



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud
“CONSUMO CRÓNICO DE EDULCORANTES Y SU IMPACTO EN
LA MICROBIOTA INTESTINAL”
TESIS

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

Presenta:

M. en C.S. Jorge Alberto Escoto Herrera

Comité Tutorial:

Tutor Académico

Dra. Beatriz Elina Martínez Carrillo

Tutor Interno

Dra. Ninfa Ramírez Durán

Tutor Externo

Hugo César Ramírez Saad



Toluca, Estado de México, 2018

ÍNDICE

	Página
Introducción	1
1. Antecedentes	2
Edulcorantes	2
Sacarosa	2
Estevia	2
Sucralosa	3
Tracto gastrointestinal	4
Microbiota intestinal	5
Microbiota intestinal y sus implicaciones con la salud	7
2. Planteamiento del problema	8
3. Justificación	9
4. Hipótesis	11
5. Objetivos: General y específicos	11
6. Diseño metodológico	11
6.1 Diseño del estudio	11
6.2 Universo y Muestra	11
6.3 Procedimientos	12
6.4 Criterios de inclusión	17
6.5 Criterios de exclusión	17
6.6. Instrumentos	17
6.7 Recolección de datos	17
6.8 Análisis de datos	17

6.9 Aspecto ético	17
7. Resultados	18
7.1 Artículo y/o capítulo de libro aceptado	18
7.1.1 Título del artículo y/o capítulo de libro aceptado	18
7.1.2 Página frontal del manuscrito	19
7.1.3 Carta de aceptación	20
7.1.4 Resumen	22
7.1.5 Apartados del artículo	23
Introducción	23
Metodología	
Resultados	
Discusión de resultados	
Conclusiones	
Referencias	
7.2 Artículo y/o capítulo de libro enviado	41
7.2.1 Título del artículo y/o capítulo de libro enviado	41
7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo	41
7.2.3 Resumen	41
7.2.4 Apartados del artículo	41
Introducción	
Métodos	
Resultados	
Discusión	
Conclusiones	

8. Referencias

9. Anexos

Introducción

La prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas como obesidad y diabetes mellitus tipo 2, entre otras, ha aumentado; esto debido a cambios en el tipo de alimentación y estilo de vida de la población, dentro de ellos, se ha incrementado el sedentarismo y el consumo de alimentos con alto contenido calórico, lo que ocasiona ganancia de peso corporal, por ello, se han buscado alternativas para reducir el consumo energético proveniente de la dieta; en este sentido, la población utiliza en alimentos y bebidas sustitutos del azúcar no calóricos como sucralosa y estevia, que son los edulcorantes no calóricos (ENC) más utilizados. Las investigaciones sobre los efectos que pudieran tener en la salud se enfocan en la toxicidad o en efectos relacionados con su metabolismo. Sin embargo, el efecto local que tienen sobre el funcionamiento del sistema inmunitario de la mucosa intestinal; su asociación con cambios en la composición de la microbiota intestinal y las hormonas relacionadas con la absorción y regulación de la glucosa a nivel de intestino delgado, son campos poco explorados. El objetivo del estudio es conocer los cambios en la microbiota intestinal, causados por el consumo crónico de edulcorantes, en ratones CD1. Aún se desconocen los efectos en la salud humana relacionados con la cantidad ingerida y el consumo por tiempo prolongado de los ENC a nivel de la mucosa del intestino delgado, por lo que proponemos iniciar con el modelo murino. Se utilizarán 54 ratones CD1 machos: un grupo basal (se sacrificará a los 21 días de edad, n=6), 2 grupos se trabajarán durante 6 y 12 semanas con los siguientes tratamientos (n=6): a) Control sin edulcorante, b) Sacarosa, c) Sucralosa, d) Estevia. Se alimentarán con dieta normal y agua *ad libitum*. Se administrará cada edulcorante vía oral diluido en agua durante 5 horas por día. Se determinará Índice de Masa Corporal, consumo de alimento y agua y glucemia. Los cambios en la microbiota serán abordados con un enfoque metagenómico, mediante secuenciación masiva de amplicones obtenidos a partir de DNA extraído de sólidos intestinales de cada ratón.

1. Antecedentes

1.1. Edulcorantes.

Los edulcorantes son aditivos alimentarios que proporcionan un sabor dulce a los alimentos, se está experimentando un incremento en su consumo y por lo tanto se dedica mayores esfuerzos en su investigación para conocer los efectos tóxicos, así como su metabolismo. El aumento en la prevalencia de padecimientos crónicos degenerativos como obesidad, diabetes, hipertensión arterial, entre otras, ha favorecido el incremento en la creciente demanda de alimentos bajos en calorías para disminuir la cantidad de energía proveniente de la dieta, en gran parte por hidratos de carbono simples, pero sin prescindir del sabor dulce (1), además, estos sustitutos de la sacarosa tienen un metabolismo independiente de la insulina, lo que parece ser una ventaja para las personas que padecen enfermedades crónicas (2).

De acuerdo con su origen, se pueden clasificar como naturales o sintéticos y respecto al aporte energético como calóricos o no calóricos (3,4).

1.1.1. Sacarosa

La sacarosa o azúcar común es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa, extraído a partir de la caña de azúcar y de la remolacha (5). Es utilizada para proporcionar sabor dulce a los alimentos, también como conservador como en las mermeladas, jaleas o almíbar. Se encuentra en un 20% del peso de la caña de azúcar y en un 15% del peso de la remolacha azucarera (2). La miel de abeja también contiene gran cantidad de sacarosa parcialmente hidrolizada (6).

El consumo de sacarosa, pese a ser un edulcorante natural, está relacionado con riesgo de padecer patologías como cáncer (7), obesidad, diabetes mellitus y síndrome metabólico (8), de esta manera, su restricción o eliminación de la dieta habitual, es una de las terapias nutricionales más recomendadas (1,2).

1.1.2. Estevia

La estevia es una planta originaria del hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay y Brasil, su nombre científico es *Stevia rebaudiana*. Es utilizada para edulcorar alimentos debido a que tiene un poder edulcorante hasta 300 veces superior a la sacarosa (9), debido a los glucósidos llamados esteviósido, y rebaudiósido (10). El sabor dulce de la estevia no es afectado por altas temperaturas; se puede utilizar en infusiones y en otras

bebidas calientes, en las frutas enlatadas o envasadas y para hornear todo tipo de postres, no añade la cualidad substancial y concentrada que otros edulcorantes con alto aporte energético, como la sacarosa lo hace (9), no se fermenta, no crea placa dental, es anticariogénico, no se carameliza al calentarse, ni se cristaliza como el azúcar (11).

Los glucósidos de la estevia no afectan la concentración de glucosa en sangre, lo que sería un edulcorante apto para el consumo por personas que padecen diabetes o fenilcetonuria (12), la estevia una vez ingerida es degradada principalmente por la microbiota intestinal en esteviol, esteviolbiónido y glucosa, que son absorbidos y metabolizados (13,14).

1.1.3 Sucralosa

La sucralosa es un derivado sintético de la sacarosa, tiene una estructura similar a la del azúcar, obtenida por la sustitución selectiva de los grupos hidroxilo de la sacarosa por tres moléculas de cloro. Es 600-800 veces más dulce que el azúcar (15), estable a pH de 3-7 y resistente a altas temperaturas (15). No puede ser metabolizada por el organismo, pasa a través del tracto gastrointestinal prácticamente inalterada, su absorción intestinal oscila entre el 11 y el 27% (16). El 85% de la sucralosa ingerida es eliminada en las heces y el 15% que se absorbe de manera pasiva no puede ser utilizado con fines energéticos. Debido a su alta solubilidad en agua (260 g/L a 20° C) y al no ligarse a las proteínas plasmáticas, es eliminada por vía renal sin efecto osmótico alguno (15,17). Es estable en amplios márgenes de pH a temperatura ambiente (18).

Su consumo es sugerido para todas las poblaciones, incluso durante el embarazo y lactancia y los niños de todas las edades (11,19). El consumo de sucralosa parece ser útil para las personas con diabetes, pues algunas investigaciones demuestran que no tiene efecto en el metabolismo de los carbohidratos, en el control de la glucosa en sangre a corto o largo plazo ni en la secreción de insulina, además de no ser cariogénico (2,17).

1.2 Tracto Gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) del ser humano está conformado por: boca, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso; tiene funciones de digestión, absorción, secreción, de barrera, se considera un órgano endocrino y forma parte del sistema inmunológico. El intestino delgado de un adulto mide de 4 a 5 m y está dividido en tres secciones; duodeno, yeyuno e íleon. Su principal función es la de absorber nutrientes provenientes de los alimentos (21). El intestino grueso de un adulto mide

aproximadamente 1.5 m de largo y se divide en distintas regiones; ciego, colon ascendente, colon transversal, colon descendente y colon sigmoide que finaliza en el recto. El colon humano tiene la función de absorber y secretar electrolitos y agua, también almacena y excreta desechos heces fecales) (20). Es el portal a través del cual las sustancias nutritivas como vitaminas, minerales y otros fluidos ingresan al cuerpo. También es el medio en el cual las proteínas, grasas, e hidratos de carbono complejos son descompuestos mecánica y químicamente a unidades capaces de absorberse (21).

En el intestino delgado, la actividad peristáltica moviliza el quimo (formado por alimentos digeridos, agua y jugos gástricos) a lo largo de todo el intestino, permitiendo que se mezcle con las enzimas pancreáticas, jugos biliares y algunas células intestinales desprendidas (22). Para este punto, el quimo ha sufrido poca digestión química. Las proteínas iniciaron su digestión en estómago, pero en intestino las proteasas pancreáticas y peptídicas, en el borde de cepillo continúan la digestión proteica creando pequeños péptidos y aminoácidos libres que pueden ser absorbidos (23).

En el intestino delgado los hidratos de carbono se convierten en polisacáridos digeribles y los disacáridos en monosacáridos para ser absorbidos. El almidón es digerido por la amilasa pancreática para formar maltosa. La disacaridasa correspondiente (lactasa, sacarasa) se encargan de los disacáridos como sacarosa y lactosa (24). Finalmente, las grasas llegan al intestino delgado en forma de gotas gruesas. En duodeno las sales biliares estabilizan estas gotas para que la lipasa pancreática pueda digerirla (23).

1.2. Microbiota Intestinal

El intestino humano es el hábitat natural de una comunidad numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o la luz intestinal (25,26). El término “microbiota intestinal” se refiere a las comunidades microbianas que habitan en el intestino, de entre las más de 400 especies de bacterias presentes en el TGI, 30 o 40 representan el 99% de los microorganismos constituyendo la microbiota normal, compuesta en su mayoría por bacterias; en el intestino delgado existen aproximadamente 10⁴ unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de contenido intestinal en la parte superior (duodeno), donde son mayoritarios nuevamente los lactobacilos y los estreptococos, hasta 10⁸ UFC/g en la región distal del íleon (27).

Los grupos bacterianos cultivables más numerosos en esta región son: bifidobacterias, enterobacterias, *bacteroides* y *fusobacterias*, los principales factores limitantes para el establecimiento de los microorganismos en el intestino delgado son los movimientos peristálticos, las secreciones pancreáticas y biliares (28,29). El intestino grueso es donde reside el mayor número de bacterias, constituye entre el 35 y 50% del volumen de su contenido sólido (30). El ecosistema microbiano del intestino incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través alimentos, bebidas (31), etc.

La microbiota intestinal tiene tres funciones primarias; metabólicas, tróficas e inmunológicas.

Funciones metabólicas; Actúa sobre los sustratos o residuos dietéticos no digeribles, el moco endógeno y los detritus celulares. La diversidad de genes en la comunidad microbiana (metagenoma) proporciona una gran variedad de enzimas y vías bioquímicas distintas de los recursos propios del anfitrión (32). La fermentación de hidratos de carbono no digeribles tiene lugar fundamentalmente en el ciego y colon, esto constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana, y además produce ácidos grasos de cadena corta que el anfitrión puede absorber. Lo anterior se traduce en recuperación de energía de la dieta y favorece la absorción de iones (Ca, Mg, Fe) en el ciego. Las funciones metabólicas también incluyen la producción de vitaminas (K, B12, biotina, ácidos fólico y pantoténico) y la síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea (33). El metabolismo anaeróbico de los péptidos y proteínas se produce en segmentos más distales del colon y también es fuente de ácidos grasos de cadena corta, pero al mismo tiempo, genera una serie de sustancias potencialmente tóxicas incluyendo amoníaco, aminas, fenoles, tioles e índoles (27, 34).

Proporciona un efecto de “barrera”, por el que las bacterias que ocupan un espacio o nicho ecológico impiden la implantación de bacterias extrañas al ecosistema. Además, la microbiota propia impide el sobre crecimiento de bacterias oportunistas que están presentes en el intestino, pero con proliferación restringida. El equilibrio entre las especies bacterianas residentes confiere estabilidad al conjunto de la comunidad microbiana. El

efecto de barrera se debe a la capacidad de ciertas bacterias para segregar sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), que inhiben la proliferación de otras bacterias, y también a la competición entre bacterias por los recursos del sistema, ya sea nutrientes o espacios ecológicos (35, 36).

Funciones tróficas; En las criptas colónicas de animales criados en condiciones de estricta asepsia se observa una disminución del “turn-over” de células epiteliales en comparación con animales control colonizados por microbiota convencional. La diferenciación celular en el epitelio está sumamente influida por la interacción con los microorganismos residentes como se demuestra por la expresión de una diversidad de genes en los animales mono-asociados a cepas bacterianas específicas (35).

Funciones inmunológicas; las bacterias también desempeñan un papel esencial en el desarrollo del sistema inmunitario; los animales criados en condiciones de asepsia estricta muestran baja concentración de células linfoides en la mucosa del intestino delgado, la estructura de los folículos linfoides está atrofiada y la concentración de inmunoglobulinas circulantes es anormalmente baja. Inmediatamente después de la exposición a microbiota convencional, aumenta el número de linfocitos de la mucosa, los centros germinales crecen en número y tamaño, apareciendo rápidamente en los folículos linfoides y la lámina propia, células productoras de inmunoglobulinas (37, 38).

1.2.1. Microbiota Intestinal y sus implicaciones con la salud.

La microbiota intestinal tiene gran importancia respecto a la salud ya que las bacterias influyen de forma beneficiosa o dañina sobre la salud del huésped. Entre los posibles efectos perjudiciales existen infecciones intestinales, infecciones extraintestinales y carcinogénesis. En condiciones normales el ecosistema intestinal está en equilibrio y los microorganismos perjudiciales no ejercen su poder patógeno; sin embargo, en determinadas situaciones, éstos pueden dar lugar a infecciones. Si se establecen en regiones del cuerpo en las que no son residentes habituales o cuando su número se incrementa de forma excesiva debido a perturbaciones del ecosistema intestinal. Entre los miembros de la microbiota anaerobia estricta, *Bacteroides fragilis* es el que con más frecuencia causa infecciones y sepsis a partir de contaminación fecal; mientras que *Escherichia coli*, es la bacteria anaerobia facultativa cultivable más frecuente en heces, es la causa más habitual de infecciones del tracto urinario (39).

1.2.2 Microbiota intestinal y su relación con el consumo de edulcorantes

Los ENC han ganado popularidad en la industria alimentaria debido a los bajos costos de producción, el bajo aporte energético que otorgan y los relativos beneficios como coadyuvantes en la reducción de peso corporal y la reducción de los niveles de glucemia, por estas razones, se han agregado a los alimentos más comúnmente utilizados como refrescos dietéticos, repostería baja en calorías, cereales industrializados, golosinas, entre otros. Algunos autores recomiendan su uso por personas con enfermedades crónicas como diabetes mellitus tipo 2(3,40). pues tiene una baja respuesta en la glucemia (41), mientras que otros han demostrado asociaciones entre su consumo, el aumento de peso corporal, y un mayor riesgo para padecer diabetes mellitus tipo 2(42). Sin embargo, la interpretación se complica por el hecho de que los ENC son típicamente consumidos por las personas que ya sufren de dichas enfermedades. A pesar de estos datos controvertidos, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó seis tipos de ENC para su uso en los Estados Unidos (43). En México, la Norma Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, señala las especificaciones nutrimentales para los alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición, sugiriendo el consumo de sucralosa, sacarosa y estevia (14,44).

La mayoría de los ENC pasan a través del tracto gastrointestinal humano sin ser digeridos y por lo tanto se encuentran directamente con la microbiota intestinal, que desempeña un papel central en la regulación de varios procesos fisiológicos. La composición y función de la microbiota son moduladas por la dieta, y a la vez sus alteraciones se han asociado como un factor de riesgo para padecer síndrome metabólico. Los cambios en la fuente de edulcorante y la cantidad ingerida impactan directamente en la regulación y el mantenimiento homeostático del balance energético mediado por hormonas secretadas por el intestino y adipocitos, así como el sistema inmune innato (39).

2. Planteamiento del problema

En México la prevalencia de enfermedades crónicas degenerativas como obesidad, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, etc. ha aumentado, ocasionando que la población busque alimentos con bajo aporte energético. Una opción aparentemente saludable ha sido el uso de sustitutos del azúcar libres o bajos en calorías llamados también edulcorantes no

calóricos (ENC); éstos están presentes en diferentes productos alimenticios, principalmente en los industrializados como son; bebidas carbonatadas, barras energéticas altas en fibra, golosinas, embutidos, repostería, entre otros, incluso existen medicamentos como jarabes para la tos, adicionados con ENC.

Organismos reguladores como la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), en México, y la Agencia de Alimentos y Medicamentos (Food and Drugs Administration; FDA) en Estados Unidos, sugieren un consumo o límite saludable por día de dichos ENC, pero el fácil acceso que tiene la población a productos adicionados con ENC hace muy difícil la estimación de las cantidades ingeridas.

Las investigaciones sobre los posibles efectos que pudiera tener el consumo de ENC, se enfocan en la toxicidad o en los efectos relacionados con su metabolismo. Sin embargo, el efecto local que tienen sobre el funcionamiento del sistema inmunitario de la mucosa intestinal; su asociación con cambios en la composición de la microbiota intestinal y las hormonas relacionadas con la absorción y regulación de la glucosa a nivel de intestino delgado, son campos poco explorados. Por lo que resulta relevante investigar los efectos locales en mucosa y microbiota intestinales, de los ENC de mayor uso en la población como son estevia y sucralosa, comparándolo con el endulzante más conocido, la sacarosa, así podremos obtener información sobre las diferencias de su metabolismo y absorción.

En primera instancia el modelo murino resulta ideal para explorar estos efectos. La sacarosa modula la secreción de células enteroendócrinas; la incógnita es, si las alteraciones ocasionadas por la absorción intestinal de sacarosa que afectan la expresión de hormonas que se producen en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos (incretinas), uno de sus efectos más importantes es la secreción de insulina por el páncreas y la disminución en los niveles de glucosa en sangre. A corto y largo plazo en el ratón (y muy probablemente en el humano) son generadas también por los ENC. Si los ENC alteran la capacidad de transporte y la afinidad de los transportadores de sodio SGLT y de glucosa GLUTs, presentes en las membranas epiteliales del intestino; además de indagar respecto a la influencia e interacción de los ENC en la microbiota y el transporte de éstos a través de la mucosa intestinal. Derivado de lo anterior, resulta indispensable profundizar en el efecto

del consumo de ENC, por tiempo prolongado y desde edad temprana, así como su interacción en la mucosa intestinal, ya que es el sitio de absorción al organismo.

Por lo cual, surge la siguiente pregunta:

¿Cuál es el efecto que el consumo crónico de edulcorantes tiene sobre la microbiota intestinal de ratones CD1?

3. Justificación

El aumento en la prevalencia de enfermedades como la obesidad, diabetes mellitus y síndrome metabólico ha generado que la población realice cambios en sus hábitos alimentarios e incorpore nutrimentos como son los ENC, éstos se utilizan como alternativa al azúcar de mesa. Las investigaciones científicas han demostrado la seguridad de 6 edulcorantes actualmente aprobados para uso en alimentos en los EE.UU. y Europa (Estevia, Acesulfame-K, Aspartame, Neotame, Sacarina y Sucralosa), si se ingieren diariamente en cantidades aceptables (12, 25). A pesar de esto, existen incógnitas respecto a su uso, como: efectos nocivos en el organismo a largo plazo, su influencia en vías metabólicas de regulación de la glucosa, su intervención en patrones de alimentación por mecanismos centrales como preferencia por el sabor dulce, así como su impacto en el balance energético, además se argumenta que no son compuestos fisiológicamente inertes (2); así como la seguridad de consumirlo en edades tempranas. La sacarosa provee de exceso de energía al cuerpo, este exceso de energía aunado a un bajo gasto energético ocasiona a largo plazo un incremento de la masa grasa (10) y con ello obesidad, diabetes mellitus y síndrome metabólico. Por esta razón, el consumo de ENC, se incrementa de forma exponencial y no se limita a la población adulta, cada vez más niños y jóvenes los consumen, aún sin saberlo. Los edulcorantes se encuentran en una gran variedad de productos, por ello su consumo no se limita únicamente a las bebidas y se subestima el consumo diario. Existen múltiples estudios relacionados con el consumo de edulcorantes pero la mayoría de ellos se centran en sus efectos sobre el control en la concentración de la glucosa a nivel periférico, principalmente en pacientes diabéticos, además en patologías de colon, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad y síndrome metabólico, pero se debe investigar los efectos de los ENC en los sujetos sanos que inician su consumo en edades tempranas de la vida y que lo realizan por tiempos prolongados, con mayor interés, el efecto local que tienen sobre la mucosa intestinal como sitio de absorción. Los resultados

respecto al efecto de los edulcorantes en la inmunidad de mucosas son escasos; por ello es necesario evaluar la interacción entre el consumo prolongado de edulcorantes con la inmunidad de mucosas y la microbiota intestinal, así como el efecto de éstos con las hormonas y los receptores que participan en la absorción de estos en sujetos sanos.

4. Hipótesis

El consumo crónico de edulcorantes modificará la composición de la microbiota en comparación con los ratones control.

5. Objetivos: General y específicos

General:

Evaluar el impacto del consumo crónico de edulcorantes sobre la microbiota intestinal de ratones CD1.

Específicos:

Determinar el peso y longitud de los ratones de los grupos de estudio para determinar su Índice de Masa Corporal.

Cuantificar el consumo de edulcorantes para determinar los mg/día consumidos.

Medir el consumo de alimento y edulcorante de los grupos de estudio para calcular el aporte energético proveniente de la dieta.

Establecer por medio de secuenciación masiva la composición y estructura de la microbiota intestinal a partir de DNA de sólidos intestinales de los ratones.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño del estudio

Se trata de un estudio analítico, experimental, aleatorizado.

6.2 Universo y Muestra

Se utilizarán 54 ratones de la cepa CD1 no consanguíneos, machos de 21 días de edad (recién destetados), libres de patógenos. Se formarán 3 grupos; a) basal (n=6, mediciones iniciales), b) 6 semanas de tratamiento; (dividido en 4 subgrupos (n=6) de acuerdo con el tratamiento; CL; control, SAC, expuestos a sacarosa, SUC; expuestos a sucralosa y EST; expuestos a estevia y c) 12 semanas de tratamiento; (dividido en 4 subgrupos (n=6) de acuerdo con el tratamiento; CL; control, SAC, expuestos a sacarosa, SUC; expuestos a sucralosa y EST; expuestos a estevia, como se muestra en la figura 1.

6.3 Procedimientos

54 ratones CD1, machos de 21 días de edad; divididos en 3 grupos; a) basal (n=6, mediciones iniciales), b) 6 semanas de tratamiento (medición intermedia) y c) 12 semanas de tratamiento (medición final); b) y c) fueron divididos en 4 subgrupos (n=6) de acuerdo con el tratamiento; CL; control, SAC; sacarosa, SUC; sucralosa y EST; estevia, se alimentaron con dieta normal para ratones de laboratorio (Rodent Laboratory Chow 5001 de Purina [3.02Kcal/gr]) y agua *ad libitum*. Se alojaron en jaulas para 3 individuos, en condiciones controladas; temperatura de 19-21°C, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12h. Se consideraron las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se cuantificó semanalmente el peso de los animales y el consumo de alimento, así como glucemia, la cual se medirá con un glucómetro Contour TS de Bayer (45).

Preparación de edulcorantes

Cada edulcorante (SAC, SUC y EST) se administró por vía oral, diluido en agua destilada a razón de 41.66 mg/mL de SAC, 4.16mg/mL de SUC y EST, de acuerdo con las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011, para bebidas saborizadas no alcohólicas. La solución con edulcorante se colocó en un bebedero diariamente en un horario de 8:00-13:00 h, se retiró para sustituirlo por agua sin edulcorante, adicionalmente, en todos los casos se cuantificó la cantidad de agua consumida por día. (Figura 2.)

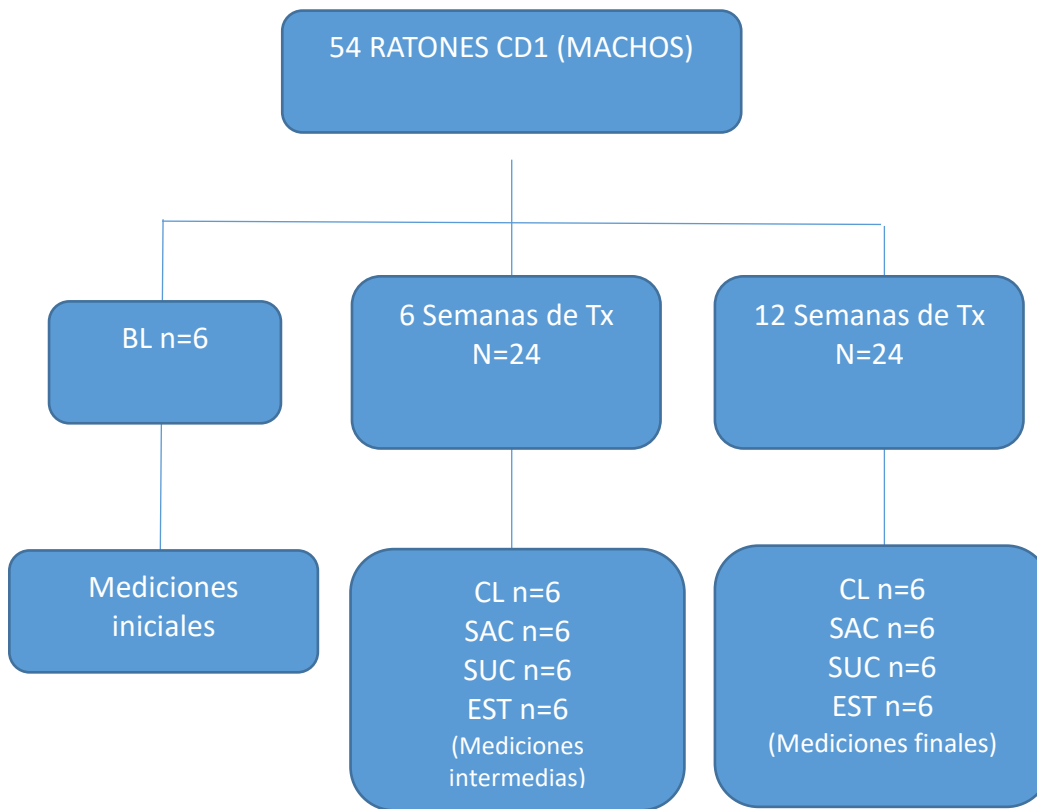


Fig 1. Conformación de grupos de estudio.

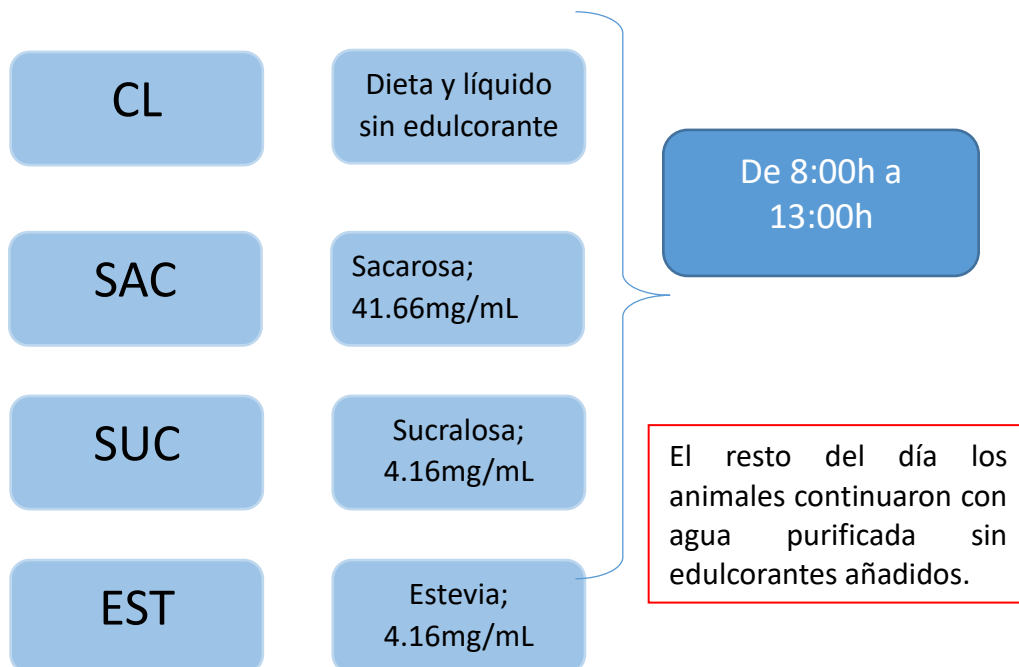


Fig 2. Esquema de dilución y administración de edulcorantes. CL; control, SAC; sacarosa, SUC; sucralosa, EST; estevia.

Determinaciones morfométricas y nutricionales.

Los ratones fueron pesados al inicio del experimento y antes del sacrificio. Se determinó longitud del cuerpo (longitud nariz-ano). El peso corporal y la longitud del cuerpo se utilizaron para determinar el Índice de Masa Corporal (IMC; peso corporal (g)/ [longitud (cm)]²) (46). Con base en el consumo de alimento y energía, se calculó el consumo energético (Kcal/día): (media del consumo de alimento multiplicado por la energía metabolizable de la dieta más el aporte energético del edulcorante consumido por semana (47).

Obtención y procesamiento de muestras

Los ratones de cada tratamiento fueron sacrificados a los días 21 (basal) y después de 6 y 12 semanas de tratamiento (CL, SAC, SUC y EST), con el método de dislocación cervical (NOM-062-ZOO-1999), se obtuvo sangre por punción cardiaca directa, posteriormente se procedió a realizar la disección de órganos y tejidos. Después de remover el intestino delgado, fue lavado con solución amortiguadora fosfato-salina (PBS), se recuperó el líquido obtenido, se centrifugó a 4000rpm/5min obteniendo así los sólidos del contenido intestinal.

Metodología de laboratorio

A partir de los sólidos intestinales de cada ratón, se extrajo el DNA metagenómico, se cuantificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% utilizando el marcador de peso molecular de Phago Lambda DNA/EcoRI y el programa Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (EDAS) 290.

Para explorar la presencia de genes y/o familias génicas en la microbiota intestinal de los ratones de cada tratamiento, se procedió a una ultra-secuenciación directa en la plataforma ILLUMINA, del DNA metagenómico de muestras seleccionadas con base a los datos de diversidad y composición diferencial. Se construirán 4 “genotecas de secuenciación” mezclando el DNA metagenómico de los ratones de cada tratamiento, se pretende obtener información que refleje las posibles funciones metabólicas de las comunidades microbianas presentes (48).

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación en Nutrición de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México y en el laboratorio de Ecología Molecular, del Depto. de Sistemas Biológicos de la UAM-Xochimilco. Para la secuenciación masiva se utilizaron servicios externos.

Operacionalización de Variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLES INDEPENDIENTES				
Tratamiento	Conjunto de medios que se aplican para curar o aliviar una enfermedad a una persona.	Edulcorante al cual el grupo de estudio será sometido. - 6 semanas - 12 semanas	Categorica	Sacarosa (SAC) Sucralosa (SUC) Estevia (EST)
Tiempo de administración	Tiempo transcurrido de inicio a fin de un tratamiento.	Tiempo transcurrido desde el inicio de la administración de edulcorante hasta la medición: - 6 semanas - 12 semanas	Cuantitativa	Semanas de tratamiento.
VARIABLES DEPENDIENTES				
Comunidades bacterianas	Interacción de poblaciones relacionadas metabólicamente que llevan a cabo procesos fisiológicos complementarios	Bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides y fusobacterias	Cuantitativa	Género bacteriano

6.4 Criterios de inclusión

Ratones recién destetados (21 días de edad), sanos.

6.5 Criterios de exclusión.

Ratones que mueran o enfermen a lo largo del tratamiento.

6.6. Instrumentos

6.7 Recolección de datos.

Los datos nutricionales y morfométricos se recabarán en el programa estadístico SPSS versión 21 para Windows.

6.8 Análisis de datos

Se realizará ANOVA de una vía con pos hoc de Bonferroni para comparar los datos morfométricos y nutricionales, para el consumo de edulcorante se realizará prueba T de student para la comparación de SUCL con EST.

Los datos obtenidos de la secuenciación se analizarán en la plataforma MOTHUR, a su vez, los archivos obtenidos serán analizados en el programa STAMP (Statistical Analysis of metagenomic profiles). V. 2.3 utilizando ANOVA de una vía y pos hoc de Tukey-Kramer.

6.9 Aspecto ético

El estudio se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, con previa autorización del comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina de la UAEMex.

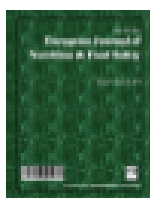
7. Resultados

7.1 Artículo aceptado

7.1.1 Título del artículo aceptado

Chronic Consumption of Sweeteners Increases Carbonylated Protein Production in Lymphocytes from Mouse Lymphoid Organs

7.1.2 Página frontal del manuscrito



European Journal of Nutrition & Food Safety

7(4): 209-219, 2017; Artículo no.EJNFS.2017.018
ISSN: 2347-5641

Chronic Consumption of Sweeteners Increases Carbonylated Protein Production in Lymphocytes from Mouse Lymphoid Organs

J. A. Escoto-Herrera¹, B. E. Martínez-Carrillo^{1*}, N. Ramírez-Durán²,
H. Ramírez-Saad³ and R. Valdés-Ramos¹

¹Laboratorio de Investigación en Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Venustiano Carranza s/n. Col. Universidad, 50180 Toluca, Estado de México, México.

²Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Venustiano Carranza s/n. Col. Universidad, 50180 Toluca, Estado de México, México.

³Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1110, CP. 04960, México City, México.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors BEMC and RVR designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript. Authors BEMC and JAEH managed the analyses of the study. Authors HRS and NRD managed the literature searches. All authors read and approved the final manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/EJNFS/2017/08772

Received 15th September 2017

Accepted 9th October 2017

Published 12th October 2017

Original Research Article

ABSTRACT

Background: The prevalence of overweight, obesity and diabetes mellitus has increased in Mexico, therefore, sucralose and stevia are being used as alternative non-caloric sweeteners to reduce energy intake. Moreover, poorly balanced diets can lead to the formation of carbonyl groups, a marker used to determine oxidative damage to proteins. Increased presence of carbonylated proteins in CD1 mice chronically consuming sweeteners, may point them as causing oxidative damage.

Aims: To determine whether the continued use of natural and artificial sweeteners increases the presence of carbonylated proteins in lymphocytes of lymphoid tissues in CD1 male mice.

Methods: The present study was conducted with 72 CD1 newly weaned (21-day old) male mice, fed with standard lab diet and water ad libitum; mice were housed in cages in groups of 4 under controlled temperature conditions (19-21°C), and light/dark cycles of 12/12 h. Weight and food intake was quantified weekly. Three groups of mice were randomly conformed: a) Baseline (21-day

*Corresponding author. Email: martinec_alina@hotmail.com

7.1.3 Carta de aceptación

De: submission sciencedomain <submission.sciencedomain@gmail.com>

Enviado: viernes, 15 de septiembre de 2017 06:52 a. m.

Para: martinez_elina9@hotmail.com

Asunto: Intermediate status of manuscript no: 2017/EJNFS/36772

Subject: Intermediate status of manuscript no: 2017/EJNFS/36772

Dear Dr. Beatriz Elina Martínez Carrillo,

Thank you for submitting your valuable manuscript in our journal. We have started the editorial processing of the paper. We'll contact you after getting the peer review result (approx. 2-3 weeks normally).

You are eligible for the special 93% discount on the E-Journal price.

Thank you for submitting your paper to this journal.

With Best Regards

Ms. Ruma Bag

SCIENCEDOMAIN international

www.sciencedomain.org

SCIENCEDOMAIN international

www.sciencedomain.org

journal, free, international, open access, peer review, scholarly, science, medicine

Reg. Offices:

India: SCIENCEDOMAIN international, Guest House Road, Street no - 1/6,, Hooghly,

West Bengal, PIN-712410, India, Corp. Firm Registration Number: L77527, Tele: +91

8617752708 +91-033-26646611, Email: contact@sciencedomain.org, Skype:

SCIENCEDOMAIN, (Headquarters)

USA: SCIENCEDOMAIN international LLP. One Commerce Centre, 1201, Orange St. # 600 Wilmington, New Castle, Delaware, USA, Corporate File Number: 5049777

UK: SCIENCEDOMAIN international Ltd., Third Floor, 207 Regent Street, London, W1B 3HH UK Registered in England and Wales, Company Registration Number: 8988029

Disclaimer: This email and any files transmitted with it are confidential and intended solely for the use of the individual or entity to whom they are addressed. If verification is required, please request a signed hard-copy/scanned version. Our company accepts no liability for the content of this email, unless that information is subsequently confirmed in writing.

7.1.4 Resúmen

Background: The prevalence of overweight, obesity and diabetes mellitus has increased in Mexico, therefore, sucralose and stevia are being used as alternative non-caloric sweeteners to reduce energy intake. Moreover, poorly balanced diets can lead to the formation of carbonyl groups, a marker used to determine oxidative damage to proteins. Increased presence of carbonylated proteins in CD1 mice chronically consuming sweeteners, may point them as causing oxidative damage.

Aims: To determine whether the continued use of natural and artificial sweeteners increases the presence of carbonylated proteins in lymphocytes of lymphoid tissues in CD1 male mice.

Methods: The present study was conducted with 72 CD1 newly weaned (21-day old) male mice, fed with standard lab diet and water ad libitum; mice were hosted in cages in groups of 4 under controlled temperature conditions (19-21°C), and light/dark cycles of 12/12 h. Weight and food intake was quantified weekly. Three groups of mice were randomly conformed: a) Baseline (21- old, newly weaned, n=8); b) 6-week of treatment (63-day old, n=32); c) 12-week of treatment (105- day old, n=32). Groups b and c were divided into 4 subgroups each (n=8): i) Control (CL) without sweeteners; ii) Sucrose (SUC); iii) Sucralose (SUCL), and iv) Stevia (ST). Body weight, food, and water consumption were measured, and BMI was calculated from those values. Lymphocytes from Peyer's patches, peripheral blood and spleen were isolated, and from these cells carbonylated protein concentration was quantified. Blood glucose was also assessed.

Results: Mice in SUCL and ST groups had lower weight gain and BMI compared to those that consumed SUC. The SUCL group consumed more food and the ST group decreased food intake, as compared with SUC and control groups. ST group drank more sweetened water, compared to the other groups. The percentage of blood lymphocytes and the carbonylated proteins concentrations were higher in the SUCL group.

Conclusions: The chronic consumption of sucralose, caused an increase in food intake. In addition, the percentage of lymphocytes circulating in blood was elevated, as well as the concentration of carbonylated proteins in these cells.

7.1.5 Apartados del artículo

1. INTRODUCTION

The prevalence of chronic diseases such as overweight, obesity and diabetes mellitus has increased over the last years [1]. Because of this, an alternative to reduce the energy intake from food is to replace sweetened foods and beverages by those with non-caloric substitutes, both natural and artificial [2]. The most widely used artificial sweetener is sucralose, followed by stevia of natural origin [3]. Sucralose is 600 times sweeter than sucrose; it is synthesized by selective halogenation of sucrose and it is not metabolized or stored, instead of, it is excreted unchanged in urine and feces [4, 5]. In addition, it is pH and temperature resistant, which makes sucralose perfect for confectionery [6]. On the other hand, stevia is extracted from leaves of the plant *Stevia rebaudiana* [7]; its sweetening power is 300 times greater than SUC [8]. ST is transported by facilitated diffusion in the intestinal epithelium, and by a monocarboxylic transporter towards the blood; in urine, it is excreted as steviol glucuronide and in feces as free steviol [9]. The use of sweeteners is approved by the Food and Drug Administration in the United States, and in Mexico by The Ministry of Health, and published in the Official Mexican Standard NOM-218-SSA1-2011 [10], in products such as non-alcoholic beverages (soft drinks), candies, frozen and baked desserts, canned fruits and fruit juices [2,11], but their long-term effects are still controversial and the studies are inconclusive.

1.1 Lymphoid Organs

Lymphoid tissue is widely distributed in the organism and is responsible for monitoring and protecting the organism against unknown substances. Lymphoid tissue consists of primary organs precursors of lymphocytes (thymus and bone marrow) and secondary organs such as lymph nodes, spleen, tonsils and Mucosal- Associated Lymphoid Tissue [12], which is divided into Bronchial-Associated Lymphoid Tissue [13], and Intestinal-Associated Lymphoid Tissue (GALT). These organs and tissues harbor mature immune cells, which interact with antigens and trigger immune response [14]. In addition, there are sites of induction of the immune response in GALT such as Peyer's patches, solitary lymphatic nodules and the lamina propria as an effector site [15]. Peyer's patches are located along the small intestine and mainly contain B-lymphocytes which synthesize immunoglobulin A [14], and they are the first contact site in the gastrointestinal tract with antigens [16].

1.2 Protein Oxidative Damage

Reactive oxygen species (ROS) are free radicals resulting from normal cellular metabolism and they play both, harmful and beneficial roles in cellular systems [17]. When overproduced, free radicals cause biological damage to main molecules such as proteins, this is called oxidative stress [18], which induces mitochondrial dysfunction, cytotoxicity and apoptosis. Localization and effect caused by oxidative stress can be measured through biomarkers assessed from tissue and fluids [19].

Proteins are very susceptible to free radical attacks, the most used biomarker to assess protein damage is the protein carbonyl assay [20]. The damage caused by ROS to proteins is an irreversible process, which can increase erroneous folding of secondary and tertiary protein structures. Among the main modifications that proteins undergo after oxidation are loss of catalytic activity, amino acid modifications, carbonyl group formation, thermal stability alteration, fragmentation, formation of erroneous disulfide bridges and higher susceptibility to proteolysis [21]. The most frequently oxidized amino acids are phenylalanine, tyrosine, tryptophan, histidine and methionine, and such oxidation forms carbonylated proteins, which favor cross-linking between proteins or with other biomolecules such as glucose (glycosylation). Formation of carbonyl compounds is used as the main marker to determine severe protein oxidation, both in vitro and in vivo. As biomarkers of oxidative damage to proteins, carbonyls have been shown to accumulate with age, causing ischemic disease and chronic inflammation [19]. Therefore, the cells are a suitable site for the accumulation of carbonylated proteins depending on the magnitude of exposure to ROS. The objective of this study was to determine if the chronic use of natural and artificial sweeteners increases the presence of carbonylated proteins in lymphocytes of lymphoid organs in male CD1 mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

The present study was conducted with 72 CD1 newly weaned (21-day old) male mice, fed with standard lab diet (Rodent Laboratory Chow 5001 Purina [3.02Kcal/gr]) and water ad libitum. Initial weight was 19.5-22.3 g; mice were hosted in cages in groups of 4 under controlled temperature conditions (19-21°C), and light/dark cycles of 12/12 h. The production, care and handling of laboratory animals were according to the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO- 1999 [22]. The project was approved by

the Bioethics Committee of the Faculty of Medicine, of the Autonomous University of the State of Mexico. Weight and food intake were quantified weekly. Three groups of mice were randomly formed: a) Baseline (21-day old, newly weaned, n=8); b) 6-week of treatment (63-day old, n=32); c) 12-week of treatment (105-day old, n=32). Groups b and c were divided into 4 subgroups each (n=8): i) Control without sweeteners (CL); ii) Sucrose (SUC); iii) Sucralose (SUCL) and iv) Stevia (ST).

2.2 Sweetener Preparation

Sweeteners were obtained from commercial formulas, administered as solutions in the water supply *ad libitum* as: 41.66 mg/mL SUC (Sucrose), 4.16 mg/mL SUCL (Splenda®) and ST (Svetia®) in accordance with the recommendations of the Official Mexican Standard NOM-218-SSA1-2011, for non- alcoholic flavored beverages [10]. Sweetener consumption was quantified weekly, considering >3 weeks intake as chronic consumption.

2.3 Morphometric and Nutritional Determinations

Mice weight and body length (nose-anus) were measured at baseline, 6 and 12-week of treatment. Weight and length were used to determine Body Mass Index (BMI) = weight (g)/ [length (cm)]². Daily energy intake per mice (kJ/day) was calculated from the proportion of weekly food and sweetener intake per cage.

2.4 Collection and Processing of Samples

Groups of mice were sacrificed at baseline, 6 and 12-week of treatment, by cervical dislocation [22], blood was obtained through direct cardiac puncture and lymphocytes were isolated using Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare BioSciences AB, Sweden). Spleen and Peyer's patches were removed and placed in Petri dishes with PBS buffer (3 mL), manually homogenized and filtered using nylon mesh (40 µm) to remove remaining connective tissue. Afterwards, samples were centrifuged at 2500 rpm/5min; cell pellets obtained from spleen were put in a hypotonic buffer solution (8.26 g/L of NH₄Cl, 1 g/L of KHCO₃ and 0.037 g/L of EDTA-Na, pH 7.4) to lyse red blood cells. The cell suspensions isolated from blood, spleen and Peyer's patches were washed with PBS. Cell viability of the isolated lymphocytes was immediately assessed with a trypan blue assay. The lymphocytes were counted in a Neubauer chamber to obtain the cellular percentage per mL of cell suspension.

2.5 Determination of Carbonylated Proteins

The lymphocytes (1x10⁶/mL PBS solution) were lysated using a tissue homogenizer (DragonLab model D-160) at 8000 rpm, then centrifuged for 5 min at 2500 rpm, the supernatant was used for the quantification of carbonylated proteins. The groups of carbonylated proteins were detected and quantified using the 2,4- dinitrophenylhydrazine (DNPH) assay. Briefly, 0.5 mL of the supernatant was treated with 0.5 mL 10 mM DNPH in 2 M hydrochloric acid, or with 0.5 mL 2 M hydrochloric acid alone as a blank. The samples were incubated for 1 h at room temperature in the dark, treated with 10% trichloroacetic acid, and centrifuged. The pellet was washed three times with ethyl acetate/ethanol (1:1 v/v) and rinsed with 1 mL of 6 M guanidine hydrochloride in 20 mM potassium phosphate, pH adjusted to 2.3 with hydrochloric acid; the resulting solution was incubated at 37°C for 15 min. Reading of the assay was performed on a spectrophotometer, at λ 370nm using 1mL of 6M guanidine hydrochloride for calibration. The carbonyl concentration was determined by the absorbance difference between the sample treated with dinitrophenylhydrazine and hydrochloric acid. The carbonyl content was expressed in nanomoles of carbonyls per milligram of protein.

2.6 Blood Glucose Quantification

Blood glucose was measured with a Bayer Contour TS glucometer at baseline, 6 and 12-week of treatment.

2.7 Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD (n = 8). Data were analyzed with one-way and two-way ANOVA. Differences were considered significant at p <0.05, the statistical package SPSS version 19.0 was used for all statistical analyzes (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Results

3.1.1 Body weight and body mass index of mice

At baseline, all groups showed no significant differences in BMI. The administration of ST after 12-week of treatment did not produce a significant increase in the animals' weight (one- way ANOVA F= 6.18, p<0.002); the Bonferroni post hoc test showed difference in weight between the groups that consumed SUC and ST (Table 1). BMI determined at 6-week of treatment showed no significant differences between subgroups. In the 12-week treatment group, BMI increased (one-way ANOVA F=3.27, p<0.023) in the SUC subgroup (Bonferroni test, p<0.020).

3.1.2 Energy and food intake

Energy intake in the 6 and 12-week groups showed significant differences (two-way ANOVA $F=10.83$, $p<0.33$). In the 6-week treatment group differences were observed (one-way ANOVA $F=125$, $p<0.001$), SUC and SUCL subgroups showed an increase when compared with the CL subgroup (Bonferroni test, $p<0.001$), while ST showed no differences (Bonferroni test, $p>0.050$). In a similar way, the 12-week treatment group showed significant differences between subgroups (one-way ANOVA $F=21$, $p<0.001$), being the SUCL group the one showing the highest increase as compared to the other subgroups (Bonferroni test, $p<0.001$) (Table 1). Food intake in the 6 and 12-week treatment groups showed significant differences (one-way ANOVA $F=11.94$, $p<0.043$); in 6-week treatment group, SUC and SUCL showed a higher food intake when compared with CL group (Bonferroni test, $p<0.001$). However, in the 12-week treatment group the increase was only observed in SUCL group (Bonferroni test, $p<0.001$).

3.1.3 Blood glucose determinations

At 6-week of treatment, blood glucose concentrations increased (one-way ANOVA $F=2.59$, $p<0.007$) in SUC, SUCL and ST subgroups, as compared with CL (Bonferroni test, $p<0.001$). In the 12-week treatment group, glucose concentrations increased (one-way ANOVA $F=5.28$, $p<0.005$) in SUC and SUCL subgroups (Bonferroni test, $p<0.001$), but decreased in the ST subgroup (Bonferroni test, $p<0.018$). After the 12-week treatment, we observed that chronic sweetener consumption had a significant effect (two-way ANOVA $F=20$, $p<0.001$) on blood glucose concentration, particularly with chronic consumption of SUCL (Bonferroni test, $p<0.047$), however, this effect was not observed at 6-week of treatment (Bonferroni test, $p<0.063$).

3.1.4 *Percentage of lymphocytes in Peyer's patches, peripheral blood and spleen*

Lymphocyte percentage obtained from Peyer's patches of the small intestine of CD1 mice at 6-week of treatment showed an increase in the SUC subgroup, while the SUCL and ST subgroups decreased, when compared to the CL subgroup. In the 12-week group, concentrations of lymphocytes in Peyer's patches decreased in the SUC subgroup (one-way ANOVA $F=3.5$, $p<0.028$), compared to the CL group (Bonferroni test, $p<0.022$), therefore, showing differences from baseline to 12-week of treatment

(Bonferroni test, $p < 0.001$). When analyzing subgroups, percentage of lymphocytes in Peyer's Patches was significantly decreased with ST treatment compared to control group (Bonferroni test, $p < 0.028$). In the 6-week treatment group we found significant differences (one-way ANOVA $F=13$, $p < 0.001$), being SUC and SUCL subgroups lower (Bonferroni test, $p < 0.001$ for both groups). Furthermore, at 12-week of treatment this percentage increased significantly (one-way ANOVA $F=31$, $p < 0.001$) with SUCL compared to SUC, ST and CL (Bonferroni test, $p < 0.001$ respectively); conversely, ST group had significantly lower values when compared to CL group (Bonferroni test, $p < 0.001$) as shown in Table 2.

The duration of sweetener intake (mL/day) had a significant outcome in spleen lymphocyte percentage (two-way ANOVA $F=35$, $p < 0.001$), especially between baseline and 12-week of treatment (Bonferroni test, $p < 0.001$). Percentage of spleen lymphocytes were modified in the 6-week treatment group (one-way ANOVA $F=11$, $p < 0.001$), decreased in SUC (Bonferroni test, $p < 0.049$) and increased in SUCL (Bonferroni test, $p < 0.035$), both compared with CL group. Moreover, in the 12-week treatment group, this modification persisted (one-way ANOVA $F=7.5$, $p < 0.001$); in the SUCL group cell percentage remained increased (Bonferroni test, $p < 0.003$) as shown in Table 2.

Oxidative Stress determination by Carbonylated protein quantification in lymphocytes from Peyer's patches, peripheral blood and spleen.

The concentration of carbonylated proteins in lymphocytes obtained from Peyer's patches did not show differences in any study group (6-week treatment group: One-way ANOVA $F=0.26$, $p < 0.850$ and 12-week' treatment group: One-way ANOVA $F=2.4$, $p < 0.082$). The duration of treatment caused significant differences (Two-way ANOVA $F=8.01$, $p < 0.001$) with the 12-week administration (Bonferroni test, $p < 0.018$) (Table 3). The carbonylated protein concentration in blood lymphocytes was not modified at 6-week of treatment (One-way ANOVA $F=2.02$, $p < 0.13$), while there was an increase at 12-week (One-way ANOVA $F=4.06$, $p < 0.016$), especially in the SUCL subgroup compared with the controls (Bonferroni test, $p < 0.03$). When comparing time of administration (Two-way ANOVA $F=9.5$, $p < 0.001$) and sweetener treatment (Two-way ANOVA $F=4.1$, $p < 0.003$), we found differences in chronic intake of SUCL between 6 and 12-week in comparison with the CL group. Spleen lymphocytes did not show differences (One-way ANOVA $F=0.78$, $p < 0.51$ and $F=1.3$, $p < 0.27$ respectively) as shown on Table 3.

Table 1. Mean morphometric values of food, energy and water consumption in subgroups of CD1 mice with sweetener supply

	CL	SUC	SUCL	ST	p
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
6-week treatment					
Weight (g/week)	33.47±3.22	32.30±2.02	34.37±1.35	34±1.79	0.282
BMI	28.25±3.28	27.13±1.88	28.88±0.835	28±1.60	0.427
Food intake (g/week/mice)	27.75±0.267 ^a	29.45±0.98 ^b	29.70±0.64 ^b	27.40±0.64 ^a	0.001*
Energy consumption (kJ/week)	83.80±0.807 ^a	88.93±2.74 ^b	89.69±1.93 ^b	82.74±1.93 ^b	0.001*
Water consumption (mL/week)	62.9±2.0 ^a	69.4±0.641 ^b	60.30±3.74 ^b	68.2±0.641 ^b	0.001*
12-week treatment					
Weight (g/week)	40.51±0.685 ^a	42.58±1.92 ^b	40.77±1.51 ^a	39.15±1.96 ^a	0.002*
BMI	34.13±1.55 ^a	35.75±1.83 ^a	22.5±1.60 ^b	33.38±2.82 ^a	0.023*
Food intake (g/week/mice)	27.65±1.55 ^a	27.4±0.64 ^a	30.59±1.59 ^b	26.5±0.962 ^a	0.001*
Energy consumption (kJ/week)	83.5±4.68 ^a	82.74±1.93 ^a	92.38±4.81 ^b	80.03±2.90 ^a	0.001*
Water consumption (mL/week)	68.8±0.646 ^a	67.05±1.22 ^a	66.35±1.76 ^a	76.65±1.55 ^b	0.001*

Table 2. Lymphocytes in Peyer's patches, blood and spleen that consumed sweeteners

	CL	SUC	SUCL	ST	p
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
	1x10 ⁶ mL	1x10 ⁶ mL	1x10 ⁶ mL	1x10 ⁶ mL	
Baseline					
Peyer's patches		25.37±1.63			1.0
Peripheral blood		21±3.85			1.0
Spleen		69.75±4.35			1.0
6-week' treatment					
Peyer's patches	51.75±4.68 ^a	80.75±2.22 ^b	36.62±6.19 ^c	30.62±4.79 ^d	0.002*
Peripheral blood	17.75±1.90 ^a	11.62±2.38 ^b	13.12±1.88 ^c	15±1.85 ^d	0.001*
Spleen	213.8±25.3 ^a	117.7±29.90 ^b	314.75±26.35 ^c	183.3±17.04 ^d	0.001*
12-week' treatment					
Peyer's patches	74.37±5.42 ^a	30.62±5.58 ^b	49.12±7.25 ^c	43.87±7.80 ^d	0.028*
Peripheral blood	10.5±1.73 ^a	11.87±1.24 ^a	22.75±1.19 ^b	6.37±0.419 ^c	0.001*
Spleen	194.87±9.71 ^a	87.5±6.29 ^b	276.5±58.47 ^c	114.87±21.93 ^d	0.001*

Table 3. Concentration of carbonylated proteins in lymphocytes from Peyer's patches, blood and spleen in CD1 mice that consumed sweeteners

	CL	SUC	SUCL	ST	p
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	
	ng/mg	ng/mg	ng/mg	ng/mg	
	protein	protein	protein	protein	
Baseline					
Peyer's patches		1.17±0.14			1.00
Peripheral blood		0.266±0.08			1.00
Spleen		1.32±0.18			1.00
6-week treatment					
Peyer's patches	0.480±0.15	0.642±0.174	0.500±0.159	0.602±0.115	0.85
Peripheral blood	0.794±0.303	0.341±0.062	1.03±0.297	0.432±0.144	0.13
Spleen	1.08±0.55	0.683±0.27	0.495±0.17	1.21±0.39	0.51
12-week treatment					
Peyer's patches	0.700±0.256	0.426±0.123	0.094±0.036	0.606±0.169	0.082
Peripheral blood	0.448±0.203 ^a	0.664±0.192 ^b	1.38±0.291 ^c	0.476±0.153 ^a	0.016*
Spleen	1.06±0.34	0.597±0.19	0.355±0.13	0.751±0.21	0.27

3.2 Discussion

Diet plays a fundamental role in health; when unbalanced, it becomes an important risk factor. High sucrose diets are associated with excess energy consumption and poor food quality, which increase the risk of developing obesity, type 2 diabetes and cardiovascular diseases. In this study, mice in SUCL and ST subgroups had lower weight gain and BMI compared to that consuming sucrose. This increase in weight is derived from the predilection for sweet foods, which are consumed in greater proportion; in addition, the consumption of sucrose increases the energy content of the diet, which generates an increase in body weight [23]. Furthermore, Figlewicz [24] reported that chronic consumption of stevia does not increase body weight or total weight gain in rats. In another study in rats consuming 10% sucrose for 10 weeks, a significant weight gain was observed [25]. This agrees with the present study, since the weight gain observed in the SUC subgroup was higher compared to the ST, SUCL and CL subgroups. Thus, weight gain can be attributed to the preferred type of sweetener [26], although some studies associate the consumption of sucralose with weight gain in animals that consumed it at low doses [27].

At the end of the study the animals in the SUCL subgroup consumed more food; the ST subgroup decreased its consumption compared to the SUC and CL subgroups. The ST subgroup consumed more sweetened water as compared with the other subgroups. The predilection for consuming a specific sweetener is variable among rats, mice and humans. In the study by Bello [28], they found that male rats showed a characteristic pattern of indifference-evasion for SUCL consumption, acknowledging that they prefer simple water to a sweet solution. This preference is different between rodent species (rats vs. mice) and between strains of mice. This study was performed in male CD1 mice, which may explain the predilection for ST. However, in rats that consume high amounts of water with glucose when they have free access to it, it is not yet clear whether it is because of the sweet taste of the solution or because of the effect caused by the intake of large amounts of glucose [26].

Also, SUC and SUCL increased the glycaemia of the animals after 12-week of chronic sweetener consumption. This allows us to show that the consumption of sucralose is not completely harmless. These results agree with the study by Pepino MY [29], in a human

experimental model, where SUCL was shown to increase plasma glycemic levels. In a rat model research, it was suggested that SUCL consumption has metabolic effects [30], since non-caloric sweeteners can alter glucose homeostasis by activating sweet taste receptors in the gut [31]. This may be explained by the fact that SUCL stimulates higher food intake, this may be the cause of the elevation of glucose in this study. There is still controversy over the effects of low- energy sweetener consumption on body weight and blood glucose. According to Lee Grotz V [32], who studied the effect of high consumption of SUCL (7.5 mg/kg/day), three times the recommended maximum intake dose, for 3 months in diabetic patients and concluded that it has no effect on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes mellitus. There is currently controversy about systemic adverse effects from ST and SUCL consumption, including the effect on the immune system and protein carbonylation. Researches carried out by Goldsmith [5], Grice and Goldsmith [32], and Grotz [33] indicate that chronic administration of SUCL produces no signs of toxicity or other adverse effects, Tordoff [34] suggest that the consumption of SUCL does not produce weight gain in rats and that they prefer sweet foods. As well, Dhingra R and cols. [35] and Nettleton JA[36] who conducted research comparing the diet of people with and without Type 2 Diabetes Mellitus, finding that there is an association between the consumption of dietary drinks (sweetened with artificial sweeteners, among them SUCL) with increase of body weight, development of cardiovascular diseases and risk of suffering Metabolic Syndrome and Diabetes Mellitus type 2, but the controversy is that dietary beverage consumption is higher among individuals with type 2 Diabetes Mellitus compared to those without type 2 Diabetes Mellitus. In this study, we only used healthy mice; it is advisable to carry out tests in diabetic mice in the future.

The chronic consumption of sweeteners decreased the percentage of lymphocytes in Peyer's patches with the consumption of SUC, SUCL and ST. In blood and spleen, the percentage of lymphocytes decreased significantly with ST and SUC consumption, increasing in the SUCL group. In the present study, we observed that SUCL elevates the concentration of carbonylated proteins as a marker of oxidative stress in peripheral blood lymphocytes, besides increasing the number of circulating cells; therefore, it is necessary to evaluate the function of the cells. Additionally, ST reduced the concentration of

carbonylated proteins in Peyer's patches, blood and percentage of spleen lymphocytes, possibly derived from the antioxidant effect that has been described before [37]. In addition, a few studies exist that analyze the effect of consuming sweeteners for prolonged periods and in early ages of life; the same happened with the effect on the immune system at the intestinal mucosa.

The connection between the use of sweeteners, the immune system and health are under intense investigation, more research is required to clarify their participation in the organism. In vitro studies have shown that natural sweeteners like ST improve IL-6 concentrations; while artificial ones, as SUCL suppress their secretion, and reduce biomarkers of humoral immunity such as IL-10 [38]. Adverse metabolic effects of non-nutritive sweeteners have been reported such as increased intestinal glucose absorption, alterations in intestinal microbiota, induction of oxidative stress and deregulation of appetite reward response [37]. In 2008, the study by Abou-Donia et al. [39] showed that the administration of SUCL for 12-week causes numerous adverse effects including reduction of fecal microbiota, increase in fecal pH and increase of P-gp expression, CYP3A4, CYP2D1, which may limit the bioavailability of orally administered drugs.

In a recent study by Saucedo-Vence [40], in carp exposed to SUCL diluted in water, they found high concentrations of the sweetener in different organs; in addition to high concentrations of carbonylated proteins in blood, the authors suggest that damage to biomolecules, such as carbonylation of proteins, are directly related to the presence of SUCL. This situation is like that reported in this study, since the diluted SUCL was administered in the drinking water and its exposure was continuous. Based on the above, it can be observed that, although a low percentage is absorbed (15%) in the organism, this proportion could reach the tissues; particularly blood, a situation that is still controversial, since the studies are inconclusive. Some research suggests that there are adverse toxic effects, both acute and chronic at the biological level [39,41,42], our findings suggest that they do cause an effect on peripheral blood lymphocytes, generating the production of high concentrations of carbonylated proteins in the group of mice exposed to SUCL consumption, a situation not observed with ST consumption.

4. CONCLUSION

Blood glucose concentration increased in the group of mice that consumed SUCL for 12-week, a situation that would explain the increase in carbonylated proteins, furthermore, prolonged consumption of ST did not increase glycaemia or carbonylated proteins. It is necessary to evaluate other markers of oxidative stress in the lymphocytes to determine its presence with the consumption of sweeteners for a prolonged time. Consumption of SUCL increases the absorption of glucose from the diet, therefore, the more SUCL is consumed, may lead to increased uptake of glucose, favoring chronic hyperglycemia states, which in the presence of insulin resistance favors the formation of advanced glycation end products. Our results suggest that chronic and routine consumption of SUCL and SUC can alter the structure of proteins, causing a reaction with amino acid residues favoring glycation and glycooxidation. However, it cannot be defined yet whether carbonylation is cause or consequence of protein oxidation, this is a field of study with research opportunities.

ETHICAL APPROVAL

The project from which this article derives was reviewed and approved by the Ethics in Research Committee of the Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México. Animal care and experimental procedures were carried out in accordance with the standards of the International Regulation for the Use of Laboratory Animals, the norms of the Universidad Autónoma del Estado de México, and the guidelines of the Mexican Secretary of Health for the production and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999 Ministry of Agriculture, Mexico City, Mexico).

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

REFERENCES

1. Tandel KR. Experimental evaluation of antipyretic and analgesic activities of aspartame. *Indian J Pharmacol* [Internet]. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.; 2011 [cited 2017 Jun 8]; 43:486. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21845019>
2. Shankar P, Ahuja S, Sriram K, Song B, Lee W, Chun OK, al. et. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2017 Jun 8]; 29:1293–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845273>

3. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jun 8]; 121:41–54. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725808001927>
4. Martínez-Cervera S, Sanz T, Salvador A, Fiszman SM. Rheological, textural and sensorial properties of low-sucrose muffins reformulated with sucralose/polydextrose. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 8]; 45:213–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381100260X>
5. Grice H, Goldsmith L. Sucralose—an overview of the toxicity data. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2000; 38:1–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691500000235>
6. Saada H, Mekky N. Biological Effect of Sucralose in Diabetic Rats. *Food Nutr ...* [Internet]. 2013 [cited 2016 May 12]; 2013:82–9. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=34006>
7. Gerwig GJ, te Poele EM, Dijkhuizen L, Kamerling JP. Stevia Glycosides. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun 8]. p. 1–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816105>
8. Lemus-Mondaca R, Vega-G??lvez A, Zura-Bravo L, Kong AH. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 2012. p. 1121–32.
9. Ashwell M. Stevia, Nature’s Zero-Calorie Sustainable Sweetener A New Player in the Fight Against Obesity. [cited 2017 Jun 8]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890837/pdf/nt-50-129.pdf>
10. NORMA Oficial Mexicana (2011) NOM-218-SSA1-2011, Products and services. Non-alcoholic flavored beverages, frozen foods, concentrated products for preparations and beverages added with caffeine. Specifications and sanitary provisions. Test methods.
11. Argyri K, Sotiropoulos A, Psarou E, Papazafiropoulou A, Zampelas A, Kapsokefalou M. Dessert Formulation Using Sucralose and Dextrin Affects Favorably Postprandial Response to Glucose, Insulin, and C-Peptide in Type 2 Diabetic Patients. [cited 2017 Jun 8]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3932070/pdf/RevDiabeticStud-10-039.pdf>

12. Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2008 [cited 2017 Jun 8]; 1:31–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mi.2007.9>
13. Tashtoush B, Okafor NC, Ramirez JF, Smolley L. Follicular bronchiolitis: A literature review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015.
14. McGhee JR, Kunisawa J, Kiyono H, Mestecky J, al. et, Iwata M, al. et, Mora JR, al. et, Johansson-Lindbom B, et al. Gut lymphocyte migration: we are halfway “home.” *Trends Immunol* [Internet]. Elsevier; 2007 [cited 2016 May 27]; 28:150–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490607000270>
15. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* [Internet]. 2005 [cited 2016 May 12]; 307:1920–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1106442>
16. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. [cited 2017 Jun 8]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4492337/pdf/nihms-511069.pdf>
17. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jun 8]; 224:164–75. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279714003044>
18. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biol* [Internet]. Elsevier; 2013 [cited 2017 Jun 8]; 1:244–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24024158>
19. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jun 8];52. Available from: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/52/4/601.long>
20. Dorin Torres-Ramos Y, Sierra-Vargas MP, María I, Juan O-C, Hicks Gómez J. Plasma markers of oxidative stress in healthy 31–60-year-old Mexican population. *Segunda Epoca* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jun 8];19. Available from: www.iner.gob.mx
21. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J* [Internet]. Portland Press Ltd; 2016 [cited 2017 Jun 8]; 473:805–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27026395>

22. Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999, Technical specifications for the production, care and use of laboratory animals.
23. Hughes B. 2008 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. Nature Publishing Group; 2009 [cited 2017 Jun 8]; 8:93–6. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd2813>
24. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth CL. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav* [Internet]. 2009 [cited 2016 May 12]; 98:618–24. Available from: <http://www.elsevier.com/copyright>
25. Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. [cited 2017 Jun 8]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3522469/pdf/nihms189182.pdf>
26. Martínez AG, López-Espinoza A, Galindo A, Aguilera V, Gonzalez A, de la Torre-Ibarra C. Effects of glucose and sucralose solutions on water and food intake: Binge drinking response in albino rats. *Appetite*. 2007; 49: 311.
27. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* [Internet]. 2006 [cited 2017 May 17]; 444:1027–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183312>
28. Wu T, Bound MJ, Standfield SD, Bellon M, Young RL, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Artificial sweeteners have no effect on gastric emptying, glucagon-like peptide-1, or glycemia after oral glucose in healthy humans [Internet]. *Diabetes Care*. American Diabetes Association; 2013 [cited 2016 May 12]. p. e202-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24265374>
29. Pepino MY, Tiemann CD, Patterson BW, Wice BM, Klein S. Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care* [Internet]. 2013 [cited 2017 May 17];36. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/36/9/2530.short>
30. Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2011 [cited 2016 May 12]; 14:391–5. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3319034&tool=pmcentrez&render type=abstract>

31. Raben A, Richelsen B. Artificial sweeteners. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 8]; 15:597–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23037901>
32. Grotz VL, Munro IC. An overview of the safety of sucralose. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009; 55:1–5.
33. Goldsmith LA. Acute and subchronic toxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol*. 2000;38.
34. Tordoff MG, Pearson JA, Ellis HT, Poole RL. Does eating good-tasting food influence body weight? *Physiol Behav* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 30]; 170:27–31. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416309994>
35. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, D’Agostino RB, Gaziano JM, Vasan RS. Soft Drink Consumption and Risk of Developing Cardiometabolic Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged Adults in the Community. *Circulation* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 17];116. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/116/5/480.long>
36. Nettleton JA, Lutsey PL, Wang Y, Lima JA, Michos ED, Jacobs DR. Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care* [Internet]. 2009 [cited 2017 May 17]; 32:688–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19151203>
37. Araújo JR, Martel F, Keating E. Exposure to non-nutritive sweeteners during pregnancy and lactation: Impact in programming of metabolic diseases in the progeny later in life. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jun 8]; 49:196–201. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623814002445>
38. Rahiman F, Pool EJ. The *in vitro* effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *J Immunoass Immunochem* [Internet]. 2014 [cited 2017 Jun 8]; 35:26–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063614>
39. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS. Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats. *J Toxicol Environ Heal Part A* [Internet]. 2008 [cited 2017 Jun 8]; 71:1415–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18800291>

40. Saucedo-Vence K, Elizalde-Velázquez A, Dublán-García O, Galar-Martínez M, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, García-Medina S, Hernández-Navarro MD, Gómez-Oliván LM. Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci Total Environ* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jun 8]; 575:347–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27744200>
41. Soh L, Connors KA, Brooks BW, Zimmerman J. Fate of Sucralose through Environmental and Water Treatment Processes and Impact on Plant Indicator Species. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 8]; 45:1363–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235203>
42. Lillicrap A, Langford K, Tollefsen KE. Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 8]; 30:673–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154846>

7.2 Artículo y/o capítulo de libro enviado

7.2.1 Título del artículo y/o capítulo de libro enviado

**“MODIFICACIÓN DE LAS POBLACIONES LINFOCITARIAS Y LA MICROBIOTA
DE INTESTINO DELGADO CON CONSUMO CRÓNICO DE EDULCORANTES”**

7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo

7.2.3 Resumen

7.2.4 Apartados del artículo

8. Referencias Bibliográficas

1. Hamilton V V, Guzmán E, Golusda C, Lera L, Cornejo E V. Edulcorantes no nutritivos e ingesta diaria admisible en adultos y niños de peso normal y obesos de tres niveles socioeconómicos, y un grupo de diabéticos de la Región Metropolitana. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2013;40(2):123–8. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182013000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es
2. Johnston C, Stevens B, Foreyt J. The role of low-calorie sweeteners in diabetes. *US Endocrinol*. 2013; 2:96–8.
3. Gardner C, Wylie-Rosett J, Gidding SS, Steffen LM, Johnson RK, Reader D, et al. Nonnutritive sweeteners: Current use and health perspectives: A scientific statement from the American heart association and the American diabetes association. Vol. 126, *Circulation*. 2012. p. 509–19.
4. Alberti K, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international a. *Circulation. Am Heart Assoc*; 2009;120(16):1640–5.
5. Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, et al. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010;55(1):37–43.
6. Nehls U, Grunze N, Willmann M, Reich M, Küster H. Sugar for my honey: Carbohydrate partitioning in ectomycorrhizal symbiosis. *Phytochemistry*. 2007;68(1):82–91.
7. Penson RT. Sugar fuels cancer. *Cancer* [Internet]. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company; 2009 Mar 1 [cited 2016 May 14];115(5):918–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.24125>
8. Phillips KM, Carlsen MH, Blomhoff R. Total Antioxidant Content of Alternatives to Refined Sugar. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(1):64–71.
9. Durán S, Rodríguez M del P, Córdón K, Record J. Estevia (stevia rebaudiana), edulcorante natural y no calórico. *Rev Chil Nutr*. 2012;39(4):203–6.
10. Geuns JMC. Stevioside. Vol. 64, *Phytochemistry*. 2003. p. 913–21.
11. Calzada-león R, María D, Luz D, Altamirano-bustamante DN, Padrón-martínez DMM. Artículo de revisión Características de los edulcorantes no calóricos y su uso en niños. 2013;141–53.

12. Figlewicz DP, Ioannou G, Bennett Jay J, Kittleson S, Savard C, Roth CL. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiol Behav* [Internet]. 2009 [cited 2016 May 12];98(5):618–24. Available from: <http://www.elsevier.com/copyright>
13. Brusick DJ. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food Chem Toxicol*. 2008;46(7 SUPPL.).
14. Aranda-González I, Segura-Campos M, Moguel-Ordoñez Y, Betancur-Ancona D. Stevia rebaudiana Bertoni. Un potencial adyuvante en el tratamiento de la diabetes mellitus. *CyTA - J Food* [Internet]. 2013 Jul 3 [cited 2016 May 12];12(3):218–26. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2013.830150>
15. Grotz VL, Munro IC. An overview of the safety of sucralose. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2009;55(1):1–5.
16. Saada H, Mekky N. Biological Effect of Sucralose in Diabetic Rats. *Food Nutr ...* [Internet]. 2013 [cited 2016 May 12];2013(July):82–9. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=34006>
17. Grotz VL, Henry RR, McGill JB, Prince MJ, Shamooh H, Trout JR, et al. Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc*. 2003;103(12):1607–1612+1711.
18. Grice H, Goldsmith L. Sucralose—an overview of the toxicity data. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2000; 38:1–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691500000235>
19. Viberg H, Fredriksson A. Neonatal exposure to sucralose does not alter biochemical markers of neuronal development or adult behavior. *Nutrition*. 2011;27(1):81–5.
20. Tlaskalová-Hogenová, H., Štěpánková, R., Hudcovic, T., Tučková, L., Cukrowska, B., Lodinová-Žádníková, R., ... & Funda, D. P, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Vol. 93, *Immunology Letters*. 2004. p. 97–108.
21. Ganong W. Digestion and Absorption. *Review of Medical Physiology* 22nd Ed. 2005. p. 476.
22. Schneeman BO. Gastrointestinal physiology and functions. *Br J Nutr*. 2002;88 Suppl 2:S159–63.
23. Silverthorn U. Dee. *Fisiología humana un enfoque integrado*. Ed. Médica Panamericana; 2014. 514-516 p.
24. Guyton A. C. *Tratado de Fisiología Médica*. Vol. 12, *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. 2011. 465-522 p.

25. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* [Internet]. 2008 Jun 20 [cited 2016 May 12];320(5883):1647–51. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1155725>
26. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* [Internet]. 2003 [cited 2016 May 12];360(9356):512–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12583961>
27. Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* [Internet]. 2005 Mar 25 [cited 2016 May 12];307(5717):1920–5. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1106442>
28. Croucher SC, Houston AP, Bayliss CE, Turner RJ. Bacterial Populations Associated with Different Regions of the Human Colon Wall Bacterial Populations Associated with Different Regions of the. *Appl Environ Microbiol*. 1983;45(3):1025–33.
29. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* [Internet]. 2005 [cited 2016 May 12];308(5728):1635–8. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/308/5728/1635.abstract>
30. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. [Internet]. Vol. 444, *Nature*. Nature Publishing Group; 2006 Dec [cited 2016 May 12]. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/4441022a>
31. Qin J, Ruiqiang Li1, 3 MA* JR, Burgdorf4 KS, Manichanh5 C, Nielsen4 T, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing: Commentary. *Nature* [Internet]. 2010 Mar 4 [cited 2016 May 12];11(1):28. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08821>
32. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* [Internet]. 2006 Jun 2 [cited 2016 May 12];312(5778):1355–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16741115>
33. Sanz Y, Collado MC, Haros M, Dalmau J. Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. 2004;
34. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*. 1995;125(6):1401–12.
35. Falk PG, Hooper L V, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1157–70.

36. Liévin V, Peiver I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser J-R, et al. activity gastrointestinal microflora exert antimicrobial Bifidobacterium strains from resident infant human Topic collections Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* [Internet]. 2000 [cited 2016 May 14];4747. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/content/full/47/5/646>
37. Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches. *J Immunol*. 2003;170(2):816–22.
38. Helgeland L, Dissen E, Dai K, Midtvedt T, Brandtzaeg P, Vaage JT. Microbial colonization induces oligoclonal expansions of intraepithelial CD8 T cells in the gut. *Eur J Immunol*. 2004;34(12):3389–400.
39. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB, Abeyesuriya V, Deen K, et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* [Internet]. American Physiological Society; 2010 Jul [cited 2016 May 14];90(3):859–904. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664075>
40. Malik VS, Hu FB. Issues in the nutritional treatment of type 2 diabetes and obesity (o hamdy, section editor) *Sweeteners and Risk of Obesity and Type 2 Diabetes: The Role of Sugar-Sweetened Beverages*. 2012;
41. Kim YJ, Park JH, Kim MH, Kim SB, Hwang SH, Lee YM. Sweetener composition for alleviating diabetes, containing slowly digestible ingredient. *Google Patents*; 2012.
42. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. 2014;
43. Fitch C, Keim KS. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Acad Nutr Diet*. 2012;112(5):739–58.
44. *Normas Oficiales Mexicanas SSA1*.
45. Durán Agüero S, Cornwall JR, Vega CE, Salazar De Ariza J, Arrivillaga KC, Del Pilar M, et al. Consumo de edulcorantes no nutritivos en bebidas carbonatadas en estudiantes universitarios de algunos países de Latinoamérica consumption of carbonated beverages with nonnutritive sweeteners in latin america university students. *Nutr Hosp Nutr Hosp* [Internet]. 2015 [cited 2017 May 17];3131(2). Available from: <http://www.aulamedica.es/nh/pdf/8026.pdf>
46. Durán Agüero S, Blanco Batten E, Rodríguez Noel M del P, Cerdón Arrivillaga K, Salazar de Ariza J, Record Cornwall J, et al. Asociación entre edulcorantes no nutritivos y riesgo de obesidad en estudiantes universitarios de Latinoamérica. *Rev Med Chil* [Internet]. Sociedad Médica de Santiago; 2015 Mar [cited 2017 May 17];143(3):367–73. Available from:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872015000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en

47. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, et al. Soft Drink Consumption and Risk of Developing Cardiometabolic Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged Adults in the Community. *Circulation* [Internet]. 2007 [cited 2017 May 17];116(5). Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/116/5/480.long>

48. De Jesús Díaz-Reséndiz F, Franco-Paredes Alma Gabriela Martínez-Moreno Antonio López-Espinoza K, Gabriela Aguilera-Cervantes V. Efectos de variables ambientales sobre la ingesta de alimento en ratas: una revisión histórico-conceptual * Effects of Environmental Variables on Eating Behavior in Rats: a Conceptual and Historical Review. 2009 [cited 2017 May 17];1657–9267. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rups/v8n2/v8n2a18.pdf>

49. García-Almeida JM, Ma Casado Fdez G, García Alemán J. A current and global review of sweeteners; regulatory aspects. *Nutr Hosp* [Internet]. 2013 [cited 2017 May 17];28(4):17–3117. Available from: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6793.pdf>

50. Grotz VL, Pi-Sunyer X, Porte D, Roberts A, Trout JR. A 12-week randomized clinical trial investigating the potential for sucralose to affect glucose homeostasis. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2017 [cited 2017 May 17];(17):30126–5. Available from: http://ac.els-cdn.com/S0273230017301265/1-s2.0-S0273230017301265-main.pdf?_tid=90183260-3b3c-11e7-ab45-00000aacb361&acdnat=1495051876_39c75a79a6a4781946355c72a4ee6cd5

51. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* [Internet]. 2014 Sep 17 [cited 2017 May 17]; Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature13793>

52. Zhang Q, Yang H, Li Y, Liu H, Jia X. Toxicological evaluation of ethanolic extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves: Genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2017 May 17]; 86:253–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027323001730079X>

9. Anexos