



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

**EFFECTO DEL CONSUMO FRECUENTE DE
EDULCORANTES COMERCIALES SOBRE EL SISTEMA
INMUNOLÓGICO**

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M.C.S. Marcela Sánchez Delgado

Comité Tutorial:

Dra. Irazú Contreras García

Tutor Académico

Dr. José Antonio Estrada Guadarrama

Tutor Interno

Dra. en C. Martha Kaufer Horwitz

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, julio de 2020

Índice

Resumen	6
1. Antecedentes	7
1.1 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO.....	7
1.2 EL METABOLISMO Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	13
1.3 EDULCORANTES	16
1.4 LOS EDULCORANTES Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA.....	21
2. Planteamiento del Problema.....	23
3. Justificación.....	25
4. Hipótesis.....	26
4.1 Modelo Murino.....	26
4.2 Modelo Humano.....	26
5. Objetivos	27
5.1 Modelo Murino.....	27
5.2 Modelo Humano.....	27
6. Diseño metodológico.....	28
6.1 Diseño de estudio.....	28
Modelo murino.....	28
Modelo humano.....	28
6.2 Universo y muestra.....	28
Modelo murino.....	28
Modelo humano.....	28
6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.....	29
Modelo murino.....	29
Modelo humano.....	29
6.4 Variables de Estudio.....	30
Modelo murino.....	30
Modelo humano.....	30
6.5 Instrumentos	36
Modelo murino.....	36
Modelo humano.....	36
6.6 Procedimientos	36
Modelo murino.....	36
Modelo humano.....	38
6.7 Recolección de datos	40

Modelo murino	40
Modelo humano.....	40
6.8 Análisis de datos.....	41
Modelo murino	41
Modelo humano.....	41
6.9 Aspectos éticos	42
7. Resultados	43
7.1 Artículo enviado	43
7.2 Artículo aceptado.....	45
8. Referencias Bibliográficas	47
9. ANEXOS.....	52

Resumen

Los edulcorantes son sustancias seguras para el consumo humano, más su efecto a largo plazo sigue siendo controversial; dichas sustancias, aunque no son metabolizadas en su totalidad, pueden tener efecto indirecto sobre las células del organismo. Las células inmunocompetentes necesitan energía para una adecuada respuesta inmunológica. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto del consumo frecuente de edulcorantes comerciales (sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol) en la respuesta inmunológica de ratones BALB/c y en humanos. En el modelo murino se realizó citometría de flujo para identificar cambios en las poblaciones leucocitarias en timo, bazo y ganglios linfáticos, así como marcadores de superficie celular, además se determinó la producción de citocinas proinflamatorias por ELISA. En el modelo humano se identificó su estado de nutrición, las concentraciones séricas de glucosa, perfil de lípidos, así como citocinas proinflamatorias por ELISA. Los resultados encontrados en el modelo murino mostraron que existe diferencia estadística en las poblaciones celulares CD3⁺ en timo y CD14⁺ en bazo del grupo de hembras al comparar entre grupos, así como en marcadores de superficie CTLA-4⁺, PD1⁺, CD69⁺ y CD80⁺ en bazo del grupo de sacarosa y sucralosa, así como los marcadores PD1⁺ y CD40L⁺ en ganglios linfáticos de hembras del grupo de sacarosa. Los resultados en humanos mostraron un incremento en peso aquellos que consumieron sucralosa, mientras que el grupo de glucósidos de esteviol redujo su masa grasa; no se encontró diferencia en las concentraciones de glucosa, pero en el grupo de sucralosa se encontró un incremento en triglicéridos y colesterol, mientras que el de glucósidos de esteviol tuvo menor concentración de triglicéridos y TNF- α .

En conclusión, los edulcorantes comerciales no nutritivos pueden interferir en la respuesta inmunológica de forma indirecta, incidiendo en el metabolismo de las células inmunocompetentes; sin embargo, es necesario seguir investigando sobre sus efectos tanto moleculares como celulares.

1. Antecedentes

1.1 EL SISTEMA INMUNOLÓGICO

La principal defensa del organismo es el sistema inmunológico (SI), el cual tiene la capacidad de identificar y destruir todo lo extraño que invade el organismo, e incluso aquello interno que se deteriora. El mecanismo defensivo propio del SI se denomina respuesta inmunológica, en la cual participan células inmunocompetentes y sus moléculas, así como también los órganos linfoides. El SI es complejo y los elementos que lo integran participan en numerosas funciones de forma integrada con otros sistemas del organismo (1).

Una primera línea de defensa son las barreras físicas y químicas, como la piel, mucosas y sus secreciones. Cuando los patógenos atraviesan esta línea entran en acción la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La respuesta innata actúa de manera inmediata y no requiere de una exposición previa al patógeno, mientras que la adaptativa presenta alta especificidad y memoria. Las células del SI se originan y maduran en los órganos linfoides primarios, la médula ósea y el timo a partir de donde las células salen a circular por el torrente sanguíneo y circulación linfática. Sin embargo, el reconocimiento de antígenos y la activación de las células de la respuesta inmune adaptativa ocurre en los órganos linfoides secundarios, como: timo, bazo, nódulos linfáticos y placas de Peyer (2).

Dentro de la inmunidad innata participan activamente células fagocíticas, como granulocitos y macrófagos, además del complemento. Mientras que la respuesta adaptativa requiere de células especializadas, como linfocitos T y linfocitos B. Los linfocitos T se dividen en cooperadores ($CD4^+$) y citotóxicos ($CD8^+$), los cuales participan en la inmunidad celular. Por su parte los linfocitos B sintetizan inmunoglobulinas, que son los principales componentes en la inmunidad humoral (3,4).

Cuando existe una agresión debida a la presencia de un microorganismo o incluso un trauma físico, se activa la respuesta inmune innata, produciendo lo que se conoce como inflamación. En la inflamación participan diferentes mecanismos tanto específicos como inespecíficos que buscan eliminar al agente agresor, esto ocurre principalmente mediante el reclutamiento de células fagocítica (2,3,5,6).

El reconocimiento de antígenos se da mediante la expresión en superficie de péptidos antigénicos unidos a proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos clases de MHC: la clase I, que se expresa en todas las células nucleadas; y la clase II, en aquellas células especializadas presentadoras de antígenos, como macrófagos, células dendríticas y linfocitos B. El MHC I es presentador de antígenos intracelulares a linfocitos T CD8⁺, mientras que el MHC II presenta antígenos derivados de microorganismos extracelulares y proteínas a linfocitos CD4⁺. Este reconocimiento permite que los linfocitos CD4⁺ proliferen y activen a los linfocitos B (7).

Otras moléculas que participan activamente durante las respuestas inmunológicas innata y adaptativa son las citocinas, la producción de cada tipo de citocina dependerá de la estirpe celular y el estímulo que reciba, puesto que incluso células que no forman parte del sistema inmunológico son capaces de producir citocinas (1,8). Una de las características más importantes de las citocinas es su capacidad de promover o inhibir la inflamación.

Las citocinas con actividad proinflamatoria incluyen las producidas por los monocitos y macrófagos activados durante las respuestas inmunológicas innatas. Las principales citocinas proinflamatorias son interleucina 1 (IL-1), interleucina 12 (IL-12), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e Interferón gamma (IFN- γ) (9), las cuales se describirán brevemente a continuación:

IL-1. Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, linfocitos NK entre otras. Existen dos formas, IL-1 α e IL-1 β que, aunque solamente tienen un 25-30 % de similitud en su secuencia aminoacídica, comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares.

Los efectos biológicos de la IL-1 dependen de la cantidad de citocina 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 (1,2,8).

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 celular. 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 intracelulares (1,2,8).

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 similitud en su secuencia de aminoácidos. El TNF actúa en diferentes vías de señalización, participa en la regulación de vías apoptóticas, es un mediador inflamatorio a través de su señalización mediante NF- κ B e incluso se ha descrito su participación en la activación de las cinasas activadas por estrés. En los sitios de infección 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 (1,2,8).

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 bacteriemias y que puede ser en muchos casos de extrema gravedad, conduciendo al individuo a la muerte.

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 sinteticen 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 (1,2,6,8).

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 tres 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 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 orquestar 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 (1,2,6,10).

Tipo III. IFN- λ al igual que los interferones tipo I tienen una importante función antiviral. De hecho, la principal diferencia entre estas citocinas se encuentra en las células que son capaces de producir y captar esta citocina ya que pocas células expresan la subunidad IL-28R α , lo que limita la acción de esta citocina. El IFN- λ regula la diferenciación de las células dendríticas y ha mostrado actividad inmunomoduladora mediante un efecto sobre proliferación de células T reguladoras (1,10,11).

IL-6. Es una citocina con actividad pleiotrópica. En el caso de la respuesta inmunológica participa especialmente en la estimulación de la producción de anticuerpos y el desarrollo de células T efectoras. Sin embargo, esta citocina es capaz de promover la diferenciación y proliferación de distintas células que no pertenecen a la respuesta inmunológica. Posterior a la síntesis local de la IL-6 en el sitio de inflamación esta se desplaza mediante el flujo sanguíneo hacia el hígado donde es capaz de inducir la síntesis de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos: como proteína C reactiva, amiloide sérico A, fibrinógeno y hepcidina (1,12).

Las citocinas con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora inhiben el crecimiento celular o suprimen la secreción de otras citocinas. Entre ellas se encuentran la interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina (IL-10) e interleucina 13 (IL-13), que activan las acciones de los linfocitos B a la vez que inhiben las respuestas inflamatorias. La IL-10 es la citocina inmunosupresora por excelencia. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) también inhibe el crecimiento y la función de muchos tipos celulares, la síntesis de determinadas citocinas y la actividad citotóxica natural y específica. Finalmente, los interferones tipo I (α y β), también se pueden considerar citocinas supresoras, debido a su capacidad anti proliferativa y a su efecto regulador de la producción de citocinas proinflamatorias (13).

IL-4. Es producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y, posiblemente por determinadas subpoblaciones de células NK. Es una citocina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos e induce la producción de IL-1Ra, que bloquea la acción de la IL-1. Por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B, produciendo el cambio

isotípico hacia IgG4 e IgE e incrementando la expresión de moléculas CD23 en linfocitos B, basófilos y eosinófilos (1,4,8,9).

IL-5. Es secretada en forma glicosilada por LT CD4⁺ activados del tipo Th2. Es esencial en la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los eosinófilos, así como en el mantenimiento de la actividad de los eosinófilos maduros siendo la responsable de la eosinofilia en infecciones parasitarias. Sobre los linfocitos B actúa incrementando su proliferación y estimulando la producción de IgA (1,4,8,9).

IL-10. Es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos/macrófagos, linfocitos B, linfocitos T reguladores, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, entre las que podemos citar IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, y la expresión de MHC-II y moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos anti proliferativos sobre muchos tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas *in vitro*. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de IgG, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T. También ejerce efectos reguladores sobre la angiogénesis (1,4,8,9).

IL-13. Es producida por linfocitos T activados del tipo Th2, compartiendo muchas de sus funciones con la IL-4 con la que se encuentra genéticamente relacionada. Es una citocina con actividad inmunosupresora ya que inhibe, junto con la IL-4 y la IL-10, la producción de citocinas inflamatorias por los monocitos (IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6). Por otra parte, esta citocina incrementa la proliferación y diferenciación de monocitos y células B, incrementa la expresión de CD23 y promueve el cambio de clase de inmunoglobulinas hacia la producción de IgE (1,4,8,9).

A pesar de que las citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias presentan actividades antagónicas, se requiere de ambas para lograr un efectivo control de los microorganismos que pudieran presentarse en el organismo. La desregulación en el balance de citocinas generalmente se asocia con el surgimiento de diferentes patologías, por lo que es importante que después de que se controla a los agentes extraños se recupere el equilibrio entre estas citocinas (1,9,13,14).

1.2 EL METABOLISMO Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Durante toda la vida de un organismo, el sistema inmunológico está en constante desarrollo y respuesta ante los estímulos del ambiente, dando así procesos de altos costos bioenergéticos. Por ejemplo, la señalización de un patógeno o una agresión externa conlleva a la secreción de citocinas, quimiocinas y mediadores inflamatorios de la respuesta inmunológica innata, así como la expansión clonal de células en la respuesta inmunológica adaptativa. Siendo que las células del SI no almacenan nutrientes, la respuesta inmunológica es sostenible sólo si existe un aumento en la captación de glucosa, aminoácidos, y ácidos grasos de su alrededor (15).

La respuesta innata depende principalmente de glucosa, mientras que la respuesta adaptativa depende de la glutamina extracelular, por lo que se provee a la célula de sustratos para la formación de ATP, así como de material para la síntesis de macromoléculas como RNA, DNA, proteínas y componentes de membranas, necesarias para la proliferación y activación de las células del SI. La activación del SI se puede dividir en cuatro componentes principales: los inductores (señales que inician la respuesta inflamatoria principalmente), sensores (proteínas que detectan la presencia de los inductores), mediadores (moléculas que señalizan para activar respuestas efectoras) y los efectores (aquella programación que facilita la función del tipo celular adecuado). Los inductores típicos de la respuesta inmunológica incluyen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), antígenos procesados, citocinas y factores de crecimiento, los cuales señalizan a las células del SI para producir cierta respuesta. Estas señales son reconocidas por receptores de superficie, como los receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), receptores de antígenos (TCRs y BCRs), receptores de citocinas y las moléculas de coestimulación (como CD28), activando con ello las distintas vías de señalización, que en su mayoría convergen en un pequeño grupo de vías reguladoras metabólicas, como PI3K/Akt/mTOR (15–18).

La glucosa entra a las células del SI mediante el transportador Glut 1, y es fosforilada a glucosa-6-fosfato (G-6-P) por la hexocinasa. Durante la glucólisis, la G-6-P es metabolizada a piruvato por la reducción de NAD^+ a NADH, generando así dos moléculas de ATP. En ausencia de oxígeno el piruvato es reducido a lactato, restaurando los niveles de NAD^+ en la célula. En presencia de oxígeno el piruvato es metabolizado a acetil-coenzima A (acetil-CoA), que es oxidado en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) para generar NADH. En las reacciones redox

de la fosforilación oxidativa (OXPHOS), los electrones son transferidos secuencialmente para generar un gradiente de H^+ a través de la membrana mitocondrial, en la que se lleva a cabo la síntesis de ATP. En contraste con la glucólisis anaeróbica, la OXPHOS mitocondrial es la forma más eficiente de generar ATP (~30-36 ATP por molécula de glucosa). Las células del SI utilizan otras tres vías: la vía de la pentosa-fosfato (PPP), la glutaminólisis y la oxidación de los ácidos grasos, para completar la demanda metabólica y funcional de estas células. La G-6-P es el punto de partida para la PPP, la cual genera ribosa a partir de la síntesis de nucleótidos. Durante este proceso, NAD es reducido a NADH, formando así el cofactor requerido para la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la vía de oxidación de NADPH en los neutrófilos y macrófagos. Durante la glutaminólisis, la glutamina es metabolizada a glutamato y subsecuentemente a α -cetoglutarato, el cual entra al ciclo del TCA. La utilización de glutamina depende del estado de activación de las células inmunocompetentes; puede ser oxidada completamente para generar ATP o usada para reponer los intermediarios metabólicos del ciclo del TCA, utilizados para la síntesis de macromoléculas. La β -oxidación de los ácidos grasos produce acetil co-A, que entra al ciclo del TCA y a OXPHOS, generando así ATP (19–21).

Las células T requieren de estímulos extracelulares como citocinas o factores de crecimiento, incluyendo IL-2, IL-4 e IL-7, así como un nivel bajo de estimulación de TCR, para un mantenimiento adecuado de captación de glucosa. Cuando no existen señales extrínsecas, las células T “vírgenes” (*naive*) internalizan Glut-1 y otros transportadores, previniendo la captación de otros nutrientes extracelulares, manteniendo así la viabilidad de la célula. Por el contrario, cuando existe una sobre-expresión de citocinas o factores de crecimiento, se incrementa la expresión y el tráfico hacia la superficie de Glut-1, incrementando con ello la glucosa en los linfocitos T. En ausencia de estas señales, el flujo de glucosa disminuye, lo que no permite la viabilidad y supervivencia de las células, activando con ello la apoptosis celular. El tráfico de Glut-1 es regulado por IL-3, en ausencia de IL-3, Glut-1 se internaliza hasta la reseñalización de IL-3. Las vías de señalización PI3K/Akt son de gran importancia para el tráfico de Glut-1, mientras que IL-7 juega un rol importante tanto para el metabolismo de la glucosa como para el desarrollo y activación de células T de memoria. Así como las células del SI responden ante los estímulos de citocinas, también responden ante hormonas y neurotransmisores. Una de estas hormonas es la insulina.

Los receptores de insulina no se encuentran en células T en reposo, pero sí se encuentran sobre-regulados en aquellas células T activadas por antígenos o mitógenos. La señalización de insulina en células T incrementa la captación de glucosa, el transporte de aminoácidos, el metabolismo de lípidos y la síntesis de proteínas, promoviendo con ello la activación y sensibilidad de las células T. La insulina también promueve la diferenciación celular para Th2. Otra hormona que juega un papel importante en el metabolismo inmunológico es la hormona de crecimiento, la cual incrementa la síntesis de proteínas, mejorando la captación de aminoácidos, incrementando la transcripción del mRNA y el traslado protéico. La hormona de crecimiento provoca la liberación de ácidos grasos del tejido adiposo, además de sobre-regular su oxidación, disminuyendo con ello el catabolismo protéico metabólico (17,22).

El tejido adiposo es capaz de llevar a cabo una estrecha interacción con el sistema inmunológico a través de la producción y liberación de más de 50 moléculas (adipocinas) entre las que destacan las citocinas o proteínas relacionadas como: TNF- α , IL-6, leptina y neurotrofinas; los quimioatrayentes como: proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1); las proteínas del sistema del complemento como: la adiposina; las proteínas relacionadas con el flujo sanguíneo y la angiogénesis como: angiotensinógeno, inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); finalmente las moléculas relacionadas con el metabolismo como son: adiponectina, resistina, vifastina y proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP) (23).

La leptina disminuye el consumo de alimentos, incrementa el gasto energético y reduce el peso corporal cuando actúa directamente sobre el hipotálamo, donde ocurren los mecanismos de regulación del sistema del hambre y la saciedad. En el caso del sistema inmunológico actúa directamente en células T, mejorando la producción de células tipo Th1, promoviendo con ello la inflamación. También se le han encontrado efectos sobre la proliferación de linfocitos y de protección en la apoptosis celular. La importancia de esta molécula para el sistema inmunológico se ha visto reforzada ya que diferentes investigaciones tanto en ratones como en humanos han mostrado que la señalización deficiente de la leptina, ya sea por falta de la hormona o por falta de su receptor, tiene un efecto directo sobre la calidad de la respuesta inmunológica que los individuos son capaces de montar frente a diferentes estímulos (17,18,22–24).

A diferencia de la leptina, la concentración de adiponectina tiene una relación inversa con la masa grasa corporal y el grado de resistencia a la insulina. Los receptores activados de adiponectina incrementan la oxidación de ácidos grasos en el músculo estriado y el hígado. Otra adipocina secretada por el tejido graso es la resistina, en humanos la resistina puede estar implicada en situaciones inflamatorias debido a que las células mononucleares la secretan en cantidades relevantes. Se ha descrito que el lipopolisacárido induce la expresión del gen de la resistina en macrófagos primarios, murinos y humanos, a través de una cascada que implica la secreción de citocinas proinflamatorias. En los monocitos humanos, la resistina, la IL-6 y el TNF- α parecen influenciarse mutuamente a través de la ruta del factor de transcripción NF- κ B.

Aún no es claro cómo la concentración de nutrimentos afecta la función de los linfocitos, pero se puede especular que las concentraciones altas de glucosa y lípidos pueden contribuir a la actividad pro-inflamatoria de los linfocitos, que se observa en enfermedades como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias y obesidad (19,25).

1.3 EDULCORANTES

El gusto es uno de los sentidos más importantes durante el desarrollo del ser humano. La lengua tiene tres variedades de papilas gustativas; se divide en regiones especializadas por los distintos sabores (dulce, amargo, salado, agrio y umami). Los sabores dulce, amargo y umami, se unen a receptores de proteína G de las células orofaríngeas. Estas células se proyectan hacia las neuronas cerebrales, haciendo consciente el sabor dulce, amargo o umami. Los receptores de sabor dulce se pueden unir químicamente a una gran variedad de estructuras, incluyendo los azúcares energéticos como sacarosa, glucosa y fructosa; proteínas dulces como taumatina y monelina, y endulzantes no energéticos. Dada la importancia del sabor dulce para el ser humano, se han desarrollado una variedad de productos con este sabor (26,27).

Los edulcorantes son aditivos alimentarios, 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 (28,29). Dada la heterogeneidad química de estos compuestos, no todos se unen al mismo ligando o dominio del receptor de sabor; sin embargo, todos los edulcorantes tienen la

habilidad de activar los receptores orofaríngeos, generando con ello la percepción consciente del sabor dulce (30).

Una de las características de los edulcorantes es la cantidad de energía que proporcionan, dividiéndolos así en energéticos y no energéticos. Los edulcorantes energéticos 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 energéticos aportan una mínima o nula cantidad de energía. 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) (28,29,31).

La glucosa obtenida de la dieta es absorbida por los enterocitos de la pared intestinal, a través del cotransportador SGLT-1 en la membrana apical y por Glut-2 en la membrana basolateral del enterocito. Ante el consumo constante de edulcorantes, los transportadores de glucosa a nivel intestinal se adaptan a distintas concentraciones de glucosa. La glucosa se une a los receptores de sabor de las células enteroendocrinas del intestino, provocando la secreción de GLP-1, GLP-2 y GIP, actuando como señales paracrinas para los enterocitos, causando la sobre regulación de SGLT-1 (32). Estudios en roedores hechos con edulcorantes no nutritivos, como sucralosa, acesulfame-k y sacarina, mencionan la sobrerregulación de SGLT-1, así como el incremento de Glut-2 en los enterocitos (33,34).

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). 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 (35).

La mayoría de los alimentos industrializados, principalmente las bebidas, son endulzadas con mezclas de distintos edulcorantes, entre ellos los no energéticos. 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% (36). En México el promedio en bebidas per cápita fue de ~382 kcal/día, representando un 19% del consumo total energético en 2012 en años subsiguientes es difícil llevar a cabo un monitoreo del aporte energético de este tipo de productos en parte por el aumento en el uso de edulcorantes no energéticos, pero un dato a resaltar es que de acuerdo con los resultados de la ENSANUT 2016 cerca del 80% de la población mexicana mencionó consumir bebidas azucaradas de manera regular; las principales bebidas fueron el agua simple, las bebidas carbonatadas y el café o té (37). Mientras que las ventas de bebidas con contenido bajo de energía han ido en aumento del período 1999-2015 y es un mercado que se espera continúe expandiéndose en los próximos años, según reporta Euromonitoreo Internacional de Mercado (37). Actualmente en México entrará en vigor la “Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-información comercial y sanitaria”, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 05 de abril de 2010, la cual menciona que aquellos alimentos que contengan edulcorantes deberán incluir la leyenda “CONTIENE EDULCORANTES - NO RECOMENDABLE EN NIÑOS”, la cual debe ir en la parte superior derecha de la superficie principal de exhibición y en caso de que el producto preenvasado tenga sellos, deben ir debajo de los mismo; contribuyendo con ello a dar al consumidor la información nutricional necesaria para un consumo responsable. Dada la contribución a la palatabilidad en los alimentos y la limitación en el consumo de energía, los edulcorantes no energéticos han sido una opción alimentaria en las ECNT. Aún existe

controversia sobre el vínculo entre el consumo de bebidas endulzadas con edulcorantes y la incidencia de síndrome metabólico, ya sea dependiente o no al aumento de peso (38–41). Es así como el uso de los edulcorantes sigue siendo tema de estudio, puesto que es importante conocer más sobre los efectos de su consumo a corto y largo plazo.

La sucralosa es uno de los edulcorantes de mayor uso a nivel comercial, debido a sus propiedades organolépticas que le brindan una buena aceptación por parte de los consumidores, por otro lado, los glucósidos de esteviol son una nueva alternativa por su origen natural, su estabilidad ha permitido su uso en distintos productos alimentarios, teniendo con ello un impacto a nivel comercial al haber una mayor diversidad de productos (42).

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. 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 (43,44).

El organismo no utiliza la sucralosa para obtener energía, por lo que pasa rápidamente a través del cuerpo, prácticamente inalterada. La sucralosa es útil para las personas con diabetes, dado que las investigaciones demuestran que no tiene efecto en el metabolismo de los carbohidratos, 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. 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.

La sucralosa se encuentra disponible como ingrediente para utilizarse en una amplia gama de alimentos y bebidas con distintos nombres comerciales, siendo uno de los principales

SPLENDA® Sucralosa. 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 (44–46).

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.

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. 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. 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 (28,46,47).

Los G.E. 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, tienen función antiácida y cardiotónica; 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. 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 su seguridad, 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 (47–51).

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 excretado en la orina como glucurónido de esteviol. Los componentes metabolizados de los G.E. esencialmente salen

del cuerpo y no hay acumulación de estos. 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(52,53). Otros estudios hechos con *Momordica grosvenori*, otro edulcorante de origen natural, también mostraron una disminución en el estrés oxidativo de ratones con diabetes. Estos estudios sugieren que algunos edulcorantes intensos de origen natural no sólo tienen beneficios de tipo nutricional, sino también inmunológico.

1.4 LOS EDULCORANTES Y LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

En las últimas décadas, tanto el tipo de alimentos como el tamaño de las porciones 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) en México, es de aproximadamente 47.9 kg al año (54). Los edulcorantes nutritivos forman parte de los principales aditivos alimentarios y fuente de hidratos de carbono simples, mientras que los no nutritivos al tener efecto sobre receptores de sabor pueden afectar de manera indirecta el metabolismo celular, por ello 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 en gran medida 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.

La prevalencia de las ECNT han aumentado en los últimos años y se han llevado a cabo distintas estrategias para su atención. El uso de edulcorantes no energéticos es una de ellas. 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 proinflamatorias, como la IL-1 β y el TNF- α , además de ON, no así su metabolito esteviol (44–47,50,55).

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 (56). 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 (56–58).

Previamente, en este grupo de investigación se realizó un análisis en modelo murino en poblaciones linfocitarias, así como de la expresión de marcadores de activación como CD25⁺ y CD69⁺. Los resultados mostraron un aumento de la población linfocitaria de bazo (CD4⁺ y CD8⁺) en aquel grupo que consumió sucralosa, así como la expresión de marcadores de activación. Suponiendo con ello que el consumo de edulcorantes puede afectar la respuesta inmunológica (59).

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 modifica la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, por lo que es necesario determinar si los edulcorantes ayudan a la prevención o si promueven el desarrollo de las ECNT.

2. Planteamiento del Problema

En la alimentación uno de los sabores más importantes es el dulce. Por ello, la industria alimentaria utiliza productos químicos como los edulcorantes, principalmente aquellos que con poca cantidad proporcionan un dulzor mayor y no proporcionen energía. Uno de los edulcorantes más comunes hoy en día es la sucralosa; sus propiedades permiten tanto al consumidor, como a la industria alimentaria usarlo en la mayoría de los alimentos. Así también los glucósidos de esteviol al ser de reciente inserción en el mercado, también son utilizados para algunos productos alimenticios; principalmente las bebidas.

El consumo de edulcorantes, principalmente de tipo no energético, ha ido en aumento en los últimos años. Las pruebas que determinan su seguridad para consumo en humanos cumplen con las especificaciones de las distintas autoridades a nivel nacional e internacional; sin embargo, el efecto de estos productos a largo plazo no es específico.

La OMS menciona nuevas directrices para la ingesta de azúcar en niños y adultos. Estos nuevos lineamientos, exhortan a reducir el consumo de azúcares libres a menos del 10% de las calorías totales diarias (en una dieta de 2,000 calorías) y destacan que una reducción a menos del 5% proporcionaría beneficios adicionales para la salud (60). El análisis de la ENSANUT 2012 mostró que el consumo de azúcares en los adultos fue de 357 kcal (68% de azúcares añadidos), mientras que ENSANUT Medio Camino 2016 menciona que el consumo de bebidas no lácteas endulzadas es de 85.3% (IC 83.8%-86.6%) y de bebidas lácteas endulzadas de un 24.1% (IC 22.4%-35.8%) (61,62). Por grupos de alimentos, las bebidas azucaradas y productos de alto valor energético fueron los que la mayor cantidad de azúcares añadidos aportaron a la dieta: el consumo per cápita de azúcares provenientes de bebidas azucaradas fue de 432 kcal de las cuales 407 kcal provinieron de azúcares añadidos. Asimismo, los productos de alto valor energético contribuyeron con 155 kcal de azúcares, de las cuales 154 kcal fueron azúcares añadidos (consumo per cápita) (59). Dentro de las pautas para una adecuada alimentación se incluye la variación de alimentos, así como la reducción de alimentos con exceso de sal, azúcar y grasas (60).

En general, en 2014 alrededor del 13% de la población adulta mundial (un 11% de los hombres y un 15% de las mujeres) eran obesos. Mientras el 39% de los adultos de 18 o más años

(un 38% de los hombres y un 40% de las mujeres) tenían sobrepeso. Las ECNT cobran la vida de 38 millones de personas cada año. Casi el 75% de las defunciones por ECNT -28 millones- se producen en los países de ingresos bajos y medios. 16 millones de las muertes atribuidas a las ECNT se producen en personas menores de 70 años de edad; el 82% de estas muertes «prematuras» ocurren en países de ingresos bajos y medianos. Las enfermedades cardiovasculares constituyen la mayoría de las defunciones por ECNT, 17,5 millones cada año, seguidas del cáncer (8,2 millones), las enfermedades respiratorias (4 millones), y la diabetes (1,5 millones). Estos cuatro grupos de enfermedades son responsables de alrededor del 82% de las muertes por ECNT (63).

El conjunto de enfermedades que se pueden presentar como consecuencia del sobrepeso y la obesidad, se denomina síndrome metabólico, ya que además del exceso en el peso existen dislipidemias, tensión arterial elevada, resistencia a la insulina y aumento de la glucosa en sangre, por lo que su tratamiento debe ser multidisciplinario.

Siendo el sistema inmunológico un participante activo en la homeostasis del cuerpo humano, es necesario conocer el efecto que tiene el consumo de edulcorantes en la producción de citocinas anti y proinflamatorias, así como la capacidad de respuesta de las células del sistema inmunológico ante un agente extraño. Investigaciones previas sugieren que la sucralosa tiene efecto sobre poblaciones linfocitarias, así como en la producción de citocinas (59).

Dado que el consumo de edulcorantes se presenta en mayor medida a nivel poblacional y no sólo en pacientes con alguna enfermedad crónica, es importante conocer:

¿Qué efecto tiene el consumo frecuente de edulcorantes comerciales sobre el sistema inmunológico?

3. Justificación

El consumo de edulcorantes a nivel mundial ha ido en aumento en los últimos años. El aumento de peso es causado principalmente por el consumo excesivo de alimentos con alto valor energético, en el cual encontramos alimentos industriales con edulcorantes de tipo artificial, pues si bien la restricción calórica es una de sus características para la disminución de peso o el mantenimiento de un peso adecuado, se puede consumir energéticamente lo mismo al aumentar el consumo de otros tipos de alimentos, como cereales, por lo que una mala alimentación o distribución de la misma, afecta directamente sobre el peso de los individuos y por consiguiente, en su salud.

El aumento de la prevalencia del síndrome metabólico es de importancia para el sector salud. Sus efectos, así como la pérdida de años productivos, justifican la atención de este. El gasto a nivel nacional para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad, así como las enfermedades como diabetes e hipertensión, es de aproximadamente un 10% del gasto público. Actualmente, tanto la población infantil como la adulta pueden presentar este síndrome que a largo plazo puede ocasionar la muerte.

Existe una relación estrecha entre las concentraciones de citocinas proinflamatorias en enfermedades como diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. Dada la importancia de la interacción entre las distintas células del sistema inmunológico, así como las del sistema endocrino, es de relevancia científica evaluar si el consumo frecuente de edulcorantes de tipo artificial afecta las respuestas de estos. Este estudio nos ayudará a discernir la importancia de la dieta, específicamente, si el consumo frecuente de edulcorantes de tipo artificial afecta la respuesta inmunológica, predisponiendo al desarrollo de ECNT.

4. Hipótesis

4.1 Modelo Murino

Hipótesis alterna

Existirá un aumento de la respuesta inmunológica proinflamatoria, representada por poblaciones leucocitarias activadas y producción de citocinas proinflamatorias, por el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos comerciales de sucralosa y glucósidos de esteviol.

Hipótesis nula

No existirá un aumento de la respuesta inmunológica proinflamatoria, representada por poblaciones leucocitarias activadas y producción de citocinas proinflamatorias, por el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos comerciales de sucralosa y glucósidos de esteviol.

4.2 Modelo Humano

Hipótesis alterna

Existirá un aumento de la respuesta inmunológica proinflamatoria, representada por el aumento de citocinas proinflamatorias, por el consumo frecuente del edulcorante comercial de sucralosa, sin presentar cambio por el consumo de glucósidos de esteviol.

Hipótesis nula

No existirá un aumento de la respuesta inmunológica proinflamatoria, representada por el aumento de citocinas proinflamatorias, por el consumo frecuente del edulcorante comercial de sucralosa, ni por el consumo de glucósidos de esteviol.

5. Objetivos

5.1 Modelo Murino

General

Evaluar el efecto de la ingestión frecuente de edulcorantes comerciales (glucósidos de esteviol y sucralosa) sobre la respuesta inmunológica de ratones BALB/c de 14 semanas de edad.

Específicos

- Cuantificar poblaciones leucocitarias (macrófagos (CD14), linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD19) y células CD16⁺) en bazo y ganglios linfáticos por citometría de flujo.
- Cuantificar poblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) en timo por citometría de flujo.
- Determinar marcadores de superficie de leucocitos (MCH-I, MCH-II, CD80, CD86, B220, CTLA-4, PD-1, CD40 y CD40L) por citometría de flujo.
- Cuantificar citocinas circulantes proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) por prueba de ELISA.

5.2 Modelo Humano

General

Evaluar el efecto de la ingestión de sucralosa y glucósidos de esteviol (comercial) sobre la respuesta inmunológica de individuos sanos con índice de masa corporal normal.

Específicos

- Evaluar el estado de nutrición de los participantes mediante las medidas antropométricas (peso, estatura, porcentaje de grasa, masa magra)
- Evaluar el consumo de alimentos antes y después del consumo de edulcorantes, por medio de una frecuencia de alimentos y diarios de alimentación.
- Cuantificar citocinas circulantes pro- inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) y antiinflamatorias (IL-10), antes y después del consumo de sucralosa y glucósidos de esteviol comerciales durante 6 semanas respectivamente, por prueba de ELISA.
- Cuantificar glucosa y perfil lipídico (colesterol y triglicéridos), antes y después del consumo de sucralosa y glucósidos de esteviol comerciales durante 6 semanas.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño de estudio

Modelo murino

Tipo de estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Modelo humano

Tipo de estudio

Experimental, de casos y autocontroles, prospectivo, longitudinal y comparativo.

6.2 Universo y muestra

Modelo murino

Universo

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

Método de muestreo

Por conveniencia y asignación aleatoria.

Tamaño de muestra

8 ratones macho y 8 hembra por grupo de estudio. 64 ratones en total.

Grupo control negativo (sin edulcorante): 16 ratones

Grupo control positivo (sacarosa): 16 ratones

Grupo glucósidos de esteviol comercial (edulcorante natural): 16 ratones

Grupo sucralosa comercial (edulcorante artificial): 16 ratones

Modelo humano

Universo

Hombres y mujeres sanos de 18 a 35 años de edad, captados por invitación para el desarrollo del estudio.

Método de muestreo

A conveniencia por ser un estudio piloto.

Tamaño de muestra

- 38 mujeres/hombres de 18 a 35 años.

6.3 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

Modelo murino

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.

Ratones BALB/c a partir de las 8 semanas de edad que no tengan peso mínimo de 20g.

Modelo humano

Criterios inclusión:

- Personas de entre 18 a 35 años de edad.
- Personas con un IMC de 18 a 24.9.
- Personas clínicamente sanas.
- Personas que aceptaron consumir durante 7 semanas una dieta sin azúcares o edulcorantes añadidos, y que sustituyeron durante 6 semanas los azúcares por 4 sobres al día (4g) de sucralosa o glucósidos de esteviol comerciales u 8 sobres de sacarosa (40g) en bebidas.
- Personas que no consumieran medicamentos para hipertensión arterial, hiperglicemia o para bajar de peso.
- Mujeres no embarazadas, ni en periodo de lactancia.
- Personas que dieron su consentimiento informado por escrito.

Criterios de exclusión:

- Personas con variación de peso >10% en los últimos 6 meses o en algún que se encuentren en tratamiento para bajar el peso.
- Personas diagnosticadas con: hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, hipotiroidismo subclínico, enfermedades cardiovasculares, neoplasias y enfermedades autoinmunes.

Criterios eliminación:

- Personas que incumplieron en >30% o suspendan el consumo de sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol comercial.
- Personas que incumplieron en >30% de las visitas de monitoreo.

- Personas que no se presentaron a alguna toma de muestra sanguínea.
- Sujetos que durante el periodo de estudio tomaban algún medicamento para el tratamiento de hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, hipotiroidismo subclínico, enfermedades cardiovasculares, neoplasias y enfermedades autoinmunes. O bien medicamentos antiinflamatorios y analgésicos tres días previos a la toma de muestra.
- Mujeres que se embaracen durante el período de estudio.

6.4 Variables de Estudio

Modelo murino

Independientes: Consumo de edulcorantes y consumo de agua

Dependientes: Peso, producción de citocinas y caracterización de poblaciones celulares.

Intervinientes: Consumo de alimento

Modelo humano

Independientes: Consumo de edulcorantes

Dependientes: Peso, circunferencia de cintura, porcentaje de grasa corporal, concentraciones de glucosa sérica; producción de citocinas y perfil lipídico.

Intervinientes: Consumo de dieta habitual.

MODELO MURINO

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					
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> <i>t-Student</i> <i>ANOVA</i>
LEUCOCITOS	<i>Células mononucleares, base celular de la respuesta inmune</i>	<i>Cuantificación del número de células CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, MCH-1, MCH-II, CD80, CD86, B220, PD-1, CTLA-4, CD40 y CD40L por medio de</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>1x10⁹/mL</i>	<i>DE</i> <i>Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y Wilcoxon</i>

	<i>citometría de flujo</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 por prueba de ELISA. Técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color; o bien existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>pg/mL</i>
				<i>Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y Wilcoxon</i>
INTERVINIENTE				
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>
				<i>ANOVA</i>

MODELO HUMANO

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	ESTADÍSTICO
INDEPENDIENTE					
CONSUMO DE EDULCORANTES	La acción y efecto de consumir un edulcorante.	Consumo de edulcorantes en bebidas: 1. Sacarosa 2. Glucósidos de esteviol comercial (Stevia) 3. Sucralosa comercial (Splenda)	Categoría nominal	Consumo de 8 sobres (40g) al día de sacarosa Consumo de 4 sobres (4g) al día de sucralosa comercial	Variable de agrupación Medidas de tendencia central t-Student ANOVA
DEPENDIENTE					
INDICE DE MASA CORPORAL	Medida de asociación entre el peso (kg) y la estatura (m) de un individuo	Determinación de estado nutrición de un individuo, obteniendo el peso del individuo con la menor ropa posible y sin zapatos, con una báscula de piso y la estatura con un estadiómetro. El peso se divide entre el cuadrado de la estatura para la obtención de IMC (kg/m^2).	Cuantitativa continua	Valores normales: 18.5 a 24.9 kg/m^2	Medidas de tendencia central Kruskal-Wallis y Wilcoxon
PERÍMETRO DE CINTURA O ABDOMINAL	Medición de la distancia alrededor del abdomen en un punto específico, generalmente a la altura del ombligo	Se utiliza una cinta métrica. Para la medición se traza una línea imaginaria que parta del hueso de la axila hasta la cresta iliaca. Sobre ésta, identificar el punto medio entre la última costilla y la parte superior de la cresta iliaca (cadera). En este punto se encuentra la cintura. Se coloca la cinta métrica en el perímetro del punto antes mencionado y proceda a la medición	Cuantitativa continua	Valores normales: Mujeres <80cm Hombres <90cm	Medidas de tendencia central

	<i>de esta circunferencia, con el individuo de pie y la cinta horizontal.</i>			
PORCENTAJE DE GRASA CORPORAL	<i>Proporción de grasa que contiene nuestro cuerpo</i>	<i>Determinación del porcentaje de grasa por medio de impedancia eléctrica</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Valores normales: Mujeres 25-31% Hombres 18-24%</i>
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE GLUCOSA EN AYUNO	<i>Concentraciones de glucosa libres en sangre</i>	<i>Determinación de concentraciones de glucosa por medio del método enzimático colorimétrico de Trinder. Se evalúa mediante la enzima glucosa oxidasa la cual cataliza la oxidación de glucosa a gluconato y peróxido de hidrógeno. La concentración de glucosa es proporcional al H₂O₂, este puede medirse apareándolo con un indicador de peroxidasa.</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Valores normales: <100mg/dl en ayuno</i>
CONCENTRACIÓN SÉRICA DE COLESTEROL	<i>Niveles de colesterol libres en sangre</i>	<i>Determinación de concentraciones de colesterol por medio del método enzimático colorimétrico de Trinder. La colesterol esterasa hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra dando colesterol libre y ácidos grasos, en una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa se forma H₂O₂ y colestero. El H₂O₂ se valora por la reacción Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-Aminocantipirina, en presencia de Peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra.</i>	<i>Cuantitativa continua</i>	<i>Valores normales: <200mg/dL</i>
				<i>Medidas de tendencia central Kruskal-Wallis y Wilcoxon</i>

CONCENTRACIÓN SÉRICA DE TRIGLICÉRIDOS	Niveles de triglicéridos libres en sangre	Determinación de concentraciones de triglicéridos por medio del método enzimático colorimétrico de Trinder. Los triglicéridos son hidrolizados enzimáticamente a glicerol, el cual, mediante Glicerol cinasa y Glicerol-P-oxidasa, libera el peróxido de hidrógeno que se valora mediante la reacción de Trinder	Cuantitativa continua	Valores normales: <150 mg/dL	Medidas de tendencia central Kruskal-Wallis y Wilcoxon
CITOCINAS EN PLASMA	Proteínas efectoras del SI. Moléculas de bajo peso molecular, importantes por sus características para regular la respuesta inmunológica	Cuantificar por prueba de ELISA. Técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color; o bien existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra.	Cuantitativa continua	pg/mL	Diferencias significativas por Kruskal-Wallis y Wilcoxon
CONSUMO DE DIETA HABITUAL	La acción y efecto de consumir distintos alimentos durante todo el día.	Evaluar el consumo de alimentos mediante el registro de diario de alimentación de tres días (dos entre semana y uno de fin de semana).	Cuantitativa continua	Porcentaje	Medidas de tendencia central t-Student ANOVA
AUTOREGISTRO DE TOMA DE EDULCORANTE	Registro del consumo al día de edulcorante	Registro de las bebidas y número de sobres de edulcorantes utilizados durante el día	Cuantitativa continua	Gramos	Medidas de tendencia central t-Student ANOVA

6.5 Instrumentos

Modelo murino

Base de datos para recabar la información de cada ratón.

Modelo humano

Historia clínica y nutricional, frecuencia de consumo de alimentos, diarios de alimentos, registro del monitoreo de peso, porcentaje de grasa y masa muscular.

6.6 Procedimientos

Modelo murino

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Neuroquímica 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 sacarosa y su proporción comercial (1 sobre - 1g) de sucralosa y glucósidos de esteviol. Al término de las 6 semanas de exposición al edulcorante, los animales fueron sacrificados por sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico de 6.3 g/100 mL (50 µL/25g de peso del ratón)), para realizar las evaluaciones correspondientes.

Extracción de sangre y obtención de plasma

Se extrajo sangre de los ratones mediante punción cardíaca, con una jeringa previamente heparinizada, obteniendo aproximadamente de 1-a 1.5 mL por ratón. Se homogenizó la muestra y se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min, se obtuvo el plasma y se congeló hasta ser utilizado en la determinación de citocinas.

Extracción de leucocitos de bazo, timo y ganglios linfáticos

En condiciones asépticas, se extrajo el bazo, el timo y los ganglios linfáticos de los ratones, colocándolo en un contenedor con medio de cultivo (RPMI). Con la ayuda de dos portaobjetos esmerilados estériles, el tejido se prensó hasta disgregarlo. El tejido disgregado se colocó en una caja de *petri* con 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; en el caso del bazo, 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 fueron centrifugadas de nuevo a 1,300 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Finalmente, las células del bazo fueron re-suspendidas en 5 mL de medio de cultivo y las células del timo y ganglios linfáticos en 3 mL, para conteo celular.

Citometría de flujo

1×10^6 leucocitos fueron colocados en tubos para citómetro con 50 μ L de solución bloqueadora (suero fetal bovino 10%) durante 1 hr; 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 fluorocromo. Para linfocitos T se emplearon los marcadores CD3, CD4, CD8; para linfocitos B, CD19; para células NK y macrófagos, CD16 y para macrófagos, CD14; así como otros marcadores de activación o maduración celular como MHC-I, MHC-II, CD80, CD86, B220, PD-1, CTLA-4, CD40 y CD40L. Pasada la hora de incubación, los leucocitos 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 re suspendido en 250 μ L de PBS. Después de los lavados las muestras fueron leídas en el Citómetro de Flujo BD Accuri C6 del Laboratorio de Neuroquímica.

Determinación de citocinas solubles

Para determinar citocinas solubles pro-inflamatorias (IL-1 β , TNF- α y IFN- γ), se utilizó la técnica de ELISA. Para esta técnica fueron empleados kits comerciales (Biolegend). 100 μ L de plasma 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 μ L de anticuerpo de detección fueron añadidos. 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 hasta que se desarrolle 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 es incluida durante todo el proceso de ELISA.

Modelo humano

Selección de los sujetos

Los sujetos de estudio se captaron por invitación pública para participar en el estudio. Se les citó para darles una plática informativa, en donde se les explicó la importancia de la investigación, así como sus posibles consecuencias. La participación fue voluntaria, los sujetos que cumplieron con los criterios de inclusión y dieron su consentimiento para participar se les pidió que firmaran la carta de consentimiento informado (Anexo 1).

A los sujetos de estudio se les hizo una historia clínica y nutricional (Anexo 2), además de la evaluación del estado de nutrición. Se registraron datos personales (nombre, teléfono y en su caso, dirección de correo electrónico), antropométricos (peso, estatura, porcentaje de grasa por bioimpedancia eléctrica y perímetro de cintura), y dietéticos (se les pidió que llenaran un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) (Anexo 3), y tres diarios de alimentación y consumo de edulcorante (Anexo 4), dos de estos diarios debían corresponder a días diferentes de la semana, lunes a viernes, mientras que el tercero corresponde a un día del fin de semana, sábado o domingo), una vez cada semana durante todo el estudio.

Toma de muestra de sangre periférica

Se realizaron dos tomas de muestra: 1) al inicio del período de consumo de edulcorante y, 2) al término de las 6 semanas de consumo del edulcorante. A las personas se les solicitó un ayuno mínimo de 8 horas. La muestra de sangre se recolectó por punción venosa en tubos de vacío (tipo vacutainer). Una vez obtenida la muestra se

dejó coagular por 30 minutos y se centrifugó 30 minutos a 900 G. Una vez separado el suero del paquete rojo, se recuperó en tubos de 1.5 mL. Con los sueros de las dos muestras se determinó glucosa, colesterol (colesterol total, HDL y LDL), triglicéridos y concentraciones de las citocinas pro- y anti-inflamatorias.

Dieta

Durante el estudio los participantes llevaron una dieta habitual, donde sólo se eliminó el consumo del grupo de azúcares, así como de productos con sustitutos de azúcares. Cada sujeto llenó durante tres veces a la semana un diario de alimentación (Anexo 2).

Administración del edulcorante

Por aleatorización se asignó un edulcorante para consumir en bebidas exclusivamente. Se pidió a los participantes que una semana previa dejaran de consumir alimentos del grupo de azúcares (semana de lavado). Pasada la semana de lavado, se les pidió consumir 4 sobres al día de sucralosa (sobre de 1g con 0.012g de sucralosa) o 4 sobres de glucósidos de esteviol comercial (sobre de 1g con 0.025g de glucósidos de esteviol) u 8 sobres de sacarosa (sobres de 5 g). Asimismo, cada sujeto debió registrar al día la hora, el tipo de bebida y el número de sobres que emplea para endulzar (Anexo 3).

Monitoreo de diario de alimentación y medidas antropométricas

A partir de la selección de los sujetos, se llevó a cabo una visita semanal para evaluar medidas antropométricas (peso y porcentaje de grasa), así como la entrega de los diarios de alimentación con previo entrenamiento del llenado de estos.

Análisis del Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos

Se hizo un análisis del CFCA para evaluar si el consumo de edulcorantes era habitual, así como identificar los principales grupos de alimentos que consumían los participantes. El análisis se reporta en porcentaje de consumo para las opciones de Nunca, Ocasional, Mensual, Semanal y Al Día.

Análisis de los diarios de alimentación

Los diarios de alimentación recolectados fueron analizados por el software Nutrimind para determinar el porcentaje de macronutrientes consumidos al día, se promedió el consumo de kilocalorías, carbohidratos, lípidos y proteínas de tres días.

Determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos.

Estos parámetros bioquímicos se midieron con kits comerciales, mediante el método colorimétrico sensible con el equipo Selectra II, el cual se encuentra en la Facultad de Medicina de la UAEMex.

Determinación de citocinas:

Se llevó a cabo una cuantificación inicial, una antes de la administración de los edulcorantes, y una cuantificación final a la exposición al edulcorante. Las citocinas previamente mencionadas se cuantificaron mediante la técnica de ELISA. Para esta técnica se utilizaron kits comerciales con la técnica previamente descrita en la fase 1.

6.7 Recolección de datos

Modelo murino

Se llevó a cabo la recolección de datos de los ratos de forma observacional, registrando la información en una base de datos. Los datos recabados fueron: el peso de cada ratón una vez a la semana, el consumo de alimento y bebida una vez al día; así como de los diferentes marcadores de citometría y la expresión de citocinas para su análisis estadístico.

Modelo humano

La recolección de datos se llevó a cabo de forma observacional y por entrevista dirigida, en la cual se recabó la historia clínica y nutricional, el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos y se dio indicaciones para el llenado de los diarios de alimentos. Los datos registrados se recabaron en una base de datos para su análisis estadístico.

6.8 Análisis de datos

Modelo murino

En el modelo murino se realizaron pruebas estadísticas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Dunn (los datos se presentan en mediana y el rango intercuartil 75-25), para comparar entre grupos, considerando $p < 0.05$ como diferencias estadísticamente significativas.

Modelo humano

En el modelo humano se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov en los datos. Para el análisis de los diarios de alimentación se utilizó una prueba de t de student pareada para comparar el consumo de alimentos en antes y el después de la suplementación de los edulcorantes, adicionalmente se realizó una ANOVA con corrección de Tukey para la comparación entre grupos (los datos se presentan en media \pm DE). El análisis de los parámetros antropométricos, bioquímicos y citocinas se llevó a cabo con una prueba Wilcoxon para muestras relacionadas y el análisis entre grupos se llevó a cabo con la prueba de Kruskal Wallis (los datos se presentan en mediana y el rango intercuartil 75-25). En todos los casos se consideró $p < 0.05$ como diferencias estadísticamente significativas.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 22.0 para el análisis de los datos y el programa GraphPad versión 7.0 para la elaboración de las gráficas.

6.9 Aspectos Éticos

Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (Anexo 5).

Modelo Murino

Los experimentos se llevaron a cabo 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.

Modelo Humano

El presente proyecto de investigación consideró las recomendaciones sobre investigación biomédica con seres humanos adoptadas de la Asamblea Médica Mundial en Helsinki. Además, son considerados los lineamientos de la Ley General de Salud de México, en su Título Quinto: Investigación para la Salud, Capítulo Único, en lo que a la investigación con seres humanos refiere. También se consideró el Reglamento de la Ley General de Salud, en materia de Investigación para la Salud, en su Título Segundo, donde se mencionan los aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, en su Capítulo I, siendo un proyecto de riesgo mínimo para la salud. A todos los sujetos se les pidió firmar una carta de Consentimiento Informado para participar en el estudio.

7. Resultados

7.1 Artículo enviado

7.1.1 Título del artículo enviado

Cambios en poblaciones leucocitarias en timo, bazo, ganglios linfáticos y producción de citocinas TNF- α e IL-1 β en ratones BALB/c con ingesta crónica de edulcorantes

7.1.2 Carta de envío

GACETA SANITARIA: confirmación de envío / Submission confirmation

em.gaceta.0.6d2a1d.009a0e61@editorialmanager.com

<em.gaceta.0.6d2a1d.009a0e61@editorialmanager.com>

on behalf of

Gaceta Sanitaria <em@editorialmanager.com>

Sat 8/8/2020 1:15 PM

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

Estimado/a Dr. Contreras:

Le confirmamos la recepción del artículo titulado: "Cambios en poblaciones leucocitarias en timo,

bazo, ganglios linfáticos y producción de citocinas TNF- α e IL-1 β en ratones BALB/c con ingesta

crónica de edulcorantes", 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,

EM

Gaceta Sanitaria

Dear Dr. Contreras,

Your submission entitled "Cambios en poblaciones leucocitarias en timo, bazo, ganglios linfáticos y

producción de citocinas TNF- α e IL-1 β en ratones BALB/c con ingesta crónica de edulcorantes" 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,

EM

Gaceta Sanitaria

Usted puede solicitar que eliminemos sus detalles personales de registro en cualquier momento.

(Utilice el siguiente URL: <https://www.editorialmanager.com/gaceta/login.asp?a=r>) Por favor póngase en contacto con la oficina de la publicación si tiene cualquier pregunta.

7.1.4 Resumen

Los edulcorantes no calóricos se utilizan para dar sabor dulce a los alimentos, sin proveer energía. El sistema inmunológico (SI) depende de la energía de la dieta para un adecuado funcionamiento, por ello la importancia de estudiar dichas sustancias sobre las células inmunocompetentes. El objetivo de este estudio fue determinar en ratones BALB/c, machos y hembras con suplementación crónica de sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol, las diferencias en frecuencia de las poblaciones leucocitarias de timo (CD3 +), bazo (CD14 + , CD16 + , CD3 + y CD19 +) y ganglios linfáticos (CD3 + y CD19 +), así como moléculas de superficie (MHC-I + , MHC-II + , CD4 + , CD8 + , CD25 + , CD69 + , CTLA-4 + , PD-1 + , CD40-L + y B220 +) por citometría de flujo; y las concentraciones de las citocinas TNF- α e IL-1 β por la técnica de ELISA. En timo se encontró una frecuencia menor de linfocitos T CD8 + en el grupo de sucralosa de machos; en bazo las poblaciones de CD4 + y CD8 + fue mayor en el grupo de sucralosa de hembras en comparación con el control, mientras que la expresión de las moléculas CD80 y CTLA-4 fue menor, no así para PD-1 la cual fue mayor, además hubo un menor porcentaje de células CD16 + en machos del mismo grupo. Se encontró una mayor concentración de TNF- α e IL-1 β en el grupo de sucralosa machos. Nuestros datos sugieren que el consumo crónico de edulcorantes puede tener algún efecto en el SI al modificar las poblaciones leucocitarias y la producción de citocinas, sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar sus efectos sobre el SI.

7.2 Artículo aceptado

7.2.1 Título del artículo aceptado

Changes in nutrient and calorie intake, adipose mass, triglycerides and TNF- α concentrations after non-caloric sweetener intake: pilot study

7.2.2 Carta de aceptación del artículo

From: em.ijvnr.0.6557a4.45416960@editorialmanager.com
<em.ijvnr.0.6557a4.45416960@editorialmanager.com> on behalf of Int J Vitam Nutr Res <em@editorialmanager.com>
Sent: Sunday, August 18, 2019 1:21:52 PM
To: Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>
Subject: Decision: your manuscript no. IJVNR-D-18-00053R2

Ref.: Ms. No. IJVNR-D-18-00053R2
Changes in nutrient and calorie intake, adipose mass, triglycerides and TNF- α concentrations after non-caloric sweetener intake:pilot study
International Journal for Vitamin and Nutrition Research

Dear Dr Contreras,

I am pleased to tell you that your work has now been accepted for publication in International Journal for Vitamin and Nutrition Research.

It was accepted on Aug 15, 2019

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

Torsten Bohn
Editor in Chief
International Journal for Vitamin and Nutrition Research

Comments from the Editors and Reviewers:

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

7.2.3 Resumen

Abstract: Establishing the safety of non-caloric sweetener consumption in humans is a difficult task, since many contradictory results have been reported. The objective of this study was to compare the effect of frequent intake of sucrose, sucralose or steviol glycosides, on selected anthropometric, biochemical and immunological parameters in healthy, young adults. 38 individuals with normal body mass index were recruited and randomly divided into three experimental groups. After a washout week (where food with added sweeteners was restricted), each group was supplemented with sucrose (85 g packets/day), sucralose or steviol glycosides (41 g packets/day each) for 6 weeks. Selected variables were measured before and after treatment in each group and differences within and among groups were assessed. Our results showed that, compared to baseline, there was a modest but significant increase in weight ($p = 0.0293$) in the sucralose group, while the steviol glycosides group reduced their fat mass ($p = 0.0390$). No differences were observed in glycaemia; however, there was a significant increase in serum triglycerides (77.8–110.8 mg/dL) and cholesterol (162.0–172.3 mg/dL) in the sucrose group, whereas the steviol glycosides group presented lower triglycerides (104.7–92.8 mg/dL) and TNF- α concentrations (51.1–47.5 pg/mL). Comparison among groups showed differences in serum triglycerides ($p = 0.0226$), TNF- α ($p = 0.0460$) and IL- β ($p = 0.0008$). Our results suggest that, even in a short time span, frequent intake of steviol glycosides may have positive effects on metabolic parameters that may be relevant for human health.

Keywords: Non-caloric sweeteners, weight, body mass index, biochemical parameters, cytokines

Sánchez-Delgado M, Estrada JA, Paredes-Cervantes V, Kaufer-Horwitz M, Contreras I. Changes in nutrient and calorie intake, adipose mass, triglycerides and TNF- α concentrations after non-caloric sweetener intake: pilot study. *Int J Vitam Nutr Res.* 2019 Oct 28;1-12. doi: 10.1024/0300-9831/a000611. Epub ahead of print. PMID: 31656130.

8. Referencias Bibliográficas

1. Abbas A, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders; 2015.
2. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197–216.
3. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol.* octubre de 1998;10(5):351–3.
4. Medzhitov R, Janeway CA. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* febrero de 1997;9(1):4–9.
5. Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* el 6 de marzo de 2012;18(3):363–74.
6. Jr CAJ, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, Jr CAJ, Travers P, et al. *Immunobiology.* 5th ed. Garland Science; 2001.
7. Hepworth MR, Sonnenberg GF. Regulation of the adaptive immune system by innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol.* abril de 2014;27:75–82.
8. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science.* el 15 de enero de 2010;327(5963):291–5.
9. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* agosto de 2000;118(2):503–8.
10. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.* diciembre de 2004;202:8–32.
11. Zhou J-H, Wang Y-N, Chang Q-Y, Ma P, Hu Y, Cao X. Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2018;51(1):173–85.
12. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord.* el 25 de septiembre de 2013;150(3):736–44.
13. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* abril de 2000;117(4):1162–72.
14. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* abril de 2000;28(4 Suppl):N3-12.
15. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang C-H, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* el 11 de octubre de 2013;342(6155):1242454.
16. Maciolek JA, Pasternak JA, Wilson HL. Metabolism of activated T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* abril de 2014;27:60–74.

17. Ganeshan K, Chawla A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:609–34.
18. Gerriets VA, Rathmell JC. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.* abril de 2012;33(4):168–73.
19. 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. *J Leukoc Biol.* octubre de 2008;84(4):949–57.
20. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol.* febrero de 2011;11(2):81.
21. Cham CM, Driessens G, O’Keefe JP, Gajewski TF. Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8+ T cells. *Eur J Immunol.* septiembre de 2008;38(9):2438–50.
22. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259–83.
23. Hermsdorff HHM, Ángeles Zulet M, Bressan J, Alfredo Martínez J. Efecto de la dieta en la inflamación crónica y de bajo grado relacionada con la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinol Nutr.* el 1 de octubre de 2008;55(9):409–19.
24. Odegaard JI, Chawla A. The immune system as a sensor of the metabolic state. *Immunity.* el 18 de abril de 2013;38(4):644–54.
25. Jacobs SR, Herman CE, Maciver NJ, Wofford JA, Wieman HL, Hammen JJ, et al. Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. *J Immunol Baltim Md 1950.* el 1 de abril de 2008;180(7):4476–86.
26. Fernstrom JD, Munger SD, Sclafani A, de Araujo IE, Roberts A, Molinary S. Mechanisms for sweetness. *J Nutr.* junio de 2012;142(6):1134S-41S.
27. Sigman-Grant M, Morita J. Defining and interpreting intakes of sugars. *Am J Clin Nutr.* octubre de 2003;78(4):815S-826S.
28. Fitch C, Keim KS, Academy of Nutrition and Dietetics. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Acad Nutr Diet.* mayo de 2012;112(5):739–58.
29. Popkin BM, Nielsen SJ. The sweetening of the world’s diet. *Obes Res.* noviembre de 2003;11(11):1325–32.
30. Brown RJ, Rother KI. Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab.* agosto de 2012;97(8):2597–605.
31. Brown RJ, de Banate MA, Rother KI. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes IJPO Off J Int Assoc Study Obes.* agosto de 2010;5(4):305–12.

32. Shirazi-Beechey SP, Moran AW, Batchelor DJ, Daly K, Al-Rammahi M. Glucose sensing and signalling; regulation of intestinal glucose transport. *Proc Nutr Soc.* mayo de 2011;70(2):185–93.
33. Margolskee RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KSH, Ilegems E, Daly K, et al. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* el 18 de septiembre de 2007;104(38):15075–80.
34. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol.* el 1 de julio de 2007;582(Pt 1):379–92.
35. Mortensen A. Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scand J Food Nutr.* el 1 de octubre de 2006;50(3):104–16.
36. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am J Clin Nutr.* septiembre de 2012;96(3):640–6.
37. Stern D, Piernas C, Barquera S, Rivera JA, Popkin BM. Caloric beverages were major sources of energy among children and adults in Mexico, 1999-2012. *J Nutr.* junio de 2014;144(6):949–56.
38. Ebbeling CB. Sugar-sweetened beverages and body weight. *Curr Opin Lipidol.* febrero de 2014;25(1):1–7.
39. Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA.* el 25 de agosto de 2004;292(8):927–34.
40. Pereira MA. Sugar-sweetened and artificially-sweetened beverages in relation to obesity risk. *Adv Nutr Bethesda Md.* noviembre de 2014;5(6):797–808.
41. Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* julio de 2011;14(4):391–5.
42. Prakash I, Dubois GE, Clos JF, Wilkens KL, Fosdick LE. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* julio de 2008;46 Suppl 7:S75-82.
43. Grotz VL, Munro IC. An overview of the safety of sucralose. *Regul Toxicol Pharmacol RTP.* octubre de 2009;55(1):1–5.
44. All About Sucralose [Internet]. IFIC Foundation. 2019 [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://foodinsight.org/all-about-sucralose/>
45. Wiklund A-KE, Breitholtz M, Bengtsson B-E, Adolfsson-Erici M. Sucralose – An ecotoxicological challenger? *Chemosphere.* el 1 de enero de 2012;86(1):50–5.
46. Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: review and update. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* diciembre de 2013;29(11–12):1293–9.

47. Goyal SK, Samsher null, Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr.* febrero de 2010;61(1):1–10.
48. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* enero de 2009;121(1):41–54.
49. Yadav SK, Guleria P. Steviol glycosides from Stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(11):988–98.
50. Wang Z, Xue L, Guo C, Han B, Pan C, Zhao S, et al. Stevioside ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by downregulating the NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* el 27 de enero de 2012;417(4):1280–5.
51. Maki KC, Curry LL, Reeves MS, Toth PD, McKenney JM, Farmer MV, et al. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* julio de 2008;46 Suppl 7:S47-53.
52. Fengyang L, Yunhe F, Bo L, Zhicheng L, Depeng L, Dejie L, et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation.* octubre de 2012;35(5):1669–75.
53. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact.* el 28 de mayo de 2008;173(2):115–21.
54. SAGARPA. Programa Nacional de la Agroindustria de la Caña de Azúcar [Internet]. DOF. Diario Oficial de la Federación. 2014 [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5343244&fecha=02/05/2014
55. Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells. *J Agric Food Chem.* el 8 de febrero de 2006;54(3):785–9.
56. Sørensen LB, Raben A, Stender S, Astrup A. Effect of sucrose on inflammatory markers in overweight humans. *Am J Clin Nutr.* agosto de 2005;82(2):421–7.
57. 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. *Am J Clin Nutr.* octubre de 2002;76(4):721–9.
58. Sørensen LB, Vasilaras TH, Astrup A, Raben A. Sucrose compared with artificial sweeteners: a clinical intervention study of effects on energy intake, appetite, and energy expenditure after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr.* julio de 2014;100(1):36–45.

59. Sánchez-Delgado M. Efecto de los edulcorantes G.E. y sucralosa en la respuesta inmunológica pro-inflamatoria [Internet]. [México]: Universidad Autónoma del Estado de México; 2013. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.11799/14388>
60. OMS | Ingesta de azúcares para adultos y niños [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: https://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugars_intake/es/
61. El consumo de azúcar en México y la nueva directriz de la OMS para su reducción global [Internet]. [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.insp.mx/epppo/blog/3609-consumo-azucar-mexico-nueva-directriz-oms.html>
62. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2018 [Internet]. [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/programas/ensanut/2018/>
63. WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2014 [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado el 27 de febrero de 2020]. Disponible en: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>

9. ANEXOS

ANEXO 1. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Carta de Consentimiento Informado

UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO FACULTAD DE MEDICINA

La Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México llevará a cabo un estudio en personas sanas. El propósito de esta investigación es evaluar la relación existente entre el consumo de frecuente de sucralosa y glucósidos de esteviol comercial y la producción de citocinas anti y pro-inflamatorias en pacientes sanos. **Después de leer la siguiente carta, por favor indique si está de acuerdo en participar en el estudio y de ser así firme el documento.**

El estudio consistirá en acudir al consultorio establecido para realizarle algunas preguntas para su historia clínica, la toma de medidas corporales como peso, estatura, porcentaje de grasa y circunferencia de cintura, además de recolectar cuatro muestras de sangre. En la cita programada se le realizará un interrogatorio con respecto a su estado de salud. Para las mediciones corporales (peso, estatura y circunferencia de cintura), se le recomienda acudir con ropa cómoda; el tiempo aproximado para esta sesión es de 30 minutos. Previo período de lavado, donde excluirá el consumo del grupo de azúcares y sustitutos de azúcar de su dieta habitual durante una semana. Se le tomará una muestra inicial de sangre (7 mL), por lo cual deberá acudir en ayuno mínimo de 8 horas. La toma de muestra sanguínea será realizada por personal profesional capacitado y se realizará una punción en el brazo, la cual puede ocasionar cierta incomodidad o algún tipo de moretón, pero no representa ningún otro tipo de riesgo. Todo el material utilizado será nuevo, desechable y estéril. Usted tendrá por 6 semanas una dieta habitual según sus requerimientos nutricionales donde se le pedirá consumir 4 sobres de sucralosa o glucósidos de esteviol comercial al día en alguna bebida. Se tomará una segunda muestra de sangre al término de las 6 semanas. Así como también deberá llenar dos formatos, un diario de consumo de edulcorante en donde debe colocar la hora, el tipo de bebida con el que endulzó y el número de sobres que utilizó, así como un diario de alimentación en el cual colocará tres veces a la semana los alimentos y bebidas consumidos en el día durante las 6 semanas de estudio con el respectivo edulcorante.

Las mediciones y los exámenes de sangre se proporcionarán **SIN COSTO** alguno para usted y los resultados le serán entregados con interpretación de manera personalizada.

La participación en el estudio es **totalmente voluntaria** y **tiene la opción de rechazar o retirarse de la investigación en el momento que usted lo decida**. También **puede negarse a contestar cualquier pregunta que lo haga sentirse incómodo**. Los riesgos que pueden presentarse en el estudio son los efectos secundarios por el consumo del edulcorante, ya sea problemas gastrointestinales o alérgicos, sin mayor riesgo para la salud. **NO EXISTIRÁ NINGÚN TIPO DE COMPENSACIÓN ECONÓMICA** de parte de la Universidad por participación en esta investigación.

La información que usted nos proporcione será estrictamente confidencial.

Los cuestionarios aplicados serán almacenados en un lugar seguro y serán destruidos aproximadamente en tres años.

Después de que se me explicaron los procedimientos, beneficios y riesgos de este estudio, declaro que he leído y comprendido las explicaciones que se me han dado a todas mis preguntas y al asentar mi firma en este documento, doy mi consentimiento para participar voluntariamente en esta investigación.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del investigador

TESTIGO 1

TESTIGO 2

Toluca, México a _____ de _____ 20____.

ANEXO 2. HISTORIA CLÍNICO Y NUTRIOLÓGICA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

HISTORIA CLÍNICO-NUTRIOLÓGICA

Fecha: _____

Expediente: _____

DATOS PERSONALES:

Nombre: _____ Edad: ____ Sexo: ____

Fecha de Nacimiento _____ Estado Civil: _____

Escolaridad: _____ Ocupación: _____

Dirección: _____

Teléfono _____ Otros (Fax/E-mail) _____

INDICADORES CLÍNICOS

ANTECEDENTES SALUD / ENFERMEDAD

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Cardiovasculares ____ Pulmonares ____ Digestivos ____ Diabetes ____ Renales ____

Quirúrgicos ____ Alérgicos ____ Transfusiones ____

Medicamentos _____

Especifique _____

ANTECEDENTES FAMILIARES

Obesidad _ Diabetes _ HTA _ Cáncer _ Hipercolesterolemia _ Hipertrigliceridemia _

Madre ____ Padre ____ Hermanos ____

ASPECTOS GINECOLÓGICOS

Embarazo actual SI _ NO _

Anticonceptivos orales: SI _ NO _

Cuál _____ Dosis _____

PADECIMIENTO ACTUAL

Diarrea: _____ Estreñimiento: _____ Gastritis: _____ Úlcera: _____

Náusea: _____ Pirosis: _____ Vómito: _____ Colitis: _____

Dentadura: _____ Otros _____

Observaciones _____

Padece alguna enfermedad diagnosticada: _____

Ha padecido alguna enfermedad importante: _____

Toma algún medicamento ____ Cuál _____

Dosis _____ Desde cuándo _____

Toma: Laxantes ____ Diuréticos ____ Antiácidos ____ Analgésicos ____

Le han practicado alguna cirugía: _____

ESTILO DE VIDA**Diario de Actividades (24 hrs):**

HORA	PRINCIPAL ACTIVIDAD REALIZADA
	DESPERTARSE DESAYUNO
	COMIDA
	CENA
	DORMIR

Actividad:

Muy ligera Ligera Moderada Pesada Excepcional

Ejercicio:

Tipo _____ Frecuencia _____ Duración _____

¿Cuándo inicio? _____

Consumo de (frecuencia y cantidad):

Alcohol: _____ Tabaco: _____ Café : _____

SIGNOS

Aspecto General (cabello, ojos, piel, uñas, labios, encías, etc.).

Presión Arterial

Conoce su presión arterial SI _ NO _ Cuál es _____

Hora: _____ Brazo Derecho: _____

INDICADORES DIETÉTICOS

Cuántas comidas hace al día: _____

	COMIDAS EN CASA	COMIDAS FUERA	HORARIO DE COMIDAS
ENTRE SEMANA			
FIN DE SEMANA			

Quién prepara sus alimentos _____

Come entre comidas _____ Qué _____

Ha modificado su alimentación en los últimos 6 meses (trabajo, estudio, o actividad)

SI _ NO _ Porqué _____ Cómo _____

Apetito: Bueno: _____ Malo: _____ Regular: _____

A qué hora tiene más hambre _____

Alimentos preferidos: _____

Alimentos que no le agradan / no acostumbra: _____

Alimentos que le causan malestar (**especificar**): _____

Es alérgico o intolerante a algún alimento: SI _ NO _ Cuál _____

Toma algún suplemento / complemento: SI _ NO _ Cuál _____

Dosis _____ Porqué _____

Su consumo varía cuando está triste, nervioso o ansioso: SI _ NO _

Cómo _____

Agrega sal a la comida ya preparada: SI _ NO _

Qué grasa utilizan en casa para preparar su comida:

Margarina Aceite vegetal Manteca Mantequilla Otros _____

Ha llevado alguna dieta especial _____

Cuántas _____

Qué tipo de dieta _____ Hace cuánto _____

Por cuánto tiempo _____ Por qué razón _____

Qué tanto se apegó a ella _____ Obtuvo los resultados esperados _____

Ha utilizado medicamentos para bajar de peso SI _ NO _ Cuáles _____

DIETA HABITUAL

Desayuno	
Colación	
Comida	
Colación	
Cena	
Colación	

Vasos de agua natural al día: _____

Vasos de bebidas al día (leche, jugo, café) _____

Cambios en fin de semana _____

INDICADORES ANTROPOMÉTRICOS

MEDICIÓN (unidad)	DATO						
Peso actual (kg)							
Peso habitual (kg)							
Estatura (m)							
EVALUACIÓN (unidad)	DATO E INTERPRETACIÓN						
Fecha							
Peso							
Índice de masa corporal (kg/m ²)							
% Grasa corporal							
Masa muscular total (kg)							
Grasa visceral							
% Agua corporal total							
<i>CINTURA</i>							

INTERPRETACIÓN DE DATOS**Indicadores Clínicos**

PADECIMIENTO Y SÍNTOMAS:	IMPLICACIONES NUTRICIAS:
MEDICAMENTOS / SUPLEMENTOS:	IMPLICACIONES NUTRICIAS:

Indicadores Dietéticos**Necesidades energéticas y nutrimentales.**

a) Para el peso actual.

GET = TMR _____ ETA _____ AF _____ TOTAL _____

NUTRIMENTO	GRAMOS	KILOCALORIAS	% DEL GET
Hidratos de carbono			
Proteínas			
Lípidos			

Indicadores Bioquímicos

MEDICIÓN DE	FECHA	VALOR	VALOR DE REFERENCIA	INTERPRETACIÓN
Glucosa				
Colesterol Total				
Triglicéridos				

Diagnóstico nutricional final

ANEXO 3. CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA



**ALTERACIONES EN LOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN RELACIONADAS AL
CONSUMO HABITUAL DE EDULCORANTES COMERCIALES EN ADULTOS JÓVENES**

FOLIO:

El siguiente cuestionario tiene el objetivo de recabar información acerca del consumo de edulcorantes, así como valorar la ingesta de alimentos. Este cuestionario forma parte del proyecto titulado: “Alteraciones en los marcadores de inflamación relacionadas al consumo habitual de edulcorantes comerciales en adultos jóvenes”, realizado por estudiantes de cuarto semestre de la Licenciatura Médico Cirujano.

En los últimos años el uso de edulcorantes ha aumentado por la población en general. Estudios realizados han mostrado alteraciones sobre la diferenciación de poblaciones de linfocitos T, propiciando el incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, dicho incremento puede conducir a efectos deletéreos al organismo. La investigación tiene como objetivo principal evaluar el efecto del consumo habitual de edulcorantes comerciales en 64 individuos, sobre los marcadores de inflamación: IL-1 β , IL-6, y proteína C reactiva.

Los individuos serán seleccionados a partir de la interpretación de este cuestionario. Le solicitamos de la manera más atenta realice el llenado del cuestionario de forma veraz, atendiendo a las indicaciones dadas.

Agradecemos su disposición y esperamos contar con su participación.

FICHA DE IDENTIFICACIÓN			
			FECHA: _____
NOMBRE: _____		SEXO: _____	
EDAD: _____	FECHA DE NACIMIENTO: _____	RELIGIÓN: _____	
PESO: _____	ESTATURA: _____	TELÉFONO/CELULAR: _____	
CORREO ELECTRÓNICO: _____			
FACULTAD: _____		LICENCIATURA: _____	SEMESTRE ACTUAL: _____
Tiene alguna de las siguientes enfermedades:			
HIPERTENSIÓN	DIABETES TIPO 1 O 2	CÁNCER	OTRA: _____
Toma algún medicamento: _____			
Es alérgico a: _____			

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Siga las instrucciones, y trate de responder lo mejor posible con la ayuda de los ejemplos, teniendo en cuenta el consumo del alimento aislado, así como el añadido a otros platos.

Por ejemplo:

Huevos: considere los consumidos solos (ej. frito o cocido) y los de otros platos (ej. tortilla, revueltos)

Pollo: considere el que come en plato único y el que come en platos mixtos.

Aceite: tenga en cuenta el que añade en la mesa a ensaladas, al pan y a otros platos como verduras y huevos fritos.

Cuando un alimento se consume solo en temporada, como algunas frutas o helados, deberá indicar el promedio de consumo.

Los productos light mencionados se refieren a los bajos en azúcar.

ANEXO 4. DIARIO DE ALIMENTACIÓN (AUTOREGISTRO)

DIARIO DE ALIMENTACIÓN			Fecha
Hora/ Lugar del consumo	Alimento	Cantidad	Ingredientes principales
DESAYUNO			
COMIDA			
CENA			
OTROS			
BEBIDAS			

ANEXO 5. CARTA DEL COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Oficio No.001/2015

23 de Febrero de 2015

DRA. IRAZU CONTRERAS GARCIA
INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTE

Por este medio le envié un cordial saludo, y en respuesta a su Solicitud de Evaluación del Protocolo de Investigación **"EFECTO DEL CONSUMO FRECUENTE DE EDULCORANTES COMERCIALES SOBRE EL SISTEMA INMUNOLOGICO"**, el Comité de Ética en Investigación dictamina como **APROBADO** el proyecto antes mencionado.

Sin otro particular por el momento, agradezco su atención dada a la presente.

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2015, Año del Bicentenario Luctuoso de José María Morelos y Pavón"

M. EN I.C. JOAQUIN ROBERTO BELTRAN SALGADO
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION

FACULTAD DE MÉDICINA



**COMITE DE ÉTICA
EN INVESTIGACIÓN**



**FACULTAD DE
MEDICINA**

c.c.p Dra. en C.S.P. Lilia Patricia Bustamante Montes/ Directora de la Facultad de Medicina
c.c.p Archivo/JRBS*DRM



www.uaemex.mx