



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud

**“EFECTO DE LOS EDULCORANTES G.E. Y SUCRALOSA EN
LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA PRO-INFLAMATORIA”**

TESIS

Para Obtener el Grado de
Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

L.N. Marcela Sánchez Delgado

Comité de Tutores

Tutora Académica

Irazú Contreras García, Ph.D.

Tutor Interno

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D.

Tutora Externa

M.C.S. Saby Camacho López

Toluca, Estado de México

Año 2013

A Alonso, por ser mi mayor tesoro y gran amor; por enseñarme a ser mejor todos los días.

A mis Tutores, por la paciencia para enseñarme y contagiarme el gusto por la investigación; son una gran inspiración.

A mis Padres, por su guía y apoyo incondicional en todo momento; por proporcionarme las herramientas para mi superación.

A Dios, por darme sabiduría, paciencia y entendimiento en esta etapa tan especial de mi vida; por mostrarme su infinito amor a cada instante.

INDICE

	No. página
Resumen	3
Abstract	4
1. Antecedentes	5
1.1. <i>Sistema Inmunológico (SI)</i>	5
1.2. <i>Epidemiología de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT)</i>	12
1.3. <i>Inflamación y las ECNT</i>	14
1.4. <i>Edulcorantes</i>	15
1.5. <i>Los edulcorantes y su relación con el SI</i>	21
2. Planteamiento del Problema	23
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	26
5. Justificación	37
6. Material y Métodos	39
6.1. Diseño de estudio	39
6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	39
6.3. Procedimientos	39
6.4. Variables de Estudio	32
6.5. Implicaciones Bioéticas	35
6.6. Análisis Estadístico	35
7. Resultados	36
7.1. Título corto del artículo enviado	36
7.1.1 Página frontal del manuscrito	37
7.1.2 Carta de envío	38
7.1.3 Resumen	39
7.1.4 Abstract	40
7.1.5 Introducción	41
7.1.6 Material y Métodos	43
7.1.7 Resultados	46
7.1.8 Discusión y Conclusiones	48
7.1.9 Referencias	52
7.1.10 Figuras y Leyendas	55

8.	Conclusiones Generales	59
	8.1. Conclusiones	59
	8.2. Limitaciones	59
	8.3. Recomendaciones	60
9.	Referencias Bibliográficas	61

Resumen:

El sistema inmunológico es uno de los mecanismos biológicos más importantes que permite mantener la integridad estructural y funcional del organismo, conservando así la homeostasis. Las citocinas son proteínas fundamentales para la respuesta inmunológica, actúan comunicando a las células del sistema inmunitario entre sí. Estas proteínas son de gran interés, debido a que las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) se caracterizan por una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, causada por la producción anormal de este tipo de moléculas.

Entre las medidas de prevención y tratamiento de las ECNT, como sobrepeso, obesidad, hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2, se considera la disminución del consumo energético como la principal recomendación nutricional, utilizando así a los edulcorantes para este propósito. En los últimos años el consumo de estos aditivos ha aumentado, no sólo en personas con alguna ECNT, sino también en la población en general. Este estudio tuvo como objetivo principal determinar si el uso frecuente de los edulcorantes comerciales glucósidos de esteviol y sucralosa modifican las poblaciones linfocitarias, así como la producción de interferón-gamma (IFN- γ) y óxido nítrico (ON) en un modelo murino.

Por medio de citometría de flujo y espectrofotometría se analizó el fenotipo de células T obtenidas de ratones BALB/c expuestos a los edulcorantes sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol por 6 semanas consecutivas, comparados con ratones no expuestos a estos compuestos. El peso de los animales y las concentraciones de glucosa en sangre no mostraron diferencias significativas entre grupos. Se encontró un mayor consumo de alimento en el grupo tratado con sucralosa, además de un mayor consumo de líquido en el grupo tratado con sacarosa. El porcentaje y número de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD69⁺ se presentan aumentados en el grupo de sucralosa. Tanto el IFN- γ producido por linfocitos de bazo, como el ON producido por macrófagos de peritoneo, se presentaron en mayor concentración en el mismo grupo.

Nuestros resultados sugieren que el consumo frecuente de sucralosa puede aumentar la capacidad pro-inflamatoria de las poblaciones leucocitarias de bazo y peritoneo, participando así en la respuesta inflamatoria crónica característica de las ECNT.

Abstract:

The immune system is one of the most important biological mechanisms allowing the maintenance of the structural and functional integrity of the organism, preserving its homeostasis. Cytokines are essential proteins for the immune response, since they allow the communication of the cells of the immune system. Chronic non-communicable diseases (CNCDs) are characterized by a chronic low-grade inflammatory response caused by abnormal production of cytokines.

The strategies for prevention and treatment of CNCDs, such as obesity, hypertension and type 2 diabetes mellitus, include a decrease in caloric consumption, which is the most important nutritional recommendation. For this purpose, the use of sweeteners has become an option in the food industry. In recent years, consumption of these additives has increased, not only in people with a CNCDs, but in the general population. The main objective of this study was to determine whether the frequent use of commercial sweeteners, such as steviol glucosides and sucralose, modifies splenic T cell subpopulations, as well as the production of IFN- γ and NO, in a murine model.

We analyzed the phenotype of splenic lymphocytes, as well as the production of IFN- γ and NO by peritoneal macrophages, from BALB/C mice which were exposed for 6 weeks to either saccharose, sucralose, steviol glucosides or water, using flow cytometry and spectrophotometry. Body weight and blood glucose did not show a significant difference between groups. Food intake was higher in the sucralose group, but liquid intake was higher in the sucrose group. We found an increase in the percentage and number of CD3+, CD4+, CD8+, CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD69⁺ T cells in the sucralose group. Production of IFN- γ and NO by macrophages was also increased in the same group.

Our results suggests that frequent sucralose intake may enhance the pro-inflammatory capacity of splenic and peritoneal leukocytes, which may have a profound impact on the chronic inflammatory response involved in CNCDs.

1. Antecedentes:

1.1. SISTEMA INMUNOLÓGICO

Para que el fenómeno defensivo se lleve a cabo, los organismos disponen de una serie de barreras naturales de aislamiento, como son la piel y las mucosas, y de un sistema especializado conocido como sistema inmunológico (SI). El SI tiene la capacidad de identificar y destruir todo lo extraño que invade el organismo, e incluso aquello interno que se deteriora (1, 2).

En su conjunto, en la respuesta inmunológica participan:

- Moléculas: entre las que destacan inmunoglobulinas (anticuerpos), citocinas y sus receptores, y el sistema de complemento, entre otras, que en general se caracterizan por su capacidad para actuar de manera inmediata, sin requerir de un aprendizaje previo.
- Células inmunocompetentes (efectoras), como linfocitos, monocitos y células dendríticas, entre otras.
- Órganos linfoides: que son el sitio donde se agrupan las células inmunocompetentes, entre ellos los órganos primarios como timo y médula ósea y los órganos secundarios, como los ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides asociados a mucosas y epitelios (1, 3).

En cada organismo evolutivamente superior, los mecanismos de defensa son tanto de tipo innato como de tipo adaptativo, que en general son muy diversos y heterogéneos, aunque siempre existe una actuación integrada de todos los componentes de ambos (1).

La respuesta inmunitaria adaptativa, que corresponde a la siguiente línea de defensa del individuo, se caracteriza por desarrollarse única y específicamente frente a cada una de las sustancias extrañas que han conseguido penetrar en el organismo y que no han sido previamente eliminadas por los mecanismos de la respuesta innata. En esta respuesta participan prioritariamente linfocitos T, linfocitos B y las moléculas liberadas por estas células, producto de su activación, como son los anticuerpos y las citocinas. Los linfocitos son un grupo heterogéneo estructural y funcionalmente. Se dividen en tres grupos: los linfocitos T (LT), que participan en la inmunidad adquirida de tipo celular, de los cuales se

identifican las dos subpoblaciones más importantes de esta línea celular como CD4⁺ (LT cooperadores) y CD8⁺ (LT *citotóxicos*); los linfocitos B (LB), que participan en la inmunidad adquirida de tipo humoral y; las células asesinas naturales (*NK* “*natural killer*”) que no expresan marcadores de células T ni células B y que participan en la inmunidad natural o innata (1).

La mayor parte de los linfocitos que se encuentran en la sangre, linfa, ganglios linfáticos y timo son linfocitos T. En cambio, un mayor porcentaje de los linfocitos presentes en la médula ósea son linfocitos B. En el bazo y amígdalas, el porcentaje de ambas subpoblaciones es similar.

La activación linfocitaria produce una amplificación clonal (etapa de proliferación de células con la misma especificidad antigénica); seguida de una especialización celular, donde las células plasmáticas son responsables de la síntesis de anticuerpos y de la inmunidad mediada por células efectoras (LT CD4⁺ y LT CD8⁺), además de células de memoria (estas dos últimas como parte de la etapa de maduración) (1).

Por otra parte, el sistema inmunitario adaptativo genera memoria de un estímulo antigénico a otro de la misma índole, debido a la permanencia por tiempos indefinidos de poblaciones linfoides sensibilizadas tras un estímulo antigénico y a diversos mecanismos internos de control, que permiten que la intensidad de la respuesta inmunológica se automodule y regule (1).

Basado en todas estas propiedades descritas, la respuesta adaptativa, a diferencia de la respuesta innata, posee las características de especificidad, memoria y autorregulación (2, 4).

1.1.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata forma parte de los mecanismos inespecíficos de defensa y representa el primer sistema defensivo del organismo, siendo de especial importancia frente a la protección del mismo ante infecciones, ya sean de tipo bacteriano o viral. Son de especial valor en la puerta de entrada de los microorganismos, piel y mucosas (1, 3, 5).

A su vez, dentro de las células de la respuesta inmunitaria innata presentes en la piel y mucosas (citocinas, quimiocinas y el sistema del complemento), destacan los fibroblastos, las células dendríticas, monocitos, neutrófilos, macrófagos y células NK. Estas células se caracterizan por su capacidad para actuar de manera inmediata, sin requerir de un aprendizaje previo, siempre que cualquier patógeno sobrepasa las barreras naturales (6).

Cuando se produce una invasión local de microorganismos o incluso un trauma de otra naturaleza, se activan una serie de componentes de la respuesta innata a nivel local, produciendo lo que se conoce como inflamación. El proceso inflamatorio es la síntesis de todas las actuaciones de la inmunidad innata a nivel de un foco de infección. En la inflamación se ponen en marcha elementos que directamente interfieren con el invasor y además, se generan señales encaminadas a atraer nuevas células al foco inflamatorio, con el objeto de contribuir de manera más eficiente a la destrucción del invasor (7, 8).

Entre los mecanismos directos de lisis en la respuesta inmunitaria innata pueden intervenir las células NK, por su acción citotóxica, pero son las células con capacidad fagocítica las que desempeñan un papel más decisivo en la eliminación del microorganismo patógeno. La fagocitosis se lleva a cabo en varias fases: reconocimiento de la partícula, internalización y lisis. Es importante realzar que este proceso de fagocitosis puede iniciarse cuando el fagocito reconoce de alguna manera al microorganismo. En este sentido, hay dos vías primordiales, una es la participación del sistema del complemento y anticuerpos, debido a que los fagocitos poseen receptores, y la otra es mediante diversos tipos de receptores presentes en los fagocitos y que tienen la capacidad de reconocer estructuras presentes en la mayoría de las bacterias y muchos virus, conocidos como receptores tipo Toll (TLRs: "*Toll like receptors*"). Probablemente, la fagocitosis es el principal elemento que actúa en este tipo de respuesta (1, 9).

Los mecanismos de defensa innata aportan un buen sistema de protección. Sin embargo, en muchas ocasiones no son suficientes para defender eficazmente al organismo. Por ello se dispone de la respuesta inmunitaria adaptativa, que puede actuar a continuación de la respuesta innata, si ésta no ha sido suficiente para eliminar el patógeno (10).

1.1.2. Citocinas

Las citocinas son un amplio grupo de moléculas de gran interés en inmunología, por su capacidad de regular la respuesta inmunitaria, aunque también pueden poseer otras muchas funciones, tales como en la embriogénesis, diferenciación y migración celular, entre otras. Aunque en su mayoría están producidas por leucocitos, determinadas citocinas pueden secretarse por otros tipos celulares (1, 11).

Las citocinas son moléculas de bajo peso molecular; en general, no se detecta una producción constitutiva de estas moléculas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan citocinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de las citocinas son secretadas en forma glicosilada, lo que incrementa su estabilidad y solubilidad. Estas proteínas poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, mediante la unión a receptores de alta afinidad (1).

Las citocinas ejercen un efecto autocrino cuando se unen a receptores presentes en la propia célula productora. También pueden tener un efecto paracrino, actuando sobre diferentes tipos celulares que se encuentren alrededor. En algunos casos pueden liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina (12).

Dos importantes características funcionales de las citocinas son su pleiotropismo, de tal manera que una misma citocina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y su redundancia, es decir, que varias citocinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular. Una consecuencia de estas propiedades es que, en ausencia de una determinada citocina, sus funciones pueden ser reemplazadas total o parcialmente por otras.

Las acciones de las citocinas se engloban dentro de un sistema o red funcional, donde el efecto de una molécula está estrechamente regulado, positiva o negativamente, por otras moléculas del sistema. Así, la secreción de una citocina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citocina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores (12).

1.1.3. Citocinas implicadas en la respuesta inmunológica innata y adaptativa

Estas citocinas se producen de forma inmediata tras el contacto de las células implicadas en la respuesta inmunitaria innata con un agente extraño. Los monocitos y macrófagos activados son la principal fuente de estas moléculas, aunque también pueden ser producidas por linfocitos activados y otras células no pertenecientes al sistema inmunitario, como células endoteliales y fibroblastos (13).

Las citocinas pro-inflamatorias son prioritariamente interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (IFN- γ), y poseen una acción relevante como elementos pro-inflamatorios e incluso contribuyendo al inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa (14).

IL-1. Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares. Existen dos formas, IL-1 alfa e IL-1 beta que, aunque solamente tienen un 25-30 % de homología en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares.

Los efectos biológicos de la IL-1 son similares a los del TNF y dependen de la cantidad de citocinas sintetizada. Cuando se secreta en concentraciones bajas, la IL-1 actúa como mediador de la inflamación local. Actúa sobre las células endoteliales para aumentar la expresión de moléculas de superficie que median la adhesión leucocitaria, como ligandos para las integrinas. Cuando se secreta en cantidades mayores, la IL-1 entra en el torrente sanguíneo y ejerce efectos endocrinos. La IL-1 sistémica induce fiebre; participa en la síntesis de proteínas plasmáticas de fase aguda por el hígado (directa o indirectamente, mediante la estimulación por la producción de IL-6) y en la producción de neutrófilos y plaquetas por la médula ósea (1, 2, 13, 15, 16).

IL-12. Es un importante mediador de la respuesta inmunológica innata temprana frente a microorganismos intracelulares y es un inductor fundamental de la inmunidad celular o respuesta inmunitaria adaptativa. Es producida mayoritariamente por monocitos/macrófagos, aunque su producción puede ser también inducida en células dendríticas y linfocitos B.

Esta citocina incrementa la actividad citotóxica de las células NK e induce células LAK (linfocitos asesinos activados por citocinas) por linfocitos T y células NK. Incrementa

la producción de IFN- γ y linfocitos T citotóxicos. Así, la inmunidad innata frente a muchos microorganismos esta mediada por la actuación de citocinas en la siguiente secuencia: microorganismos \rightarrow respuesta de los macrófagos y células dendríticas \rightarrow IL-12 \rightarrow IFN- γ \rightarrow activación de los macrófagos \rightarrow muerte de los microorganismos (1, 2, 13, 15, 16).

TNF. Los factores de necrosis tumoral fueron descritos inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores. Con posterioridad, sin embargo, ganaron protagonismo por las numerosas funciones que ejercen sobre la respuesta inmunitaria. Se han descrito dos moléculas: el TNF- α y el TNF- β , con elevada homología en su secuencia aminoacídica. La principal función fisiológica del TNF es estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar a estas células para que erradiquen los microorganismos. Si hay cantidades inadecuadas de TNF, una consecuencia puede ser la imposibilidad de contener las infecciones.

Las citocinas IL-1 y TNF- α promueven la expresión de moléculas de superficie, tales como ICAM y selectinas sobre células endoteliales, para contribuir a la acumulación de leucocitos en sitios locales de inflamación. Igualmente, provocan que fagocitos mononucleares y células endoteliales sintetizen quimiocinas activadoras de leucocitos. Además, el TNF- α activa al endotelio vascular e incrementa su permeabilidad, lo cual provoca un incremento en la entrada de IgG, complemento y células a los tejidos e incrementa el fluido de drenaje hacia los nódulos linfoides. Una vez atraídas las células, el TNF- α estimula a neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares para lisar microbios.

El TNF- α es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el lipopolisacárido (LPS), presente en las bacterias Gram negativas. Junto con la IL-1, está implicado en los procesos inflamatorios derivados de los procesos infecciosos, elevando la temperatura corporal y produciendo cansancio y sueño al actuar sobre el sistema nervioso central.

Esta citocina es la principal responsable del choque séptico asociado a bacteremias y que puede ser en muchos casos de extrema gravedad, conduciendo al individuo a la muerte (1, 2, 13, 15, 16).

Interferones. Los interferones fueron inicialmente descritos como agentes producidos por células infectadas por virus. Posteriormente se descubrió que además de su

capacidad antiviral, ejercían efectos reguladores sobre la proliferación y la diferenciación de varios tipos celulares y tenían capacidad de modular el sistema inmunitario. Se clasifican en dos grupos:

Tipo I. IFN- α e IFN- β ; que tienen como función inhibir la replicación viral. Los IFNs de tipo I aumentan además la actividad lítica de las células NK, las cuales pueden matar en forma más eficaz las células infectadas. El IFN de tipo I estimula el desarrollo de los linfocitos T β 1 en los seres humanos. Este efecto se debe principalmente a la capacidad del IFN de tipo I de favorecer en los linfocitos T la expresión de receptores funcionales para la principal citocina inductora de T β 1, IL-12. Los macrófagos son las mejores células productoras de IFN- α y por esto se lo llama interferón leucocitario.

Tipo II. IFN- γ . Es la principal citocina activadora de los macrófagos y tiene funciones fundamentales en la inmunidad innata y la inmunidad celular adaptativa frente a los microorganismos intracelulares. Es producido por linfocitos T CD4⁺ de tipo Th1, linfocitos T CD8⁺ y células NK; existen evidencias de que también las células B, las NKT y las células presentadoras de antígeno (APC) son capaces de producirlo. El IFN- γ se encarga de orquestrar la respuesta de los macrófagos; además, dirige la atracción de leucocitos y el crecimiento, maduración y diferenciación de muchos tipos celulares, refuerza la actividad de las células NK y regula la función de las células B. Este IFN también es llamado interferón inmunitario. La producción de IFN- γ es controlada por citocinas secretadas por APC, principalmente IL-12 e IL-18. Las citocinas que regulan negativamente la producción de IFN- γ son IL-4 e IL-10 (1, 2, 13, 15-17).

1.1.4. Otras moléculas que participan en la respuesta pro-inflamatoria

Óxido Nítrico (ON).

El óxido nítrico se forma a partir de L-arginina por la actividad enzimática de la sintasa del óxido nítrico (NOS), con la obtención de L- citrulina como co-producto. El ON es un mensajero intracelular, reconocido por su amplia versatilidad en el SI. Células del SI como macrófagos, neutrófilos y NK, utilizan receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Al ser activados los macrófagos inhiben la replicación del patógeno, liberando una gran cantidad de moléculas, incluyendo el ON, el cual es un potente microbicida para destruir los

microorganismos ingeridos. Además de los macrófagos, otras células del SI producen y responden al ON. A nivel celular afecta las funciones como diferenciación y crecimiento de los leucocitos, induce apoptosis y motilidad citoplasmática en los macrófagos, modula la adhesión de neutrófilos, además de regular la síntesis de citocinas. Las funciones de ON dependen de su concentración, por lo que también se puede regular su producción (18-20).

La producción de radicales libres, principalmente ON, es altamente eficiente en la eliminación de microorganismos. Sin embargo, el estrés oxidativo provocado por los radicales libres daña numerosas células. La producción de ON es inducida fuertemente a través de IL-1 y TNF- α en células endoteliales, monocitos/macrófagos y fibroblastos (1, 2, 13, 15, 16).

El ON es un importante mediador en la homeostasis del SI. Alteraciones en su generación o acción pueden inducir estados patológicos (18).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CRÓNICAS NO TRANSMISIBLES (ECNT)

Las ECNT (obesidad, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cardiovasculares y enfermedad vascular cerebral) son un grupo heterogéneo de padecimientos que contribuye a la mortalidad mediante sus complicaciones. La prevención y el control de las enfermedades crónicas y degenerativas debe ser una prioridad para el sector salud, su crecimiento y letalidad lo justifican. El efecto social de estas anomalías será creciente, ya que afecta a individuos en edades productivas y representa costos elevados para el sector salud (21, 22).

El control de las ECNT se fundamenta en principios distintos en relación con los padecimientos transmisibles. Implica un proceso educativo para entender la enfermedad, cambios significativos y focalizados en las conductas, utilización a largo plazo de múltiples fármacos y evaluaciones frecuentes, además de la participación de especialistas en conjunto con la familia y la comunidad. En este sentido, las acciones que realice el gobierno y la sociedad deben orientarse a la prevención de enfermedades comunes con características de epidemia, como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) (21, 23).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que a nivel mundial, al menos 2.8 millones de personas mueren al año como resultado del sobrepeso o la obesidad. Esas patologías tienen efectos metabólicos adversos asociados a otros problemas de salud, siendo un factor de riesgo para resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hígado graso, aterosclerosis, problemas respiratorios y algunos tipos de cáncer. En 2008, a nivel mundial, el 35% de los adultos de 20 años o más tenían sobrepeso ($IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$), de los cuales un 34% eran hombres y un 35% mujeres (24). La prevalencia mundial de obesidad entre 1980 y 2008 se ha más que duplicado. En 2008, el 10% de los hombres y el 14% de las mujeres en el mundo eran obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$), en comparación con el 5% para los hombres y el 8% de las mujeres en 1980. Para 2008, un estimado de 205 millones de hombres y 297 millones de mujeres mayores de 20 años de edad eran obesos; un total de más de medio billón de adultos obesos en todo el mundo (24).

En 2008, la prevalencia mundial de diabetes se estimó en 9% de la población. La diabetes es la principal causa de insuficiencia renal, amputaciones de miembros inferiores, así como de discapacidad visual o ceguera. Los pacientes con diabetes necesitan al menos de 2 a 3 veces más recursos de salud que aquellos que no tienen diabetes, representando así el 15% del presupuesto nacional en salud en la atención y el cuidado de la diabetes (24). Tanto la prevalencia en México de DM 2 como de hipertensión arterial aumentó en los últimos años, a 9.2% y 31.5%, respectivamente; siendo los adultos con sobrepeso y obesidad los que presentan mayor incidencia de estas enfermedades (25).

Actualmente, la prevalencia nacional combinada de sobrepeso y obesidad en adolescentes fue de alrededor de 35.8% para el sexo femenino y 34.1% en el sexo masculino, dando un total nacional de 71.28%, según datos de la ENSANUT 2012 (25).

En adultos, los aumentos en las prevalencias de obesidad en México se encuentran entre los más rápidos documentados en el plano mundial. De 1988 a 2012, el sobrepeso en mujeres de 20 a 49 años de edad se incrementó de 25 a 35.3% y la obesidad de 9.5 a 35.2% (25). De acuerdo a las tendencias que muestran las encuestas nacionales de los últimos años, la prevalencia de sobrepeso, obesidad y diabetes va en aumento (23, 26, 27).

1.3. INFLAMACIÓN Y LAS ECNT

La inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector, cuyo objetivo último es defender al organismo de la lesión celular iniciada por microorganismos, toxinas, alérgenos, etc., así como de las consecuencias de la misma en las células y restos tisulares necróticos. Estos procesos inflamatorios y de reparación pueden llegar a ser lesivos y perjudiciales, si adquieren carácter crónico (28, 29).

En la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus tipo 2, existe una interacción entre el metabolismo y el sistema inmunológico. Estas ECNT se asocian a una inflamación crónica de bajo grado, caracterizada por la producción anormal de citocinas de tipo pro-inflamatorio. Los mecanismos que pueden ocasionar esta patogénesis son, en primer lugar, el consumo elevado de glucosa y otros macronutrientes, provocando con ello un aumento en el estrés oxidativo de las células e inflamación; y en segundo lugar, al elevarse las concentraciones de los mediadores inflamatorios (citocinas pro-inflamatorias), interfieren a su vez con las acciones de la insulina, inhibiendo los efectos anti-inflamatorios de la misma, promoviendo así el proceso inflamatorio (28, 30).

La respuesta inflamatoria iniciada en el tejido adiposo blanco produce una situación crónica a nivel sistémico, generando un círculo vicioso, que finalmente conduce a resistencia insulínica, aterosclerosis y alteraciones propias del síndrome metabólico (31). Entre los principales mediadores de la inflamación liberados por el tejido adiposo se encuentran el TNF- α , el angiotensinógeno y las hormonas secretadas por los adipocitos, como la leptina y la resistina. Además, estos mediadores de la inflamación se han asociado con efectos negativos sobre la hipertensión, diabetes, dislipidemias, infecciones y cáncer (31-33). Junto con el tejido adiposo, las proteínas de fase aguda de origen hepático, la proteína C reactiva, el amiloide A, el fibrinógeno y el inhibidor de la activación de plasminógeno, también se han vinculado con el desarrollo de procesos inflamatorios. A este fenómeno se le conoce como meta-inflamación (inflamación metabólica), desencadenada por un exceso de nutrientes, así como de su metabolismo, los cuales están relacionados directamente con la homeostasis del sistema inmunológico (28, 34-36).

La meta-inflamación y el estrés oxidativo se relacionan con la modulación y mediación de las citocinas pro-inflamatorias, así como la de las especies reactivas de oxígeno. El desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y las

defensas antioxidantes provocan estrés oxidativo, alterando así las vías de señalización, y provocando con ello daño tisular. La glucotoxicidad y lipotoxicidad también inducen el estrés oxidativo y sobre-regulan las citocinas TNF- α e IL-6 (34).

En las personas obesas, la resistencia a la insulina está ligada al aumento de metabolitos bioactivos derivados de adipocitos, como lípidos, ácidos grasos libres, MCP-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos) y citocinas pro-inflamatorias (30, 31). Sin embargo, a pesar de ser la obesidad un factor de riesgo para el desarrollo de resistencia a la insulina o diabetes, otros factores también están involucrados. Un estudio realizado en jóvenes con resistencia a la insulina, e insulino-sensibles como control, hijos de pacientes con diabetes tipo 2, con un Índice de Masa Corporal (IMC) normal (delgados) en común, mostraron concentraciones similares en plasma de TNF- α , IL-6, y adiponectina (37). Esto sugiere que, en las personas delgadas, la inflamación sistémica no tiene un papel significativo en el desarrollo de resistencia a insulina. Estos resultados implican que la resistencia a la insulina se puede atribuir a una desregulación del metabolismo celular de los ácidos grasos (38).

1.4. EDULCORANTES

Dentro de las medidas nutricionales de restricción energética, el uso de edulcorantes ha permitido que aquellos pacientes con diabetes mellitus, sobrepeso y obesidad, tengan a su disposición una gran variedad de alimentos que satisfacen la palatabilidad de las personas, sin que estos contengan una alta cantidad de energía. En las últimas décadas, el aumento en el consumo de estos aditivos ya no es sólo por pacientes con alguna ECNT, sino también por la población en general (39-41).

Los seres humanos nacen con una preferencia innata por lo dulce. La sacarosa o azúcar de mesa ($C_{12}H_{22}O_{11}$) es el endulzante más común. A través del tiempo, el azúcar ha sido uno de los más importantes productos adicionados en los alimentos. El azúcar no sólo provee sabor dulce, sino también da características biológicas o antimicrobiales, sensoriales (sabor, aroma, textura, apariencia, etc.), físicas (viscosidad, consistencia, deshidratación, etc.) y químicas (caramelización, productos de oxidación, etc.) a los alimentos. Es

utilizado principalmente en productos de panadería, cereales, dulces, confitería, helados, productos lácteos, bebidas, alimentos enlatados, embotellados o congelados, entre otros (42).

Los edulcorantes son aditivos alimentarios, ya que se incluyen en la formulación de los productos y actúan como estabilizantes, conservadores o modificadores de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad. Los edulcorantes confieren a un alimento un sabor dulce y son también conocidos como endulzantes. Una de las características de los edulcorantes es la cantidad de energía que proporcionan, dividiéndolos así en nutritivos y no nutritivos (43, 44).

Los edulcorantes nutritivos proporcionan 4 kcal/g, teniendo así un efecto en la glucosa sanguínea. Los más comunes son: sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrosa, miel y miel de maíz, así como también los polioles o azúcar de los alcoholes, que aportan 2 kcal/g, siendo menos dulces que el azúcar y no producen caries; entre ellos está el sorbitol, xilitol, manitol, maltitol, isomaltitol, lactitol y eritritol.

Los edulcorantes no nutritivos no aportan energía o aportan una mínima cantidad, que no es considerable. Tienen un alto poder endulzante y basta una cantidad muy pequeña para obtener el sabor dulce. Actualmente se encuentran en el mercado mexicano: aspartame, sacarina, acesulfame K, sucralosa, ciclamato, alitame y glucósidos de esteviol (stevia).

El uso de los edulcorantes es regulado por cada país, pero antes de ser permitidos para su uso, la seguridad de estos es evaluada por diferentes comités mundiales, como son el Comité Científico para la Alimentación (SCF, *Scientific Committee on Food*), el Comité de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*), el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, *Food and Drugs Administration*), las Autoridades Europeas de Seguridad en Alimentos (EFSA, *European Food Safety Authority*), y en el caso de México, la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (45). Para poder evaluar la seguridad de un aditivo de alimentos, es necesario incluir resultados de estudios experimentales sobre absorción, distribución y metabolismo en modelos animales y

humanos; pruebas toxicológicas *in vitro* e *in vivo*; datos técnicos como identidad, pureza, estabilidad y productos de degradación; datos de administración, proceso de fabricación, necesidades tecnológicas, evaluaciones por los consumidores, las posibles aplicaciones, niveles de uso en las distintas categorías de alimentos y el resultado estimado a la exposición del uso propuesto (43).

La evaluación toxicológica consiste en una evaluación de riesgo de los edulcorantes. Para ello, se realiza un procedimiento de cuatro pasos: la identificación y caracterización de los peligros, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo. Durante la evaluación de riesgo se determina la ingestión diaria aceptable (IDA), la cual es la cantidad de aditivo alimentario, expresada en mg/kg de peso corporal, que puede ser ingerido al día durante toda la vida sin provocar algún riesgo para la salud (45).

Los datos sobre la cantidad consumida de edulcorantes generalmente son sobrestimados y en una gran mayoría no son fiables; es decir, la información proporcionada en el etiquetado de los alimentos puede ser confusa o errónea. Se utilizan distintos términos para mencionar el uso de aditivos, como son: “sin calorías”, “bajo en calorías”, “reducido en calorías”, “sin azúcar”, “reducido en azúcar”, “con sustituto de azúcar”, “con edulcorante”, o marcas comerciales de los mismos, como “aspartame”, “splenda”, “sucralosa” y “estevia”; por lo que se debe evaluar cada producto para determinar si contiene o no el aditivo mencionado y la cantidad del mismo (40), siguiendo las especificaciones para la población mexicana de la NOM-086-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales; y la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, de Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados - Información Comercial y Sanitaria.

El consumo de edulcorantes ha ido en aumento en las últimas décadas (46), así como también el incremento en la incidencia y prevalencia de obesidad y diabetes mellitus. La mayoría de los alimentos industrializados, principalmente las bebidas, son endulzadas con edulcorantes (47). En Estados Unidos, la prevalencia del consumo de bebidas endulzadas con algún tipo de edulcorante no nutritivo aumentó de un 6.1% a un 12.5% en niños, y en adultos de un 18.7% a un 24.1% (48). Dada la contribución a la palatabilidad en los alimentos y la limitación en el consumo de energía, los edulcorantes han sido una

opción alimentaria en las ECNT. Es así como el uso de los edulcorantes sigue siendo tema de estudio, puesto que es importante conocer más sobre el uso a corto y largo plazo, y los efectos de los mismos.

La sucralosa es uno de los edulcorantes de mayor uso a nivel comercial, debido a sus propiedades organolépticas, así como también los glucósidos de esteviol, que son de reciente inserción en el mercado mexicano, siendo estos una nueva alternativa por su origen natural, teniendo con ello un impacto a nivel comercial.

1.4.1 Sucralosa

La sucralosa ($C_{12}H_{19}Cl_3O_8$) se obtiene del azúcar a través de un proceso de elaboración patentado, mediante el cual se sustituyen selectivamente tres grupos hidroxilo de la molécula de azúcar con tres átomos de cloro, del cual se obtiene 4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-fructofuranósilo (43). El cloro está presente de manera natural en muchos de los alimentos y bebidas que se ingieren todos los días, siendo de gran importancia en muchos procesos biológicos y en la naturaleza. La presencia de cloro en la sucralosa produce un edulcorante que no tiene energía, pero que es 600 veces más dulce que el azúcar. En apariencia es un polvo blanco, sin olor, termoestable y de pH neutro. Tiene un claro sabor dulce, rápidamente perceptible, que no deja un sabor desagradable. Asimismo, la sucralosa retiene su sabor dulce durante todos los procesos de fabricación de alimentos y bebidas, y esto permite que se utilice prácticamente en cualquier actividad en que se emplea el azúcar, incluyendo cocinar y hornear (49).

El organismo no utiliza la sucralosa para obtener energía, por lo que pasa rápidamente a través del cuerpo, prácticamente inalterada. La sucralosa ha sido sometida a extensas pruebas durante un período de 20 años y se ha comprobado que es segura y un ingrediente extraordinariamente inerte. La sucralosa es útil para las personas con diabetes, dado que las investigaciones demuestran que no tiene efecto en el metabolismo de los hidratos de carbono, el control de la glucosa en sangre a corto o largo plazo, ni la secreción de insulina, por lo que puede ser utilizada por toda la población (41, 50, 51). La ingestión diaria aceptable de sucralosa es de 0 a 15 mg/kg de peso corporal, según la JECFA dada en 1990 y por la SCF en el 2000 (44, 45).

Una ventaja de la sucralosa para los fabricantes de alimentos y bebidas y los consumidores es su estabilidad excepcional, ya que retiene su sabor dulce con el paso del tiempo en una amplia variedad de condiciones de temperatura y almacenamiento. Se emplea en frutas enlatadas, bebidas de frutas bajas en energía, productos horneados, salsas y almíbares. Se puede utilizar como edulcorante en suplementos dietéticos, alimentos con fines médicos, suplementos vitamínicos y minerales y productos farmacéuticos. La sucralosa se encuentra disponible como ingrediente para utilizarse en una amplia gama de alimentos y bebidas con el nombre comercial de SLENDA® Sucralose (52). Los ingredientes de la fórmula comercial son dextrosa (95.8%), maltodextrina (3%) y Sucralosa (1.2%). El país de origen es Estados Unidos de América, comercializado por McNeil Nutritionals, LLC 2010.

1.4.2 Glucósidos de Esteviol

Los glucósidos de esteviol (G.E.), por su origen natural, gran poder endulzante y seguridad, son uno de los edulcorantes más utilizados recientemente por la industria alimentaria. A este edulcorante se le conoce comúnmente como *Stevia*, ya que proviene de una planta con el mismo nombre (53).

La *Stevia* es una especie botánica de la familia de las asteráceas, nativa de la región tropical de Sudamérica, su nombre científico es *Stevia rebaudiana Bertoni*, es llamada “Hierba Dulce del Paraguay”. Los compuestos edulcorantes de la planta están contenidos sobre todo en las hojas. Las hojas secas son entre 20 y 35 veces más dulces que el azúcar (53, 54). En 1931, los químicos franceses M. Bridel y R. Lavieille lograron aislar los glucósidos de esteviol que provocan su sabor. Los catalogaron como esteviósidos (contienen glucosa) y rebaudiósidos A, B, C, D y E (53, 55). Los esteviósidos (110-270 veces más dulces que el azúcar) son el componente principal, constituyendo cerca del 85% de los edulcorantes totales, y rebaudiósidos A (180-400 veces más dulce que el azúcar), en menor proporción, es el componente más dulce (56).

Los GE son 300 veces más dulces que el azúcar, son estables a los 200°C y no se fermentan. Otras ventajas adicionales de los G.E. son: no aportan energía al ser metabolizados, por lo que no elevan las concentraciones de glucosa en la sangre (57, 58), tienen función antiácida y cardiotónica (59); además, no producen caries, al no ser

fermentados por las bacterias orales y se distingue de los edulcorantes artificiales por no tener sabor metálico y no ser cancerígenos (60). Los estudios clínicos realizados por el JECFA demuestran que los G.E. no tienen efecto en la respuesta de la presión sanguínea ni de la glucosa en sangre, indicando así la seguridad para ser utilizados por las personas que tienen diabetes, pero sin ser útiles como tratamiento médico o farmacológico. Estudios independientes realizados recientemente en seres humanos sobre seguridad, metabolismo e ingestión de G.E., respaldan la seguridad de los mismos. Estableciendo así una IDA de 4 mg/kg de peso corporal (expresada como esteviol). La ingestión estimada de G.E., incluso entre los mayores consumidores, no excede la IDA (61).

De su hábitat en Paraguay la *Stevia* ha pasado a cultivarse en extensas áreas, especialmente en países como China, Brasil, Japón, Corea, Tailandia, Taiwán e Israel; siendo Japón el mayor consumidor mundial de stevia, con un 40% del mercado de edulcorantes, donde se utiliza en todo tipo de alimentos y bebidas (54).

Los G.E. son metabolizados por una ruta común. Esta ruta comienza en el intestino, donde los glucósidos de esteviol son descompuestos en esteviol; el esteviol es secretado en la orina como glucurónido de esteviol. Los componentes metabolizados de los G.E. esencialmente salen del cuerpo y no hay acumulación de los mismos (61). El producto comercial no da información clara sobre sus ingredientes, ya que solo mencionan mezcla de azúcares o disacáridos y stevia (Rebaudiósidos A 97% de pureza (0.5g/100g)).

En 2008 se realizó un estudio donde se evaluó la respuesta inmunológica de los esteviósidos en ratones, con tres diferentes dosis, en el cual se observó que la actividad fagocitaria de los macrófagos, así como también la proliferación de linfocitos, tuvo un incremento (62). Otros estudios hechos con *Momordica grosvenori*, otro edulcorante de origen natural, también mostraron una disminución en el estrés oxidativo de ratones con diabetes (63-65). Estos estudios sugieren que algunos edulcorantes intensos de origen natural no sólo tienen beneficios de tipo nutricional sino también inmunológico.

1.5. LOS EDULCORANTES Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNITARIO

En las últimas décadas, tanto el tamaño como el tipo de alimentos han ido evolucionando, así como los hábitos alimentarios de la población. El consumo de azúcares tiene un gran impacto sobre la salud poblacional. Actualmente, el consumo per cápita de azúcar (sacarosa) es de aproximadamente 47.9 kg al año (66), 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 (67). 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.

La habilidad de las células de percibir y responder de forma adecuada en los distintos microambientes se lleva a cabo por medio de la señalización celular. Uno de los más importantes metabolitos o nutrimentos que modulan la respuesta celular es la glucosa. La glucosa es la fuente primaria de síntesis de energía. Gracias a ella, la célula puede realizar distintas funciones, por tanto el metabolismo celular depende de glucosa. Durante la síntesis de energía se producen otras moléculas, como las especies reactivas de oxígeno, que también forman parte del metabolismo celular, siendo las responsables de la respuesta inflamatoria, que es causada en parte por el estrés oxidativo.

Anteriormente, se mencionó que existe una relación entre la inflamación crónica, el estrés oxidativo y las ECNT, en donde el exceso de macronutrimentos afecta la homeostasis del sistema inmunológico (28, 35, 36). Ya que las ECNT aumentaron su prevalencia en los últimos años, se han llevado a cabo distintas estrategias para la atención de las mismas. El uso de edulcorantes no energéticos es una de ellas (41).

Entre los edulcorantes energéticos más utilizados se encuentra la sacarosa, la cual está formada por una molécula de glucosa y otra de fructosa, siendo una de las principales fuentes de glucosa para el organismo. Un edulcorante no energético que proviene de la sacarosa es la sucralosa, donde se intercambian tres grupos OH por Cl, obteniendo así un poder endulzante superior, suponiendo con ello que, por ser de origen similar a la sacarosa, su funcionamiento a nivel celular es parecido. En cambio, los G.E. tienen una estructura química diferente, por lo que su metabolismo a nivel celular ha mostrado otros efectos. En

el sistema inmunológico, los esteviósidos actúan como inmunomoduladores y anti-inflamatorios, inhibiendo la producción y síntesis de citocinas de tipo pro-inflamatorias como la IL-1 β y el TNF- α , además de ON, no así su metabolito esteviol (68).

Estudios realizados sobre el uso de sacarosa y sus efectos en marcadores de inflamación, como la proteína C-reactiva, la haptoglobina y la transferrina, demuestran que existe un incremento en su concentración. En cambio, el consumo de edulcorantes no energéticos demuestra que la concentración de marcadores inflamatorios disminuye, sin tener efecto en el peso o el consumo energético total (69, 70).

Por lo tanto, siendo el SI uno de los principales componentes para mantener la homeostasis del organismo y regular las respuestas inflamatorias, es importante conocer la interacción entre las distintas moléculas del metabolismo celular, el sistema inmunitario y las ECNT, mediadas por la metainflamación. En la actualidad no existe suficiente evidencia que indique que el uso frecuente de edulcorantes de diferentes naturalezas modifica la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, por lo que es necesario determinar si los edulcorantes son una solución o si promueven el desarrollo de las ECNT.

2. Planteamiento del Problema:

El gusto es uno de los cinco sentidos con los que cuentan los seres vivos y es el más desarrollado desde antes del nacimiento. La preferencia por los sabores dulces está integrada a los sentidos humanos, ya que los órganos y sistemas del cuerpo utilizan a los carbohidratos como principal fuente de energía y entre ellos se encuentran algunos edulcorantes.

Los edulcorantes son aditivos que se agregan a los alimentos o bebidas para darles un sabor dulce. Se pueden clasificar en naturales y artificiales, según su origen. Entre los primeros se encuentran la sacarosa, fructosa, lactosa, maltosa, dextrosa, miel, miel de maíz, polioles (sorbitol, xilitol, maltitol, isomaltitol, lactitol, manitol y eritriol), y esteviósidios; los artificiales son la sacarina, aspartame, acesulfame-K, sucralosa, ciclamato y alitame. En el último medio siglo, se han desarrollado edulcorantes o sustitutos del azúcar que han demostrado ser una valiosa ayuda para los consumidores, en particular para los pacientes con diabetes, sobrepeso u obesidad, ya que les permiten controlar su peso sin dejar de disfrutar los sabores dulces.

La disponibilidad de los edulcorantes artificiales ha permitido que en la actualidad cualquier persona tenga a su alcance alimentos y bebidas adicionadas con edulcorantes, sin que estos le aporten un incremento en la ingestión energética, además de disfrutar del placer de saborear lo que más les guste.

Antes de entrar al mercado, los edulcorantes deben cumplir con las regulaciones gubernamentales de cada país y sólo se ponen a la venta después de demostrar su inocuidad. Diversas publicaciones demuestran la seguridad de su consumo en referencia a la toxicología, sin dar respuesta a procesos de tipo inmunológico a corto o largo plazo. Generalmente sólo se hace mención a la ingestión diaria recomendada de estos, sin precisar algún efecto de los edulcorantes a nivel de la respuesta orgánica inmunitaria.

En 2008 se realizaron estudios de los edulcorantes G.E. y *Momordica grosvenori* (de origen natural) que mostraron efectos en la respuesta inmunitaria, con aumento en la proliferación de linfocitos y fagocitosis (62). Sin embargo, no hay más reportes en la literatura con respecto al efecto de los edulcorantes en la respuesta inmunitaria.

En los últimos años se ha incrementado tanto el consumo como la promoción de los edulcorantes, principalmente los no energéticos, que son utilizados por la población en general. Médicos, nutriólogos y otros profesionales de la salud refieren el uso de edulcorantes, para ayudar a los pacientes a resolver problemas como control de peso, obesidad y tratamiento dietético en personas con diabetes, sin considerar que el uso excesivo de estos puede ser contraproducente.

Se ha demostrado que las ECNT están asociadas a procesos inflamatorios crónicos, resultado de un desequilibrio entre el metabolismo y el sistema inmunológico. Al ser los edulcorantes una alternativa con bajo aporte energético para el consumo de alimentos, conllevan un efecto en el metabolismo orgánico, y por consiguiente, en el sistema inmunitario. Siendo que la población general está expuesta a este tipo de productos es necesario conocer más sobre el tema, por lo que surge la pregunta:

¿Qué efecto tienen los edulcorantes G.E. y sucralosa sobre la respuesta inmunitaria de tipo pro-inflamatoria en ratones BALB/c?

3. Hipótesis:

Hipótesis nula:

Las poblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$), así como las concentraciones de IFN- γ y ON, estarán aumentadas por el consumo frecuente de edulcorantes comerciales G.E. y sucralosa.

Hipótesis alterna:

Las poblaciones de linfocitos T ($CD4^+$ y $CD8^+$) y las concentraciones de IFN- γ y ON no estarán afectadas por el consumo frecuente de edulcorantes comerciales G.E. y sucralosa.

4. Objetivos:

GENERAL

Evaluar el efecto que tienen los edulcorantes comerciales G.E. (natural) y sucralosa (artificial) sobre la respuesta inmunológica pro-inflamatoria en ratones BALB/c de 14 semanas de edad.

DE CONTROL

- Evaluar los cambios en el consumo de alimento y líquido durante las 6 semanas de exposición al edulcorante.
- Evaluar el cambio de peso durante las 6 semanas de exposición.
- Determinar la concentración de glucosa sérica periférica, antes de ser expuestos, a las 3 semanas y al finalizar la exposición a los distintos edulcorantes.

ESPECÍFICOS

- Determinar y cuantificar por citometría de flujo las poblaciones de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺.
- Cuantificar la producción de IFN- γ por prueba ELISA, en linfocitos de bazo de ratones BALB/c de 14 semanas de edad.
- Cuantificar la producción de ON en macrófagos de ratones BALB/c de 14 semanas de edad, por medio del ensayo colorimétrico de Greiss.

Como complemento de este trabajo de investigación se tomaron los objetivos de una Tesis de Licenciatura (P. Biol. Jessica Serrano Valdés) para fines de publicación del artículo científico. Estos objetivos incluyeron determinar y cuantificar por citometría de flujo las poblaciones de linfocitos T CD4⁺/CD25⁺, CD4⁺/CD69⁺, CD8⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD69⁺.

5. Justificación:

Las ECNT como la diabetes mellitus, hipertensión arterial, obesidad, cáncer, etc. son actualmente las principales causas de muerte en México, según las estadísticas del Sistema Nacional de Información en Salud. El aumento en el consumo de alimentos con alto valor energético ha provocado que el país se encuentre entre los primeros lugares a nivel mundial de sobrepeso y obesidad, ya no sólo en adultos sino también en niños. Una de las principales estrategias es la restricción energética, lo que ha permitido el uso de edulcorantes, principalmente de aquellos que no aportan energía, tanto en pacientes con diabetes mellitus, como aquellos con obesidad y sobrepeso.

Los edulcorantes tienen gran importancia en la industria alimentaria, ya que proporcionan sabor dulce, cuerpo o consistencia al alimento. Además, actúan como conservadores. Utilizando una pequeña cantidad de edulcorantes distintos al azúcar (sacarosa) se puede obtener un gran sabor dulce, por lo que el consumo de azúcar ha disminuido o ha sido sustituido por alguno de estos edulcorantes, siendo que, en teoría, esto disminuiría el consumo energético total, mejorando así el estado nutricional. Existen estudios donde se demuestra que el consumo de edulcorantes artificiales sólo satisface al paladar, sin que esto signifique que el consumo energético sea bajo. Por el contrario, se ha visto que el consumir edulcorantes como aspartame, sacarina o acesulfame K estimula el apetito, al no haber un equilibrio energético; por consiguiente se aumenta la ingestión de alimentos con otras fuentes energéticas, provocando con ello incremento en la masa grasa y por tanto, un aumento en el peso corporal.

El desarrollo de sustitutos de azúcar ha permitido que actualmente se cuente con una gran variedad tanto de origen natural como artificial. Químicamente, pueden ser diferenciados y por consiguiente, su metabolismo es distinto entre ellos. Debido a que algunos son fuente de glucosa, estos participan en los procesos celulares para obtener energía y realizar sus funciones; en el caso de los edulcorantes de origen artificial y algunos naturales, sus componentes no son la glucosa, por lo que metabólicamente no pueden tener el mismo efecto.

Durante años se ha comprobado que las ECNT tienen efectos o son dependientes de la respuesta inmunitaria del organismo. Se ha visto que la inmunidad innata tiene una función

elemental en el proceso inflamatorio. Debido a que las ECNT generalmente poseen un componente inflamatorio, es importante conocer la relación o interacción entre los distintos edulcorantes y la respuesta inmunitaria, siendo esta la defensa ante la amenaza de diferentes agentes biológicos. Dado que la respuesta inmunitaria se basa en procesos celulares dependientes de glucosa, es necesario conocer si los componentes de los distintos edulcorantes influyen en estos procesos.

6. Material y Métodos:

6.1. Diseño de Estudio

Tipo de estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Universo

Células de ratones BALB/c de 14 semanas de edad, machos y hembras.

Método de muestreo

Por asignación aleatoria.

Tamaño de muestra

8 ratones machos y 8 hembras por grupo de estudio. 64 ratones en total.

Grupo Control Negativo (Sin edulcorante): 16 ratones

Grupo Control Positivo (Sacarosa): 16 ratones

Grupo Stevia (Edulcorante Natural): 16 ratones

Grupo Splenda (Edulcorante Artificial): 16 ratones

6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Criterios inclusión: Ratones BALB/c a partir de las 8 semanas de edad que consumieron edulcorantes durante 6 semanas

Criterios eliminación: Ratones BALB/c a partir de las 8 semanas de edad que consumieron edulcorantes y enfermaron o murieron durante el estudio.

6.3. Procedimientos

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica y en el Laboratorio de Investigación en Nutrición de la Facultad de Medicina de la UAEMex.

Crianza de ratones BALB/c:

Se criaron ratones de la cepa BALB/C bajo condiciones estándar: dieta para roedor (Purina, USA), completa en cuanto al contenido de proteína, grasa, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales; acceso libre a agua purificada. Se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad natural; temperatura ambiente de 22° C, según la Norma Oficial NOM-062-ZOO-1999 para las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

A las 8 semanas de edad se expusieron a los distintos edulcorantes durante 6 semanas, a una concentración del 10% para la sacarosa y su proporción comercial (1 sobre-1g) de sucralosa y estevia. Al término de las 6 semanas de exposición al edulcorante, los animales fueron sacrificados (con sobredosis de anestesia), para realizar las evaluaciones correspondientes.

Extracción de macrófagos de peritoneo

A los ratones de 14 semanas de edad se les inyectó intraperitonealmente (ip) 1.5 ml de medio tioglicolato modificado al 3%. Después de cuatro días se recolectaron las células producidas en la cavidad peritoneal con una inyección ip y las células se recuperaron en 7 ml de PBS libre de endotoxinas. Las células recolectadas fueron lavadas dos veces con PBS, centrifugándose 10 min a 1,250 rpm. Posterior a los lavados las células se contaron y se sembraron en placas de 12 pozos, a una densidad de 1×10^6 células por pozo en medio de cultivo DMEM complementado con 10% suero fetal bovino, L-glutamina y antibióticos. Después de cinco horas de cultivo (para permitir la adhesión de las células), se realizaron varios lavados con PBS para eliminar aquellas células no adheridas. Posterior a esto se agregó medio de cultivo fresco y las células se utilizaron 24 hr después. La estimulación antigénica se llevó a cabo adicionando LPS 100 ng/mL/24 hr. Posterior a esto se determinó el ON.

Extracción de linfocitos de bazo

En condiciones asépticas, se extrajo el bazo de los ratones, colocándolo en un contenedor con medio de cultivo (RPMI). Con la ayuda de dos portaobjetos esmerilados estériles el tejido se presionó hasta disgregarlo. El tejido disgregado se colocó en una caja de *petri* con medio de cultivo (RPMI). Con la ayuda de una pipeta de vidrio el tejido fue re-

suspendido para garantizar su desintegración completa. La suspensión celular se colocó en un tubo y se centrifugó a 1,300 rpm por 10 min. Transcurrido el tiempo de centrifugación se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue re-suspendido en 1 mL de solución de lisis durante 1 min, para la eliminación de glóbulos rojos. Posterior a esto, las células se centrifugaron de nuevo a 1,300 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con solución balanceada de fosfatos (PBS). Finalmente, las células fueron re-suspendidas en 10 mL de medio de cultivo para conteo celular.

Una vez obtenidos los linfocitos de bazo, estos fueron sembrados en placas de 96 pozos a una densidad de 0.25×10^6 células por pozo. Estas células fueron estimuladas (Ionomicina 10 ng/mL y PMA 100 ng/mL) para la determinación de citocinas por ELISA.

Citometría de flujo

1×10^6 linfocitos fueron colocados en tubos para citómetro con 50 μ l de solución bloqueadora (suero fetal bovino 10%) durante 1hr; después fueron centrifugados a 1,250 rpm por 5 min. El botón celular fue re-suspendido en 1ml de PBS y centrifugado nuevamente. El botón celular fue re suspendido en 50 μ l de solución bloqueadora y se incubó 1 hr con el anticuerpo conjugado con algún fluorocromo, para CD3 (marcador de linfocitos T) con FITC (Isotiocianato de fluoresceína), CD4 (marcador de linfocitos T cooperadores) con PE (Ficoeritrina) y CD8 (linfocitos T citotóxicos) con APC (Aloficocianina). Pasada la hora de incubación los linfocitos fueron lavados con 500 μ L de PBS, se centrifugaron a 1,250 rpm por 5 min, se quitó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en 250 μ L de PBS. Después de los lavados, se agregó 20 μ L de paraformaldehído. Finalmente las muestras fueron leídas en el Citómetro de Flujo FACSCalibur de BD, que se encuentra en el Centro de Investigación en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa *Flowing Software 2.5.0*.

Determinación de citocinas solubles (IFN- γ)

Para determinar citocinas solubles pro-inflamatorias producidas por los linfocitos de bazo (IFN- γ), se utilizó la técnica de ELISA. Para esta técnica fueron empleados kits comerciales. Se sembraron 0.25×10^6 células en placas de 96 pozos. Un día después los linfocitos fueron estimulados con 100 ng/mL de PMA (*phorbol 12-myristate-13-acetate*) y

10 ng/mL Ionomycina durante 24 hr. Transcurrido el tiempo de estimulación, 100 µL de sobrenadante fueron transferidos a una placa de ELISA previamente recubierta con el anticuerpo de captura. El sobrenadante fue incubado en la placa por un período de 2 hr a temperatura ambiente. La placa fue lavada 5 veces con PBS. Posteriormente, 100 µL de anticuerpo de detección fueron añadidos. Para la detección colorimétrica se adicionaron 100 µL de Avidina-HRP, incubándose por otros 30 min. Finalmente, 100 µL de solución de sustrato fueron añadidos e incubados por 15 min hasta que se desarrolló el color. La placa fue leída a 450 nm y las concentraciones de las citocinas por muestra fueron analizadas utilizando una curva estándar, la cual fue incluida durante todo el proceso de ELISA.

Producción de óxido nítrico

Para medir la producción de ON de los macrófagos de peritoneo se llevó a cabo una reacción de Griess, donde por desarrollo colorimétrico se determinan nitratos en el sobrenadante. Para esta técnica fueron sembradas 1×10^6 células en cajas de 12 pozos. Las células fueron estimuladas con 100 ng/mL de LPS por 24 hr. Transcurrido este tiempo, 100 µL de sobrenadante por muestra fueron transferidos a una placa de 96 pozos, donde se mezclaron con 100 µL de solución de Griess conteniendo 50 µL de reactivo Griess A (80% ácido fosfórico, 1% sulfanilamida) y 50 µL de reactivo Griess B (0.1% etilenamida). En la placa se incluyó una curva estándar con las siguientes cantidades totales (µg) de nitritos: 6.25, 12.5, 25, 50 y 100. Después de agregar a cada muestra la mezcla de Griess, la placa fue leída a 450 nm.

6.4. Variables de Estudio

Independientes: Consumo de edulcorantes

Dependientes: Peso, concentraciones de glucosa sérica, citocinas producidas por macrófagos y linfocitos, producción de óxido nítrico por macrófagos.

Intervinientes: consumo de alimento

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	ESTADÍSTICO
INDEPENDIENTE					
CONSUMO DE EDULCORANTES	<i>La acción y efecto de consumir un edulcorante</i>	<i>Consumo de edulcorante diluidos en agua:</i> 1. <i>Control negativo.</i> <i>Agua</i> 2. <i>Control positivo.</i> <i>Sacarosa</i> 3. <i>Natural.</i> <i>Glucósidos de esteviol</i> 4. <i>Artificial.</i> <i>Sucralosa</i>	<i>Categoría nominal</i>	<i>Consumo de agua</i> <i>Consumo de sacarosa</i> <i>Consumo de glucósidos de esteviol</i> <i>Consumo de sucralosa</i>	<i>Variable de agrupación</i>
DEPENDIENTE					
CONSUMO DE ALIMENTO	<i>La acción y efecto de consumir un alimento</i>	<i>Consumo de alimento para roedores completo nutricionalmente</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Gramos</i>	<i>Medidas de tendencia central</i>
PESO	<i>La fuerza con la cual un cuerpo actúa sobre un punto de apoyo, originado por la aceleración de la gravedad, cuando esta actúa sobre la masa del cuerpo</i>	<i>Determinación de la masa por medio de una balanza</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Gramos</i>	<i>Medidas de tendencia central</i>
CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SÉRICA	<i>Magnitud química que expresa la cantidad de un elemento o un compuesto por unidad de volumen</i>	<i>Cuantificación de glucosa en sangre</i>	<i>Cuantitativa discreta</i>	<i>mg/dL</i>	<i>DE</i> <i>Diferencias significativas</i>

LINFOCITOS	<i>Células mononucleares, base celular de la respuesta inmune específica</i>	<i>Cuantificación del número de células CD4+ y CD8+ por medio de citometría de flujo</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>1x10⁶/mL</i>	<i>DE Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney</i>
CITOCINAS EN LINFOCITOS	<i>Proteínas efectoras del SI. Moléculas de bajo peso molecular, importantes por sus características para regular la respuesta inmunológica</i>	<i>Cuantificar IFN -γ por prueba de ELISA</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>pg/mL</i>	<i>Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney</i>
MACRÓFAGOS	<i>Células mononucleares, encargadas de fagocitar cuerpos extraños, actúan como células presentadoras de antígenos, producen citocinas pro-inflamatorias TNF-α, IL-1 cuando son activados.</i>	<i>Cuantificar Macrófagos por microscopía en cámara de hematología</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>1x10⁶/mL</i>	<i>DE Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney</i>
ÓXIDO NITRÍCO EN MACRÓFAGOS	<i>Agente bactericida producto de la fagocitosis en macrófagos</i>	<i>Cuantificación de producción ON por el método de Greiss</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Micromoles de NO₂</i>	<i>Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y U-Mann Whitney</i>

6.5 Implicaciones Bioéticas

Los experimentos se llevaron a cabo bajo y de acuerdo con la norma oficial mexicana: NOM-062-ZOO-1999 de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

6.6 Análisis Estadísticos

Se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis para comparar entre dos grupos y entre grupos, considerando $p < 0.05$ como diferencias estadísticamente significativas.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 20.0 para el análisis de los datos y el programa GraphPad versión 5.0 para la elaboración de las gráficas.

7. Resultados

7.1. EFECTO DEL CONSUMO DE EDULCORANTES COMERCIALES SOBRE POBLACIONES LINFOCITARIAS DE BAZO DE RATONES BALB/c

7.1.1. Página frontal

EFFECTO DEL CONSUMO DE EDULCORANTES COMERCIALES SOBRE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS DE BAZO DE RATONES BALB/c

Marcela Sánchez-Delgado¹, José A. Estrada¹, Jessica Serrano-Valdés¹, Roxana Valdés-Ramos², Irazú Contreras^{1*}

- 1. Laboratorio de Neuroquímica. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.**
- 2. Laboratorio de Investigación en Nutrición. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México.**

***Autor corresponsal: Irazú Contreras, Ph.D. 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. Tel. +52(722) 270-2899 ext. 218. Email: icontrerasg@uaemex.mx**

7.1.2. Carta de envío

GACETA SANITARIA: confirmación de envío / Submission confirma... <https://correoweb.uaemex.mx/owa/?ae=Item&t=IPM.Note&id=Rg...>



Microsoft Office Outlook Web Access Type here to search This Folder Address Book Options Log Off

Mail Deleted Items (2) Drafts (1) Inbox (15) Junk E-Mail Sent Items

Click to view all folders

Clasica Perfiles Platinum Manage Folders...

Reply Reply to All Forward Move Delete Junk Close

GACETA SANITARIA: confirmación de envío / Submission confirmation
ees.gaceta.0.23bb5e.552936a2@eesmail.elsevier.com
[ees.gaceta.0.23bb5e.552936a2@eesmail.elsevier.com] on behalf of Gaceta Sanitaria [gs@elsevier.com]

Sent: Friday, September 06, 2013 12:31 PM
To: Irazú Contreras García

Estimado/a Dr. Contreras:

Le confirmamos la recepción del artículo titulado: "Efecto del consumo de edulcorantes comerciales sobre las poblaciones linfocitarias de bazo de ratones BALB/c", que nos ha enviado para su posible publicación en Gaceta Sanitaria.

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
Gaceta Sanitaria

Dear Dr. Contreras,

Your submission entitled "Efecto del consumo de edulcorantes comerciales sobre las poblaciones linfocitarias de bazo de ratones BALB/c" has been received by journal Gaceta Sanitaria.

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,

EES
Gaceta Sanitaria

Connected to Microsoft Exchange

1 de 1 06/09/2013 12:39 p.m.

7.1.3. Resumen

Objetivo: Conocer el efecto de los edulcorantes comerciales sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa sobre las poblaciones de linfocitos T de bazo y sobre la producción de interferón gamma (IFN- γ), así como la producción de óxido nítrico (ON), por linfocitos y macrófagos de peritoneo, respectivamente.

Métodos: El estudio se llevó a cabo en un modelo murino, con ratones BALB/c de 14 semanas de edad, los cuales consumieron por vía oral los edulcorantes durante 6 semanas. Se realizó citometría de flujo para la identificación de poblaciones celulares de linfocitos T. Adicionalmente, se midió la producción de IFN- γ y ON por ELISA y método de Greiss, respectivamente.

Resultados: El consumo de líquido fue mayor en el grupo de sacarosa y sucralosa, sin presentar cambios en peso o concentraciones de glucosa sérica. Fenotípicamente, el grupo que consumió sucralosa presentó mayor número y frecuencia de linfocitos T CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD69⁺; también se observó una mayor producción de IFN- γ y ON en el mismo grupo de estudio.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que el consumo de sucralosa comercial modifica las subpoblaciones de linfocitos T e incrementa la producción de IFN- γ y ON por linfocitos y macrófagos, lo que puede tener un efecto significativo sobre la homeostasis del organismo.

Palabras clave. - Edulcorantes, respuesta inmunológica, linfocitos T, citocinas, óxido nítrico

7.1.4. Abstract

Objective: To determine the effect of chronic intake of commercial sweeteners, such as sucrose, steviol glucosides and sucralose, on splenic lymphocyte populations, as well as interferon gamma (IFN- γ) and nitric oxide (NO) production by lymphocytes and peritoneal macrophages, respectively.

Methodology: 14 week-old BALB/c mice were fed commercial sweeteners in *ab libitum* drinking water for 6 weeks. We used flow cytometry to analyze splenic T lymphocyte populations. Additionally, IFN- γ and NO production were measured by ELISA and Greiss spectrophotometric assay, respectively.

Results: We found higher water consumption in the groups treated with sucrose and sucralose, but neither group presented a significant statistical change in weight or serum glucose. We identified CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD8⁺/CD25⁺ and CD8⁺/CD69⁺ populations, finding a significant statistical increase in the number and percentage of these cellular populations in the sucralose group. We also observed increased production of IFN- γ and NO by macrophages from the same experimental group.

Conclusions: Our results suggest that frequent consumption of commercial sucralose may modify T lymphocyte subpopulations and increase the production of IFN- γ and NO by lymphocytes and peritoneal macrophages, which may have a significant effect on homeostasis of the organism.

Key words: sweeteners, immune response, lymphocytes, cytokines, nitric oxide.

7.1.5. Introducción

La alimentación humana se ha ido modificando con el paso del tiempo, junto con los cambios en el estilo de vida. Los seres humanos nacemos con una preferencia innata por el sabor dulce. Para satisfacer la palatabilidad en los productos alimentarios, la industria utiliza aditivos, entre ellos los edulcorantes. Estos compuestos se incluyen en la formulación de los productos y actúan como estabilizantes, conservadores o modificadores de sus características organolépticas, para favorecer ya sea su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad (1-3). Una de las características de los edulcorantes es la cantidad de energía que proporcionan, dividiéndolos así en nutritivos y no nutritivos, y por su origen en naturales o artificiales. La sucralosa es un endulzante artificial 600 veces más dulce que el azúcar común, siendo utilizado en diversos productos como panadería, cereales, confitería, productos lácteos, productos enlatados y bebidas. Los glucósidos de esteviol (G.E.) son compuestos de origen natural 300 veces más dulces que el azúcar, actualmente son distribuidos y utilizados por la industria alimentaria por ser seguros para el consumo humano (4-6). Para la prevención y tratamiento de las Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT), se considera la disminución del consumo energético como una medida nutricional importante, por lo que los edulcorantes o endulzantes que no aportan energía han sido utilizados en la industria alimentaria para este propósito (4, 7, 8).

Uno de los principales componentes de las ECNT es la relación entre el metabolismo y el sistema inmunológico (9). Este sistema es uno de los principales mecanismos de defensa del organismo, manteniendo su integridad estructural y funcional ante alguna amenaza. La respuesta inmunológica se caracteriza por la participación de varias células, entre ellas macrófagos y linfocitos, así como de otras moléculas (citocinas) encargadas de la comunicación y regulación de la respuesta inmune (10, 11). El buen funcionamiento de este sistema depende de los nutrientes que consumimos (12).

Las ECNT se caracterizan por una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, causada por una producción anormal de citocinas (9, 13-15). Actualmente, la obesidad, hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2 presentan una alta incidencia en la población mundial (16).

En los últimos años el consumo de edulcorantes ha ido en aumento no sólo en pacientes con alguna ECNT, sino también en la población en general (17); sin embargo existen pocos estudios sobre el efecto de estos compuestos en el sistema inmune (18-20). Hay estudios que demuestran la capacidad inmuno-moduladora de los edulcorantes no nutritivos de origen natural como los glucósidos de esteviol (G.E.) y momordica grosvenori (20-22). Otros estudios mencionan que los edulcorantes artificiales no tienen efecto sobre la respuesta inmunológica (23). El objetivo de este estudio fue determinar si el uso frecuente de los edulcorantes comerciales G.E. y sucralosa, modifican la respuesta inmune pro-inflamatoria en un modelo murino, en comparación con el consumo de agua y sacarosa. Nuestros resultados muestran que el consumo frecuente de sucralosa modifica las poblaciones linfocitarias del bazo, así como la producción de IFN- γ y ON.

7.1.6. Material y Métodos

Animales y dieta

48 ratones BALB/C de 14 semanas de edad, 24 hembras y 24 machos, criados bajo condiciones estándar: dieta para roedor (Purina, USA) completa en cuanto al contenido de proteína, grasa, carbohidratos, fibra, vitaminas y minerales; con acceso libre a bebida. Se mantuvieron bajo un ciclo de luz/oscuridad natural, a temperatura ambiente de 22° C, según la Norma Oficial Mexicana: NOM-062-ZOO-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Diseño Experimental

Se hicieron 4 grupos de estudio: el primero, utilizado como control, suplementado únicamente con agua; el segundo, suplementado con sacarosa (azúcar); el tercero, con G.E. y el cuarto, con sucralosa comercial. Se guardó una proporción de edulcorante del 10% para cada bebida. Los grupos estuvieron expuestos durante 6 semanas (a partir de la semana 8 de edad) a los distintos edulcorantes. Diariamente se midió el consumo de alimento y bebida de cada grupo, y cada semana se recolectaron los pesos individuales de cada ratón. Así mismo, se midieron concentraciones séricas de glucosa periférica en tres momentos del estudio: antes de ser suplementados, a las 3 semanas y al final del estudio.

Extracción de macrófagos de peritoneo

A los ratones de 14 semanas de edad se les inyectó intraperitonealmente (ip) 1.5 ml de medio tioglicolato modificado al 3%. Después de cuatro días, mediante una inyección ip se recolectaron las células producidas en la cavidad peritoneal y las células se recuperaron en PBS libre de endotoxinas. Las células recolectadas fueron lavadas con solución balanceada de fosfatos (PBS) para centrifugación. Las células se contaron y se sembraron en placas de 12 pozos, a una densidad de 1×10^6 células por pozo, en DMEM complementado con 10% suero fetal bovino y antibióticos. Después de cinco horas de cultivo (para permitir la adhesión de las células), se realizaron varios lavados con PBS para eliminar aquellas células no adheridas. Posterior a esto, se agregó medio de cultivo fresco. Las células fueron

cultivadas en una incubadora bajo condiciones normales, y se utilizaron 24 hr después para determinar ON.

Extracción de linfocitos de bazo

En condiciones asépticas, se extrajo el bazo de los ratones, colocándolo en un contenedor con medio de cultivo (RPMI). El tejido se prensó con portaobjetos esmerilados hasta disgregarlo. La suspensión celular se colocó en un tubo y se centrifugó a 1,300 rpm por 10 min. Transcurrido el tiempo de centrifugación se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en solución de lisis, para la eliminación de glóbulos rojos. Posterior a esto, las células se centrifugaron de nuevo. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con PBS. Finalmente, las células fueron resuspendidas para conteo celular.

Citometría de flujo

1×10^6 linfocitos fueron colocados en tubos para citómetro con 50 μ L de solución bloqueadora (suero fetal bovino). Posteriormente, fueron centrifugados y el botón celular fue resuspendido en PBS y centrifugado nuevamente. El botón celular fue resuspendido en solución bloqueadora e incubado con anticuerpos primarios conjugados con alguno de los siguientes fluorocromos: Isotiocianato de fluoresceína (FITC) para CD3 (linfocitos T), CD25 (células T reguladoras o de activación) y CD69 (marcador de activación temprana); Ficoeritrina (PE) para CD4 (linfocitos T cooperadores); Aloficocianina (APC) para CD8 (linfocitos T citotóxicos). Después de la incubación, los linfocitos fueron lavados con PBS, se centrifugaron, se quitó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido en PBS y fijado con paraformaldehído. La lectura de las muestras se realizó en el Citómetro de Flujo BD FACSCalibur del Centro de Investigación en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa *Flowing Software 2.5.0*.

Determinación de IFN- γ por ELISA

Para esta técnica fueron empleados kits comerciales. Se sembraron 0.25×10^6 células en placas de 96 pozos. 24 hrs después, los linfocitos fueron estimulados con 100 ng/mL de PMA (*phorbol 12-myristate-13-acetate*) y 10 ng/mL de ionomicina, durante 24 hr.

Transcurrido el tiempo de estimulación, el sobrenadante fue transferido a una placa de ELISA previamente recubierta con el anticuerpo de captura, la cual fue incubada por un período de 2 hr a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa fue lavada con PBS y se le añadió el anticuerpo de detección. Para la detección colorimétrica, se adicionaron 100 μ L de Avidina-HRP, incubándose por otros 30 min. Finalmente, 100 μ L de solución de sustrato fueron añadidos e incubados por 15 min o hasta que se desarrolló el color. La placa fue leída a 450 nm y las concentraciones de las citocinas por muestra fueron analizadas utilizando una curva estándar, la cual fue incluida durante todo el proceso de ELISA.

Producción de óxido nítrico

Para medir la producción de ON de los macrófagos de peritoneo se llevó a cabo una reacción de Griess, donde por desarrollo colorimétrico se determina la concentración de nitratos en el sobrenadante. Para esta técnica fueron sembradas 1×10^6 células en cajas de 12 pozos. Las células fueron estimuladas con 100 ng/mL de LPS por 24 hr. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante de cada muestra fue transferido a una placa de 96 pozos, donde se mezclaron con 100 μ L de mezcla de Griess, conteniendo 50 μ L de reactivo Griess A (80% ácido fosfórico, 1% sulfanilamida) y 50 μ L de reactivo Griess B (0.1% etilenamida). En la placa se incluyó una curva estándar con las siguientes cantidades totales de nitritos (μ g): 6.25, 12.5, 25, 50 y 100. Después de agregar a cada muestra la mezcla de Griess, la placa fue leída a 450 nm.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística no paramétrica, para comparar entre dos grupos (U de Mann-Whitney) y entre grupos (Kruskal-Wallis). Se consideró $p < 0.05$ para establecer la significancia de los datos.

Se utilizó los paquetes estadísticos SPSS versión 20.0 y GraphPad Prisma 5.0.

7.1.7. Resultados

Peso, concentraciones de glucosa, consumo de líquido y alimento

Se realizó el pesaje de los ratones una vez a la semana, a la misma hora, con el objetivo de determinar si el consumo de los edulcorantes tenía efecto en el peso. El grupo de machos que mostraron mayor peso fué el que consumió agua, pesando en promedio 24.38g; el grupo de hembras con mayor peso fue aquel que consumió G.E. con un promedio de 21.03g. La cepa BALB/c por lo general no presenta cambios importantes en peso, por lo que no se puede considerar que el edulcorante intervenga directamente en el peso de los murinos (datos no mostrados).

Para evaluar el consumo de líquido y alimento se realizaron mediciones diarias. El grupo que presentó mayor insumo de líquido fue el suplementado con sacarosa, bebiendo en promedio 5.9 mL por ratón ($p < 0.05$ entre grupos) y el grupo que consumió menor cantidad de líquido fue el tratado con G.E. Con respecto al consumo de alimento, el grupo que consumió más fué el de sucralosa, con un consumo promedio de 3.2 g por ratón ($p < 0.05$ entre grupos), mientras que el grupo de sacarosa fué el que consumió menos alimento, lo que sugiere que el grupo de sacarosa compensaba la ingesta energética al disminuir el consumo de alimento.

En referencia a las concentraciones de glucosa sérica, se realizaron mediciones sin encontrar diferencias significativas en el transcurso del estudio entre grupos, ya que en promedio los grupos mantuvieron la glucosa entre 90 y 110 mg/dL (datos no mostrados).

Poblaciones celulares de linfocitos T

El objetivo de nuestra investigación fue conocer si el consumo de algún edulcorante tenía efecto en las poblaciones de células T, con el fin de identificar el tipo de respuesta inmunológica. Para esto se realizó un marcaje para linfocitos T ($CD3^+$), así como para $CD4^+$, $CD8^+$ y los marcajes de $CD4^+/CD25^+$, $CD4^+/CD69^+$, $CD8^+/CD25^+$ y $CD8^+/CD69^+$, con el propósito de contabilizar células cooperadoras, citotóxicas, así como el estado de activación de las mismas. El grupo de sucralosa fué el que presentó en mayor número y porcentaje los fenotipos $CD3^+$ ($p < 0.001$ entre grupos), $CD4^+$ ($p < 0.05$ entre grupos), $CD8^+$ ($p < 0.001$ entre grupos), como se observa en la Figura 1. Asimismo, el grupo de sucralosa

mostró en mayor número de células con el fenotipo CD4⁺/CD25⁺ ($p < 0.05$ entre grupos), CD4⁺/CD69⁺ ($p < 0.05$ entre grupos), CD8⁺/CD25⁺ ($p < 0.05$ entre grupos), como se muestra en la Figura 2.

Producción de IFN- γ

Para evaluar la funcionalidad celular de los linfocitos, se midió la producción de IFN- γ , citocina pro-inflamatoria que activa macrófagos. Para medir su producción, los linfocitos fueron estimulados durante 24 hr. El grupo que presentó mayor cantidad de IFN- γ sin estímulo fue el de G.E. con $p < 0.05$. El grupo que presentó concentraciones mayores de IFN- γ después de la estimulación fué el grupo de sucralosa, pero sin ser estadísticamente significativo, como se muestra en la Figura 3. Las concentraciones de IFN- γ a pesar de ser diferentes entre los distintos grupos, son bajas, y es posible que no tengan efectos directos sobre la respuesta pro-inflamatoria.

Producción de ON

Considerando que los macrófagos tienen una importante participación en la respuesta inflamatoria por la producción de moléculas como ON y otros mediadores de la inflamación, analizamos su producción para valorar si los edulcorantes podían afectar la actividad oxidativa de estas células. Se obtuvieron macrófagos de peritoneo y se evaluó la producción de ON en células no estimuladas y estimuladas con LPS. El grupo suplementado con sucralosa fué el que presentó mayor producción de ON, tanto en células estimuladas por 24 hrs, como en células no estimuladas, encontrando una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada grupo (Figura 4). Esto sugiere que el consumo de la sucralosa no sólo afecta el comportamiento de los linfocitos T, sino de otros tipos celulares, como son los macrófagos.

7.1.8. **Discusión y Conclusiones**

En las últimas décadas la incidencia de ECNT ha ido en aumento, siendo la dieta uno de los principales factores para el desarrollo de las mismas. El exceso de nutrientes 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 glucotoxicidad, lipotoxicidad o ambas, induciendo con ello enfermedades metabólicas.

La glucosa es la principal fuente de energía para el organismo, en especial para el cerebro, su metabolismo contribuye a la regulación de procesos biológicos. Un desequilibrio entre el metabolismo de la glucosa y el sistema inmunológico puede ocasionar procesos inflamatorios crónicos, desarrollando con ello un cambio en las funciones celulares, predisponiendo así al organismo a padecer enfermedades (24). 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 (24-26). Como protección, el organismo utiliza distintos mecanismos, como la redistribución de nutrientes o energía. La respuesta inmunológica depende del metabolismo de la glucosa, determinando con ello la eficiencia para mantener al organismo en buen estado. Siendo la dieta la principal fuente de nutrientes y con la múltiple variedad de productos que existen en la actualidad, es importante determinar su efecto en nuestra salud.

Existe una controversia sobre los efectos del consumo de edulcorantes de bajo aporte energético sobre el peso corporal y las concentraciones de glucosa sérica. Nuestro estudio muestra que al menos en un modelo murino (de ratones BALB/C), los edulcorantes no afectan el peso o la glucosa sérica en comparación con aquellos que consumen agua o solución endulzada con sacarosa. Dado que las dietas empleadas en diversos estudios son distintas, no se puede atribuir que el uso de edulcorantes sea determinante en la ingesta energética y por tanto, que afecte el peso o las concentraciones de glucosa (8, 19, 23, 27-29).

Siendo de nuestro interés conocer como afectaba el consumo de edulcorantes en poblaciones linfocitarias, hemos encontrado que el número y la actividad de los linfocitos T presentan una diferencia en aquel grupo que consumió sucralosa (edulcorante artificial), suponiendo así que aunque este edulcorante no contiene glucosa, la fuente de la misma se

pudo adquirir del alimento, ya que como se mencionó anteriormente, el consumo de alimento fue mayor en aquel grupo que tomo la solución de sucralosa. En ratones obesos inducidos por dieta se ha demostrado el papel del tejido adiposo en la respuesta inmune adaptativa, encontrando un mayor número de células efectoras CD8⁺, con una disminución de CD4⁺ y de T reguladoras, antes de la infiltración de macrófagos al tejido adiposo (30), además de encontrar en menor cantidad linfocitos T reguladores en ratones obesos que en normales, lo que también provoca una mayor producción de IFN- γ por el tejido adiposo (31). Estos estudios sugieren que al haber una disminución de células T reguladoras, se promueve el aumento de CD8⁺ así como de CD4⁺ Th1, dando como resultado un perfil pro-inflamatorio dirigido por la actividad de las distintas citocinas y en resultado una respuesta inmunológica adversa (30, 32, 33). En nuestro estudio se encontró un mayor número de linfocitos T CD4⁺, mejorando con ello la respuesta inmunológica en caso de presentarse una infección, a su vez se presentaron células T CD8⁺ aumentadas; suponiendo así que la activación de linfocitos cooperadores y la producción de citocinas se refleja en el aumento de esta subpoblación. Los marcadores de activación CD25⁺ y CD69⁺ también se encontraron incrementados, principalmente en células CD4⁺. Estos resultados suponen que, fenotípicamente, el grupo que consumió sucralosa presenta una mejor respuesta inmunológica, aunque es necesario evaluar el efecto que pueden ocasionar la activación celular. La funcionalidad de estos linfocitos fue evaluada por la producción de IFN- γ , donde el grupo de sucralosa mostró nuevamente resultados significativos aún sin ser estimuladas las células, pero no en suficiente concentración para afectar directamente la respuesta inmunológica, implicando que el consumo de edulcorantes puede tener un efecto en la respuesta inmunológica; sin embargo, es necesario seguir evaluando la funcionalidad celular.

Como parte de las moléculas que regulan la respuesta inmunológica, el ON representa un factor importante para la misma. Las interacciones celulares, así como el tipo y número de células que participan en el sistema inmunológico, están reguladas por las concentraciones de ON. El ON puede modular el tono vascular, la neurotransmisión, la inflamación crónica o aguda, así como ser parte esencial para la defensa en la respuesta inmune innata. Los macrófagos son la línea inicial de defensa del organismo, produciendo ON en grandes cantidades como un importante microbicida. Las concentraciones de ON

pueden auto regular la producción del mismo, puede actuar sobre otras moléculas, produciendo citotoxicidad o bien como protector. Además, su concentración esta relaciona con el tipo de respuesta Th1 al estar en baja concentración, o bien Th2 cuando hay un cambio en la misma. Su concentración puede afectar también la diferenciación celular, convirtiendo las células $CD4^+/CD25^-$ en $CD4^+/CD25^+$. Dado que la respuesta inmunológica depende de varios factores, este estudio observó que los macrófagos de peritoneo estimulados con LPS mostraron mayor concentración de ON en el grupo de sucralosa, considerando con ello un efecto oxidativo, dado que al principio puede ser benéfico en la respuesta inmunológica, una constante estimulación del mismo conlleva efectos adversos a nivel celular (34, 35).

Probablemente, el tiempo de exposición a los edulcorantes no fue el suficiente para demostrar la forma en que los mismos pueden afectar la respuesta pro-inflamatoria, pero nuestros datos señalan que las diversas subpoblaciones de células T son afectadas por los edulcorantes. Adicionalmente, algunas de las principales moléculas reguladoras de la respuesta inmunológica, el $IFN-\gamma$ y el ON modifican su producción al ser expuestas a edulcorantes.

Este fue un estudio en un modelo murino, la relevancia del mismo se muestra en la participación del sistema inmunológico, en especial de las poblaciones leucocitarias y su relación con la alimentación, ya que en la actualidad el consumo de edulcorantes ha ido en aumento. Esta investigación demuestra que el consumo de sucralosa puede incrementar la respuesta inmunológica pro-inflamatoria; pero aún es necesario realizar otros estudios para conocer cómo se afecta. En conclusión, la alimentación es uno de los factores más importante para el desarrollo de ECNT, la población en general está expuesta a varios compuestos adquiridos de la dieta que pueden afectar la salud.

¿Qué se sabe sobre el tema?

Existe poca información sobre el consumo frecuente de edulcorantes y su efecto en el sistema inmunológico. Una gran variedad de alimentos en nuestra dieta contienen algún tipo de edulcorante, por ello la importancia de este proyecto. Los estudios que existen sobre el tema fueron realizados en líneas celulares y utilizando edulcorantes de origen natural, en los cuales, se encontró un efecto inmuno-modulador. Esta investigación evalúa elementos que participan en la respuesta inmunológica, permitiéndonos así, elucidar el efecto de los edulcorantes más comunes para el consumo humano en el sistema inmunológico.

¿Qué añade el estudio realizado a la literatura?

El consumo de edulcorantes se ha incrementado en los últimos años. Nuestro estudio en un modelo murino, permite visualizar el efecto de los edulcorantes en poblaciones leucocitarias participantes de la respuesta inmunológica pro-inflamatoria; siendo de interés la evaluación de factores que intervienen en el sistema inmunológico. Esta investigación otorga así, nueva información para áreas de ciencias biológicas y nutrición.

7.1.9. Referencias

1. Sigman-Grant M, Morita J. Defining and interpreting intakes of sugars. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;78(4):815S-26S.
2. Popkin BM, SJ N. The sweetening of the world's diet. *Obes Res*. 2003;11(13):25-32.
3. Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (GSFA, Codex STAN 192-1995) [database on the Internet]. 2011. Available from: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/results.html?techFunction=26&searchBy=tf>.
4. Fitch C, Keim KS. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012;112(5):739-58.
5. Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects 2006.
6. Report from the Commission on Dietary Food Additive Intake in the European Union [database on the Internet]. 2001. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav15_en.pdf.
7. Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004;104(2):255-75.
8. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutrition Research Reviews*. 2005;18(01):63-76.
9. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
10. Iwasaki A MR. Regulating adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327:291-5.
11. Hori T, Nakashima T, Take S, Kaizuka Y, Mori T, Katafuchi T. Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity. *Brain Research Bulletin*. 27(3-4):309-13.
12. MacIver NJ, Jacobs SR, Wieman HL, Wofford JA, Coloff JL, Rathmell JC. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *Journal of Leukocyte Biology*. 2008;84(4):949-57.
13. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003;52(3):812-7.
14. Pickup JC. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813-23.
15. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*. 2004;25(1):4-7.
16. WHO. Preventing chronic diseases: WHO global report. Genova, Suiza: WHO, 2005.
17. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;96(3):640-6.
18. Giugliano D, Ceriello A, Esposito K. The Effects of Diet on Inflammation: Emphasis on the Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(4):677-85.

19. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth CL. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiology & Behavior*. 2009;98(5):618-24.
20. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;173(2):115-21.
21. Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(3):785-9.
22. Song F, Chen W, Jia W, Yao P, Nussler AK, Sun X, et al. A natural sweetener, *Momordica grosvenori*, attenuates the imbalance of cellular immune functions in alloxan-induced diabetic mice. *Phytotherapy Research*. 2006;20(7):552-60.
23. Raben A VT, Moller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr*. 2002;76:721-9.
24. Ruiz-Núñez B, Pruijboom L, Dijck-Brouwer DAJ, Muskiet FAJ. Lifestyle and nutritional imbalances associated with Western diseases: causes and consequences of chronic systemic low-grade inflammation in an evolutionary context. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (0).
25. Mozaffarian D. Trans fatty acids – Effects on systemic inflammation and endothelial function. *Atherosclerosis Supplements*. 2006;7(2):29-32.
26. Simopoulos AP. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 2008;233(6):674-88.
27. Martínez AG, López-Espinoza A, Galindo A, Aguilera V, Gonzalez A, de la Torre-Ibarra C. Effects of glucose and sucralose solutions on water and food intake: Binge drinking response in albino rats. *Appetite*. 2007;49(1):311.
28. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;89(1):1-14.
29. Polyák É, Gombos K, Hajnal B, Bonyár-Müller K, Szabó S, Gubicskó-Kisbenedek A, et al. Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiologica Hungarica*. 2010;97(4):401-7.
30. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, et al. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009;15(8):914-20.
31. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat Med*. 2009;15(8):930-9.
32. Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012;33(1):26-34.
33. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, et al. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009;15(8):921-9.
34. Niedbala W, Cai B, Liu H, Pitman N, Chang L, Liew FY. Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3- regulatory T cells from CD4+CD25- T cells via p53, IL-2, and OX40. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(39):15478-83.

35. Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, et al. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011;89(6):873-91.

7.1.10. Figuras y Leyendas de Figuras

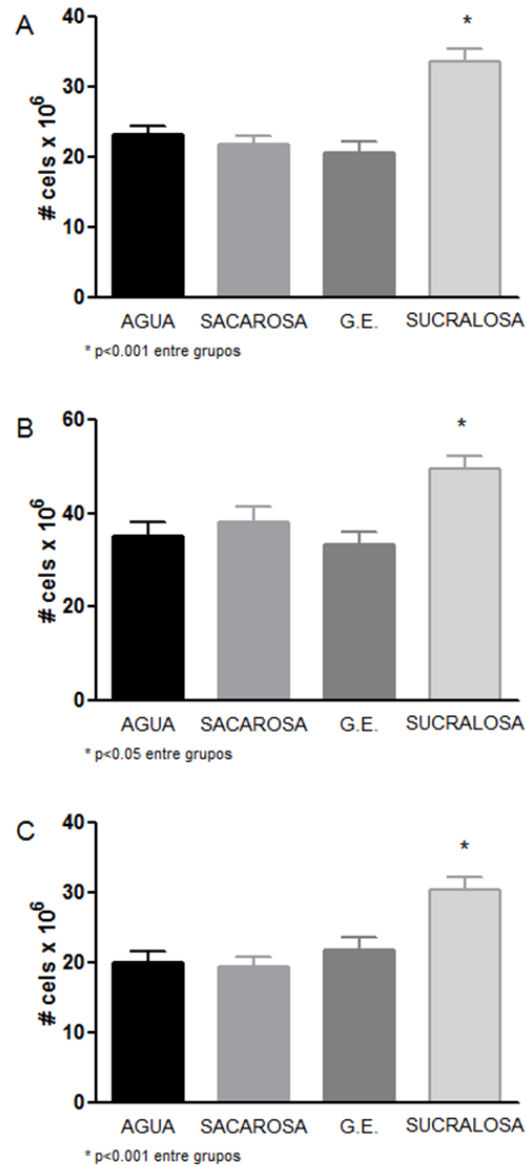


Figura. 1. Subpoblaciones de Linfocitos T en el bazo de los ratones expuestos a edulcorantes. Número de leucocitos de bazo marcados para: A) Linfocitos CD3⁺, B) Linfocitos T CD4⁺ y C) Linfocitos T CD8⁺. *p ≤ 0.05 entre grupos.

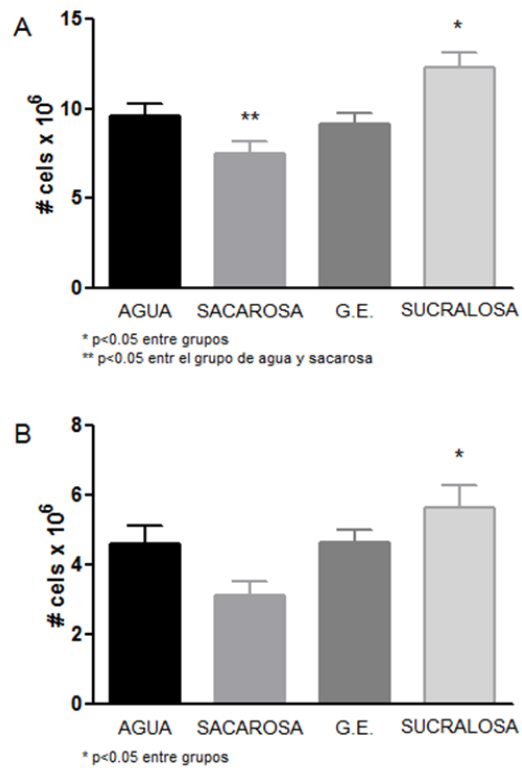


Figura 2. Subpoblaciones de linfocitos CD4⁺/CD25⁺ y CD8⁺/CD25⁺. Número de linfocitos T de bazo marcados para: A) CD4⁺/CD25⁺ y B) CD8⁺/CD25⁺. *p ≤ 0.05 entre grupos y **p ≤ 0.05 entre el grupo de agua y sacarosa.

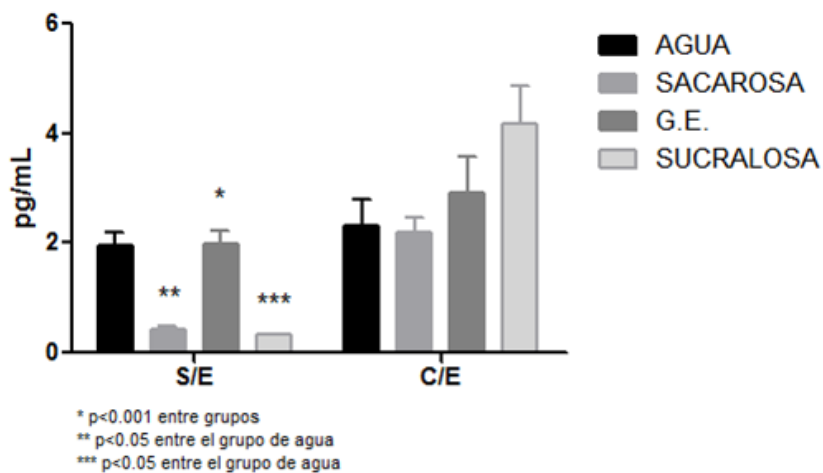


Figura 3. Producción de IFN- γ por linfocitos T de bazo. Linfocitos T de bazo cultivados y estimulados por 24 hr con 100 ng/mL de PMA y 10 ng/mL de Ionomicina. Los sobrenadantes del cultivo celular se utilizaron para la determinación de IFN- γ por la técnica de ELISA. * $p \leq 0.05$ entre grupos, ** $p \leq 0.05$ entre el grupo de agua y sacarosa y *** $p \leq 0.05$ entre el grupo de agua y sucralosa.

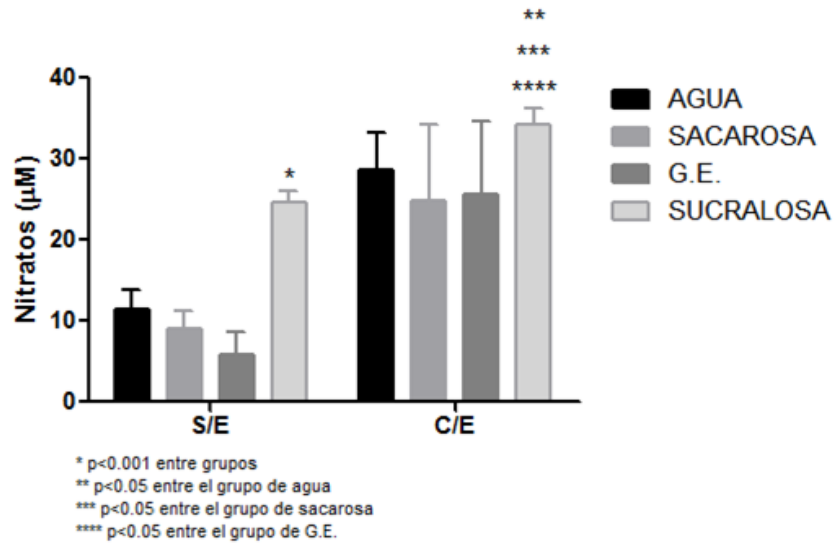


Figura 4. Producción de ON por macrófagos de peritoneo. Macrófagos obtenidos del peritoneo estimulados por 24 hr con 100 ng/mL de LPS. La concentración de nitritos en sobrenadante se midió por medio de la técnica de Greiss *p ≤ 0.05 entre grupos, ** p ≤ 0.05 entre el grupo de agua y sucralosa, *** p ≤ 0.05 entre el grupo de sacarosa y sucralosa y **** p ≤ 0.05 entre el grupo de G.E. y sucralosa.

8. Conclusiones Generales

8.1. Conclusiones

El consumo de edulcorantes de bajo aporte energético ha dado al mercado alimentario una diversidad de productos para disposición de la población en general. La ingesta de productos procesados, en especial aquellos que ofrecen una alternativa para mejorar la salud, lleva al organismo a sufrir no sólo cambios en el peso de los individuos o en un buen control de glucosa sérica. Los compuestos utilizados en estos alimentos pueden influir metabólicamente en el organismo, por lo que una exposición constante a los mismos debe inducir mecanismos de adaptación.

Es sabido que antes de permitir el consumo alimentario, los distintos componentes de un producto son evaluados toxicológicamente para probar su letalidad, aunque no siempre es fácil evaluar el efecto de la exposición crónica a los mismos. Los edulcorantes hoy en día representan un ingrediente importante en nuestra alimentación, y nuestro estudio demuestra que a pesar de ser compuestos avalados para consumo humano, pueden tener repercusiones para el organismo a largo plazo. Los resultados obtenidos a partir del uso frecuente de edulcorantes comerciales en un modelo murino y su respuesta inmunológica, nos da pauta para seguir evaluando su funcionamiento en distintos niveles, así como también el efecto que pueden tener otros edulcorantes utilizados por la industria alimentaria. Este estudio y sus datos nos ayudan a dilucidar el efecto de estos compuestos a nivel celular.

8.2. Limitaciones

Existe muy poca información sobre el efecto de edulcorantes en el sistema inmune, así como también del efecto que un producto comercial de este tipo puede tener a nivel celular. Dada la dificultad de conocer las vías que son afectadas por la variedad de componentes que existen en una dieta, esta investigación colabora en la generación de conocimiento pero no es concluyente, ya que es necesario conocer la función de las células de las distintas subpoblaciones que se mostraron incrementadas por el uso de edulcorantes.

8.3. Recomendaciones

El período de exposición a los distintos edulcorantes, así como la edad de los ratones, puede representar una diferencia en los resultados, ya que en la actualidad el consumo de edulcorantes se inicia desde edades muy tempranas y perdura durante periodos prolongados de la vida, por lo que se sugiere que en estudios posteriores se evalúen otros rangos de edad, así como el tiempo de exposición a estos compuestos.

9. Referencias Bibliográficas

1. Abbas Abul K. , Lichtman Andrew H., Shiv P. *Inmunología celular y molecular*. 6a ed 2008.
2. Martin R. *Immunity, Components of the Immune System and Immune Response*. *Biologicals*. 1997;25(2):165-8.
3. Bruce B. *Innate immunity: an overview*. *Molecular Immunology*. 2004;40(12):845-59.
4. Sirisinha S. *Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease* 2011.
5. Turvey SE, Broide DH. *Innate immunity*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2, Supplement 2):S24-S32.
6. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. *Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response*. *Semin Immunol*. 1998;10(5):349-50. Epub 1998/11/04.
7. Akira S. *Innate immunity and adjuvants*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;366(1579):2748-55.
8. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. *Innate immune recognition*. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216. Epub 2002/02/28.
9. Medzhitov R, Janeway Jr CA. *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. *Seminars in Immunology*. 1998;10(5):351-3.
10. Medzhitov R, Janeway C, Jr. *Innate immunity*. *N Engl J Med*. 2000;343(5):338-44. Epub 2000/08/03.
11. Hori T, Nakashima T, Take S, Kaizuka Y, Mori T, Katafuchi T. *Immune cytokines and regulation of body temperature, food intake and cellular immunity*. *Brain Research Bulletin*. 27(3-4):309-13.
12. Oberholzer A OC, Moldawer LL. *Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states*. *Crit Care Med*. 2000;28(4 Suppl):N3-12.
13. Medzhitov R, Janeway C, Jr. *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97. Epub 2000/03/17.
14. Akira S. *Pathogen recognition by innate immunity and its signaling*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(4):143-56.
15. Miguel A. Hernández-Urzúa AA-N. *Interleucinas e inmunidad innata*. *Rev Biomed*. 2001;12:272-80.
16. Iwasaki A, Medzhitov R. *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. *Science*. 2010;327(5963):291-5. Epub 2010/01/16.
17. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions*. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;75(2):163-89.
18. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. *The role of nitric oxide in inflammatory reactions*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;51(3):443-52.
19. Bogdan C. *The Function of Nitric Oxide in the Immune System*. In: Mayer B, editor. *Nitric Oxide: Springer Berlin Heidelberg*; 2000. p. 443-92.
20. Wu KK. *Nitric Oxide: Synthesis and Action*. eLS: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
21. WHO. *Preventing chronic diseases: WHO global report*. Genova, Suiza: WHO, 2005.
22. Rivera JA BS, Gonzalez-Cossio T, Olaiz G, Sepulveda J. *Nutrition transition in Mexico and in other Latin American countries*. *Nutr Rev*. 2004;62(7 Pt 2):S149-S57.

23. Ávila-Burgos L C-HL, González-Domínguez D, Aracena-Genao B, Montañez-Hernández JC, Serván-Mori EE, Rivera-Peña G. , editor. Cuentas en diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares y obesidad, México 2006. Ciudad de México/Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública; 2009.
24. WHO. Global Health Observatory (GHO). [cited 2011]; Available from: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_text/en/index.html.
25. Gutiérrez JP R-DJ, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública; 2012.
26. Córdova-Villalobos JA B-MJ, Lara-Esqueda A, Barquera S, Rosas-Peralta M, Hernández-Ávila M, De León-May ME, Aguilar-Salinas CA. Las enfermedades crónicas no transmisibles en México: sinopsis epidemiológica y prevención integral. *Salud Publica Mex* 2008;50:419-27.
27. Escobar MC PA, Peruga A, Silva N, Vives M, Robles S. Mitos sobre la prevención y el control de las enfermedades no transmisibles en América Latina. *Salud Publica Mex* 2000;42:56-64.
28. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
29. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2111-7.
30. Pradhan A. Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 Diabetes: Inflammatory Basis of Glucose Metabolic Disorders. *Nutrition Reviews*. 2007;65:S152-S6.
31. Schuster DP. Obesity and the development of type 2 diabetes: the effects of fatty tissue inflammation *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010;3 (1):253-62.
32. Calle MC, Fernandez ML. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism*. 2012;38(3):183-91.
33. Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: An adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment — An evolutionary perspective. *Metabolism*. 2013;62(5):622-33.
34. Lamb RE, Goldstein BJ. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. *International Journal of Clinical Practice*. 2008;62(7):1087-95.
35. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, et al. Inflammatory Cytokines and the Risk to Develop Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2003;52(3):812-7.
36. A. Badawi AK, P. Haddad Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2010 3(1):173-86
37. Befroy DE, Petersen KF, Dufour S, Mason GF, de Graaf RA, Rothman DL, et al. Impaired Mitochondrial Substrate Oxidation in Muscle of Insulin-Resistant Offspring of Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes*. 2007;56(5):1376-81.
38. King GL. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetes and Its Complications. *Journal of Periodontology*. 2008;79(8s):1527-34.
39. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutrition Research Reviews*. 2005;18(01):63-76.

40. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009;89(1):1-14.
41. Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004;104(2):255-75.
42. Sigman-Grant M, Morita J. Defining and interpreting intakes of sugars. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2003;78(4):815S-26S.
43. Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects 2006.
44. Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios (GSFA, Codex STAN 192-1995) [database on the Internet]. 2011. Available from: <http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/results.html?techFunction=26&searchBy=tf>.
45. Report from the Commission on Dietary Food Additive Intake in the European Union [database on the Internet]. 2001. Available from: http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/flav15_en.pdf.
46. Popkin BM, SJ N. The sweetening of the world's diet. *Obes Res*. 2003;11(13):25-32.
47. Popkin BM, Gordon-Larsen P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(S3):S2-S9.
48. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;96(3):640-6.
49. Grotz VL, Munro IC. An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2009;55(1):1-5.
50. Grotz VL HR, McGill JB, et al.. Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc*. 2003;103:1607-12.
51. Gougeon R SM, Lee K, Field CJ. Canadian Diabetes Association National Nutrition Committee Technical Review: non-nutritive intense sweeteners in diabetes management. *Canadian J Diab*. 2004;28:385-99.
52. Information SDBSPP. Sucralose: A Scientific and Safety Review. 2007.
53. Jan M.C G. Stevioside. *Phytochemistry*. 2003;64(5):913-21.
54. González-Moralejo A. Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la Stevia Rebaudiana Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. 2011.
55. Prakash I, DuBois GE, Clos JF, Wilkens KL, Fosdick LE. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(7, Supplement):S75-S82.
56. Liu J, L. Jin-wei y T. Jian. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts. *Food Bioprod Process*. 2010;88((2-3)): 215-21.
57. Jeppesen PB GS, Poulsen CR, Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism*. 2000;49(2):208-14.
58. Kujur R S SV, Ram Mahendra, Yadava Harlokesh Narayan, Singh K K, Kumari Suruchi, Roy B K Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetic rats. *Phcog Res*. 2010;2(4):258-63.

59. Chan P, Tomlinson B, Chen Y-J, Liu J-C, Hsieh M-H, Cheng J-T. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2000;50(3):215-20.
60. Tadhani M., Patel V, Rema S. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *J Food Compos Anal*. 2007;20:323-9.
61. Jarma AdJ, Combatt EM, Cleves JA. Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). . *Agronomía Colombiana*. 2010;XXVIII(2):199-208.
62. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chemico-Biological Interactions*. 2008;173(2):115-21.
63. Song F, Chen W, Jia W, Yao P, Nussler AK, Sun X, et al. A natural sweetener, *Momordica grosvenori*, attenuates the imbalance of cellular immune functions in alloxan-induced diabetic mice. *Phytotherapy Research*. 2006;20(7):552-60.
64. Song F, Qi X, Chen W, Jia W, Yao P, Nussler A, et al. Effect of *Momordica grosvenori* on oxidative stress pathways in renal mitochondria of normal and alloxan-induced diabetic mice. *European Journal of Nutrition*. 2007;46(2):61-9.
65. Qi X-Y, Chen W-J, Zhang L-Q, Xie B-J. Mogrosides extract from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals in vitro and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice. *Nutrition research (New York, NY)*. 2008;28(4):278-84.
66. SAGARPA. PROGRAMA NACIONAL DE LA AGROINDUSTRIA DE LA CAÑA DE AZÚCAR 2007-2012. 2007:6.
67. Levitsky DA YT. The more food young adults are served, the more they overeat. . *J Nutr*. 2004;134:2546-9.
68. Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(3):785-9.
69. Sørensen LB, Raben A, Stender S, Astrup A. Effect of sucrose on inflammatory markers in overweight humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2005;82(2):421-7.
70. Raben A, Vasilaras TH, Møller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002;76(4):721-9.