos edulcorantes artificiales revelaron un efecto supresor sobre secreción de la IL-6. La exposición de células de la sangre a los edulcorantes que contienen sucralosa en condiciones estimulantes reducen los niveles del biomarcador de inmunidad humoral IL-10. La supresión acumulada de los niveles de IL-6 y la IL-10, inducidas por la sucralosa, pueden contribuir a la incapacidad en el montaje de una respuesta humoral efectiva<sup>6</sup>.

### 1.3.2. *Stevia rebaudiana*

*Stevia rebaudiana* es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia de las *Asteraceas*, que crece como arbusto salvaje en el suroeste de Brasil y Paraguay y generalmente se propaga comercialmente de manera asexual. Las hojas contienen sustancias intensamente dulces que son 300 veces más dulce que el azúcar. Muchos pueblos indígenas de América del Sur han utilizado estevia como edulcorante durante siglos y ha sido utilizada en Japón por más de 30 años. Además de Japón, otros países donde se utiliza como edulcorante son China, Rusia, Corea, Brasil, Paraguay, Argentina, Indonesia y Malasia<sup>7</sup>. Estos glucósidos son principalmente compuestos del diterpeno derivado *steviol* de *S. rebaudiana* Bertoni, el más dulce contiene estigmasterol, b-sitosterol y campesterol<sup>8</sup>.

Aunque existe consenso mundial de las ventajas de estevia para la salud humana, aún existen grandes vacíos en el conocimiento de esta especie, principalmente en aspectos como la nutrición y sus efectos ambientales<sup>9</sup>. Un estudio de B. Geeraert y colaboradores, realizaron el siguiente diseño de investigación: los ratones de doce semanas de edad fueron tratados con esteviósido o placebo durante 12 semanas. Se encontró que el esteviósido no tenía ningún efecto sobre el peso y los triglicéridos, pero sí se redujo la glucosa y la insulina. El tratamiento mejoró la maduración del tejido adiposo, y el aumento de transporte de glucosa, señalización de la insulina y la defensa antioxidante en el tejido adiposo blanco. Juntos, estos aumentos se asociaron con un doble aumento de la adiponectina; además, el estevia redujo el volumen de la placa en el arco aórtico por la disminución de los macrófagos, de los lípidos y las lipoproteínas de baja densidad<sup>10</sup>.

### 1.3.3. Sacarosa

La sacarosa ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), llamada comúnmente azúcar de mesa, es el endulzante más conocido en la industria y el hogar. Se trata de un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, extraído de la caña de azúcar y de la remolacha. Desde hace tiempo se conoce la relación que existe entre el consumo de azúcares principalmente sacarosa y la caries dental; esta enfermedad es el resultado del crecimiento de bacterias tales como *Streptococcus mutans* y *S. sanguis*. Por otra parte, la sacarosa es un azúcar que el intestino utiliza fácilmente, convirtiéndolo en sus correspondientes monosacáridos; la glucosa se absorbe con rapidez e incrementa de manera precipitada la concentración en la sangre, lo cual puede provocar problemas en el sistema hormonal, por lo que no es recomendable un consumo excesivo para personas con diabetes<sup>11</sup>.

El consumo de azúcares tiene un gran impacto sobre la salud poblacional. Actualmente, el consumo per cápita de sacarosa es de aproximadamente 47.9 kg al año, lo que equivale al 16 % del requerimiento energético de un día, es decir, 6 % por arriba de las recomendaciones de hidratos de carbono simples para la población. Siendo los edulcorantes los principales aditivos alimentarios y fuente de hidratos de carbono simples, es importante conocer sus efectos a largo plazo en el organismo. Los productos sustitutos del azúcar, tanto naturales como artificiales, sólo atienden un

segmento muy pequeño del mercado en México; no obstante, su consumo está creciendo debido a los cambios en los hábitos alimenticios de las personas y cuestiones relacionadas a la salud. El principal producto competidor del azúcar es el jarabe de maíz rico en fructosa (JMRF). A partir del ciclo 2003-2004 la fructosa ha desplazado el consumo nacional de azúcar hasta en 1.7 millones de toneladas, de las cuales más del 70% de esa fructosa es importada. En el ciclo azucarero 2012/2013, el consumo nacional aparente de edulcorantes fue de 5.8 millones de toneladas, del cual el azúcar representó el 73.2%, y por su parte el JMRF representó el 26.8%<sup>12</sup>.

#### **1.4. Tejido Adiposo.**

El tejido adiposo está compuesto al menos por dos tipos diferentes de grasas como son el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón o pardo (TAM) que presentan diferencias en cuanto a su morfología, distribución, genes y función. El TAB es el principal reservorio de energía y libera un gran número de hormonas que modulan el metabolismo del organismo y la resistencia a la insulina<sup>13,14</sup>.

El desarrollo de la obesidad no solo depende del balance entre la ingestión y el gasto energético, también depende del balance entre el TAB, como principal reservorio energético, y el TAM, especializado en el gasto energético en forma de termogénesis. Además, el TAB podría afectar al metabolismo del organismo al alterar la sensibilidad a la insulina<sup>15,16</sup> al igual que modificar la susceptibilidad a desarrollar obesidad<sup>17</sup>.

##### **1.4.1. Morfología y distribución del tejido adiposo blanco.**

El adipocito del TAB tiene una forma variable, aunque clásicamente es esférica, de tamaño entre 25-200  $\mu\text{m}$ . Además, tiene un núcleo periférico, plano y un citoplasma delgado que contiene una única gota lipídica grande que ocupa aproximadamente el 90% del volumen de la célula. Presenta escasas mitocondrias y pequeños retículos endoplasmáticos liso y rugoso. El TAB se compone de los adipocitos que se mantienen unidos por un tejido conectivo laxo, que esta adecuadamente vascularizado e inervado. La presencia de los fibroblastos, los macrófagos, y otros leucocitos, junto con los adipocitos, da cuenta de la gran variedad de proteínas que son secretadas por TAB bajo condiciones variables<sup>18</sup>.

El TAB está distribuido a lo largo de todo el organismo y tiene diferentes compartimentos que varían en cuanto al tamaño celular del adipocito<sup>19,20</sup> a la actividad metabólica y a su papel potencial en la resistencia a la insulina y otras complicaciones vasculares asociadas a la obesidad<sup>21,22</sup>. En humanos, se diferencian dos depósitos principales de TAB: el depósito subcutáneo, correspondiente al tejido adiposo que se localiza bajo la piel, y el depósito visceral. Hay dos tipos de tejido adiposo visceral: el mesentérico y el omental<sup>23</sup>. El primero se encuentra envolviendo al intestino, el segundo se extiende

desde la parte inferior del estómago, recubriendo el abdomen y es el que normalmente se emplea en el estudio de la grasa visceral. Hace tiempo que se sabe que el tejido adiposo visceral y el subcutáneo presentan numerosas diferencias anatómicas, celulares y moleculares; por ejemplo, la irrigación de ambos tejidos es diferente, y los niveles de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de leptina en el tejido adiposo subcutáneo están incrementados respecto del visceral<sup>24,25</sup>.

Estos tejidos también son diferentes en cuanto a la capacidad de movilización de ácidos grasos. La grasa omental es más sensible a los efectos lipolíticos de las catecolaminas y menos sensible a los efectos antilipolíticos de la insulina; por tanto, este tejido tiene una mayor capacidad de movilización de ácidos grasos que el depósito subcutáneo<sup>26,27</sup>. Adicionalmente, hay descritas numerosas diferencias entre el tejido adiposo visceral y subcutáneo referentes a la secreción de adipocinas<sup>28</sup>. En este sentido, una obesidad periférica se caracteriza por una acumulación de tejido adiposo subcutáneo y es más frecuente en mujeres. Este tipo de obesidad no se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir patologías asociadas<sup>29</sup>. Sin embargo, la obesidad central o abdominal es más frecuente en hombres y consiste en una acumulación de tejido adiposo visceral. Este tipo de obesidad se ha asociado, mediante estudios epidemiológicos, con un mayor riesgo de sufrir enfermedades tales como resistencia a la insulina, diabetes de tipo 2 e hipertensión, aumentando considerablemente el riesgo cardiovascular<sup>30</sup>.

#### **1.4.2. Morfología y distribución del tejido adiposo pardo o marrón.**

El TAM está formado por adipocitos marrones y células progenitoras de adipocitos, tiene una forma poligonal con un núcleo oval y centrado en un citoplasma grande que contiene múltiples y pequeñas gotas lipídicas. Posee un gran número de mitocondrias y un retículo endoplásmico poco desarrollado. Además, se encuentra altamente vascularizado e innervado<sup>31</sup>. Originalmente, se pensó que el TAM estaba presente en los seres humanos solo durante el periodo neonatal; sin embargo, datos recientes han demostrado que los adultos conservan algunos depósitos metabólicamente activos de TAM que responden al frío y a la activación simpática del sistema nervioso. Actualmente, en humanos, el tejido adiposo marrón se ha descrito que está localizado en depósitos de la región cervical, supraclavicular, paravertebral, mediastinal, para-aortica y suprarrenal<sup>32</sup>. Además, también se han localizado pequeños grupos de adipocitos marrones en el interior del músculo esquelético en adultos humanos. Por otro lado, recientes datos han mostrado que los adipocitos marrones encontrados en el interior de otros depósitos de tejido adiposo blanco no son derivados del linaje myf5, como son los clásicos adipocitos marrones del tejido interescapular de los roedores, y se denominan células beige<sup>33</sup>. La activación del TAM reduce la adiposidad y protege al ratón de la obesidad inducida por la dieta rica en grasas<sup>34,35</sup>. La pérdida de la masa del TAM, como puede ser una lipoatrofia marrón severa por una delación del receptor de la insulina en ese tejido<sup>36</sup>, o la pérdida de proteína desacoplante 1 (UCP-1), confieren susceptibilidad a desarrollar obesidad en ratones referencia En los últimos años, se ha descrito que la

cantidad de TAM estaba inversamente correlacionada con el índice de masa corporal en humanos, especialmente en personas de avanzada edad<sup>34</sup>. Además, se ha demostrado recientemente que el tejido adiposo marrón podría proteger frente a múltiples enfermedades relacionadas con el envejecimiento<sup>37</sup>. Individuos con depósitos de TAM más pequeños son más susceptibles a acumular tejido adiposo blanco y aumentar su peso corporal y tener un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y vasculares asociadas a dicha obesidad<sup>34</sup>. Una de las principales funciones del TAM es la activación de la termogénesis a través de la activación de la UCP-1, generando calor a partir de los ácidos grasos en la termogénesis. El TAM utiliza, en primer lugar, los lípidos almacenados como sustrato para generar calor<sup>38</sup>. A continuación se muestra en la figura 1, los principales efectos en la obesidad y el proceso de inflamación crónica de bajo grado, las células del SI que intervienen, características de los diferentes tipos de tejido adiposo y sus repercusiones sistémicas.

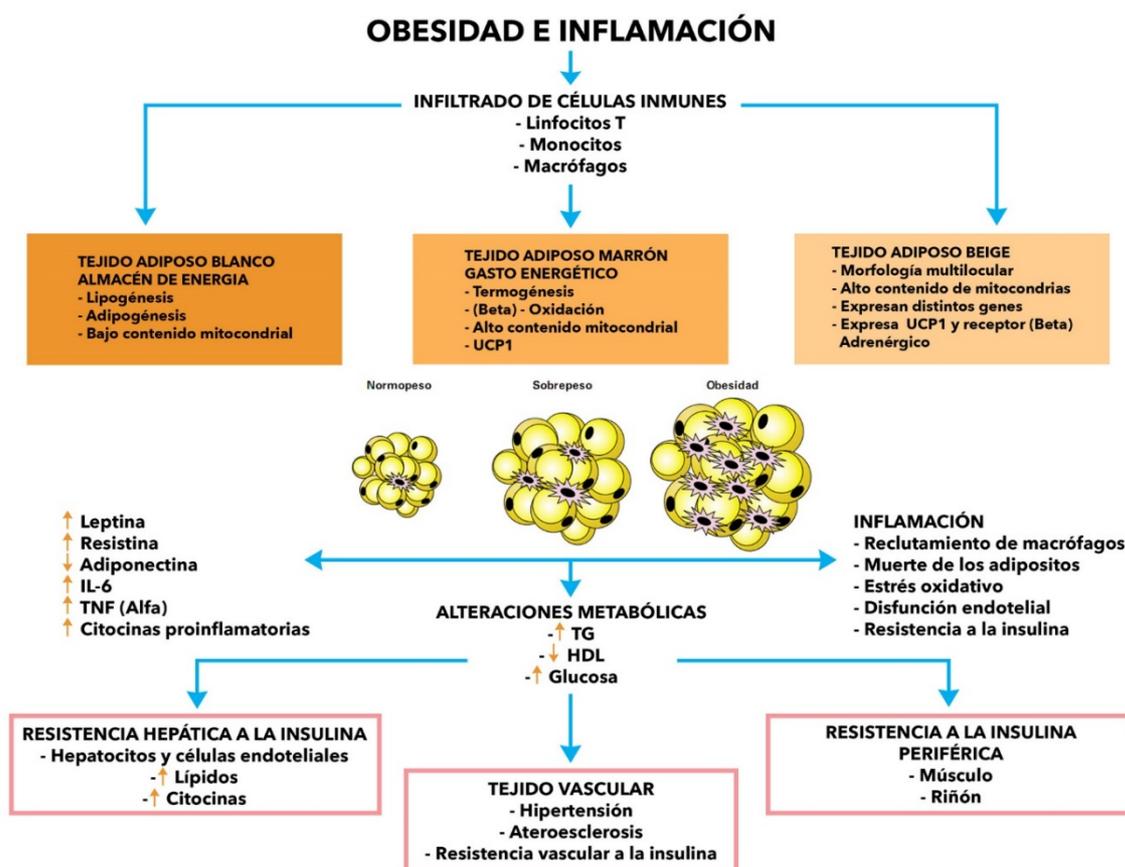


Figura 1: Papel del tejido adiposo en la obesidad y el proceso inflamatorio. Modificada de Hernández<sup>39</sup>.

### 1.4.3. El tejido adiposo como órgano endocrino

En primer lugar, el TAB es un órgano que constituye el mayor reservorio energético del organismo. La energía es almacenada en los adipocitos en forma de triglicéridos. La principal fuente de triglicéridos procede de los quilomicrones y las proteínas de muy baja densidad (VLDL) circulantes. En los humanos, el almacenamiento de los ácidos grasos en el tejido adiposo depende prácticamente de la liberación de los mismos desde las lipoproteínas por acción de la lipoproteína lipasa (LPL)<sup>40</sup>.

Tal es el protagonismo de esta enzima en el metabolismo lipídico que se ha descrito una acción proaterogénica de la LPL, expresada por el macrófago, y una acción antiaterogénica de la LPL, expresada en el tejido adiposo y músculo. Por tanto, esta enzima estaría implicada en las alteraciones lipídicas de la obesidad<sup>41</sup>. Su actividad aumenta en el periodo posprandial y se inhibe en el ayuno y esta incrementada en el tejido adiposo tanto de humanos como de animales de experimentación obesos<sup>42,43</sup>. Sin embargo, la capacidad de respuesta de la LPL a la insulina y la alimentación en pacientes obesos esta disminuida<sup>44,45</sup>. El TAB no solo es un órgano de reservorio de energía sino también un órgano secretor de ciertas moléculas que tienen una acción endocrina, paracrina y autocrina, algunas de estas moléculas secretadas por los adipocitos están implicadas en la regulación del peso corporal, leptina y adiponectina<sup>46</sup>. En una situación de obesidad se produce una acumulación de lípidos en los adipocitos, iniciándose un estrés en la célula y generándose una inflamación local del adipocito blanco. Esta puede exportarse en la vía portal del hígado y finalmente a otros tejidos periféricos, como el territorio vascular donde podría producir aterosclerosis, hipertensión y resistencia vascular a la insulina, como se observa en la figura 1.

En este sentido, para la expansión de la grasa, la microcirculación podría desempeñar un papel clave en la inflamación del tejido adiposo. Así, en un endotelio normal que es antiadherente, los leucocitos no se adhieren, mientras que después de la administración de dieta rica en grasas se ha demostrado que dicho endotelio expresa moléculas de adhesión y une leucocitos<sup>47</sup>. La mayoría de los estudios han examinado al tejido adiposo y a los adipocitos para la búsqueda de los mecanismos subyacentes de la obesidad, síndrome metabólico, diabetes tipo 2 y la aterosclerosis, que presentan defectos tanto en las vías metabólicas como en las inflamatorias<sup>48</sup>. Mientras que se conoce bastante acerca del papel de los adipocitos en el metabolismo energético, es poco lo que se sabe de su papel en la inflamación. Se ha observado que los adipocitos y varias células del sistema inmune, tales como las células T y los macrófagos poseen características similares en cuanto a la producción de citocinas proinflamatorias y a las vías de señalización<sup>47</sup>. Por ejemplo, las células precursoras de los adipocitos (preadipocitos) poseen potente actividad fagocitaria<sup>49</sup>. Aunado a esto, muchos genes críticos para los adipocitos, incluyendo aquellos que codifican para factores de transcripción, moléculas inflamatorias, transportadores de ácidos grasos y receptores basureros, también son expresados en los macrófagos y tienen un papel importante en la biología del macrófago<sup>50</sup>. Sin embargo, se encuentran pocas excepciones a esta redundancia funcional y molecular entre los preadipocitos y los macrófagos. A

partir de la comparación de patrones de expresión de genes entre muestras de tejidos adiposos humanos y de ratones obesos contra controles delgados, así como de estudios que correlacionan los patrones de expresión genética en sujetos con diferentes grados de obesidad, se ha encontrado que la infiltración de macrófagos al tejido adiposo en la obesidad puede ser parte integral de los cambios inflamatorios en el TAB<sup>51</sup>. Esto sugiere que gran cantidad de genes que se regulan en la obesidad proviene de la expresión de genes de los macrófagos infiltrados en el TAB y de las células reticuloendoteliales, y no solamente de los preadipocitos o adipocitos<sup>52</sup>.

#### 1.4.4. Porcentajes de tejido adiposo

La distribución del tejido adiposo es casi general en el cuerpo humano. Existen lugares en donde el tejido adiposo se acumula aún en mayor cantidad, por ejemplo: en el tejido subcutáneo, formando el “panículo adiposo”; en la palma de las manos y la planta de los pies, en la región perirrenal; en el tejido conjuntivo que rodea a ciertos órganos como en el pericardio; alrededor de las vísceras abdominales; por detrás del globo ocular; en las glándulas mamarias y en la región glútea<sup>39</sup>. El porcentaje de grasa y rangos de normalidad se evalúan según el sexo y edad en el cuerpo humano. En las tablas 2 y 3 se pueden visualizar los porcentajes correspondientes.

**Tabla 2:** El porcentaje de grasa y sus rangos de normalidad según sexo y edad de acuerdo a lo propuesto por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO).

Edad en años	Mujer %	Varón %
15-20	18-22	15-18
21-25	21-23	16-20
26-30	22-24	19-21
31-35	25-26	20-21
36-45	25-27	21-23
46-50	28-30	22-23
51-60	29-31	23-24
>60	29-31	24-25

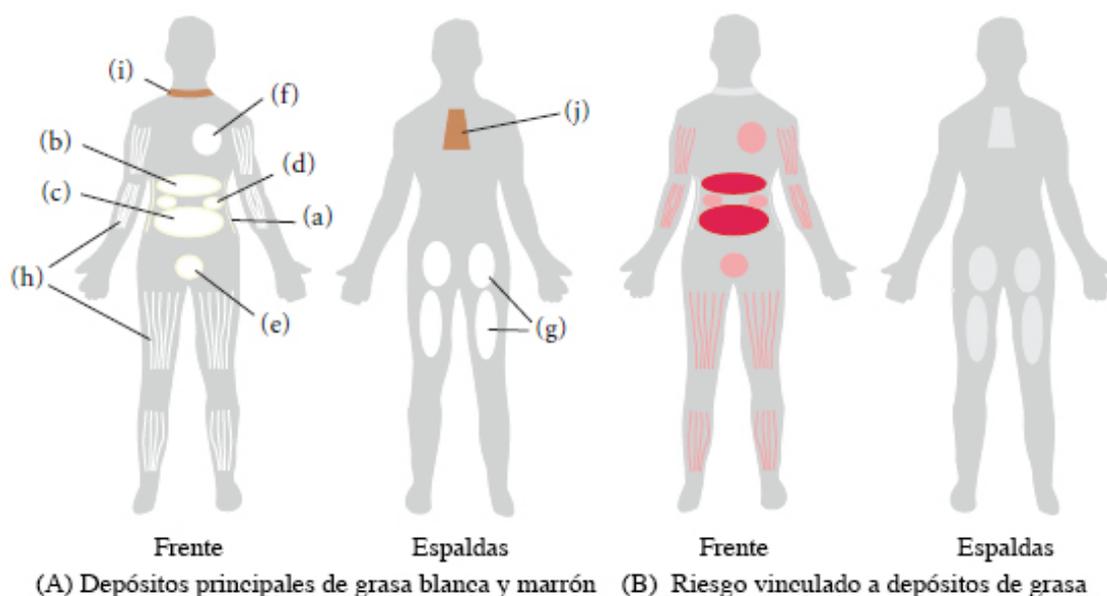
Tomada de: (Bray)<sup>53</sup>.

**Tabla 3:** Clasificación de grasa corporal de acuerdo con categorías del IMC en relación con la edad.

Edad (años)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Grasa corporal %
<b>Varones</b>		
20 a 39	<18.5	8
	≥ 25.0	21
	≥ 30.0	26
40 a 59	<18.5	11
	≥ 25.0	23
	≥ 30.0	29
<b>Mujeres</b>		
20 a 39	<18.5	21
	≥ 25.0	33
	≥ 30.0	39
40 a 59	<18.5	23
	≥ 25.0	35
	≥ 30.0	41

Tomado de (Gallegher)<sup>53</sup>.

La distribución de la grasa entre estos depósitos parece ser más importante que la masa total de tejido adiposo para el riesgo de desarrollar enfermedades asociadas con la obesidad (Figura 2)<sup>24</sup>.



**Figura 2: Principales depósitos de grasa blanca y marrón.** (A) Las principales depósitos de tejido adiposo blanco son tejido adiposo abdominal subcutáneo (a) y tejido adiposo visceral (TAV). TAV rodea los órganos internos y se puede dividir en omental (b), mesentérica (c), retroperitoneal (d): que rodea el riñón, gonadal (e): unido al útero y los ovarios en mujeres; epidídimo y testículo en hombres y por ultimo pericárdico (f). El tejido adiposo glúteo-femoral (g).TAB también se puede encontrar por vía intramuscular (h). Así bien el Tejido adiposo marrón se encuentra por encima de la clavícula (i) y en la región subescapular (j). En la sección (B), los depósitos de tejido adiposo que se han relacionado con el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con la obesidad se indican en rojo. El vínculo mejor documentado de riesgo se encontró para tejido adiposo omental y mesentérico<sup>54</sup>.

### **1.5. Generalidades del Sistema Inmunológico.**

El Sistema Inmunológico (SI) es una compleja red, por un lado, de células y moléculas solubles y por otro lado, de diversos órganos y tejidos, los cuales se estructuran y coordinan de forma dinámica con el fin de mantener a los seres vivos a salvo de invasiones o colonizaciones por otros seres vivos (más comúnmente, microorganismos patógenos). Los leucocitos son las células del SI que se encuentran generalmente en la circulación sanguínea o sistema linfático. Todas las células sanguíneas proceden de precursores hematopoyéticos localizados en la médula ósea. Los mecanismos de la inmunidad humana pueden ser agrupados en dos grandes categorías: el SI innato o inespecífico, que provee una primer defensa y de carácter general contra cualquier elemento reconocido como extraño; y el SI adquirido o específico, que reconoce agentes amenazantes específicos y genera una respuesta especializada contra esos elementos<sup>55</sup>.

#### **1.5.1. Inmunidad innata**

Es la primera línea de defensa contra una infección. Casi todos los componentes de la inmunidad innata se encuentran antes del inicio de la infección y constituyen un grupo de mecanismos de resistencia contra la enfermedad que no son específicos de un patógeno particular, sino que incluyen componentes celulares y moleculares, que reconocen clases de moléculas peculiares a los patógenos que se encuentran con frecuencia. La palabra “innata” se refiere al hecho de que todas son determinadas totalmente por los genes que el individuo hereda de sus progenitores. Muchas familias de proteínas receptoras contribuyen al reconocimiento de los patógenos en la respuesta inmunitaria innata. Son de varios tipos estructurales distintos y se unen a ligandos químicamente diversos: péptidos, proteínas, glucoproteínas, proteoglicanos, peptidoglicano, carbohidratos, glucolípidos, fosfolípidos y ácidos nucleicos<sup>56</sup>.

#### **1.5.2. Inmunidad adaptativa o adquirida.**

La inmunidad adaptativa o adquirida se desencadena cuando algún patógeno evade la acción del SI innato, o cuando el organismo posee ya memoria inmunológica ante un agente foráneo dado. Las células del SI adaptativo son un tipo especial de leucocitos, los denominados linfocitos. Cada tipo celular juega un papel completamente distinto en la respuesta inmunológica adaptativa. Una subpoblación de linfocitos T, los “T ayudadores/cooperadores” o Th CD4<sup>+</sup> son fundamentales para la coordinación y orquestación de la respuesta inmune adaptativa, principalmente reconociendo antígenos y potenciando el tipo de respuesta que sea más efectivo para combatir a cada tipo de microorganismo<sup>57</sup>. Otra subpoblación de linfocitos T están implicados en la respuesta inmunológica de tipo celular, los llamados T CD8<sup>+</sup>, que se encargan de la citotoxicidad y que es la forma más efectiva de combatir virus, parásitos intracelulares y células tumorales o aberrantes<sup>58</sup>. Por otro lado, los

linfocitos B son los productores de los anticuerpos, moléculas solubles que reconocen específicamente antígenos y son muy efectivos para erradicar patógenos extracelulares<sup>39</sup>.

Los mecanismos de la inmunidad innata proporcionan la defensa inicial contra las infecciones. Las respuestas inmunitarias adaptativas aparecen después y consisten en la activación de los linfocitos. Las características y comparación entre ambas se muestran a continuación en la tabla 4.

**Tabla 4: Características de la inmunidad innata y adaptativa**

<b>Características</b>	<b>Innata</b>	<b>Adaptativa</b>
<b>Especificidad</b>	Frente a moléculas compartidas por grupos de microbios y moléculas relacionadas producidas por células dañadas del anfitrión	Frente a antígenos microbianos y no microbianos
<b>Diversidad</b>	Limitada; codificada en línea germinal	Muy grande; los receptores se producen por recombinación somática de segmentos génicos
<b>Memoria</b>	Ninguna	Si
<b>Falta de reactividad frente a lo propio</b>	Si	Si
<b>Componentes</b>		
<b>Proteínas sanguíneas</b>	Complemento y citocinas	Anticuerpos y citocinas
<b>Células</b>	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), linfocitos citolíticos naturales y células linfoides innatas	Linfocitos T y B, células dendríticas, y macrófagos

Tomada de (autor)<sup>58</sup>.

### 1.5.3. Células del Sistema Inmunológico

Las células del SI son los leucocitos o glóbulos blancos, se llaman así porque que no poseen color propio, a diferencia de los hematíes y las plaquetas, los leucocitos son células completas provistas de membrana, citoplasma y núcleo, en las que es posible distinguir al microscopio diversos tipos morfológicos, cada uno de los cuales posee una actividad concreta dentro del común denominador de la función defensiva que les es propia<sup>55</sup>. Los leucocitos que normalmente se encuentran en la sangre periférica son de tres tipos básicos:

1. Granulocitos o polimorfonucleares
2. Linfocitos
3. Monocitos

**1. Granulocitos o polimorfonucleares:** Llamados así por los gránulos que poseen en el citoplasma. Tienen el núcleo segmentado y, según las características, se dividen en:

**Neutrófilos:** Los neutrófilos se forman por hematopoyesis en la médula ósea. Se liberan a la sangre periférica y circulan durante siete a 10 horas antes de migrar a los tejidos, en donde tienen un lapso de vida de sólo unos cuantos días. En respuesta a muchos tipos de infecciones, la médula ósea libera más de la cantidad usual de neutrófilos y estas células suelen ser las primeras que llegan al sitio de inflamación. El incremento transitorio resultante del número de neutrófilos circulantes, llamado leucocitosis, se utiliza en clínica como una indicación de infección. Principales funciones: fagocitosis y activación de mecanismos bactericidas<sup>59</sup>.

**Eosinófilos:** Su función fagocítica es significativamente menos importante que la de los neutrófilos, y se piensa que intervienen en la defensa contra microorganismos parásitos secretando el contenido de los gránulos eosinofílicos, lo cual suele dañar la membrana de los parásitos.

**Basófilos:** Los basófilos son granulocitos no fagocíticos que se producen por hematopoyesis y cuya función es liberar sustancias farmacológicamente activas de sus gránulos citoplásmicos. Estas sustancias tienen un papel importante en ciertas reacciones alérgicas.

**2. Linfocitos:** Son las células que específicamente reconocen y responden a los antígenos extraños. Son células de tamaño pequeño (6-8 micras), aunque en ocasiones pueden ser un poco más grandes (linfocitos grandes: 10-25 micras). El núcleo nunca presenta segmentación y es redondeado, con una discreta zona invaginada. El citoplasma suele ser escaso, basofílico (de color azul claro) y forma una delgada banda perinuclear. En ocasiones puede presentar una fina granulación citoplasmática azurófila<sup>59</sup>. Los linfocitos constan de diferentes subgrupos que difieren en sus funciones y productos proteicos, aunque todos ellos parecen morfológicamente similares. Una clase de linfocitos son los linfocitos B,

así llamados porque se observó en las aves que maduraban en un órgano denominado bolsa de Fabricio<sup>60</sup>. La segunda clase principal de linfocitos son los linfocitos T, cuyos precursores provienen de la médula ósea y después migran y maduran en el timo (de allí su nombre). Los linfocitos T se subdividen en poblaciones funcionalmente distintas, siendo las mejor definidas las células T colaboradoras y las células T citotóxicas<sup>58</sup>.

**Linfocitos T:** Representan el 70-80% del total de los linfocitos. Son los responsables de la respuesta inmune producida por células y por anticuerpos. Estos linfocitos se originan en la médula al igual que los demás, pero posteriormente migran al timo. Existen tres tipos: linfocitos T citotóxicos, colaboradores y supresores o reguladores. En el momento que un linfocito T detecta en el cuerpo antígenos de su especialidad se activa y empieza a multiplicarse y a formar clones y todos estos linfocitos estarán en continuo movimiento por los líquidos corporales. Para que un linfocito T reconozca un antígeno este debe ser presentado anteriormente por el complejo mayor de histocompatibilidad. Por su parte los T colaboradores y supresores participan de forma directa en la inmunidad regulando la respuesta de las células B y de las T citotóxicas. Los marcadores cúmulo de diferenciación (CD) son moléculas marcadoras en la superficie celular, que reconocen ciertos anticuerpos, usadas para la identificación del tipo de célula, estadio de diferenciación celular y actividad de la misma, que le pertenecen a este tipo de linfocitos suelen ser los de números inferiores, siendo el CD4 y el CD8 los específicos de estos linfocitos<sup>61</sup>.

**Linfocitos B:** Representan el 10-20% del total de los linfocitos. Son los encargados de producir anticuerpos para que se unan a antígenos de una manera específica. El desarrollo de las células B se lleva a cabo a partir de unas células madre que se transforman en células B inactivas y emigran a los órganos linfoides secundarios, donde se unen a los antígenos y se activan. A partir de aquí existen dos caminos. Parte de los linfocitos B se convertirán en células memoria que se almacenarán y otra parte se transformará en células plasmáticas que se encargaran de segregar inmunoglobulinas. Los marcadores CD que le pertenecen a este tipo de linfocitos suelen ser los de números superiores, siendo el CD19 el marcador específico de estos linfocitos<sup>59</sup>.

**Linfocitos NK (citotóxicos naturales):** Representan el 10% restante del total de los linfocitos. Estas células forman la primera línea de defensa mediada por células citotóxicas. Se encargan de destruir los tumores mediante mecanismos inespecíficos sin necesidad de haberse expuesto anteriormente frente a los antígenos tumorales; realizan citolisis sobre las membranas plasmáticas de algunas células. Su acción es apoyada posteriormente por los linfocitos T citotóxicos. Estas células tienen dos tipos de receptores en la membrana: receptores activadores y receptores inhibidores. Sus marcadores CD específicos son CD56 y CD57<sup>62</sup>.

**3. Monocitos:** Son las células de mayor tamaño que circulan en la sangre periférica normal. Tienen un diámetro aproximado de 14-20 mm. El núcleo casi siempre es reniforme y está formado por una cro-

matina laxa y de aspecto ondulado (cromatina “peinada”). El citoplasma es amplio, de color gris pálido y posee una granulación azurófila muy fina y abundante. Se mantienen muy poco tiempo en la sangre (10-20 horas) antes de salir de los capilares hacia los tejidos. Allí se agrandan y se transforman en los macrófagos tisulares. En esta forma pueden vivir meses o incluso años. Pueden activarse por una gran variedad de estímulos y pueden adquirir diferentes formas. Algunos llegan a tener un citoplasma abundante y se llaman células epiteloideas, por parecerse a las epiteliales y también pueden fusionarse y formar células gigantes multinucleadas<sup>62</sup>.

**Macrófagos:** Proviene de los monocitos. Estos se originan en la médula ósea gracias a diversos factores de crecimiento. Tienen doble función: la primera consiste en fagocitar y digerir todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo, liberando los restos antigénicos en su citosol y la segunda es la de presentación de antígenos. Después de haber fagocitado los microorganismos extraños, procesan y presentan estos antígenos en su superficie con el fin de que sean reconocidos por los linfocitos T colaboradores y citotóxicos, para que estos a su vez activen los linfocitos B y las respuestas efectoras correspondientes. Los macrófagos reciben distintos nombres dependiendo del lugar donde se encuentren; algunos ejemplos serían: microglía (en el cerebro), osteoclasto (en el tejido óseo)<sup>63</sup>.

Los macrófagos pueden ser residentes (fijos en tejidos) o libres. Entre los primeros destacan:

- a. Macrófagos intestinales. Los macrófagos se encuentran principalmente en la lámina propia del tracto gastrointestinal. Las áreas corticales ricas en linfocitos asociados a intestino (GALT) y las placas de Peyer contienen muy pocos macrófagos. Respecto a su función, podrían participar en la presentación antigénica y en la fagocitosis de microorganismos y células muertas<sup>64</sup>.
- b. Macrófagos del hígado. Las células de Kupffer se ubican en las paredes vasculares de las sinusoides hepáticas. Pueden fagocitar un espectro amplio de células y partículas, entre ellos, liposomas, bacterias, parásitos, virus, glóbulos rojos y plaquetas opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG) y/o complemento<sup>65</sup>.
- c. Macrófagos peritoneales. Éstos se encuentran entre los macrófagos de serosas; tienen capacidad para destruir células neoplásicas y bacterias. En casos de peritonitis o ascitis maligna aumenta el número de macrófagos<sup>66</sup>.

Por lo antes expuesto las terapias que activan estas células podrían contribuir al manejo de la obesidad, la diabetes y el síndrome metabólico. Investigaciones previas han mostrado la existencia de una amplia población de células NK en el tejido adiposo, tanto en ratones como en humanos<sup>54</sup>. Ahora, se ha comprobado en ratones que estos linfocitos desempeñan una función reguladora del peso corporal y el estado metabólico al modular la inflamación en el tejido adiposo. Los ratones que carecían de células NK presentaban una mayor ganancia de peso, adipocitos más grandes, hígado graso y

resistencia a la insulina cuando se les suministraba una dieta rica en grasa<sup>25</sup>. La transferencia de este tipo de linfocitos o su activación *in vivo* mediante su ligando lipídico, alfa-galactosilceramida, disminuía la grasa corporal, los niveles de triglicéridos, la leptina y el hígado graso de los animales, además de mejorar su sensibilidad a la insulina con la producción de citocinas antiinflamatorias<sup>67</sup>.

### 1.6. Complejo mayor de histocompatibilidad y presentación de antígeno

El MHC influye en la reacción de un individuo a antígenos de microorganismos infecciosos, y por tanto se le ha implicado en la susceptibilidad a enfermedades así como en el desarrollo de autoinmunidad. El MHC participa en el desarrollo tanto de las inmunorreacciones humorales como de las mediadas por células. Los estudios sobre este grupo génico se originaron cuando se descubrió que el rechazo de tejido ajeno es el resultado de una reacción inmunitaria a moléculas de la superficie celular, ahora llamadas **antígenos de histocompatibilidad**<sup>68</sup>.

Cada especie de mamífero estudiada a la fecha posee el grupo de genes unidos de manera estrecha que constituyen el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), cuyos productos desempeñan funciones importantes en el reconocimiento intercelular y la diferenciación entre lo propio y lo extraño<sup>56</sup>.

El complejo mayor de histocompatibilidad es un conjunto de genes dispuestos dentro de una tira continua larga de DNA en el cromosoma 6 en seres humanos y en el cromosoma 17 en ratones. El MHC se denomina **complejo HLA** en el ser humano y **complejo H-2** en ratones. Aunque la disposición de los genes es un poco distinta en las dos especies, en ambos casos los genes del MHC (o genes MHC) se organizan en regiones que codifican tres clases de moléculas (**Figura 3**):

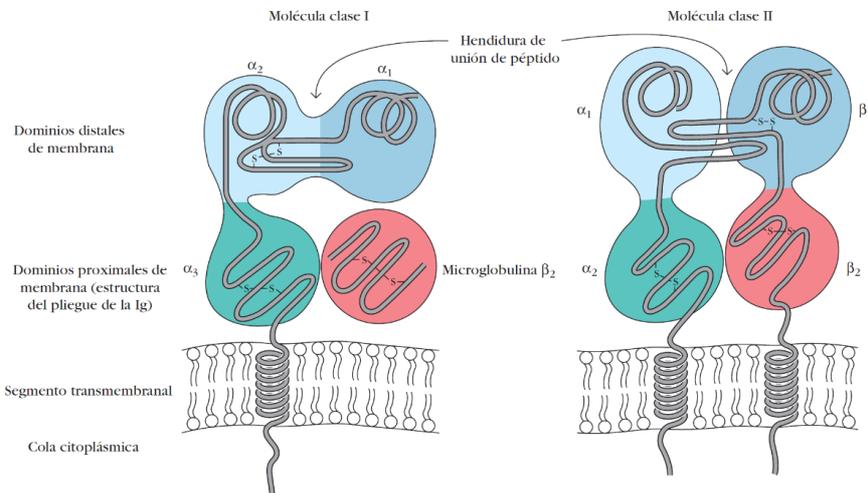
**Genes MHC clase I:** codifican glucoproteínas que se expresan en la superficie de casi todas las células nucleadas; la principal función de los productos génicos clase I es la presentación de antígenos péptidos a células T citotóxicas.

**Genes MHC clase II:** codifican glucoproteínas que se expresan sobre todo en células presentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas y células B), donde presentan péptidos antigénicos procesados a células TH.

**Genes MHC clase III:** codifican, además de otros productos, varias proteínas secretadas que desempeñan funciones inmunitarias, inclusive componentes del sistema de complemento y moléculas relacionadas con la inflamación<sup>69</sup>.

Las moléculas MHC-I y MHC-II son glucoproteínas unidas a membrana que se relacionan de manera estrecha tanto en estructura como en función. Ambos tipos de glucoproteínas de membrana funcionan como moléculas presentadoras de antígeno muy especializadas que forman complejos excepcionalmente estables con péptidos antigénicos, los cuales se exhiben en la superficie celular para

reconocimiento por células T. En contraste, las moléculas MHC-III son un grupo de proteínas no relacionadas que no comparten la similitud estructural y funcional con las moléculas clase I y II. En la siguiente figura se aprecia la estructura de las moléculas MHC-I y MHC-II, que mediante un análisis cristalográfico con rayos X muestra la similitud de las moléculas<sup>68</sup>.



**Figura 3. Esquemas de la molécula MHC clase I y clase II que muestran los dominios externos, el segmento transmembranal y la cola citoplásmica.** La hendidura de unión de péptido está formada por dominios distales de membrana tanto en las moléculas clase I como en la clase II. Los dominios proximales de membrana poseen la estructura básica del pliegue de inmunoglobulina; por tanto, las moléculas MHC clase I y clase II se clasifican como miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas<sup>70</sup>.

### 1.7. Tejido adiposo y el Sistema Inmunológico

Hasta hace poco tiempo el tejido adiposo era considerado un compartimento cuya función principal era el almacenamiento de triacilglicérols, debido a la capacidad del tipo de células más abundante en su estructura, el adipocito, de almacenar hasta el 95% de su masa en grasa<sup>43</sup>. En la actualidad se considera que el adipocito, además de almacenar lípidos, es una célula endocrina extremadamente activa con roles centrales en la homeostasis energética de todo el organismo e importante influencia sobre otros procesos fisiológicos, entre ellos la función inmune, lo cual ejecutan no solo actuando sobre la homeostasis lipídica sistémica, sino a través de la producción y liberación de factores hormonales, algunos propios y otros compartidos con otros tejidos, citocinas y componentes de la matriz extracelular<sup>51</sup>. Se ha sugerido, por estas razones, que el tejido adiposo debiera formar parte del SI<sup>17</sup>. A nivel anatómico, es un hecho que gran parte del tejido linfoide, sobre todo los ganglios linfáticos, se encuentran rodeados y fuertemente asociados al tejido adiposo, lo cual tiene importantes repercusiones estructurales y funcionales<sup>71</sup>. En respuesta a una agresión foránea, se requiere que la energía esté disponible rápidamente para una inmediata reacción del organismo. Por tanto, el tejido adiposo que rodea los ganglios linfáticos sirve como principal suministrador de ácidos grasos para ser utilizados como combustible<sup>20</sup>. Se ha observado, *in vivo*, una inmediata lipólisis en los adipocitos que

rodean los ganglios linfáticos posterior a activación inmune local<sup>72</sup>. Los ácidos grasos poliinsaturados del tejido adiposo son, por otra parte, precursores de prostaglandinas y leucotrienos, ambos involucrados en la inflamación<sup>73</sup>. Desde el punto de vista estructural, se ha observado que el contenido de lípidos de la membrana plasmática de células dendríticas y linfoides de los ganglios linfáticos se correlaciona con el patrón lipídico de los adipocitos adyacentes, lo cual, adicionalmente, tiene implicaciones en las señalizaciones entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T y en la orientación de la respuesta Th1/Th2<sup>74</sup>.

La condición crónica de inflamación se ha relacionado también con la generación de resistencia a la insulina<sup>75</sup>. En este sentido, el soporte metabólico juega un papel muy importante, ya que puede modificar la capacidad inmunitaria del organismo para combatir infecciones en la respuesta inflamatoria. A su vez, la respuesta inflamatoria modifica el metabolismo del organismo, favoreciendo o suprimiendo algunas vías, como es el caso de la vía de señalización de la insulina<sup>63</sup>. La combinación de la respuesta inmune con un balance metabólico adecuado es benéfica para el mantenimiento de un buen estado de salud. Existen evidencias que apoyan la asociación entre el metabolismo y la inmunidad: el mantener un peso saludable conduce a un equilibrio inmunitario; por el contrario, con la desnutrición se favorece la inmunosupresión, mientras que en la obesidad se genera una inflamación crónica<sup>76</sup>. A pesar de la aparente independencia entre los campos de la inmunología y la nutrición, muchas observaciones muestran claramente que el SI no puede funcionar adecuadamente en condiciones de malnutrición, ya sea por defecto o por exceso. El desbalance metabólico conduce a un desequilibrio inmunológico, con malnutrición e inmunosupresión en un extremo del espectro, y la obesidad o enfermedades inflamatorias en el otro extremo. Así, la integración entre el metabolismo y el SI, la cual en condiciones normales es beneficiosa y necesaria para el mantenimiento de una buena salud, puede convertirse en perjudicial en condiciones de sobrecarga metabólica<sup>77</sup>.

La mayoría de los estudios indican que varios edulcorantes pueden ayudar con la obesidad y/o diabetes tipo 2<sup>78,79</sup>. Otros estudios sugieren que varios edulcorantes pueden paradójicamente conducir a un aumento de peso en diferentes situaciones. En 2013, Kimihiko Mitsutomi, y Takayuki Masaki realizaron un estudio sobre los efectos de los edulcorantes no nutritivos en el tejido adiposo en ratones, durante 4 semanas de suplementación. Los resultados obtenidos fueron que la suplementación con sacarosa incrementó la hiperglucemia, la adiposidad corporal, y el cuerpo de peso en comparación con el grupo control. Además, la suplementación disminuyó significativamente la hiperglucemia en comparación con el sucralosa administrada grupo<sup>80,81</sup>. Curiosamente, la suplementación de edulcorantes aumentó la adiposidad, que estuvo acompañado por la hiperinsulinemia, en comparación con los controles. También aumentó los niveles de leptina en el tejido adiposo blanco y los niveles de triglicéridos en tejidos en comparación con los controles<sup>80</sup>. En recientes estudios realizados en ratones se ha documentado la presencia de poblaciones leucocitarias en el tejido adiposo, que intervendrían potencialmente en el desarrollo de la situación inflamatoria característica de la obesidad.<sup>82</sup> Xu y Yang

Q, Tan G, observaron una notable infiltración de macrófagos en el tejido adiposo y hallaron que los genes específicos de la inflamación y los macrófagos están regulados al alza en este tejido, lo que anunciaría un aumento de los valores circulantes de insulina<sup>83</sup>.

### **1.8. Epidemiología de la obesidad**

La obesidad se caracteriza por un aumento de la masa adiposa secundario a un balance energético positivo mantenido en el tiempo. El incremento en el volumen del tejido adiposo se acompaña de otros cambios en las características biológicas habituales de éste, que se vuelve disfuncional. El depósito visceral de la grasa, la hipertrofia y cambio del perfil secretor de los adipocitos, junto con la infiltración del tejido adiposo por células inflamatorias son algunas de las características que determinan una comunicación alterada del tejido adiposo con otros órganos<sup>84</sup>. La obesidad es una enfermedad crónica de origen multifactorial que ha aumentado de forma considerable en los países desarrollados en las últimas décadas, siendo en la actualidad una epidemia mundial<sup>85</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera obesos a aquellas personas que tengan un índice de masa corporal (IMC) superior a 30 Kg/m<sup>2</sup> y ha estimado que en el 2015 habrá 2,300 millones de adultos con sobrepeso y 700 millones de obesos. Además, ha aumentado de forma preocupante la obesidad infantil y así, en 2010, alrededor de 40 millones de niños menores de cinco años tenían sobrepeso<sup>86</sup>. La obesidad se ha convertido en un problema de salud pública, no solo por el aumento de la estigmatización social, el problema económico que supone o bien el fallo en la calidad de vida, sino también por el riesgo asociado que presentan dichos pacientes a desarrollar otras patologías como la diabetes tipo 2, dislipidemias, hígado graso, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, Alzheimer, enfermedades óseas y con frecuencia algunos tipos de cáncer, especialmente digestivos<sup>87</sup>. Estas enfermedades ocurren como resultado de la resistencia a la insulina inducida por la obesidad y el hecho de que el tejido adiposo no solo sirve como reservorio de energía, sino como un órgano endocrino secretor de hormonas, citocinas y proteínas que afectan a la funcionalidad de las células y tejidos a lo largo de todo el organismo<sup>88</sup>. Esta forma de distribución de la grasa en el paciente con obesidad está claramente relacionada con la morbimortalidad<sup>89</sup>.

## 2. Planteamiento del Problema

La obesidad es un desorden epidémico mundial que se ha reconocido en el siglo XXI como una amenaza de salud principal en la mayoría de los países. La obesidad se caracteriza por la acumulación de exceso de grasa corporal y se define cuantitativamente como un índice de masa corporal superior a 30. Entre las influencias ambientales, la combinación de exceso de la ingestión calórica y vida sedentaria se contribuye más significativamente a la incidencia de la obesidad<sup>90</sup>.

En los últimos años, el aumento de la mortalidad relacionada con la obesidad ha dado lugar a una oleada de dietas de pérdida de peso, productos y varias rutinas de acondicionamiento físico. Como resultado de las muchas condiciones de salud negativas asociadas con la ingestión de azúcar en exceso, ha habido un aumento en el consumo de edulcorantes no nutritivos como alternativa dietética<sup>91,92</sup>.

En un estilo de vida moderno las personas están expuestas crónicamente a cantidades elevadas de lípidos y carbohidratos, lo que puede conducir a la disfunción de diversos tejidos. El tejido adiposo está muy involucrado en el desarrollo de trastornos metabólicos<sup>93</sup>. El tejido adiposo, es un órgano endocrino, está estrechamente relacionado con el almacenamiento de energía, participa en la secreción de una variedad de proteínas que permite participar también significativamente en la regulación del apetito, el metabolismo, la reproducción y la función cardiovascular. Actualmente también puede ser considerado como un órgano inmunológico puesto que es el sitio principal de la inflamación en la obesidad y secreta una gran cantidad de factores que participan en la respuesta inmune<sup>94</sup>.

El sistema inmunológico se compone de una variedad de diferentes tipos de células y proteínas. Cada componente cumple con una tarea especial dirigida a reconocer y/o reaccionar contra material extraño, como lo hacen en el proceso inflamatorio, el cual puede definirse como una respuesta local al daño celular, que se caracteriza por el aumento del flujo sanguíneo, vasodilatación, infiltración de leucocitos y la producción local de mediadores de inflamación. En la inflamación es necesario el retorno a la homeostasis; cuando persiste este estímulo, la inflamación puede hacerse crónica y contribuir a la patogénesis de enfermedades tales como la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión y el síndrome metabólico, puesto que cursan por un estado inflamatorio crónico de bajo grado como consecuencia del incremento del tejido adiposo, que tiene como efecto el aumento en la producción de mediadores pro inflamatorios que son estimulados por señales de origen exógeno y/o endógeno; los macrófagos del tejido adiposo son la población de leucocitos predominante en este órgano<sup>78,95</sup>.

En estas enfermedades, macromoléculas como ácidos grasos saturados, lipoproteínas y agregados proteicos, inician la respuesta inmunitaria y producen inflamación, que, al no poder ser fácilmente eliminados, perpetúan la respuesta y contribuyen con la persistencia de la enfermedad.

En los últimos años se ha atribuido un gran impacto y asociación a los patrones de consumo saludable con las bajas concentraciones de marcadores de inflamación. Entre los componentes de una dieta saludable, el consumo de cereales integrales, pescado, frutas y verduras se asocian con menor inflamación, mientras otros nutrientes como los lípidos tienen efectos opuestos. Los productos como edulcorantes artificiales y su papel en la producción de la inflamación crónica bajo grado no han dado resultados concluyentes aún. Sin embargo, se conocen los efectos y asociación en el consumo elevado de fructuosa y sacarosa, mientras que el proceso que deriva de los edulcorantes artificial se vuelve un nuevo blanco terapéutico relacionado con la inmunidad<sup>96,97</sup>.

Por lo comentado anteriormente, surge la siguiente pregunta de investigación:

**¿Cuáles son las modificaciones de las poblaciones leucocitarias del tejido adiposo en ratones BALB/c, suplementados con edulcorantes comerciales?**

### 3. Hipótesis

**Hipótesis alterna:** Los ratones suplementados con edulcorantes comerciales presentarán un aumento en la cantidad de células presentadoras de antígeno infiltradas en el tejido adiposo, comparado con los ratones no suplementados de edulcorantes.

**Hipótesis nula:** Los ratones suplementados con edulcorantes comerciales no presentarán un aumento en la cantidad de células presentadoras de antígeno infiltradas en el tejido adiposo, comparado con los ratones no suplementados de edulcorantes.

#### **4. Objetivos**

##### **General:**

Caracterizar las poblaciones leucocitarias del tejido adiposo de ratones consumidores de edulcorantes comerciales.

##### **Específicos:**

Por medio de la técnica de citometría de flujo cuantificar:

- Las poblaciones leucocitarias: CD45, CD14, CD19, CD3, CD4 y CD8
- La expresión de los marcadores MHC I y MHC-II

## 5. Justificación

El concepto de salud es ampliamente diverso y los factores determinantes de la misma engloban desde los aspectos más biológicos, como los caracteres genéticos, a otros socioeconómicos y culturales que, en conjunto, determinan la situación de salud de los individuos. Los cambios acontecidos en los modelos de enfermedad en el tiempo y probablemente, asociados a las modificaciones en los estilos de vida de la población y aumento en el consumo de productos industrializados, han originado un incremento de la prevalencia de numerosas enfermedades crónicas no transmisibles como obesidad, diabetes tipo 2, síndrome metabólico que, en definitiva, determinan un incremento de la morbimortalidad.

Los principales contribuyentes a la creciente epidemia de obesidad son el exceso de consumo de alimentos energéticamente densos y la reducción de la actividad física. Muchos factores adicionales también han sido reportado para contribuir a la epidemia de obesidad, incluyendo el uso de edulcorantes, consumo de refrescos, uso de medicamentos, epigenética cambios debido a un ambiente propicio a la obesidad en el útero y la privación crónica del sueño.

Discutiendo específicamente el consumo de alimentos que contienen edulcorantes con el objetivo de prevención o reducción de la obesidad y enfermedades crónicas no transmisibles, posiblemente esté asociado al efecto de los azúcares líquidos, puesto que no conducen a una sensación de saciedad, por lo que el consumo de otros alimentos no se reduce. En los últimos 10 años se han llevado a cabo investigaciones básicas y clínicas sobre las sospechas de que los edulcorantes pueden jugar un papel causal en el desarrollo de enfermedades metabólicas. Los datos epidemiológicos han demostrado una asociación entre el uso de edulcorantes artificial y la ganancia de peso, así bien la evidencia científica indica que el aumento de la prevalencia de la obesidad, diabetes mellitus tipo II, síndrome metabólico han sido vinculadas al aumento del consumo de alimentos o bebidas que contienen fructosa. Sin embargo, se carece de datos para mostrar que la sustitución de bebidas que contienen azúcar, contra las bebidas no calóricas, realmente cause alteraciones en la composición corporal.

Por lo tanto, conocer los efectos que pueden desencadenar el uso de edulcorantes que actualmente están en disponibilidad y accesibilidad resulta crucial, principalmente porque aún no se tiene una certeza de que su uso resulte benéfico para la salud.

## **6. Material y Métodos**

### **6.1. Diseño de Estudio**

**Tipo de estudio:** Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo

**Población de estudio:** Tejido adiposo de ratones BALB/c de 14 semanas de edad, machos y hembras.

**Método de muestreo:** Por asignación aleatoria.

**Tamaño de muestra:** 6 ratones machos y 6 hembras por grupo de estudio. 48 ratones en total.

Grupo Control: 12 ratones

Grupo Sacarosa: 12 ratones

Grupo Glucósidos de esteviol (Edulcorante Natural): 12 ratones

Grupo Sucralosa (Edulcorante Artificial): 12 ratones

Para el grupo sacarosa se utilizó 10g/100 mL de solución acuosa, lo cual es equivalente a 2 cucharaditas de azúcar de mesa. Para los grupos estevia y sucralosa, se utilizó un sobre comercial de 1 g/100 mL de solución acuosa (cantidad aproximada de edulcorante en cada sobre: 1g). La concentración de las tres soluciones tiene la finalidad de equiparar el sabor dulce entre los grupos de estudio y proporcionar una cantidad similar de edulcorante a la que utilizan habitualmente los seres humanos.

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

**Criterios inclusión:** Ratones BALB/c a partir de las 8 semanas de edad, con un peso aproximado entre 20 y 25 g.

**Criterios eliminación:** Ratones BALB/c que enfermaron o murieron durante el estudio. Ratones que no alcancen un peso adecuado.

### **6.3. Procedimientos**

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

#### **Crianza de ratones BALB/c:**

Se criaron ratones de la cepa BALB/C en el bioterio ubicado dentro de la misma Facultad, en condiciones de temperatura regulada de 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Se siguieron las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales en laboratorio, según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. Los ratones tuvieron acceso libre a agua y alimento, la dieta para roedores es completa en su contenido de proteína, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales (LabDiet 5001). A las 8 semanas de edad, se formaron los grupos experimentales, a los cuales se les adicionó en su agua de uso diario el edulcorante durante 6 semanas. Se evaluó

diariamente y a la misma hora la cantidad de agua ingerida por los ratones de cada grupo experimental y control. Se cuantificaron los gramos de alimento consumidos por los ratones de cada grupo. Se midió semanalmente el peso corporal de los ratones, desde el inicio hasta el final del tratamiento. Para el sacrificio de los ratones, una vez obtenidos los grupos experimentales, los ratones se pesaron y anestesiaron vía peritoneal con 50  $\mu$ L de pentobarbital sódico por cada 25 g de peso del ratón.

**Obtención del tejido adiposo:** El ratón completamente anestesiado, se colocó en la tabla de disección sujetando sus cuatro patas. se fijó al animal a la plancha del corcho, con el dorso hacia abajo, atando patas delanteras y patas traseras, se levantó la piel del abdomen con la pinza, por consiguiente se realizó un corte superficial de la piel abdominal con el bisturí se corta cuidadosamente las capas de tejidos abdominales del ratón, con cuidando de no dañar los órganos situados debajo, el corte se realizó por la línea media ventral; se separó la piel del músculo para exponer la cavidad abdominal, para identificar el tejido adiposo gonadal, la disección se hace siempre siguiendo la forma de la piel del animal.

#### **Aislamiento de leucocitos de tejido adiposo**

Para continuar con la obtención de leucocitos del tejido adiposo se procedió a transferir la muestra en una caja de Petri en hielo que contenga 2 mL de 1X DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) (sin Mg o Ca) suplementado con 0.5% de BSA (albumina bovina). Se cortó la muestra en piezas finas, se mantuvieron las muestras en hielo y se preparan 3 mL de colagenasa tipo I, con 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , en concentración 1 mg/mL. Para la digestión, se transfirió el tejido adiposo a tubos cónicos de 50 mL vertiendo el homogeneizado y se enjuagó con 1 mL de DPBS (0.5% de BSA) y 3 mL de colagenasa tipo I. Seguido de ese paso procedemos a incubar en baño maría a 37 °C durante 30 min con movimientos intermitentes. Se filtraron las células a través de un filtro de 70 micras añadiendo 10 mL de DPBS (0.5% BSA) a tubos cónicos nuevos de 50 mL en seguida se centrifugo a 2,200 revoluciones durante 15 min a 4 °C.

Transcurrido ese tiempo procedimos a decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3 mL de buffer ACK (buffer de lisis de eritrocitos) con el objetivo de lisar los eritrocitos contaminantes además se incorporó 7 mL de buffer FACS (1x DPBS sin Ca y Mg, 2 Mm EDTA y 1% FCS) y la suspensión celular se centrifugó a 2,200 revoluciones durante 15 min a 4 °C. El siguiente paso consistió en decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento de células en buffer FACS, para proceder a colocar las muestras en hielo y preparar alícuotas 1:10 de dilución de cada muestra para el recuento de células mediante la mezcla de azul de tripano 90  $\mu$ L solución, y 10  $\mu$ L de suspensión celular.

## **Citometría de flujo**

El botón celular fue resuspendido en 1 mL de solución FACS.  $1 \times 10^6$  leucocitos se colocaron en tubos para citómetro y se incubó 45 minutos con el anticuerpo conjugado con fluorocromos. La población de leucocitos se identifica por medio del marcador CD45.

- Tinción I: Las poblaciones leucocitarias: CD14 y CD19 y expresión de los marcadores MHC-I y MHC-II.
- Tinción II. Las poblaciones leucocitarias CD3 y las subpoblaciones de linfocitos T CD4 y CD8.

Finalmente, se analizó en el citómetro de flujo BD Accuri, apoyado del software BD Accuri C6.

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

Independientes: Consumo de edulcorantes

Dependientes: Peso, tejido adiposo, poblaciones leucocitarias.

Intervinientes: Ingestión de alimento.

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operativa</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Análisis Estadísticos</b>
<b>CONSUMO DE EDULCORANTES</b>	Se le llama edulcorante a cualquier sustancia, natural o artificial, que edulcora	Cantidad en gramos de agua o edulcorante bebidos por caja del grupo de animales asignados, de acuerdo al peso en una báscula de alimento. Consumo de edulcorante diluidos en agua al 10%.	Independiente Cuantitativa categórica nominal	Mililitros	Medidas de tendencia central ANOVA ,EE
<b>CONSUMO DE ALIMENTO</b>	La acción y efecto de consumir un alimento	Cantidad en gramos de pellets consumidos por caja del grupo de animales asignados, de acuerdo al peso en una báscula de alimento.	Dependiente Cuantitativa continua nominal	Gramos	Medidas de tendencia central ANOVA, EE
<b>PESO</b>	Fuerza con que la Tierra atrae a un cuerpo, por acción de la gravedad.	Cantidad de fuerza medida por la báscula referente a la masa de un cuerpo	Dependiente Cuantitativa continua nominal	Gramos	Medidas de tendencia central ANOVA. EE
<b>LEUCOCITOS</b>	Células mononucleares, son base celular de la respuesta inmune.	Cuantificación del número de células por medio de la técnica citometría de flujo.  Macrófagos (CD14+)  Linfocitos B (CD19+) MCH-I y MCH-II  Linfocitos T (CD3+) subpoblaciones (CD8+ y CD4+)	Dependiente Cuantitativa continua categórica De relación	1x10 <sup>6</sup> /mL	Medidas de tendencia central EE (Pruebas no paramétricas) Kruskal Wallis

## 6.5. Implicaciones Bioéticas

Los experimentos se realizaron siguiendo las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales en laboratorio, según la norma oficial mexicana: NOM-062-ZOO-1999 de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Función del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Su función principal es la de asegurar la existencia de un mecanismo institucional encargado de revisar que el cuidado y uso de los animales de laboratorio con propósitos de investigación, pruebas y/o enseñanza, sea de manera apropiada y humanitaria.

En cuanto a la salud animal.

a) Todas las instituciones donde se alojen animales de laboratorio con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas y enseñanza, deberán implantar programas sanitarios para la prevención de enfermedades.

b) Las cajas y jaulas se mantendrán limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables.

c) Todos los días se observarán los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

d) El agua suministrada a los animales debe ser potable y a libre acceso.

Cuenta con registros diversos para el adecuado control de sus poblaciones animales. Estos sistemas incluyen desde tarjetas de jaulas individuales o colectivas, hasta hojas clínicas o impresos de computadora que auxilien al investigador en dicha tarea.

Las tarjetas: Se colocan en las jaulas o cajas y los datos que en ella figuran corresponden a la identificación que llevan los animales que contienen, sexo, número de animales, cepa, protocolo al que están sometidos y el responsable del proyecto de investigación.

Colorantes o tinturas: Sólo se recomiendan en casos de identificación usar colorantes que no sean tóxicos para los animales.

Alimento. El alimento para todas las especies debe cumplir con las siguientes características:

- Debe estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes.
- Debe estar dentro de su periodo de caducidad.
- Almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.

## **6.6. Análisis Estadísticos**

Para justificar el valor estadístico de los datos se utilizó la prueba ANOVA con un post hoc de Tukey, y la prueba para datos no paramétricos de Kruskal Wallis. El valor de  $p < 0.05$  se aceptó como estadísticamente significativo. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23.0 para el análisis de los datos y para la elaboración de las gráficas se empleó el software Graph Pad Pris 6.

## **7.0. Resultados**

### **7.1. Título del artículo enviado**

**Cuantificación de las poblaciones leucocitarias CD14 y CD19 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales**

## 7.2. *Página frontal del manuscrito*

### **“Cuantificación de las poblaciones leucocitarias CD14 y CD19 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales”**

**Ana Lilibeth Díaz-Arizmendi<sup>1</sup>, José Antonio Estrada<sup>1</sup> e Irazú Contreras<sup>1\*</sup>**

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

\* **Autor corresponsal:** Irazú Contreras, Ph.D. Paseo Tollocan s/n esq Jesús Carranza, Colonia Moderna de la Cruz. Toluca, Estado de México. México. C.P. 50180. Email: [icontrerasg@uaemex.mx](mailto:icontrerasg@uaemex.mx)

**Palabras clave:** Edulcorantes; leucocitos; tejido adiposo; MHC.

### 7.3. Carta de envío

Endocrinología, Diabetes y Nutrición: confirmación de envío / Submission confirmation

10/10/17, 2:55 PM

Reply all | Delete Junk | ...



## Endocrinología, Diabetes y Nutrición: confirmación de envío / Submission confirmation

EN Endocrinologia y nutricion &lt;eesserver@eesmail.elsevier.com&gt;

Reply all |

Today, 2:53 PM

Irazú Contreras García

Inbox

Estimado/a Dr. Contreras:

Le confirmamos la recepción del artículo titulado: "Cuantificación de las poblaciones leucocitarias CD14 y CD19 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales", que nos ha enviado para su posible publicación en Endocrinología, Diabetes y Nutrición.

En breve recibirá un mensaje con el número de referencia asignado y se iniciará el proceso de revisión del artículo. En caso de que sea necesario que haga algún cambio previo, también se le notificará por correo electrónico.

Tal y como se especifica en las normas de publicación de la revista, le recordamos que su manuscrito no puede ser publicado en ninguna otra revista mientras dure el proceso de revisión.

No dude en contactar con la redacción para cualquier información adicional.

Reciba un cordial saludo,

EES  
Endocrinología, Diabetes y Nutrición

\*\*\*\*\*

Dear Dr. Contreras,

Your submission entitled "Cuantificación de las poblaciones leucocitarias CD14 y CD19 en tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes comerciales" has been received by journal Endocrinología, Diabetes y Nutrición.

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

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

<https://outlook.office.com/owa/projection.aspx>

Page 1 of 2

#### **7.4. Resumen:**

**Introducción:** Se ha evidenciado como contribuyentes a la epidemia de obesidad, al exceso de consumo de alimentos energéticamente densos y la reducción de la actividad física, entre las medidas de prevención y tratamiento se considera la implementación de edulcorantes no calóricos para este propósito.

**Objetivos:** Cuantificar poblaciones leucocitarias CD45<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> y marcadores de superficie MHC I- MHC II, del tejido adiposo gonadal de ratones consumidores de edulcorantes comerciales.

**Metodología:** Se procesó tejido adiposo gonadal de ratones BALB/c de 14 semanas de edad, machos y hembras, suplementados con edulcorantes comerciales durante 6 semanas y clasificados en grupos de 6 ratones por edulcorante (sucralosa, estevia, sacarosa y control, por sexo). Posteriormente, se cuantificaron las diferentes poblaciones celulares y los marcadores MHC-I y MHC-II empleando la técnica de citometría de flujo.

**Resultados:** Se observó un incremento en la frecuencia de células CD45<sup>+</sup> en hembras con sucralosa ( $66.1 \pm 3.4\%$ ), estevia ( $63.8 \pm 5.0\%$ ) y sacarosa ( $67.7 \pm 4.9\%$ ) en contraste con ratones macho donde las diferencias se encontraron en sacarosa ( $68.4 \pm 6.0\%$ ) y estevia ( $67.1 \pm 3.4\%$ ). Para el marcador CD14<sup>+</sup> los datos muestran que los grupos de hembras con sacarosa ( $21.3 \pm 4.3\%$ ) y sucralosa ( $22.2 \pm 3.3\%$ ) presentan una frecuencia mayor de células, los ratones machos muestran diferencias en el grupo sacarosa ( $19.6 \pm 1.4\%$ ). El análisis de la frecuencia de células CD19<sup>+</sup> en hembras muestra diferencias en sucralosa ( $69.4 \pm 5.7\%$ ), y en ratones macho se observó diferencia en los grupos sacarosa ( $38.1 \pm 2.6\%$ ) y estevia ( $36.8 \pm 4.1\%$ ). Para la expresión el marcador de superficie MHC clase I o II no se encontraron cambios significativos en comparación con los grupos control, pero si se observaron algunos cambios en cuanto a la intensidad media de fluorescencia de estos marcadores.

**Conclusiones:** El consumo crónico de edulcorantes artificiales puede tener efectos en las modificaciones de las poblaciones de leucocitos totales, macrófagos y linfocitos B.

**Palabras clave:** edulcorantes comerciales, tejido adiposo, población leucocitaria.

## **7.5. Introducción**

Cualquier desequilibrio en el consumo de nutrimentos puede llevar a consecuencias perjudiciales. La desnutrición severa puede llevar a la pérdida gradual de peso, la reducción del gasto energético y la disminución en la tasa metabólica basal. Por otro lado, la sobre-nutrición crónica, caracterizada por un desequilibrio prolongado de energía positiva que desarrolla la obesidad, está asociada con el progreso de múltiples problemas de salud, como las cardiopatías y la diabetes, que contribuyen directamente al aumento del costo de salud, morbilidad y mortalidad<sup>1</sup>. Las modificaciones en los estilos de vida de la población, como el exceso en el consumo de alimentos energéticamente densos y la reducción de la actividad física, han originado un incremento en la incidencia y prevalencia de numerosas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNTs), entre ellas la obesidad, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión y síndrome metabólico<sup>2</sup>. Estas enfermedades presentan un origen multifactorial y se relacionan con procesos inflamatorios crónicos de bajo grado<sup>3</sup>. En el caso de la obesidad, el proceso inflamatorio depende en gran medida del incremento del tejido adiposo, que tiene como efecto el aumento en la producción de mediadores pro-inflamatorios derivados de la producción incrementada de ácidos grasos saturados, lipoproteínas y agregados proteicos. En el tejido adiposo se inician respuestas inmunitarias que producen inflamación crónica al no poder ser fácilmente eliminados<sup>4</sup>. La inflamación presente en individuos obesos contribuye a la aparición de resistencia a la insulina y al desarrollo de otras ECNTs<sup>5</sup>.

El tejido adiposo participa en la regulación del apetito, metabolismo, reproducción, coagulación y función cardiovascular<sup>6,7</sup>. El tejido adiposo es un órgano metabólico central en la regulación de la homeostasis energética de todo el cuerpo. El tejido adiposo produce muchas sustancias bioactivas secretoras, también conocidas como adipocinas (o adipocitoquinas), que se ha encontrado que afectan directamente de una manera pró o antiinflamatoria; además, secreta diversas hormonas y metabolitos que controlan el equilibrio de la energía mediante la regulación de las señales al sistema nervioso central, así como la actividad metabólica en los tejidos periféricos<sup>8</sup>. Los cambios en el número y el tamaño de los adipocitos afectan al microambiente del tejido adiposo, acompañado de alteraciones en la secreción de adipocinas, muerte de adipocitos, hipoxia local y flujos de ácidos grasos. Al mismo tiempo, las células vasculares del estroma en el tejido adiposo, incluidas las células inmunitarias, están implicadas en numerosos procesos adaptativos, tales como depuración de adipocitos muertos, adipogénesis y angiogénesis<sup>9</sup>.

Los macrófagos del tejido adiposo son la población de leucocitos predominante en este, y participan en un papel fundamental en los procesos de regulación metabólica<sup>10</sup>. Los efectos en modelos de obesidad murina en los que se evitó la infiltración por macrófagos en el tejido adiposo a través de la separación génica de diferentes moléculas pro-inflamatorias, resultaron que no desarrollan las alteraciones metabólicas sistémicas propias de la obesidad<sup>11</sup>.

En fechas recientes se ha acumulado evidencia sobre el papel del tejido adiposo en el desarrollo del estado inflamatorio sistémico que contribuye a los riesgos asociados con obesidad. Los adipocitos estimulados por señales de origen infeccioso o inflamatorio secretan muchos mediadores de la inflamación, que incluyen TNF- $\alpha$ , PAI-1, MCP-1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, factor inhibidor de leucemia, factor de crecimiento del hepatocito y moduladores inflamatorios potentes como la leptina, la adiponectina y la resistina. Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene fibroblastos, preadipocitos y macrófagos que residen en este tejido. Se sabe que los macrófagos son contribuyentes cruciales en el proceso inflamatorio<sup>3,12</sup>.

Los macrófagos han sido implicados también en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación inducida por la obesidad en el tejido adiposo, y la producción de muchas de las moléculas proinflamatorias secretadas por el tejido adiposo<sup>13</sup>. Un dato importante a resaltar es la expresión genética de ambas células pues de acuerdo a estudios es afín: los macrófagos expresan la mayoría de los productos proteicos genéticos del adipocito, como las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP-aP2, por sus siglas en inglés) y el PPAR, mientras que los adipocitos pueden expresar muchas proteínas que podrían considerarse exclusivas de genes proinflamatorios de macrófagos, tales como TNF- $\alpha$  y IL-6. Los macrófagos pueden atraer, englobar y almacenar lípidos para convertirse en células espumosas ateroscleróticas<sup>14</sup>. Los preadipocitos bajo ciertas circunstancias pueden presentar propiedades fagocíticas y antimicrobianas, y pueden tener la capacidad de diferenciarse en macrófagos<sup>15</sup>. Estos hallazgos indican que la obesidad se caracteriza por una acumulación de macrófagos en el tejido adiposo, y agregan una nueva dimensión en la manera como debemos entender e interpretar el comienzo de la obesidad y su vincula relación con los procesos inflamatorios que ocurren simultáneamente<sup>16</sup>. Se ha podido determinar que el número de macrófagos presentes en el tejido adiposo se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal, y además se podría decir también estos macrófagos podrían contribuir al crecimiento de la masa grasa corporal<sup>17</sup>.

El objetivo principal de este estudio fue conocer si las poblaciones leucocitarias específicamente la cantidad y activación de células presentadoras de antígeno CD14 y CD19 se veían aumentadas en los grupos de animales suplementados con edulcorantes artificiales en ambos sexos y conocer la expresión de las moléculas de MHC-I y II.

## 7.6. *Material y Métodos*

**Animales y grupos experimentales:** Se criaron ratones de la cepa BALB/c en condiciones de temperatura constante aproximada de 23° C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas con acceso a alimento y agua (*Ad libitum*). Se siguieron las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales en laboratorio, según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. A las 8 semanas de edad, se formaron 4 grupos experimentales con 6 ratones hembra y 6 machos cada uno, tres ratones por caja, separándolos de la siguiente forma: control (sin suplementación de edulcorante), sacarosa (10g/100 mL de agua purificada), sucralosa (un sobre comercial de 1 g/100 mL de agua purificada (cada sobre contiene 1 g de edulcorante) y estevia (un sobre comercial de 1 g/100 mL de agua purificada (cada sobre contiene 1 g de edulcorante), la suplementación se realizó con ayuda del bebedero, esta solución fue cambiada por una nueva diariamente y a la misma hora, durante 6 semanas. La concentración de las tres soluciones tiene la finalidad de equiparar el sabor dulce entre los grupos de estudio y proporcionar una cantidad similar de edulcorante a la que utilizan habitualmente los seres humanos. Se evaluó diariamente y a la misma hora la cantidad de agua y alimento consumido y se midió semanalmente el peso corporal. Al término del periodo de tratamiento, se sacrificó a los animales por anestesia vía intraperitoneal con 50 µL de pentobarbital sódico por cada 25 g de peso del ratón y se procedió con la disección del tejido adiposo

**Obtención del tejido adiposo:** Una vez anestesiados los animales, se procedió a realizar la disección del tejido adiposo, realizando un corte por la línea media ventral, separando la piel del músculo para exponer la cavidad abdominal. Para identificar el tejido adiposo, la disección se hizo siguiendo la forma de la piel del animal con ayuda de un microscopio óptico, identificando el tejido gonadal y aislandolo cuidadosamente, posteriormente fue colocado en una caja de Petri en hielo con PBS para realizar un lavado y continuar el proceso.

**Aislamiento de leucocitos de tejido adiposo:** Las muestras se colocaron en cajas de Petri con 2 mL de DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) 1X (KCl 200 mg, NaCl 8000 mg, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.160 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg), sin Mg o Ca, suplementado con 0.5% de BSA (albumina sérica bovina), sobre cama de hielo. El tejido se corta en piezas finas y se transfiere a tubos cónicos de 50 mL para su digestión enzimática, vertiendo el homogeneizado y enjuagando con 1 mL de DPBS y 3 mL de colagenasa tipo I (C0130, Sigma). Seguido de ese paso, procedimos a incubar en baño maría a 37 °C durante 20 min con agitación intermitentes. Las células separadas se pasaron a través de un filtro de 70 micras (22363548, Fisherbrand), añadiendo 10 mL de DPBS a tubos cónicos nuevos de 50 mL. En seguida, se centrifugó a 2,200 rpm durante 15 min a 4 °C. Transcurrido ese tiempo, procedimos a decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento celular en 3 mL de buffer ACK (buffer de lisis de eritrocitos, (1.652 g NH<sub>4</sub>Cl, 0.2 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0074 g EDTA), con el objetivo de lisar los eritrocitos contaminantes; adicionalmente, se añadieron 7 mL de buffer FACS (1X DPBS, sin Ca o Mg, 2 mM

EDTA, y 1% suero fetal bovino) y la suspensión celular se centrifugó a 2,200 rpm durante 15 min a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el sedimento de células fue resuspendido en 7 mL de buffer FACS. Las muestras se colocaron en hielo y se procedió al conteo celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano en dilución 1:10 (90 µL colorante, 10 µL de suspensión celular), empleando un hemocitómetro.

**Citometría de flujo:**  $1 \times 10^6$  células se colocaron en tubos de 5 mL para citómetro y se incubaron durante 45 min con anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos: CD19-FITC (Cat.115506, Biolegend), CD14-APC (Cat. 123312, Biolegend), CD45-APC (Cat. 147708, Biolegend), MHC-I-PE (Cat.12-5998-81, e-Biosciences) y MHC-II-PE-Cy5 (Cat. 107611, Biolegend). Los anticuerpos se emplearon en las concentraciones sugeridas por el fabricante. Al término de la incubación, las muestras se lavaron con 1 mL de solución FACS y se procedió al análisis en un citómetro de flujo BD Accuri C6, empleando el software del mismo equipo. El análisis estadístico se realizó con los programas IBM SPSS versión 23 y Graph Pad Prism 6.

## 7.7. Resultados

### **Incremento en la frecuencia de leucocitos en tejido adiposo gonadal de ratones suplementados con edulcorantes.**

Diferentes investigaciones postulan que la acumulación de leucocitos en el tejido adiposo es un proceso importante en el establecimiento de los procesos inflamatorios crónicos observados en individuos que cursan con obesidad. Para identificar la presencia de leucocitos dentro del tejido adiposo gonadal en ratones que fueron suplementados con edulcorantes, empleamos citometría de flujo para cuantificar leucocitos totales, utilizando el marcador CD45<sup>+</sup> para identificarlos.

Nuestros resultados muestran un incremento significativo en la frecuencia de células CD45<sup>+</sup> (leucocitos totales) en el tejido adiposo gonadal de las hembras suplementadas con sacarosa (67.6 ± 4.1%) (3, 588,100 células), sucralosa (66.1 ± 3.4%), (3, 701,600 células) y estevia (63.8 ± 5.0%), (3,636,600 células), en comparación con el grupo control (41.5 ± 1.5%), (2,091,000 células), (p<0.05, **Fig. 1B y C**). En contraste, en ratones macho las diferencias significativas se encontraron en los grupo sacarosa (68.4 ± 6.0%), (3, 604,000 células) y estevia (67.1 ± 3.4%), (3, 819,000 células), siendo estos grupos los que reportaron mayor porcentaje de células CD45<sup>+</sup> en tejido adiposo gonadal comparados el grupo control (47.3± 5.0%), (2,412,300 células), (p<0.05, **Fig. 1E y F**). El grupo sucralosa mostró un incremento no significativo con respecto al control (51.7 ± 6.0%), (2, 763,200 células). Los datos sugieren que los ratones que consumen edulcorantes acumulan una mayor proporción de leucocitos en el tejido adiposo gonadal en comparación con ratones sin suplementación.

### **Alteraciones en las frecuencias de células CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup> en tejido adiposo gonadal de ratones su**

Con el fin de determinar la presencia de macrófagos y linfocitos B en el tejido adiposo gonadal, procedimos a analizar las poblaciones leucocitarias extraídas del mismo tejido, empleando anticuerpos contra los marcadores CD14 y CD19. De manera similar a lo observado en el análisis previo, los datos obtenidos muestran que los grupos de hembras suplementados con sacarosa (21.8 ± 4.3%), (1,128,900 células) y sucralosa (22.2 ± 3.3%), (1,232,000 células) y estevia (20.1 ± 4.2%), (1,140,000 células) presentan una frecuencia significativamente mayor de células CD14<sup>+</sup> en el tejido adiposo gonadal, comparados con el grupo control (6.8 ± 1.6%), (346,800 células), (p<0.05, **Fig. 2B y C**). Por otra parte, los datos arrojados por las poblaciones obtenidas del tejido adiposo gonadal de ratones machos muestran diferencias significativas en los grupos sacarosa (19.6 ± 1.8%), (1, 038,800 células), comparados con el grupo control (13.6 ± 1.3%), (693,600 células), (p<0.05, **Fig. 2E y F**). El grupo estevia no mostró diferencias significativas con respecto al control (16.4 ± 1.6%), (923,400 células), (p<0.05), tampoco así el grupo sucralosa (14.5 ± 1.7%), (812,000 células).

De forma similar, el análisis de la frecuencia de células CD19<sup>+</sup> en el tejido adiposo gonadal en hembras muestra diferencias significativas en el grupo sucralosa (69.4 ± 5.7%), (3, 886,400 células) en relación

al grupo control ( $38.2 \pm 8.4\%$ ), (1,861,500 células) ( $p < 0.05$ , **Fig. 3B y C**). En este caso, los grupos sacarosa ( $44.9 \pm 4.3\%$ ), (2, 379,700 células) y estevia ( $38.2 \pm 8.3\%$ ), (2,177,400 células) no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En contraste, los resultados en ratones macho únicamente mostraron una diferencia significativa en los grupos sucralosa ( $38.1 \pm 2.6\%$ ), (1,920,800 células) y estevia ( $36.8 \pm 4.7\%$ ), (2,097,600 células) comparado con el grupo control ( $20.9 \pm 3.2\%$ ), (1,025,100 células), mientras que el grupo sacarosa ( $34.4 \pm 2.1\%$ ), (2,019,300 células) no obtuvo datos estadísticamente significativos (**Fig. 3E y F**).

### **Expresión de moléculas MHC clase I y II por leucocitos en tejido adiposo gonadal de ratones suplementados con edulcorantes.**

Un objetivo más de este estudio fue determinar la expresión de los marcadores de superficie MHC clase I y II en los grupos de células analizadas, puesto que estas moléculas son esenciales en la presentación de antígenos por macrófagos y linfocitos B, incrementando su expresión cuando existe activación celular durante las respuestas inflamatorias<sup>18</sup>. Con relación a las células CD14<sup>+</sup>, nuestros datos muestran que la frecuencia de células MHC-I<sup>+</sup> no fue significativamente mayor en ningún grupo de hembras suplementadas: sacarosa ( $100.0 \pm 0.0\%$ ), sucralosa ( $99.1 \pm 0.1\%$ ) y estevia ( $100 \pm 0\%$ ) en comparación con el grupo control ( $99.8 \pm 0.2\%$ ), (**Fig. 4C**). Por otra parte, en los machos tampoco se observó una diferencia significativa en los ratones suplementados con sucralosa ( $99.5 \pm 0.1\%$ ), sacarosa ( $100 \pm 0\%$ ) y estevia ( $99.8 \pm 0.3\%$ ) comparados con el grupo control ( $99.7 \pm 0.5\%$ ), (**Fig. 4E**).

En contraste, el análisis de la expresión de moléculas MHC-II<sup>+</sup> en macrófagos en ratones hembra no observamos un incremento o disminución significativa reportando los siguientes datos: sacarosa ( $97.9 \pm 0.5\%$ ) estevia ( $98.5 \pm 0.5\%$ ) y sucralosa ( $97.7 \pm 0.3\%$ ) comparados con el control ( $99.8 \pm 0.1\%$ ), (**Fig. 4D**). En los machos, los grupos suplementados con sacarosa ( $98.1 \pm 0.3\%$ ), estevia ( $98.0 \pm 0.3\%$ ) y sucralosa ( $98.2 \pm 0.5\%$ ) no reportaron diferencias en el porcentaje de células MHC-II<sup>+</sup>, comparados con el grupo control ( $98.1 \pm 0.2\%$ ), (**Fig. 4F**).

En relación a la expresión de estos marcadores en células CD19<sup>+</sup>, en hembras, los resultados obtenidos no reflejaron diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control. Para el marcador MHC-I se encontraron los siguientes datos: control  $98.8 \pm 0.2\%$ ; sacarosa  $98.7 \pm 0.6\%$ ; sucralosa  $99.1 \pm 0.6\%$  y; estevia  $98.5 \pm 0.4\%$ . (**Fig. 5C**). Por su parte, para el marcador MHC-II, no obtuvo resultados diferentes entre: sacarosa ( $46.9 \pm 0.8\%$ ); estevia ( $51.2 \pm 0.7\%$ ) y sucralosa ( $44.9 \pm 0.8\%$ ); comparado con el grupo control ( $43.2 \pm 0.1\%$ ), (**Fig. 5D**).

En ratones macho, los resultados para el marcador MHC-I en los grupos de los edulcorantes sacarosa ( $98.8 \pm 0.4\%$ ), sucralosa ( $99.1 \pm 0.2\%$ ) o estevia ( $98.8 \pm 0.4\%$ ) no muestran diferencias significativas comparados con el control ( $98.5 \pm 0.5\%$ ) (**Fig. 5E**). De la misma forma, no encontramos diferencias

significativas para la frecuencia de células CD19<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup> en los grupos sacarosa (50.1 ± 3.6%), sucralosa (44.4 ± 3.3%) o estevia (45.3 ± 3.1%) en relación al grupo control (43.3 ± 3.8%) (**Fig. 5F**).

Adicionalmente, el análisis de intensidad media de fluorescencia (IMF) para estos marcadores en células CD14<sup>+</sup> indica que, en ratones hembra, los grupos suplementados con sacarosa (253,253 ± 10,100), sucralosa (239,652.5 ± 9,600) o estevia (241,795.7 ± 8,800), presentaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad media de fluorescencia para MHC-I comparados contra el control (283,915.30 ± 9,620), (p< 0.05, **Fig. 4G**). De forma similar se observaron diferencias significativas en la IMF para el marcador MHC-II en ratones hembras en el grupo sacarosa (1, 244,967.1 ± 195,628), comparados con el grupo control (458,036.2 ± 191,989); sucralosa (826,477.6 ± 197,543) y estevia (10, 200,615.7 ± 246,660) no reportaron diferencias estadísticamente significativas (p< 0.05, **Fig. 4H**). Por su parte, en ratones macho, la IMF para MHC-I en los grupos suplementados con edulcorantes no mostró incrementos estadísticamente significativos comparados con el grupo control (sacarosa 152,903 ± 3,561.4; sucralosa 152,679.5 ± 6,712.1; estevia 149,188.6 ± 2,798.3 y; control 160,955.7 ± 8,332.1), (**Fig. 4I**). No obstante, en la intensidad media de fluorescencia del marcador MHC-II en machos presentó un incremento significativo en el grupo suplementado con sacarosa (1, 245,879 ± 197,798); comparados con el control (537,065.5 ± 29,445.5), (p<0.05, **Fig. 4J**). Los grupos sucralosa (1, 018,015 ± 156,297.5) y estevia (1, 126,581 ± 183,204.7), no obtuvieron datos estadísticamente significativos, aunque sí se observa una tendencia a aumentar comparados con el grupo control.

En contraste, el análisis de la intensidad media de fluorescencia de MHC-I y MHC-II en células CD19<sup>+</sup> no mostró diferencias significativas entre los grupos de ratones hembra suplementados con edulcorantes y el control (MHC-I: sacarosa (254,690.6 ± 9,620), sucralosa (253,630.2 ± 10,100) y estevia (242,253.1 ± 9,600.0), y grupo control (244,917.4 ± 8800.0), (MHC-II: sacarosa 1,080,805 ± 190,000; sucralosa 1,265,495 ± 190,000; estevia 846,144.5 ± 240,000; control 1,029,251 ± 180,000) (**Fig. 5G y H**). En ratones macho, la expresión de MHC-I no mostró diferencias significativas entre grupos (sacarosa 153,939.7 ± 3,594.6; sucralosa 156,242.5 ± 5,965; estevia 151,549.7 ± 3,013.5; control 168,476.7 ± 7,869). Sin embargo, la expresión del marcador MHC-II demostró incremento estadísticamente significativo en los grupos sacarosa (1,274,219 ± 194,164.7) y estevia (1,147,368 ± 179,721.1), p<0.05, comparados con el grupo control (404,784.3 ± 146,995), mientras que el grupo sucralosa no mostró diferencias (**Fig. 5I y J**).

## 7.8. *Discusión*

El estado nutricional puede influir tanto en lo innato como en lo adaptativo los sistemas inmunológicos. De hecho, numerosos estudios han identificado un vínculo entre la nutrición y los macrófagos. La obesidad conduce a una acumulación de macrófagos pro-inflamatorios en el tejido adiposo tanto en modelos murinos como en humanos; estos macrófagos inflamatorios comprenden 40-60 % de tejido inmune en la obesidad y producen citoquinas pro-inflamatorias<sup>19</sup>.

Por lo tanto conocer si el consumo crónico de edulcorante tendría efecto en las poblaciones leucocitarias del tejido adiposo resultó crucial, con el fin de identificar el tipo de respuesta inmunológica, se realizaron tinciones con fluorocromos conjugados para poblaciones celulares CD45<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y marcadores de superficie MHC I y II. En células CD45<sup>+</sup> en tejido adiposo gonadal en hembras presentó mayor porcentaje de células el grupo sucralosa y estevia, mientras que en machos las diferencias se encontraron el grupo sacarosa y estevia, ( $p < 0.05$  comparado con control). Este dato nos brinda información relevante al tránsito de leucocitos totales, que están vinculadas con la obesidad y procesos inflamatorios crónicos que a menudo dan lugar a diabetes mellitus tipo 2. Los edulcorantes alteran significativamente la prueba de sobrecarga oral de glucosa, induciendo un perfil de insulinoresistencia, que a largo plazo puede favorecer el sobrepeso<sup>20</sup>. La información obtenida se confirma con la investigación realizada en 2004 donde investigadores concluyeron que, la inflamación del tejido adiposo inducida por la obesidad es controlada por una diversa red de leucocitos compuestos por múltiples reguladores celulares de la inmunidad innata y adaptativa<sup>21</sup>.

En el análisis realizado se calculó un aumento en las poblaciones en el recuento de células y en el porcentaje de células obtenidas para CD14<sup>+</sup>, las diferencias fueron encontradas en los grupos suplementados con sacarosa y sucralosa para ambos sexos, ( $p < 0.05$  comparado con control). Podemos vincular un aumento de estas células al consumo crónico de los edulcorantes puesto que los animales de experimentación (de ratones BALB/c), fueron alimentados con una dieta completa y equilibrada, en macro y micro nutrientes, además que la cepa que se utilizó no responde al aumento de peso genéticamente, así se asegura que de ganancia de peso es directamente del agente causal a medir en esta cepa murina. Además investigadores proponen que el contenido de macrófagos se correlaciona positivamente con los trastornos metabólicos asociados con la obesidad en roedores y humanos<sup>22</sup>.

Para el análisis del porcentaje de células CD19<sup>+</sup> en el tejido adiposo gonadal de ratones hembras y machos las diferencias significativas se hallaron en el grupo sucralosa ( $p < 0.05$  comparado con control), estos resultados sugieren que el consumo de sucralosa podría estar estimulando la respuesta inmunitaria humoral. Siendo de nuestro interés conocer como afectaba el consumo de edulcorantes en poblaciones linfocitarias, hemos encontrado que el número de linfocitos B y macrófagos presentan una diferencia en aquellos grupo que consumieron: sucralosa, suponiendo así que aunque este

edulcorante no contiene glucosa, el origen del producto tiene efectos en el consumo energético, el aumento de peso y el incremento de las poblaciones infiltradas de células presentadoras de antígeno; y sacarosa concluyendo que el aporte calórico desequilibrado y crónico del azúcar afecta en la balance positivo de la alimentación y como resultado existe el aumento de peso, que condiciona en este proyecto el aumento de las células presentadoras de antígeno, de esta forma se rechaza la hipótesis nula, puesto que se analizaron cambios en el aumento de células CD14<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>.

Muchas pruebas apoyan un papel de las células T pro-inflamatorias y los macrófagos promueven la inflamación local en tejidos como el tejido adiposo visceral. Más recientemente, se ha sugerido que las células B actúan como un activador en la orquestación en estos procesos. Las células B se infiltran en el tejido adiposo y muestran cambios funcionales y fenotípicos en la respuesta a la obesidad inducida por la dieta, en nuestro estudio logramos identificar cambios fenotípicos en el tejido adiposo de animales suplementados. Se ha vinculado a las células B como contribuyentes a la resistencia a la insulina mediante la presentación de antígenos a las células T, pues este proceso da pie al inicio de secretar citoquinas inflamatorias y producción de anticuerpos patógenos<sup>23,24</sup>.

En nuestros resultados el grupo en tratamiento con sucralosa tanto en machos como en hembras es el que se mostró con diferencias estadísticamente significativas, aumentando las poblaciones tanto en el porcentaje como el conteo en número de células, estos resultados nos hablan de un proceso probable de infiltración de células B para mediar el descontrol al que se somete el animal bajo suplementación crónica, contribuyendo a una cascada pro inflamatoria. A través de estos procesos, las células B tienen la capacidad única de modular la producción de citoquinas de células T y macrófagos además de la polarización a múltiples niveles, y por lo tanto, potencialmente representan un nuevo objetivo terapéutico para la terapia inmunológica<sup>25,26</sup>.

Además de producir citocinas, las células B también son células importantes presentando antígenos y través de esta actividad pueden influenciar profundamente las células T. En obesidad inducida por dieta. Las células B pueden interactuar con células T de una manera dependiente del MHC para inducir la expresión del IFN $\gamma$ , que contribuye a la inflamación local y sistémica y la resistencia a la insulina que está asociada<sup>18</sup>.

Como parte de las moléculas que regulan la respuesta inmunológica el porcentaje de células que expresan MHC clase I o clase II en monocitos/macrófagos, se comportaron para hembras y machos muy similares, no se hallaron diferencias significativas comparadas con el grupo control, sin embargo, si se encontraron algunas diferencias en la intensidad media de fluorescencia, lo que nos puede indicar que las células que expresan estas moléculas presentan más moléculas de MHC en su superficie, lo que puede aumentar la presentación de antígenos a los linfocitos T.

Este fue un estudio en un modelo murino, en el que se trabajó con del sistema inmunológico, en especial de las poblaciones leucocitarias y células presentadoras de antígeno y su relación con la alimentación y el consumo crónico de edulcorantes artificiales, ya que en la actualidad el consumo de edulcorantes se ha tornado muy público. Esta investigación demuestra que el consumo de sucralosa y sacarosa puede incrementar la respuesta inmunológica pro-inflamatoria; pero aún es necesario realizar otros estudios para conocer más a detalle este efecto inmunológico.

## 7.9. Conclusiones

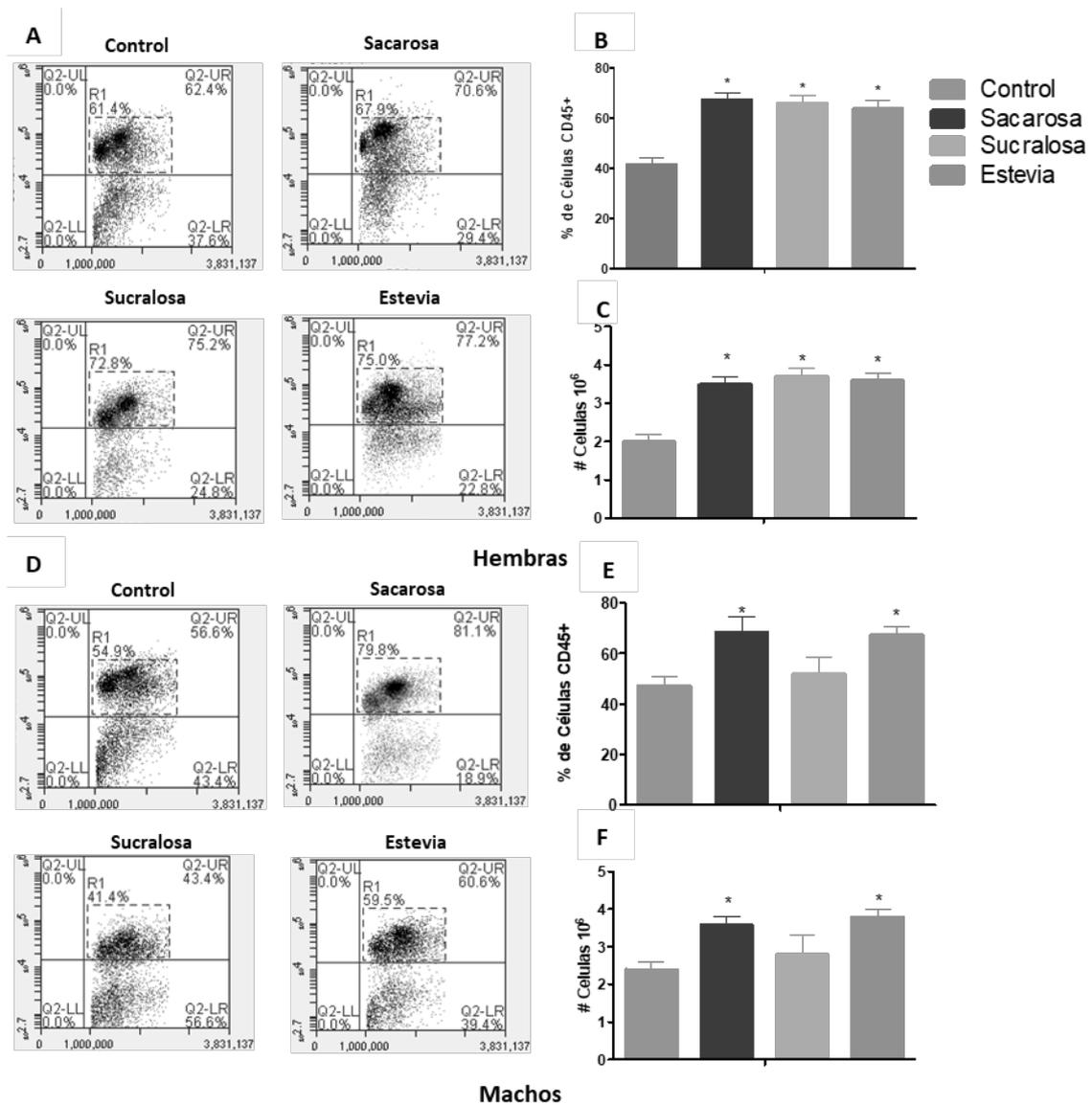
El estudio nos permite concluir que en el análisis para citometría de flujo las poblaciones con más células CD45<sup>+</sup> fueron, en hembras: sacarosa, sucralosa y estevia, mientras que en macho fueron sacarosa y estevia, lo que demuestra que el reclutamiento de leucocitos en el tejido adiposo de ratones suplementados con edulcorantes comerciales aumenta comparado con el grupo control.

En cuanto a las poblaciones CD14<sup>+</sup> los datos estadísticamente significativos se hallaron para hembras en los grupos sacarosa sucralosa y estevia para machos en sacarosa, este dato puede deberse al aumento en el consumo energético que tienen estos dos grupos. Para el porcentaje de células CD19<sup>+</sup> fueron estadísticamente significativas aquellas con suplementación de sucralosa.

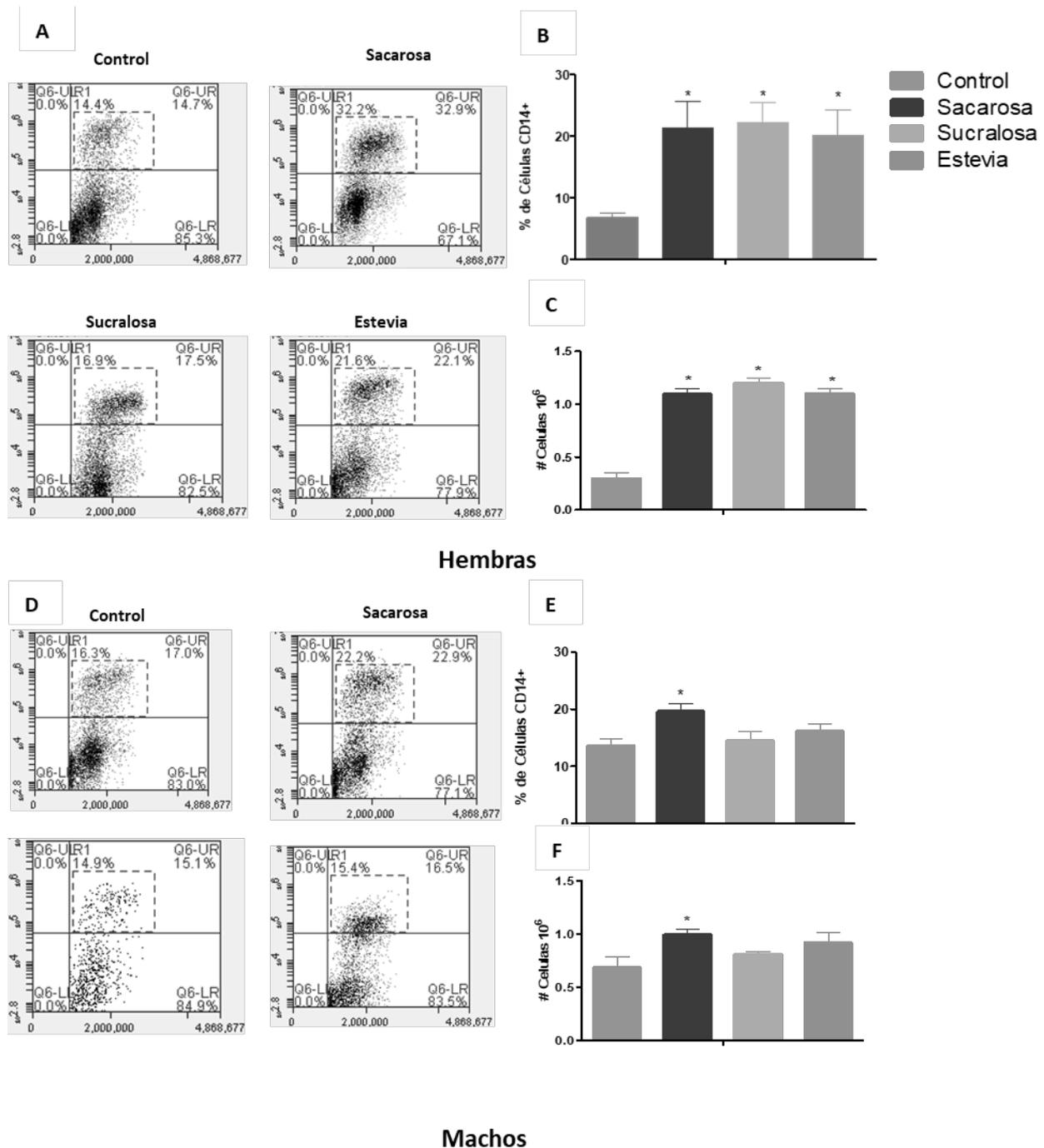
El porcentaje de células que expresan MHC-I- II en monocitos/macrófagos y linfocitos B no reportaron diferencias significativas en los grupos con tratamiento comparadas con el grupo control, pero si hubo mayor expresión en el número de moléculas del MHC por célula.

---

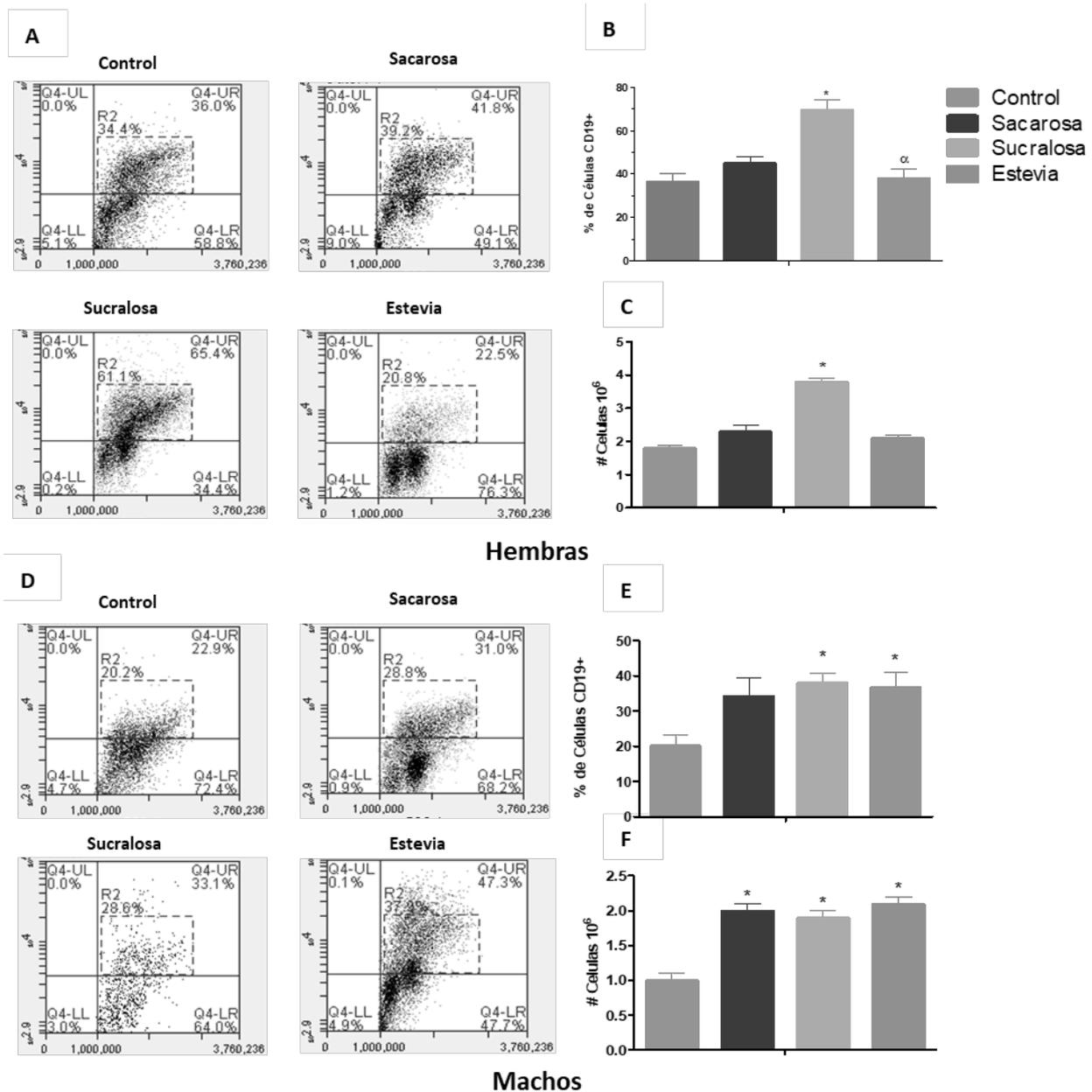
## 7.10. Figuras



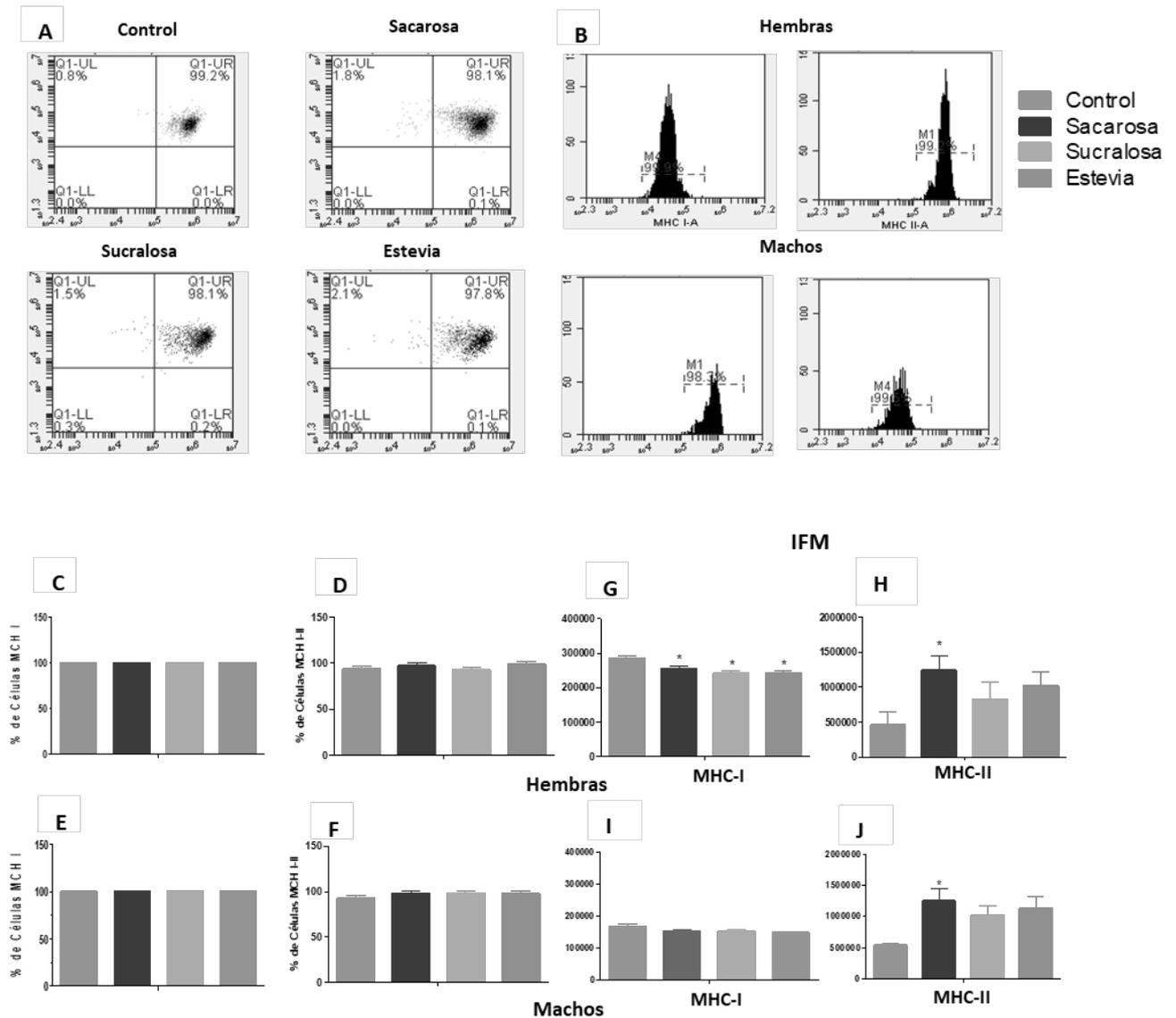
**Figura 1. Porcentaje de células que expresan CD45<sup>+</sup> (leucocitos totales) en el tejido adiposo gonadal. A y D) Dot plots del porcentaje de células positivas para CD45<sup>+</sup> (machos y hembras), en la sección R1. B y E) Porcentaje de células CD45<sup>+</sup>. C y F) Número total de células CD45<sup>+</sup>. n=6 animales por grupo/sexo. Los valores representan la media ± E.E. \*p<0.05 comparado con el grupo control.**



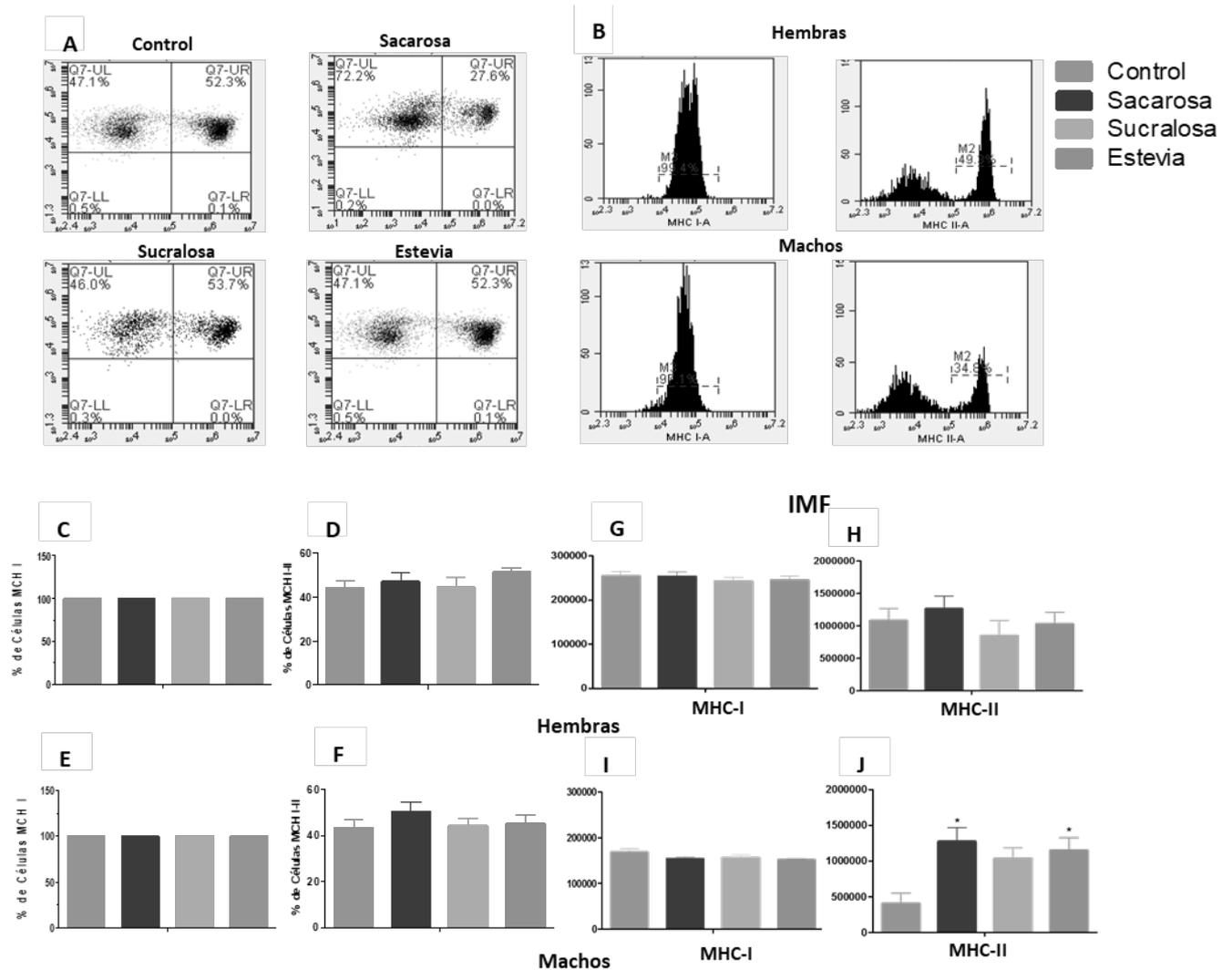
**Figura 2. Porcentaje de células que expresan CD14<sup>+</sup> (macrófagos y monocitos) en el tejido adiposo gonadal. A y D) Dot plots del porcentaje de células positivas para CD14<sup>+</sup> (machos y hembras), en la sección R1. B y E) Porcentaje de células CD14<sup>+</sup>. C y F) Número total de células CD14<sup>+</sup>. n=6 animales por grupo/sexo. Los valores representan la media ± E.E. \*p<0.05 comparado con el grupo control.**



**Figura 3. Porcentaje de células que expresan CD19<sup>+</sup> (linfocitos B) en el tejido adiposo gonadal. A y D) Dot plots del porcentaje de células positivas para CD19<sup>+</sup> (hembras y machos), en la sección R1. B y E) Porcentaje de células CD19<sup>+</sup>. C y F) Número total de células CD19<sup>+</sup>. n=6 animales por grupo/ sexo. Los valores representan la media  $\pm$  E.E. \*p<0.05 comparado con el grupo control.  $\alpha$  p<0.05 estevia comparado con sucralosa.**



**Figura 4. Porcentaje de células que expresan MHC-I y doble positivas en células CD14<sup>+</sup> del tejido adiposo gonadal. A)** Dot plots del porcentaje de células positivas para MHC-I y MHC-II en la región UL y UR (un dot plot representativo por grupo de edulcorante). **B)** Histograma de células positivas al marcador MHC-I y MHC-II (hembras y machos). **C y E)** Porcentaje de células MHC-I<sup>+</sup>. **D y F)** Porcentaje de células MHC-II<sup>+</sup>. **G e I)** Intensidad media de fluorescencia (IMF) para MHC-I. **H y J)** IMF para MHC-II. n=6 animales por grupo/sexo. Los valores representan la media ± E.E. \* p<0.05 comparado con el grupo control.



**Figura 5. Porcentaje de células que expresan MHC-I y doble positivas en células CD19<sup>+</sup> del tejido adiposo gonadal.** A) Dot plots del porcentaje de células positivas para MHC-I y MHC-II en la región UL y UR (un dot plot representativo por grupo de edulcorante). B) Histograma de células positivas al marcador MHC-I y MHC-II (hembras y machos). C y E) Porcentaje de células MHC-I<sup>+</sup>. D y F) Porcentaje de células MHC-II<sup>+</sup>. G e I) IMF para MHC-I. H y J) IMF para MHC-II. n=6 animales por grupo/sexo. Los valores representan la media ± E.E. \* p<0.05 comparado con el grupo control.

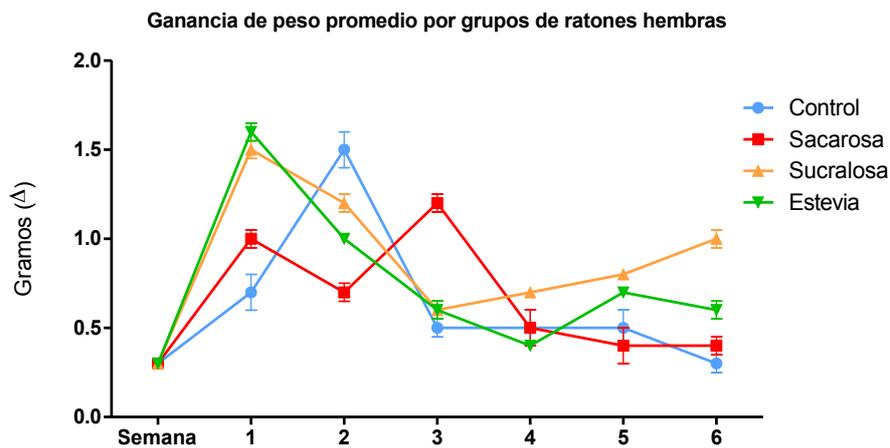
### 7.11. Referencias

1. States U, *et al.* Prevalence of Obesity Among Adults and Youth : 2011–2014, (2015).
2. Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol Metab.* 24: 431–41, (2013).
3. Miranda-Garduño LM, *et al.* Obesidad , inflamación y diabetes. *Gaceta médica de México.* 144: 39–46, (2008).
4. Reyes M. Características biológicas del tejido adiposo : el adipocito como célula endocrina. *Rev. Med. Clin. Condes.* 23: 136–144, (2012).
5. Awad AB, *et al.* Adipose Tissue and Inflammation. *Der Hautarzt.* 61, (2010).
6. Marin P, *et al.* The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 41(11): 1242-1248, (1992).
7. Ghorbani M, *et al.* Hypertrophy of Brown adipocytes in Brown and White adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 54: 121-131, (1997).
8. Wing EJ, *et al.* Acute starvation in mice reduces the number of T cells and suppresses the development of T-cell-mediated immunity. *Immunology.* 63: 677-682, (1988).
9. PoherA, *et al.* Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity / insulin resistance. *Front Physiol.* 6: 1–9, (2015).
10. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutrition Research Reviews.* 18: 63-76, (2005).
11. Mcnelis JC, *et al.* Review Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity* 41: 36–48, (2014).
12. Haase J. *et al.* Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *57: 562–571, (2014).*
13. Nishimura S, *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 15: 914-20, (2009).
14. Bastarrachea RA, *et al.* Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta médica de México.* 143: 505–512, (2007).
15. Duque-Correa M, *et al.* Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología.* 26: 73–86, (2007).
16. Xu H, *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* 112: 1821-1830, (2003).

17. Weisberg SP, *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112: 1796-1808, (2012).
18. Winer DA, *et al.* B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. *Nat Med.* 17: 610–617, (2011).
19. Oh DY, *et al.* Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes.* 61: 346–354, (2012).
20. Burke MV, *et al.* Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiol. Behav.* 152: 381-388, (2015).
21. Muñoz M, *et al.* Obesidad y sistema inmune. *Nutrición Hospitalaria.* 19: 319–324, (2004).
22. Rodríguez-Rodríguez E, *et al.* Obesidad, resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas: importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición Hospitalaria.* 24: 415–421, (2009).
23. Fengyang L. *et al.* Stevioside Suppressed Inflammatory Cytokine Secretion by Downregulation of NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. *Inflammation.* 35: 1669–1675, (2012).
24. Winer S, *et al.* Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4 T cells Control Glucose Homeostasis. *Nat. Med.* 15: 921–929, (2011).
25. Lynch L. *et al.* Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production. *Immunity.* 37: 574–587, (2012).
26. Sánchez-Muñoz F, *et al.* Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta médica de México.* 141: 505–512, (2005).

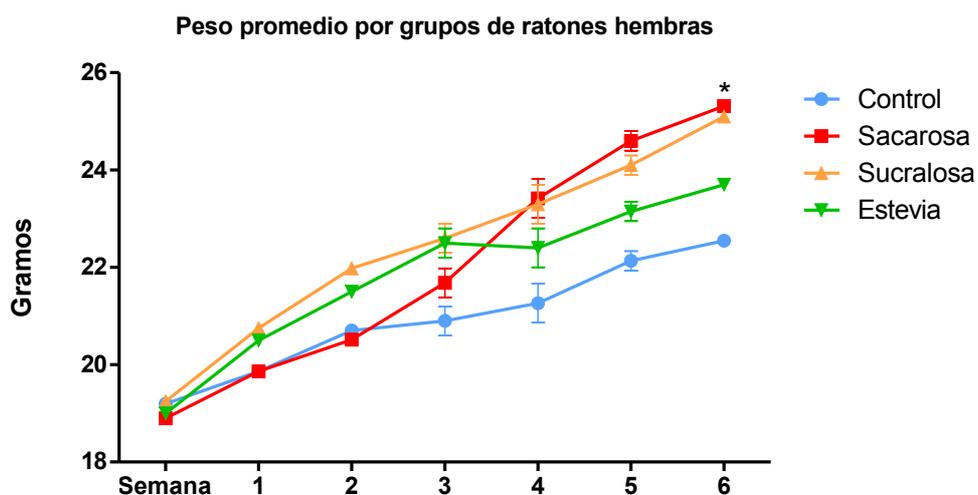
### 7.12. Resultados adicionales

En este estudio resulto muy importante conocer la variable del peso puesto que es un indicador fiable y de fácil acceso para muchos estudios además nos brinda la oportunidad de compararlo para conocer las diferencias de peso por semana entre lo diferentes grupos suplementados, para esto, se realizó un análisis obteniendo la media de ganancia de peso (delta) de los grupos por semana (Gráfica 1). El análisis estadístico no arrojó diferencias estadísticas en ningún grupo de las hembras.



**Gráfica 1. Ganancia de peso semanal promedio por grupo de ratones hembras.** Se muestra la ganancia de peso promedio en gramos, comparado por tratamiento de edulcorantes y grupo control, expresado en  $\Delta$ .  $n=6$  animales por grupo.

Se analizó el peso de los ratones semanalmente y a la misma hora, con el objetivo de determinar si el consumo de los edulcorantes tenía efecto en el aumento de peso. El grupo de hembras que mostró mayor peso fue el que consumió sacarosa (25.7 g en promedio) como se muestra en las gráfica 2.



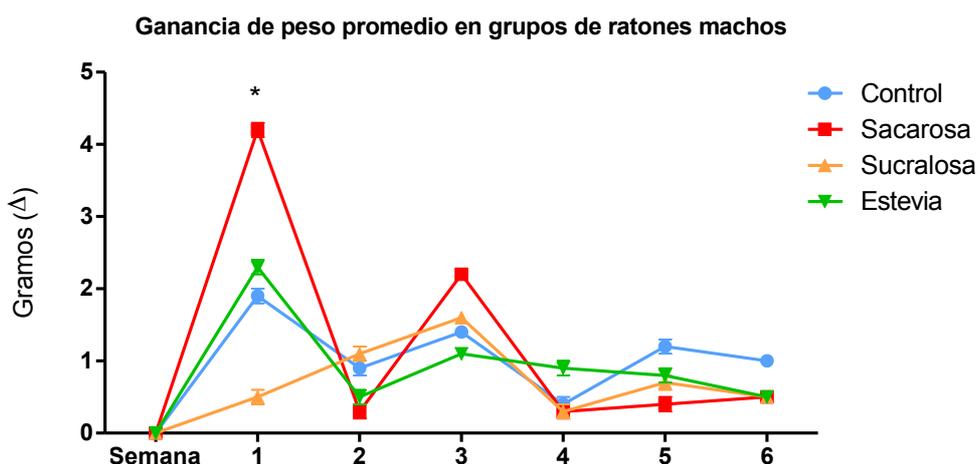
**Gráfica 2. Peso promedio semanal por grupo de ratones hembras.** Se muestra la ganancia de peso promedio por grupos de tratamiento y grupo control en gramos, durante las semanas de suplementación.  $n=6$  animales por grupo. \* $p=0.02$  sucralosa y sacarosa comparados con el grupo control.

En relacion a las gráficas antes presentadas se muestra en seguida en la tabla 5 el análisis estadístico de pesos de los animales en tratamiento (hembras). Donde se encontraron resultados estadísticamente significativos solo en la última semana de tratamiento, entre sacarosa ( $25.7 \pm 0.6$  g) y sucralosa ( $25.5 \pm 0.5$  g) comparado con el grupo control ( $22.1 \pm 0.6$  g).

	<b>Control</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Sacarosa</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Sucralosa</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Estevia</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Valor p*</b>
<b>Peso inicial</b>	19.20 $\pm$ 0.36	19.0 $\pm$ 0.36	19.06 $\pm$ 0.32	19.03 $\pm$ 0.77	0.956
<b>Semana 1</b>	19.86 $\pm$ 0.53	19.80 $\pm$ 0.57	20.76 $\pm$ 0.48	20.58 $\pm$ 0.58	0.546
<b>Semana 2</b>	20.70 $\pm$ 0.51	20.54 $\pm$ 0.59	21.98 $\pm$ 0.47	21.56 $\pm$ 0.55	0.205
<b>Semana 3</b>	20.90 $\pm$ 0.56	21.65 $\pm$ 0.48	22.60 $\pm$ 0.42	22.13 $\pm$ 0.53	0.149
<b>Semana 4</b>	21.26 $\pm$ 0.64	22.18 $\pm$ 0.66	23.34 $\pm$ 0.29	22.48 $\pm$ 0.62	0.106
<b>Semana 5</b>	22.13 $\pm$ 0.45	24.94 $\pm$ 0.40	24.14 $\pm$ 0.36	23.15 $\pm$ 0.74	0.119
<b>Semana 6</b>	22.15 $\pm$ 0.62	25.74 $\pm$ 0.62	25.58 $\pm$ 0.56	23.30 $\pm$ 0.89	0.02*

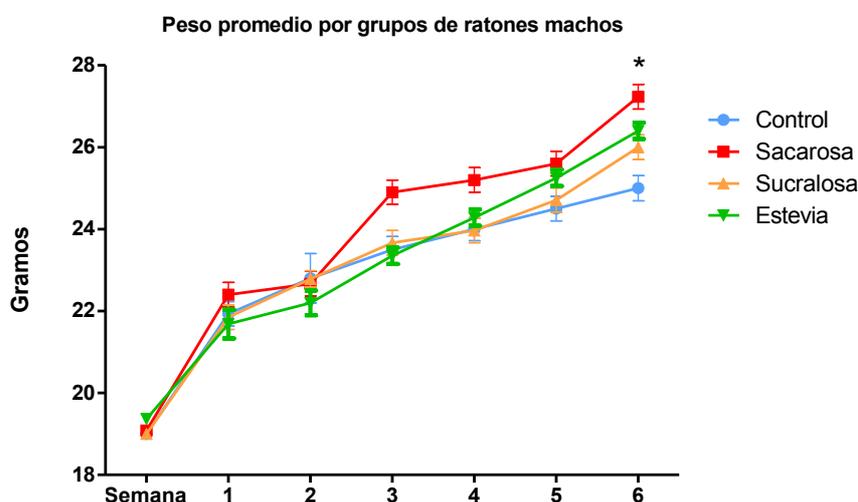
**Tabla 5. Valores corporales en ratones hembras con suministro de edulcorantes por 6 semanas.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. (error estándar) en gramos de peso, las diferencias entre los grupos, se consideran estadísticamente significas con un valor de  $p < 0.05$ ,  $n = 6$  animales por grupo. \* $p = 0.02$  sucralosa y sacarosa comparados con el grupo control.

En este estudio nos dimos a la tarea de analizar también la ganancia de peso de los grupos macho que conformaban los grupos de tratamiento, se obtuvo la ganancia de peso de los grupos de macho por semana (Gráfica 3). El análisis estadístico nos arrojó diferencias en la semana 1 entre el grupo sacarosa ( $4.2 \pm 1.7$  g) comparado con sucralosa ( $0.5 \pm 0.4$  g) y control ( $1.8 \pm 0.7$  g).



**Gráfica 3. Ganancia de peso promedio por grupo de ratones machos.** Se muestra la ganancia de peso promedio en gramos, comparado por tratamiento de edulcorantes y grupo control, expresado en  $\Delta$ .  $n = 6$  animales por grupo. \*  $p = 0.02$  sacarosa comparados con sucralosa y grupo control.

Por otro lado, en las siguientes graficas podemos visualizar la ganancia promedio por semana, en animales machos, donde podemos identificar que los grupos suplementados con edulcorantes comerciales aumentan gradualmente su peso; el grupo que más gano peso al final del estudio y reflejo diferencias estadísticas fue el grupo de sacarosa (27.2 g en promedio).



**Gráfica 4. Peso promedio por grupo de ratones machos.** Se muestra la ganancia de peso promedio por grupos de tratamiento y grupo control en gramos durante las semanas de suplementación. n=6 animales por grupo. \*p=0.038 sacarosa comparado con el grupo control.

En seguida se muestra el análisis estadístico de pesos de los animales machos en tratamiento, se puede resaltar el valor de p=0.038 en la ultima semana, esta diferencia se identificó en el grupo sacarosa comparado con el control.

	Control Media ± E.E.	Sacarosa Media ± E.E.	Sucralosa Media ± E.E.	Estevia Media ± E.E.	Valor p*
<b>Peso inicial</b>	19.1 ± 0.41	19.08 ± 0.15	19.33 ± 0.59	19.36 ± 0.34	0.822
<b>Semana 1</b>	21.93 ± 0.30	22.40 ± 0.82	21.85 ± 0.57	21.68 ± 0.35	0.883
<b>Semana 2</b>	22.80 ± 0.38	22.66 ± 0.80	22.78 ± 0.54	22.20 ± 0.30	0.848
<b>Semana 3</b>	23.50 ± 0.32	24.90 ± 0.95	23.66 ± 0.81	23.35 ± 0.49	0.442
<b>Semana 4</b>	24.33 ± 0.28	25.20 ± 0.88	23.96 ± 0.71	24.28 ± 0.58	0.593
<b>Semana 5</b>	24.86 ± 0.47	25.60 ± 0.82	24.70 ± 0.77	25.25 ± 0.59	0.803
<b>Semana 6</b>	25.00 ± 0.30	27.20 ± 0.76	26.38 ± 0.80	26.95 ± 0.48	0.038*

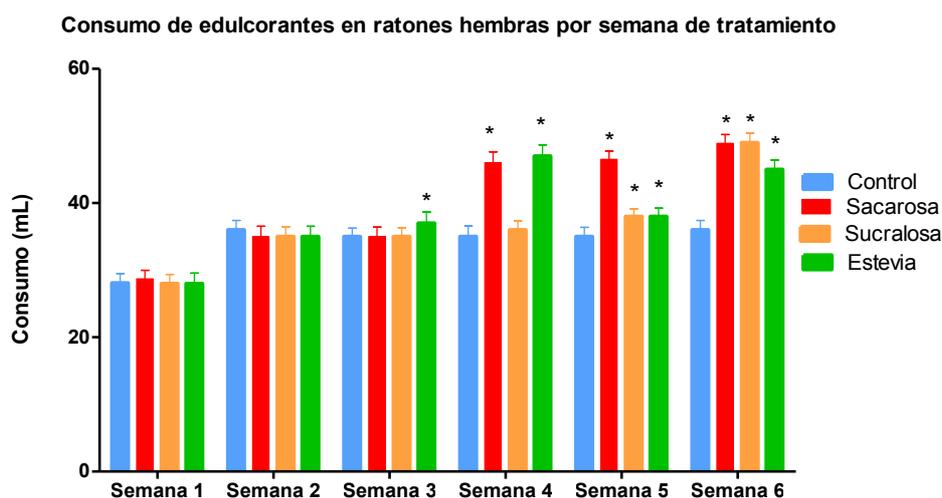
**Tabla 6. Valores corporales en ratones machos con suministro de edulcorantes por 6 semanas.** Los valores representan la media ± E.E. en gramos de peso, las diferencias entre los grupos, se consideran estadísticamente significas con un valor de p < 0.05. n=6 animales por grupo. \*p=0.038 sacarosa comparado con el grupo control.

Para conocer las posibles diferencias en el peso final entre los grupos de macho y hembras se realizó una prueba estadística (ANOVA univariado) la cual demostró que existen diferencias en los pesos de los animales suplementados, siendo un factor que repercute en los resultados el sexo de los animales (Tabla 7). Las diferencias que existen, se deben tanto por el tratamiento como por la variable sexo, en el análisis por grupos el control, sacarosa, sucralosa, y estevia, muestran diferencias al compararlos por el sexo.

Pruebas de efectos inter-sujetos		
Variable dependiente: Peso		
Origen	Media cuadrática	Sig.
Tratamiento	13.810	0.00*
Sexo	38.163	0.00*
tratamiento * sexo	5.246	0.041*

**Tabla 7. Prueba inter-sujetos en el peso final de ratones machos y hembras.** Con suministro de edulcorantes por 6 semanas.  $p < 0.05$ .  $n=6$  animales por grupo. \*  $p = 0.041$  comparando tratamiento y sexo.

Para conocer cómo influye el consumo de edulcorantes o agua se evaluó el consumo de bebida realizando mediciones diarias y a la misma hora. El grupo que presentó mayor consumo de líquido fue el suplementado con sacarosa (40 mL en promedio por semana), seguido por grupo estevia (38.9 mL en promedio por semana) y sucralosa (37.2 mL en promedio por semana), mientras que el grupo control tuvo un promedio por semana de 34.5 mL.



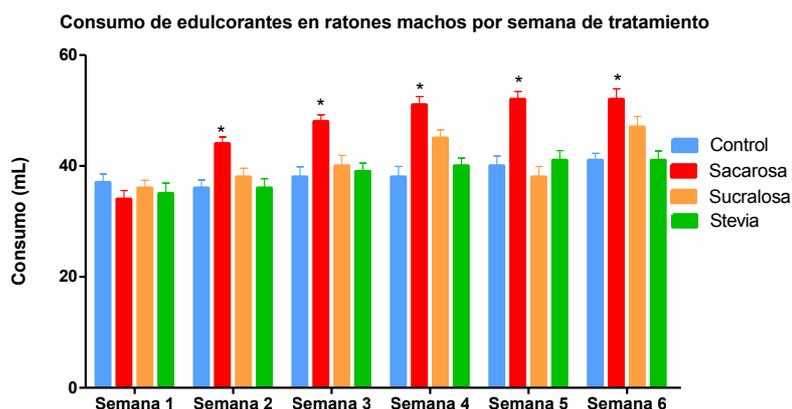
**Gráfica 5. Consumo promedio de edulcorantes o agua en ratones hembras.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. reportado en mL del consumo de edulcorante o agua. Se puede visualizar el consumo comparado por diferentes tratamientos durante 6 semanas de evolución.  $n=6$  animales por grupo. \*  $p < 0.05$  comparado con el grupo control.

En la siguiente tabla se muestra el análisis estadístico que se llevó a cabo para identificar diferencias estadísticamente significativas, encontrando resultados desde la semana 3 entre grupos y con el grupo control.

	<b>Control</b> Media ± E.E.	<b>Sacarosa</b> Media ± E.E.	<b>Sucralosa</b> Media ± E.E.	<b>Estevia</b> Media ± E.E.	<b>Valor p*</b>
<b>Semana 1</b>	28.00 ± 0.41	28.7 ± 0.28	28.4 ± 0.38	28.87 ± 0.57	0.189
<b>Semana 2</b>	36.0 ± 0.66	35.5 ± 0.55	35.6 ± 0.47	35.95 ± 0.55	0.531
<b>Semana 3</b>	35.75 ± 0.25	35.1 ± 43.2	35.95 ± 0.33	37.10 ± 0.67	0.003*
<b>Semana 4</b>	35.70 ± 0.56	46.10 ± 0.62	36.15 ± 0.34	47.90 ± 0.67	0.004 $\alpha$
<b>Semana 5</b>	35.6 ± 0.38	46.50 ± 0.21	38.15 ± 0.14	38.40 ± 0.26	0.008 $\beta$
<b>Semana 6</b>	36.80 ± 0.40	48.14 ± 0.89	49.60 ± 0.42	45.80 ± 0.40	0.001 $\beta$

**Tabla 8. Consumo de edulcorante o agua en ratones hembras por 6 semanas.** Los valores representan la media ± E.E. en gramos de peso, las diferencias entre los grupos, se consideran estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.05$  estevia comparado con el grupo control.  $\alpha$   $p < 0.05$  sacarosa y estevia comparado con el grupo control.  $\beta$   $p < 0.05$  sucralosa, sacarosa y estevia comparado con control.

A continuación, se reportan los datos obtenidos del consumo de edulcorantes en ratones machos, durante el tratamiento y los resultados fueron los siguientes: grupo sacarosa reportó mayor consumo (47.3 mL en promedio por semana), seguido por sucralosa (40.1 mL en promedio por semana) y estevia (39.0 mL en promedio por semana) por último el grupo control con un consumo de 38.9 mL en promedio por semana. Estos resultados se equiparan a los datos obtenidos en hembras, los resultados nos permiten conocer que existe una predilección por el consumo de bebidas azucaradas como sucede en otros estudios en cepas murinas y humanos<sup>98,99,100</sup>.



**Gráfica 7. Consumo promedio de edulcorantes o agua en ratones machos.** Los valores representan la media ± E.E. reportado en mililitros del consumo de edulcorante. Se puede visualizar el consumo comparado por diferentes tratamientos durante 6 semanas de evolución.  $n=6$  animales por grupo. \*  $p < 0.05$  comparado con el grupo control.

A continuación se muestra el análisis estadístico del consumo de edulcorantes en ratones machos. Donde se reportaron diferencias desde la semana 2 entre el grupo de sacarosa y el grupo control.

	<b>Control</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Sacarosa</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Sucralosa</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Estevia</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Valor p*</b>
Semana 1	37.3 ± 1.62	34.20 ± 2.45	36.25 ± 3.6	35.20 ± 0.84	0.193
Semana 2	36.8 ± 0.35	44.50 ± 4.38	38.45 ± 2.89	36.95 ± 0.77	0.002*
Semana 3	38.7 ± 28.42	48.90 ± 1.27	40.15 ± 0.91	39.70 ± 0.28	0.001*
Semana 4	38.8 ± 0.21	51.15 ± 0.35	45.65 ± 10.11	40.50 ± 0.28	0.003*
Semana 5	40.20 ± 0.98	50.00 ± 0.56	35.50 ± 3.53	41.05 ± 6.71	0.002*
Semana 6	41.65 ± 4.45	55.30 ± 0.00	45.10 ± 0.84	40.70 ± 0.14	0.001*

**Tabla 9. Consumo de edulcorante o agua en ratones BALB/c machos por 6 semanas.** Los valores representan la media ± E.E. en gramos de peso, las diferencias entre los grupos se consideran estadísticamente significas con un valor de  $p < 0.05$ .  $n=6$  por grupo. \*  $p < 0.05$  sacarosa comparado con control.

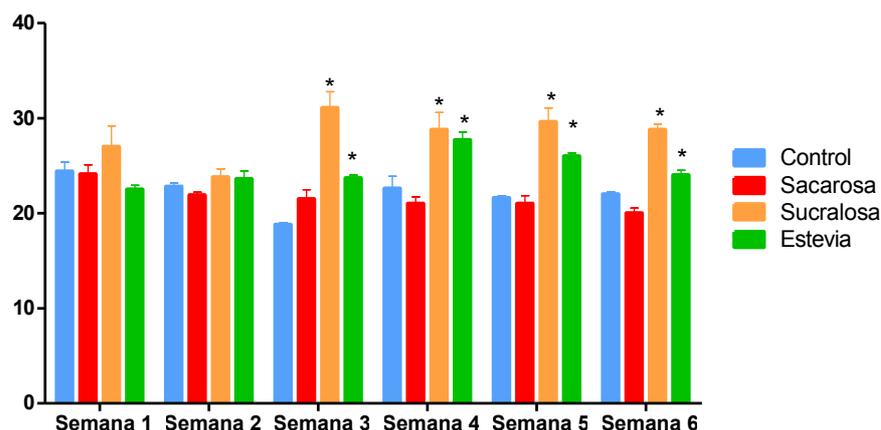
Se debe agregar que el sexo resulta una variable importante al hablar de consumo de los edulcorantes, en general los machos reportaron una media: sacarosa (47.3 mL en promedio por semana), sucralosa (40.1 mL en promedio por semana), estevia (39.0 mL en promedio por semana), control (38.9 mL en promedio por semana), mayor que las hembras: sacarosa (40 mL en promedio por semana), estevia (38.9 mL en promedio por semana) y sucralosa (37.2 mL en promedio por semana), mientras que el grupo control (34.5 mL en promedio por semana). Al realizar análisis estadístico (ANOVA univariado) conocemos que existen diferencias entre machos y hembras por grupos en el consumo de edulcorantes, de acuerdo al tratamiento (Tabla 10).

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>		
Variable dependiente: Consumo edulcorante		
Origen	Media cuadrática	Sig.
tratamiento	364.695	0.00
sexo	24.510	0.03
tratamiento * sexo	90.952	0.00*

**Tabla 10. Prueba inter-sujetos en el consumo final de edulcorantes en ratones machos y hembras.** Con suministro de edulcorantes por 6 semanas.  $p < 0.05$ .  $n=6$  animales por grupo. \* $p = 0.00$  comparando tratamiento y sexo.

En nuestro estudio también resultaba prioridad conocer el consumo de alimento de los animales en tratamiento, por lo tanto, a continuación se reportan los datos obtenidos del consumo de alimento de hembras durante las 6 semanas de tratamiento. Los resultados muestran que el grupo con consumo de alimento más alto fue sucralosa (27.4 g en promedio por semana), seguido por grupo estevia (24.6 g en promedio por semana) y control con 23.6 g en promedio por semana, mientras que el grupo sacarosa disminuyó su consumo a partir de la semana 4 (21.8 g en promedio por semana).

Consumo promedio de alimento en ratones hembras por semana de tratamiento



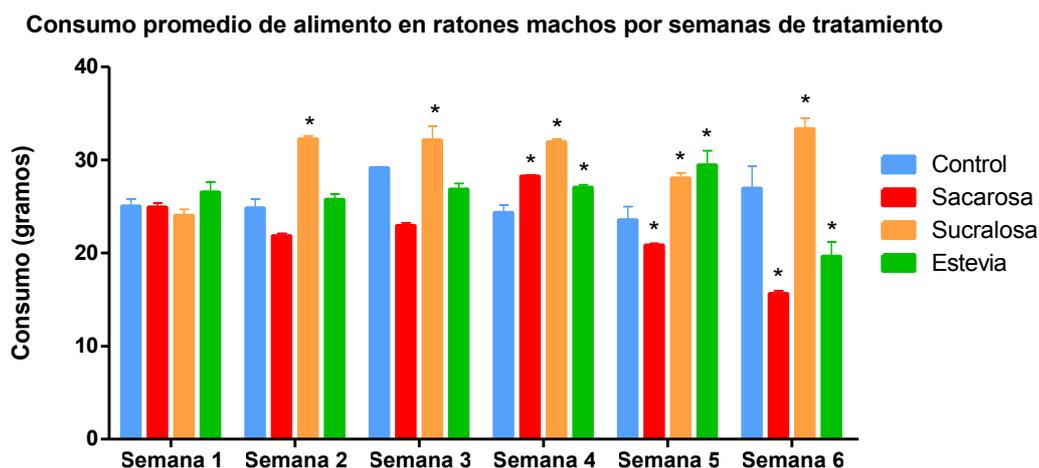
**Gráfica 6. Consumo promedio de alimento en ratones hembras.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Se presenta el consumo promedio de alimento comparado por diferentes tratamientos y el grupo control indicado en las 6 semanas de evolución, expresado en gramos.  $n=6$  animales por grupo.  $*p<0.05$  comparado con el grupo control.

Como resultado de la gráfica anterior se realizó el análisis estadístico del consumo de alimento de los animales en tratamiento. En esta tabla podemos conocer los cambios que se dan durante las 6 semanas de suplementación.

	Control Media $\pm$ E.E.	Sacarosa Media $\pm$ E.E.	Sucralosa Media $\pm$ E.E.	Estevia Media $\pm$ E.E.	Valor $p^*$
<b>Semana 1</b>	24.40 $\pm$ 0.98	24.25 $\pm$ 1.0	22.6 $\pm$ 2.70	22.5 $\pm$ 0.42	0.161
<b>Semana 2</b>	22.8 $\pm$ 0.40	21.9 $\pm$ 0.33	23.8 $\pm$ 0.70	23.6 $\pm$ 0.84	0.194
<b>Semana 3</b>	18.8 $\pm$ 0.20	21.5 $\pm$ 0.99	31.30 $\pm$ 1.64	23.5 $\pm$ 0.30	0.008*
<b>Semana 4</b>	22.60 $\pm$ 1.40	24.75 $\pm$ 0.7	28.8 $\pm$ 4.4	27.7 $\pm$ 0.82	0.003 $\alpha$
<b>Semana 5</b>	35.2 $\pm$ 0.33	22.2 $\pm$ 0.83	29.1 $\pm$ 1.50	25.8 $\pm$ 0.35	0.007 $\alpha$
<b>Semana 6</b>	18.30 $\pm$ 0.24	16.5 $\pm$ 0.55	28.8 $\pm$ 0.6	24.7 $\pm$ 0.52	0.002 $\alpha$

**Tabla 11. Consumo de alimento en ratones hembras por 6 semanas.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. en gramos de peso, las diferencias se consideran estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ .  $*p < 0.05$  sucralosa comparado con control.  $\alpha p < 0.05$  sacarosa, sucralosa y estevia comparado con control.

De igual forma analizamos los datos obtenidos en el consumo de alimento en los grupos de machos; los resultados nos indican que el grupo que más consumió alimento fue sucralosa (32.1g en promedio por semana), seguido por grupo estevia (25.7 g en promedio por semana) y control (25.6 g en promedio por semana), mientras que el grupo sacarosa, disminuye notablemente su consumo a partir de la semana 4 (22.3 g en promedio por semana), es probable que estos animales realicen una compensación calórica, al aumentar el aporte de calorías en el consumo aumentado de azúcar en el agua.



**Grafica 8. Consumo promedio de alimento en ratones machos.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Se representa el consumo de alimento, comparado por diferentes tratamientos y el grupo control, mostrado en 6 semanas de evolución, expresado en gramos. n=6 animales por grupo. \*  $p < 0.05$  comparado con control.

En la siguiente tabla se encuentra el analisis estadístico por semana del consumo promedio de alimento en ratones machos.

	<b>Control</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Sacarosa</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Sucralosa</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Estevia</b> Media $\pm$ E.E.	<b>Valor p*</b>
<b>Semana 1</b>	25.00 $\pm$ 0.82	24.9 $\pm$ 0.45	24.0 $\pm$ 0.69	26.50 $\pm$ 1.14	0.192
<b>Semana 2</b>	24.8 $\pm$ 0.89	21.90 $\pm$ 0.45	32.50 $\pm$ 0.32	25.70 $\pm$ 0.64	0.003*
<b>Semana 3</b>	29.50 $\pm$ 0.12	22.65 $\pm$ 0.35	43.00 $\pm$ 1.51	26.50 $\pm$ 0.62	0.840*
<b>Semana 4</b>	24.5 $\pm$ 0.86	28.2 $\pm$ 0.16	31.00 $\pm$ 0.34	27.00 $\pm$ 0.35	0.001 $\alpha$
<b>Semana 5</b>	23.50 $\pm$ 1.52	20.70 $\pm$ 0.24	28.50 $\pm$ 0.63	29.50 $\pm$ 1.15	0.008 $\alpha$
<b>Semana 6</b>	26.90 $\pm$ 2.36	15.65 $\pm$ 0.38	33.70 $\pm$ 1.37	19.60 $\pm$ 1.6	0.001 $\alpha$

**Tabla 12. Consumo de alimento en ratones BALB/c machos por 6 semanas.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. en gramos de peso, las diferencias entre los grupos, se consideran estadísticamente significas con un valor de  $p < 0.05$ . n=6 por grupo. \*  $p < 0.05$  entre sucralosa comparada con control.  $\alpha$   $p < 0.05$  sucralosa, sacarosa y estevia comparado con control.

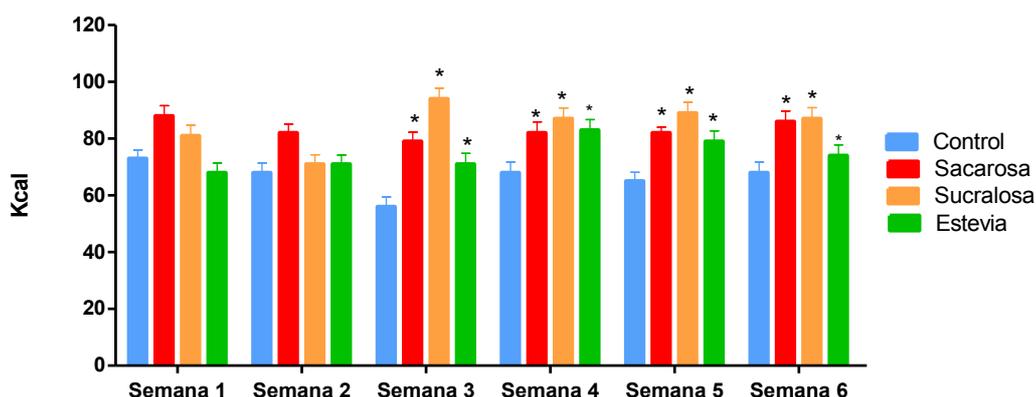
En vista de que los resultados de peso y el consumo de edulcorantes resulto estadísticamente significativos entre los grupos en tratamiento y el grupo control por sexo, se optó por conocer las diferencias que existían en el consumo de alimento, (ANOVA univariado). Donde se reportó que existen diferencias en el consumo de alimento comparando cada uno de los grupos por sexo.

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>		
Variable dependiente: Consumo Alimento		
Origen	Media cuadrática	Sig.
tratamiento	345.370	0.00
sexo	3.050	0.37
tratamiento * sexo	91.784	0.00*

**Tabla 13. Prueba inter-sujetos en el consumo final de alimento en ratones machos y hembras.** Con suministro de edulcorantes por 6 semanas.  $p < 0.05$ .  $n=6$  animales por grupo.  $*p = 0.00$  comparando tratamiento y sexo.

Fue también de nuestro interés conocer los cambios producidos por los edulcorantes en el consumo energético total por semana, los resultados demuestran que el aporte mas alto en calorías fue sucralosa (85.3 Kcal en promedio por semana), seguido por grupo sacarosa (83.4 Kcal en promedio por semana) y estevia (74.9 Kcal en promedio por semana), mientras que el grupo control tuvo un consumo de 66.6 Kcal en promedio por semana; se puede notar que los grupos que tienen un consumo energético mayor fueron aquellos que aumentaron su consumo en alimento y edulcorantes.

**Consumo energético promedio de ratones hembras**



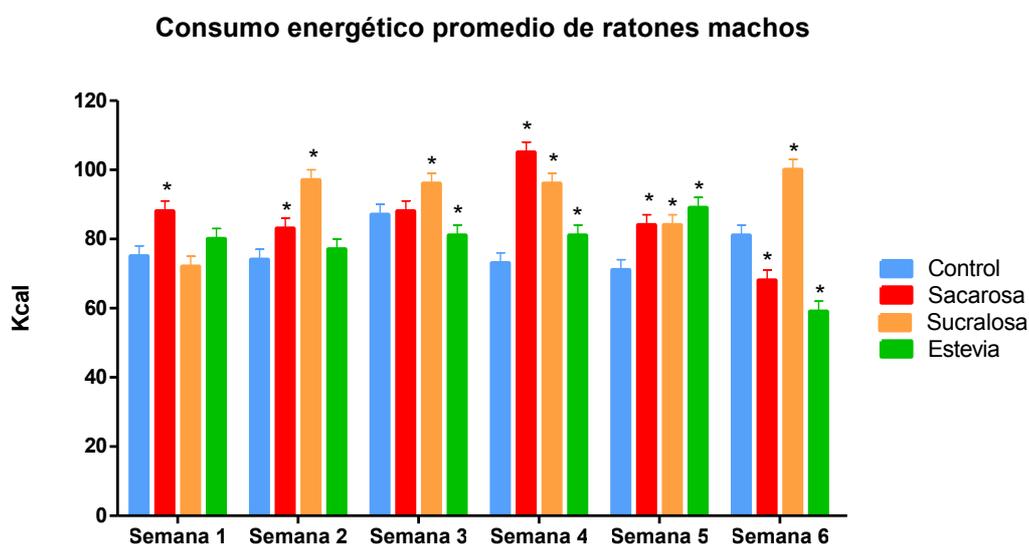
**Grafica 9. Consumo energético promedio semanal en ratones hembras.** Los valores representan la media  $\pm$  E.E. Se representa el consumo energético de ratones hembras comparadas con el tratamiento correspondiente y el grupo control, mostrado en 6 semanas de evolución, expresado en kilocalorías (Kcal).  $n=6$  animales por grupo.  $*p < 0.05$  comparado con control.

En seguida, en la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en el analisis estadistico analizado para el consumo enegetico de animales hembras.

	<b>Control</b> Media ± E.E.	<b>Sacarosa</b> Media ± E.E.	<b>Sucralosa</b> Media ± E.E.	<b>Estevia</b> Media ± E.E.	<b>Valor p*</b>
<b>Semana 1</b>	73.66 ± 1.5	88.39 ± 1.6	81.92 ± 2.8	68.53 ± 1.4	0.017*
<b>Semana 2</b>	68.11 ± 3.4	82.26 ± 2.1	71.58 ± 2.3	71.43 ± 2.2	0.004 $\alpha$
<b>Semana 3</b>	56.13 ± 1.4	79.96 ± 2.3	94.34 ± 1.8	71.96 ± 1.7	0.002 $\beta$
<b>Semana 4</b>	68.82 ± 1.9	82.03 ± 0.9	87.42 ± 0.3	83.70 ± 1.7	0.008 $\beta$
<b>Semana 5</b>	65.31 ± 2.9	82.78 ± 0.8	89.22 ± 0.2	79.32 ± 2.1	0.001 $\beta$
<b>Semana 6</b>	68.00 ± 2.6	86.24 ± 1.7	87.57 ± 2.9	74.71 ± 0.8	0.001 $\beta$

**Tabla 14. Consumo energético en ratones hembras por 6 semanas.** Los valores representan la media ± E.E. en gramos de peso, para comparar las diferencias entre los grupos, las cuales se consideran estadísticamente significas con un valor de  $p < 0.05$ . \*  $p < 0.05$  sacarosa comparado con control.  $\alpha$   $p < 0.05$  entre sacarosa y sucralosa comparado con control.  $\beta$   $p < 0.05$  entre sacarosa estevia y sucralosa comparado con control.

También calculamos el consumo energético en machos durante las 6 semanas de tratamiento. Los resultados encontrados son los siguientes: sucralosa (91.0 Kcal en promedio por semana), seguido por sacarosa (85.1 Kcal en promedio por semana), estevia (78.1 Kcal en promedio por semana), mientras que el grupo control reporto 77.3 Kcal en promedio por semana.



**Grafica 10. Consumo energético promedio en ratones machos.** Los valores representan la media ± E.E. Se representa el consumo energético promedio de ratones machos, mostrado en 6 semanas de evolución, expresado en Kcal. Con una  $n=6$  animales por grupo. (\*)  $p < 0.05$  comparado con control.

En la siguiente tabla pueden ver los resultados al analizar las diferencias en el consumo energético promedio por semanas y las diferencias entre grupos.

	<b>Control</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Sacarosa</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Sucralosa</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Estevia</b> <b>Media ± E.E.</b>	<b>Valor p*</b>
<b>Semana 1</b>	75.36 ± 1.3	89.06 ± 0.74	72.95 ± 1.7	80.12 ± 1.1	0.001*
<b>Semana 2</b>	74.56 ± 0.9	83.29 ± 0.57	97.21 ± 1.9	77.40 ± 1.3	0.002*
<b>Semana 3</b>	87.05 ± 3.6	86.82 ± 1.0	96.98 ± 1.1	81.28 ± 1.1	0.003 $\alpha$
<b>Semana 4</b>	73.47 ± 0.8	104.29 ± 0.42	96.34 ± 1.5	81.74 ± 1.2	0.001 $\alpha$
<b>Semana 5</b>	71.73 ± 1.8	81.52 ± 0.37	84.46 ± 1.7	89.18 ± 1.4	0.007 $\alpha$
<b>Semana 6</b>	81.94 ± 1.8	65.38 ± 0.43	100.89 ± 2.3	59.58 ± 1.9	0.001 $\alpha$

**Tabla 15. Consumo energético en ratones BALB/c hembras por 6 semanas.** Los valores representan la media ± E.E. en gramos de peso para comparar las diferencias entre los grupos, las cuales se consideran estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ . \* $p < 0.05$  sacarosa y sucralosa comparado con control.  $\alpha$   $p < 0.05$  sucralosa, sacarosa y estevia comparado con control.

Es importante mencionar también que el consumo energético en general se evalúa de acuerdo al sexo, dado que los requerimientos son fisiológicamente diferentes por sexo y etapa de la vida, por ello se realizó un análisis estadístico (ANOVA univariado), para conocer las diferencias en este experimento con respecto al sexo, donde de acuerdo al análisis si existen diferencias en el cálculo energético por el tratamiento, sin embargo, no se muestran diferencias claras por sexo, puesto que los grupos del mismo edulcorante sean machos o hembras se comportan muy parecido comparados con los demás tratamientos y el control.

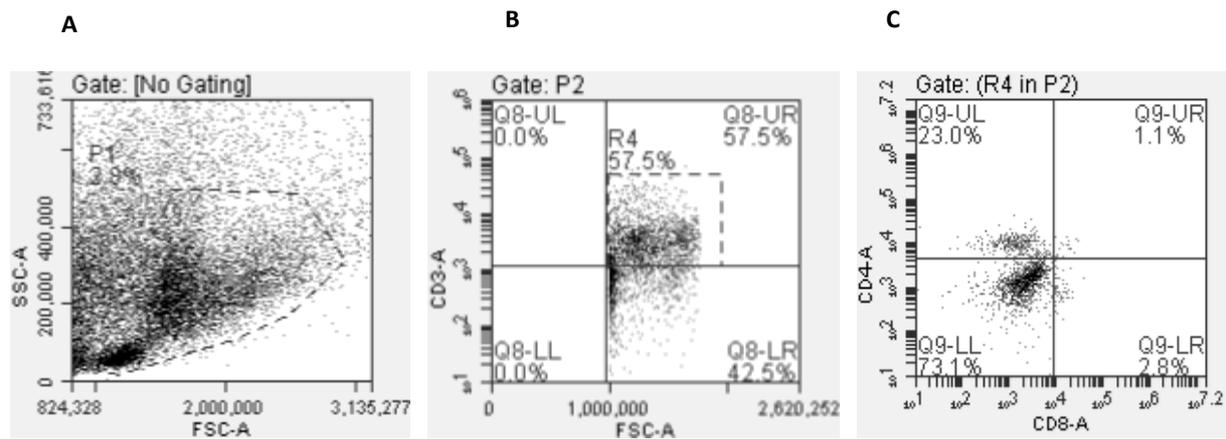
<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>		
Variable dependiente: Cálculo Energético		
Origen	Media cuadrática	Sig.
tratamiento	1504.161	0.00
sexo	37.383	0.31
tratamiento * sexo	866.299	0.00*

**Tabla 15. Prueba inter-sujetos en el consumo final de edulcorantes en ratones machos y hembras.** Con suministro de edulcorantes por 6 semanas.  $p < 0.05$ .  $n=6$  animales por grupo. \* $p = 0.00$  comparando tratamiento y sexo.

## Citometría de Flujo

Parte de los objetivos en el análisis inmunológico competía en analizar las células CD3 con sus subpoblaciones CD4 y CD8, en el tejido adiposo, sin embargo, no se logró un buen análisis para estas poblaciones, ya que no se consiguió una adecuada separación de las células teñidas. A continuación se muestran los dot plot de las poblaciones obtenidas (**Figura 5**).

Los resultados de la tinción II no fueron los ideales, como ya se comentó, no se logró una separación eficiente de las células CD3, por su parte las células CD8 resultaron casi inexistentes.



**Figura 5. Tinción II: Porcentaje de poblaciones leucitarias positivas a CD3 y expresión de CD4 y/o CD8 en tejido adiposo.** Donde A) Selección de la población P1. B) Selección del porcentaje de células positivas para el marcador CD3, C) Dot plot de las poblaciones celulares CD4 y CD8 positivas.

## **8.0. Conclusiones Generales**

### **8.1. Conclusiones**

En las últimas décadas la incidencia de la obesidad ha ido en aumento, siendo el consumo calórico uno de los principales factores para el desarrollo de las mismas. El exceso de nutrimentos lleva al organismo a sufrir cambios metabólicos para conservar la homeostasis de este, por lo que una alimentación mal distribuida y en exceso puede provocar lipotoxicidad, induciendo con ello enfermedades metabólicas.

Un desequilibrio entre el metabolismo y el sistema inmunológico puede ocasionar procesos inflamatorios crónicos, desarrollando cambios en las funciones celulares. Dietas ricas en azúcares, grasas saturadas y trans, así como bajas en antioxidantes, fibra y omega-3, han demostrado promover la inflamación crónica de bajo grado que se lleva a cabo en el tejido adiposo. La respuesta inmunológica depende del metabolismo, como resultado de la eficiencia para mantener al organismo en buen estado<sup>101</sup>.

Existe una controversia sobre los efectos del consumo de edulcorantes de bajo aporte energético sobre el peso corporal; nuestro estudio mostro que al menos en un modelo murino (de ratones BALB/c), los edulcorantes suplementados de forma prolongada afectan el peso en la semana 6 en comparación con aquellos que no consumieron los edulcorantes, estas diferencias de notan tanto en machos como en hembras. En otros estudios las dietas empleadas son distintas, o bien no se mencionan, sin embargo, en este estudio, el alimento suplementado fue el mismo para todos los grupos de estudio, completo en macro y micronutrimentos, por lo que se puede atribuir que el uso de edulcorantes determina el aumento de peso de los animales suplementados<sup>68</sup>.

En este estudio se buscaba conocer si el consumo de alimento en los animales suplementados tenía un cambio al aumentar los efectos proinflamatorios; el grupo que consumió más fue el de sucralosa evidenciado en las gráficas 6 y 8, el análisis estadístico arrojó un valor  $p < 0.05$  comparado con el control, en ambos sexos; mientras que el grupo de sacarosa después de la semana 3 fue el que consumió menos alimento, lo que sugiere que el grupo de sacarosa compensa la ingestión calórica, al reducir el consumo de alimento, efecto observado en ambos sexos, además, los resultados mostraron que el grupo estevia en hembras aumentó de peso en la última semana emparejándose con los grupos sacarosa y sucralosa, sin embargo, presentó un consumo notablemente más bajo de alimento ( $19.7 \pm 0.52$  g) y edulcorantes ( $45.8 \pm 0.40$  mL), pero aumentando casi el mismo peso que los otros grupos, en machos ocurre una situación similar en las últimas semanas, los resultados indican que existe un aumento de peso en los ratones suplementados con estevia equiparado a los otros tratamientos, cuando el consumo de alimentos disminuye drásticamente en las últimas semanas. Gracias a las evaluaciones realizadas se

puede concluir que el aumento de peso en los grupos de tratamiento es significativamente mayor que el grupo control.

Por lo tanto conocer si el consumo crónico de edulcorante tendría efecto en las poblaciones leucocitarias del tejido adiposo resultó crucial, con el fin de identificar el tipo de respuesta inmunológica, se realizaron tinciones con fluorocromos conjugados para poblaciones celulares CD45<sup>+</sup> (leucocitos), CD14<sup>+</sup> (macrófagos/monocitos), CD19<sup>+</sup> (linfocitos B) y marcadores de superficie MHC-I y II. En células CD45<sup>+</sup> en tejido adiposo gonadal de hembras presentó mayor porcentaje de células el grupo sacarosa, sucralosa y estevia, mientras que en machos las diferencias se encontraron en el grupo sacarosa y estevia, ( $p < 0.05$  comparado con control). Estos datos se confirman con la investigación realiza en 2004 donde investigadores concluyeron que, la inflamación del tejido adiposo inducida por la obesidad es controlada por una diversa red de leucocitos compuestos por múltiples reguladores celulares de la inmunidad innata y adaptativa<sup>66</sup>.

En el análisis realizado para el porcentaje de células CD14<sup>+</sup>, las diferencias fueron encontradas en los grupos suplementados con sacarosa y sucralosa en hembras, en grupos macho las diferencias se hicieron notar solo en el grupo sacarosa ( $p < 0.05$  comparado con control). Investigadores proponen que el contenido de macrófagos se correlaciona positivamente con los trastornos metabólicos asociados con la obesidad en roedores y humanos<sup>75</sup>. Así mismo para el análisis del porcentaje de células CD19<sup>+</sup> en el tejido adiposo gonadal de ratones hembras las diferencias significativas se hallaron en el grupo sucralosa, sin embargo en machos este resultado discrepo al mostrar diferencias en los grupos sacarosa y estevia ( $p < 0.05$  comparado con control), estos resultados sugieren que el consumo de sucralosa podría estar estimulando la respuesta inmunitaria humoral. Siendo de nuestro interés conocer como afectaba el consumo de edulcorantes en poblaciones linfocitarias, hemos encontrado que el número de linfocitos B y macrófagos presentan una diferencia en aquellos grupo que consumieron sucralosa suponiendo así que aunque este edulcorante no contiene glucosa, el origen del producto tiene efectos en el consumo energético, el aumento de peso y el incremento de las poblaciones infiltradas de células presentadoras de antígeno; y sacarosa concluyendo que el aporte calórico desequilibrado y crónico del azúcar afecta en la balance positivo de la alimentación y como resultado existe el aumento de peso, que condiciona en este proyecto el aumento de las células presentadoras de antígeno.

Como parte de las moléculas que regulan la respuesta inmunológica el porcentaje de células que expresan MHC clase I en monocitos/macrófagos lo datos se comportaron para hembras estadísticamente significativos en sacarosa y sucralosa, mientras que en machos fueron solo aquellos los suplementados con sucralosa, los que obtuvieron datos significativos, ( $p < 0.05$  comparado con control).

Esta investigación demuestra que el consumo de sucralosa y sacarosa puede incrementar la respuesta inmunológica pro-inflamatoria; pero aún es necesario realizar otros estudios para conocer más a detalle los efectos adversos.

### ***8.2. Limitaciones***

Una de las principales limitantes dentro del desarrollo de este proyecto fue el análisis que se pretendía realizar en relación a las poblaciones CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> sin embargo, los resultados no fueron fiables y no se logró obtener el resultado deseado en todas los experimentos..

### ***8.3. Recomendaciones***

Se considera útil realizar más estudios relacionados al proceso inflamatorio mediado por células del sistema inmune vinculados al consumo crónico de edulcorantes artificiales, se propone conocer la participación de células CD3, CD4 y CD8, y asesinas naturales (NK) conocer el tránsito de las poblaciones infiltradas, realizar un análisis de marcadores de inflamaciones, adipocinas y un análisis bioquímico, el equipo de trabajo recomienda ampliamente estudiar estos componentes en seres humanos, ambiciosamente sería el siguiente paso tras los resultados que se han hallado en este proyecto.

## 9.0. Referencias Bibliográficas

1. Food and Drug Administration. Food additives permitted for direct addition to foods for human consumption. Neotame. Final rule; response to objections and denial of requests for a hearing. *Fed Reg.* 70: 21619–2. 2005.
2. García-Almeida JM, *et al.* Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr. Hosp.* 28 (4): 17–31. 2013.
3. Chepulis LM. The effect of honey compared to sucrose, mixed sugars, and a sugar-free diet on weight gain in young rats. *J. Food Sci.* 72 (3): S224-229. 2007.
4. Rodero AB, *et al.* Toxicity of Sucralose in Humans: A Review. *Int. J. Morphol.* 27 (1): 239–244. 2009.
5. Schiffman SS, *et al.* Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *J. Toxicol. Environ. Heal.* 16 (7): 399–451. 2013.
6. Rahiman F *et al.* The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *J. Immunoass. Immunochem.* 35 (1): 26–36. 2014.
7. Kroger M, *et al.* Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: A review of the safety issues. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5: 35–47. 2006.
8. Goyal SK, *et al.* Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61 (1): 1–10. 2010.
9. Razak UN, *et al.* In vitro micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Malaysia. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 57 (1): 23–28. 2014.
10. Geeraert B. *et al.* Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice. *Int. J. Obes. (Lond).* 34 (3): 569–577. 2010.
11. Badui Dergal S. Química de los alimentos. Ed. Pearson educación. 2006.
12. SAGARPA. Programa nacional de la agricultura de la caña de azúcar. 2007.
13. Aldhahi W, *et al.* Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep.* 3(4): 293–298. 2007.
14. Rosen ED, *et al.* Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 444 (7121): 847-853. 2006.
15. Lowell BB, *et al.* Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of Brown adipose tissue. *Nat. Publ. Gr.* 366(6457): 740-742. 1993.
16. Yang X, *et al.* Reduced expression of FOXC2 and Brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res.* 11 (10): 1182-1181. 2003.
17. Almind K, *et al.* Ectopic Brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 (7): 2366-2371. 2007.

18. Mattson MP. Perspective: Does Brown fat protect against diseases of Ageing. *Res Rev.* 9(1): 69-76. 2010.
19. Johnson PR, *et al.* Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res.* 12 (6): 706- 714. 2009.
20. Krotkiewski M, *et al.* Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest.* 72 (3): 1150-1162. 1983.
21. Coon PJ, *et al.* Role of body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab.* 75(4): 1 125-1132. 1992.
22. Gastaldelli A, *et al.* Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(11): 5090-5103. 2002.
23. Marin P, *et al.* The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men. *Metabolism.* 41(11):1242-1248.1992.
24. Montague CT, *et al.* Depot and sex-specific differences in human leptin mRNA expression: implications for the control of regional fat distribution. *Diabetes.* 46(3): 342-347. 1997.
25. Wachenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 21(6): 697-738. 2000.
26. Bjöontorn P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care.* 14 (12): 1132-1143. 1991.
27. Hellmer J, *et al.* Mechanisms for differences in lipolysis between human subcutaneous and omental fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 75(1):15- 20. 2009.
28. Fain JN, *et al.* Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145(5): 2273-2282. 2004.
29. Snijder MB, *et al.* Associations of hip and thigh circumferences independent of waist circumference with the incidence of type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Am J Clin Nutr.* 77(5): 1192-1197. 2003.
30. Fox CS, *et al.* Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 116(1): 39- 48. 2007.
31. Mattson MP. Does Brown fat protect against diseases of aging?. *Ageing Res Rev.* 9(1): 69-76. 2010.
32. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 4(4): 263-269. 2006.
33. Ishibashi J, *et al.* Medicine. Beige can be slimming. *Science.* 328 (5982): 1113-1114. 2010.
34. Ghorbani M, *et al.* Hypertrophy of Brown adipocytes in Brown and White adipose tissues and reversal of diet-induced obesity in rats treated with a beta3-adrenoceptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 54(1): 121-31. 1997.

35. Guerra C, *et al.* Emergence of Brown adipocytes in White fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest.* 102(2): 412–420. 1998.
36. Gómez-Hernandez A, *et al.* Brown fat lipoatrophy and increased visceral adiposity through a concerted adipocytokines overexpression induces vascular insulin resistance and dysfunction. *Endocrinology.* 153(3): 1242-1255. 2012.
37. Hansen JB, *et al.* Regulatory circuits controlling White versus Brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 398 (Pt 2): 153–168. 2006
38. Cannon B, *et al.* Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 84(1): 277-359. 2004.
39. Hernández AG, *et al.* Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. *Clina e investigación en arteriosclerosis.* 25 (1): 322–346. 2014.
40. Bray GA, *et al.* Handbook of Obesity. Vol. 1. CRC Press. 2014.
41. Wang H, *et al.* Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009.
42. Bessesen DH, *et al.* Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 261(2 Pt 1): E246-51. 1991.
43. Terretaz J, *et al.* *In vivo* regulation of adipose tissue lipoprotein lipase in normal rats made hyperinsulinemic and in hyperinsulinemic genetically-obese (fa/fa) rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 18 (1): 9–15. 1994.
44. Sadur CN, *et al.* Insulin responsiveness of adipose tissue lipoprotein lipase is delayed but preserved in obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 59(6): 1176-82. 1984.
45. Schwartz RS, *et al.* Increase of adipose tissue lipoprotein lipase activity with weight loss. *J Clin Invest.* 67(5): 1425–1430. 1981.
46. Fruhbeck G, *et al.* The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280 (6): E827-847. 2001.
47. Blake GJ, *et al.* Inflammatory bio markers and cardiovascular risk prediction. *J Intern Med.* 252(4): 283-94. 2002.
48. Yamamoto-Furusho JK, *et al.* Genetic Markers Associated with Clinical Outcomes in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 21(11): 2683-95. 2015.
49. Gregoire FM, *et al.* Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78 (3): 783–809. 1998.
50. Winer DA. *et al.* B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. *Nat Med.* 17(5): 610-617. 2011.
51. Kershaw EE, *et al.* Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89 (6): 2548-56. 2004.

52. Sánchez-Muñoz F, *et al.* Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta Médica de México*. 141 (6): 505–512. 2005.
53. Palafox, E. *et al.* Manual de formulas y tablas para la intervención nutricional. 2° ed. Mc Graw hill. Mexico. 2015.
54. Reyes M. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endócrina. *Rev. Médica Clínica Las Condes*. 23 (2): 136–144. 2012.
55. Borda G, *et al.* Cátedra de Fisiología Humana. Carrera de Enfermería. UNNE. Sist. Inmune. 2010.
56. Peter Parham. Sistema Inmune. 3ª ed. Manual Moderno. México. 2011.
57. Vega-Robledo BG. El adipocito y la respuesta inmune. *Rev.Fac. Med. UNAM*. 53 (1): 43–45. 2010.
58. Abbas AK, *et al.* Inmunología celular y molecular. 7ª ed. Elsevier. España. 2012.
59. Toche P. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev. Médica Clínica Las Condes*. 23 (4): 446–457. 2012.
60. Delves P, *et al.* Roitt. Inmunología. Fundamentos. 12ª ed. Panamericana. México. 2014.
61. Mendoza HL, *et al.* Y Darwin tenía razón... La evolución del sistema inmunitario. *Ciencia*. 66 (2): 60–66. 2015.
62. Tomé-Calvo G. Células del sistema inmune, antígenos de histocompatibilidad, citocinas. *Trastornos inmunológicos*. 2008.
63. Bastarrachea RA, *et al.* Macrófagos, inflamación, tejido adiposo, obesidad y resistencia a la insulina. *Gaceta médica de México*. 143 (6): 505–512. 2007.
64. Ortiz-Andrellucchi A. Nutrición e inmunidad. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Perez Leon*. 38 (Sup 1): 12–18. 2007.
65. Duque Correa MA, *et al.* Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*. 26 (2): 73–86. 2007.
66. Muñoz M, *et al.* Obesidad y sistema inmune. *Nut. Hos*. 19 (6): 319–324. 2004.
67. Lynch, L. *et al.* Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder through Regulatory Cytokine Production. *Immunity*. 37 (3): 574–587. 2012.
68. Murphy K, *et al.* Inmunobiología de Jeneway. 7ª ed. McGrawHill. México. 2009.
69. Collado VM, *et al.* El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Rev. Complut. Ciencias Vet*. 2: 1–16. 2008.
70. Owen J, *et al.* Kuby Inmunología. 7ª ed. McgrowHill. México. 2013.

71. Pond CM, *et al.* Interactions between adipose tissue around lymph nodes and lymphoid cells in vitro. *J Lipid Res.* 36 (10): 2219-2231. 1995.
72. Nishimura S, *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 15(8):914-20. 2009.
73. Trayhurn, P. Adipocyte biology. *Obesity reviews.* 8 (1): 41–44. 2007.
74. Ruiz-Alvarez V, *et al.* Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Rev cubana de invs. med.* 29 (3): 364–397. 2010.
75. Rodríguez-Rodríguez E, *et al.* Obesidad , resistencia a la insulina y aumento de los niveles de adipocinas : importancia de la dieta y el ejercicio físico. *Nutrición hospitalaria.* 24 (4): 415–421. 2009.
76. Blancas-Flores G, *et al.* La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Médico del Hospital Infantil de México.* 67 (2): 88-98. 2009.
77. Wellen KE, *et al.* Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest.* 115(5): 1111-1119. 2005.
78. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity?. *Nutrition Research Reviews.* 18(1):63-76. 2005.
79. Madan S. *et al.* Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni - A Review. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 1 (3): 267–286. 2010.
80. Mitsutomi K, *et al.* Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism.* 63 (1): 69–78. 2014.
81. Haase J, *et al.* Local proliferation of macrophages in adipose tissue during obesity-induced inflammation. *Diabetología.* 57 (3): 562–571. 2014.
82. Lee J. Adipose tissue macrophages in the development of obesity-induced inflammation, insulin resistance and type 2 diabetes. *Arch. Pharm Res.* 36 (2): 208-222. 2013.
83. Xu H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 112 (12): 1821–1830. 2003.
84. Reyes, M. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Rev. Med. Clin. Condes.* 23 (2): 136–144. 2012.
85. Caballero B. The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiol Rev.* 29:1-5. 2007.
86. Nota descriptiva N°311. Obesidad y sobrepeso. *Organ. Mundial de la Salud.* 2011.
87. Nota descriptiva N°312. Obesidad y sobrepeso. *Organ. Mundial de la Salud.* 2011.
88. Gesta S, *et al.* Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell.* 131(2): 242-256. 2007.
89. Mathieu P, *et al.* Obesity, inflammation, and cardiovascular risk. *Clin Pharmacol Ther.* 87 (4): 407-416. 2010.

90. Nishimura S, *et al.* CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med.* 15 (8): 914-920. 2009
91. Bermúdez-Menéndez de la Granda M, *et al.* Fatty acids and obesity. *Curr Pharm Des.* 15 (6): 4117–4125. 2009.
92. Tandel KR. Sugar substitutes: health controversy over perceived benefits. *J Pharmacol Pharmacother.* 2 (4):236–243. 2011.
93. Seale P. *et al.* Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J. Clin. Invest.* 121 (1): 96–105. 2011.
94. Rosen ED, *et al.* Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 444 (7121): 847–853. 2006.
95. Bulló Bonet M. La leptina en la regulación del balance energético. *Nutr Hosp.* 17 (Sup 1): 42–48. 2002.
96. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 444 (7121): 860-867. 2006.
97. Pradhan A. Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes: Inflammatory Basis of Glucose Metabolic Disorders. *Nutrition Reviews.* 65 (12): S152-S6. 2007.
98. de Ruyter JC, *et al.* A Trial of Sugar-free or Sugar- Sweetened Beverages and Body Weight in Children. *N. Engl. J. Med.* 367 (15): 1397–1406. 2012.
99. Pereira MA. Sugar-Sweetened and Artificially-Sweetened Beverages in Relation to Obesity Risk. *Advances in Nutrition.* 5 (6): 797–808. 2014.
100. Swithers SE. Artificial sweeteners produce the counterintuitive effect of inducing metabolic derangements. *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (9): 431–441. 2013.
101. Lumeng CN, *et al.* Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation.* 121(6): 2111-2117. 2011.

## **10.0. Anexos**

### **1. Reactivos:**

Etanol al 70%

1X PBS

1X DPBS (sin Ca y Mg) suplementado con BSA al 0,5%

FACS buffer: 1X DPBS (sin Ca y Mg), 2 mM EDTA, y 1% FCS

ACK: 150 mM de NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> y 0,1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA en agua

1X DPBS (sin Ca y Mg) suplementado con BSA al 0.5%. (1 L)

- KCl 200 mg
- NaCl 8000 mg
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2160 mg
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg
- BSA al 5%

FACS buffer: 1X DPBS (sin Ca y Mg), 2 mM EDTA, y 1% FCS. (100 mL)

- FBS 1mL
- EDTA 0.2M 1mL
- DPBS 1X 98 mL

## **2. Preparación de tejido adiposo:**

Se humedece completamente la piel del ratón con etanol al 70%. Se realiza una incisión a nivel del proceso xifoideo (parte inferior del esternón) y abrir la cavidad torácica para exponer el corazón, teniendo cuidado de no cortar los vasos sanguíneos principales.

Nota: En este punto, también es útil dejar el diafragma intacto lo más posible y cortar una muesca del lado derecho de la caja torácica para permitir que la sangre y el perfusado fluyan fuera de la cavidad torácica.

Se sujeta el corazón con fórceps y se inserta suavemente una aguja en el ventrículo izquierdo a través del ápice. Lentamente perfundir el ratón con 15 mL de PBS estéril.

Nota: Reduzca la velocidad de perfusión si los pulmones comienzan a llenarse y expandirse.

Se Abre la cavidad peritoneal y quita las almohadillas de grasa gonadal. La parte específica de grasa gonadal que recolectamos se colocó en una caja de Petri en hielo que contenía 2 mL de DPB 1X (sin Mg o Ca) suplementado con BSA al 0,5% se realizaron cortes finos en las muestras. Posteriormente se mantuvieron las muestras en hielo, seguido de este paso se preparó una solución de 3 mL a la que se adicióno colagenasa consistente en DPBS 1X suplementado con BSA al 0,5%, CaCl<sub>2</sub> 10 mM y colagenasa tipo I de 10 µg / mL.