



**Universidad Veracruzana**  
**Instituto de Ciencias de la salud**  
**Región Xalapa**

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Efecto de los edulcorantes no nutritivos en la morfología e interacción celular del enterocito”**

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

**Presenta:**  
**Jimena Patricia Susan Muñoz**

Directora de tesis:  
Dra. Mónica Flores Muñoz  
Codirector de tesis:  
Dr. Óscar López Franco

Julio de 2022

“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”



# **Universidad Veracruzana**

Instituto de Ciencias de la Salud  
Región Xalapa

Maestría en Ciencias de la Salud

*“Efecto de los edulcorantes no nutritivos en la morfología e interacción celular del enterocito”*

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

Presenta:

Jimena Patricia Susan Muñoz

Directora de Tesis :

Dra. Mónica Flores Muñoz

Codirector de Tesis :

Dr. Óscar López Franco

Comité tutorial

Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Dra. Claudia Janeth Juárez Portilla



## **Agradecimientos**

Agradezco a mi alma máter, la Universidad Veracruzana (UV), al Instituto de Ciencias de la Salud por el apoyo brindado en la Maestría Ciencias de la Salud; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca con número:**784775**, la cual fue brindada durante mi estancia en el posgrado. Este proyecto de investigación fue posible gracias al Laboratorio de Medicina Traslacional de la UV, la colaboración de la Dra. Mónica Flores Muñoz, Dr. Óscar López Franco, Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández y la Dra. Claudia Janeth Juárez Portilla.

Parecía muy lejano el momento para llegar a este apartado de la tesis, el cual definitivamente es el más fácil de todos, pues estoy bien segura de a quién voy a mencionar. En primer lugar, Dra. Mónica quiero agradecer la oportunidad brindada, por introducirme a este mundo que, aunque no me fue fácil, usted me dedicó tiempo y jamás mostró desinterés por los avances obtenidos, lo cual me motivó siempre a seguir trabajando a su lado, aprendí mucho de usted. Dr. Óscar, a usted ni se diga las gracias por la paciencia brindada, aunque sea molestón y bulleador, siempre estuvo cuidando este proyecto y se lo agradezco mucho. Admiro mucho el trabajo de ambos y el tiempo que dedican al lab.

Gracias a mi comité tutorial por su compromiso, su amabilidad y motivación a ser mejor estudiante.

A mis compañeros de laboratorio, gracias por estar en las buenas y en las malas, molestarlos y hacerles bullying, me mantenía cuerda cuando sentía que el estrés me rebasaba. Gracias por enseñarme a sellar material, lavar pipetas, sexar ratones, esterilizar, ¡no es cierto!, gracias por motivarme, escucharme, enseñarme todo lo que estaba a su alcance y compartir su conocimiento con cariño. Gido, César, Anita, Vic, Cindy, Jesús, Dra. Diana, José Carlos, Ale me encantó coincidir con ustedes. Jailo con “I”, gracias por motivarme a venir a trabajar a las 7 am y fines de semana, me enseñaste que el tiempo nunca es suficiente si se quiere aprender.

Gracias a mis papás y mi bro por el soporte de todos los días, por no entender absolutamente nada de lo que estaba haciendo y aun así motivarme a ser mejor estudiante y persona. Me enseñan que si uno es determinado todo se logra y que el trabajo honesto es el más valioso. Agradezco a Tere por malcriarme y tenerme siempre la bata limpia, planchadita, ver por mis perros, ayudar y cuidar a mi mamá cuando más lo necesitamos.

Para mis amigos Jorge, Dani y amigos del tenis que les cancelé miles de salidas, les dejé plantados, no llegaba a la cancha, me iba temprano de las fiestas, les contestaba los mensajes una semana después, gracias por seguir presentes. ¡Los quiero!, por último, pero no menos importante a los más lindos de mi vida, mis perros Gordon y Drako, que me acompañaron en muchos desvelos a cambio de nada.

## Resumen

En la actualidad, el uso de los edulcorantes no nutritivos (ENN) incluidos en la dieta con el propósito de disminuir el consumo de azúcar y potenciar el sabor de la industria, se ha tornado excesivo y su consumo se ha asociado a modificaciones en la microbiota e inflamación de bajo grado en la mucosa. Sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos por los cuales los ENN promueven la diferenciación, migración y agregación celular en el sistema digestivo aún son controversiales. El objetivo de la investigación fue evaluar los efectos del aspartame, sucralosa y rebaudiósido A en los cambios morfológicos y migratorios de células de la línea celular de enterocito de ratas (IEC-6). En el estudio preclínico *in vitro* a partir del cultivo de IEC-6, se determinó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. Para la evaluación morfométrica, las células fueron fijadas con paraformaldehído y la migración celular por el proceso de cicatrización de herida, por ensayo de “scratch”. El análisis se hizo en el Software ImageJ, versión 1.8.9\_172 y los datos fueron procesados con el programa estadístico GraphPad Software, versión 9.0. En el estudio se encontró que las concentraciones de 1nM a 10 $\mu$ M de los diferentes ENN tuvieron la capacidad de modificar la morfología celular, hipertrofiando al cultivo, algo similar a lo que se determinó en nuestro modelo de hiperglucemia. Por otra parte, los edulcorantes a concentraciones de 0.1 $\mu$ M y 1 $\mu$ M disminuyeron la capacidad de la migración de la línea IEC-6 después de 24h. En conclusión, los ENN mostraron efectos en la morfología como se presenta en la hiperglucemia y a pesar de que, estos aditivos son considerados inocuos se observó disminución en la capacidad migratoria del cultivo, lo cual podría comprometer la comunicación celular que es esencial en la coordinación de las diversas funciones del intestino.

**Palabras clave:** enterocito, edulcorantes no nutritivos, morfología, hipertrofia, migración.

## Abreviaturas

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En casos se ha mantenido la abreviatura en inglés debido al lenguaje científico.

7TMR	Receptores con 7 dominios transmembrana
AGL	Ácidos grasos libres
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosín Trifosfato
CCK	Colecistoquinina
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Enfermedades crónicas
ECD	Enfermedades crónico-degenerativas
ENN	Edulcorantes no nutritivos
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
FAK	Quinasa de adhesión focal
FDA	Food and Drug Administration
Fz	Frizzled
GIP	Polipéptido insulino-trópico dependiente de glucosa
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GIT	Tracto gastrointestinal
GLUT	Glucose transporters
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G

IgA	Inmunoglobulina
IMC	Índice de masa corporal
IRS1	Sustrato 1 del Receptor de Insulina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MEM	Minimum Essential Media
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear- $\kappa$ B
OMS	Organización Mundial de la Salud
P13	Fosfatidilinositol 3
PFA	Paraformaldehído
PYY	Péptido doble YY
RAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SG	Glúcido de esteviol
SGLT1	Cotransportador de sodio-glucosa
SNC	Sistema nervioso central
T <sub>a</sub>	Temperatura ambiente
T1R (T1R2, T1R3)	Taste receptor (Taste receptor 1 member 2, Taste receptor 1 member 3)
Thr	Treonina
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$
TRL	Receptores de tipo Toll
UE	Uniones estrechas



# Índice

1 Introducción.....	12
2 Antecedentes.....	13
2.1 Consumo de carbohidratos y obesidad. ....	14
2.2 Morfofisiología e importancia del intestino en la salud humana.....	16
2.3 Migración celular y salud intestinal.....	27
2.4 Obesidad y salud intestinal. ....	30
2.5 Tratamiento Nutricional de la obesidad.....	32
2.6 Industria de edulcorantes no nutritivos y su uso.....	33
2.7 Efecto negativos de los ENN a nivel intestinal y la perspectiva de su uso. ....	35
3 Justificación.....	38
4 Hipótesis.....	39
5 Objetivos.....	39
Objetivo general. ....	39
Objetivos particulares. ....	39
6 Materiales y Métodos.....	40
6.1 Productos químicos.....	40
6.2 Cultivo celular. ....	40
6.3 Criopreservación.....	40
6.4 Estímulos. ....	41
6.5 Modelo <i>in vitro</i> de morfología.....	41
6.6 Modelo <i>in vitro</i> de migración celular con edulcorantes no nutritivos ( <i>ensayo de cicatrización de herida</i> ). ....	42
6.7 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).....	42
6.8 Análisis estadístico. ....	43
7 Resultados.....	44
7.1 Efectos en la morfología del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones de glucosa. ....	44
7.2 Efectos en la morfología del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones edulcorantes no nutritivos. ....	48

7.3 Efectos en la migración células del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones de edulcorantes no nutritivos ( <i>ensayo de cicatrización de herida</i> ). .....	53
7.4 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).....	59
8 Discusión .....	61
9 Conclusiones.....	72
10 Perspectivas de la tesis.....	74
11 Consideraciones éticas y de bioseguridad .....	75
12 Bibliografía.....	76

## Índice de Figuras

Figura 1: Anatomía del intestino. ....	18
Figura 2: Capas y subcapas del intestino. ....	19
Figura 3: Migración celular. ....	21
Figura 4: Uniones de células epiteliales. ....	23
Figura 5: Tipos de células del intestino delgado. ....	25
Figura 6. Células IEC-6 a distintas concentraciones de glucosa. ....	46
Figura 7. Efecto de las distintas concentraciones de glucosa en la longitud de células intestinales (IEC-6). ....	47
Figura 8. Efecto de las distintas concentraciones de glucosa en el área de células intestinales (IEC-6). ....	47
Figura 9. Células IEC-6 estimuladas a distintas concentraciones de rebaudiósido A. ....	49
Figura 10. Rebaudiósido A indujo hipertrofia en las células intestinales IEC-6. ....	49
Figura 11. Células IEC-6 a distintas concentraciones de aspartame. ....	51
Figura 12. Efecto de las distintas concentraciones de aspartame en la morfología de células intestinales (IEC-6). ....	51
Figura 13. Células IEC-6 estimuladas a distintas concentraciones de sucralosa. ....	52
Figura 14: Efecto de las diferentes concentraciones de sucralosa en la línea celular IEC-6. ....	53
Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de rebaudiósido A en la migración de células IEC-6. ....	55
B) ....	57
Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de aspartame en la migración de células IEC-6. ....	57
Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de sucralosa en la migración de células IEC-6. ....	58
Figura 18. Viabilidad celular del modelo de hiperglucemia. ....	59
Figura 19: Viabilidad celular de enterocitos IEC-6 con distintas concentraciones de ENN. ....	60

## Introducción

La obesidad, considerada una epidemia por su alta prevalencia, posee un origen etiológico diverso. El más trascendente incluye los hábitos de vida y alimentación, siendo la que más influyen las dietas altas en alimentos procesados y elevado contenido de azúcar. Los componentes dulces de la dieta son degradados y reconocidos desde la cavidad bucal hasta el intestino, gracias a las células que residen en el intestino el cual es conformado de varias capas, el órgano se compone de la mucosa intestinal que contiene al epitelio constituido por células diferenciadas que se distribuyen en las vellosidades, las cuales tienen distintas funciones, entre las que destacan la actividad de barrera, inmunidad, absorción, transporte y capacidad metabólica-hormonal.

Cada una de estas células nacen de manera programada desde el fondo de las criptas intestinales a partir de las células madre, y debido a la comunicación celular por uniones, canales, poros y la secreción de péptidos, permiten la homeostasis entre ellas y por consecuencia la del intestino, que al trabajar con otros órganos diana mejoran el tratamiento de las enfermedades crónicas (EC). Diversos estudios han reportado evidencias *in vitro* e *in vivo* sobre cómo el inducir a estos modelos a dietas occidentales perturban el funcionamiento de las células intestinales, modificando la permeabilidad del epitelio, cambios en la absorción de nutrientes, pérdida de uniones célula-célula, disminución de la capacidad inmunitaria, etc. Con relación a ello, el consumo alto de azúcares y el vínculo con el desarrollo de la obesidad han condicionado a la industria alimentaria y a las estrategias nutricionales a introducir sustitutos de azúcar mediante aditivos inertes capaces de igualar el sabor dulce sin proporcionar calorías; los edulcorantes no nutritivos (ENN) aprobados para su uso en diversos productos industrializados y dietas bajas en azúcares simples han promovido el uso descontrolado de ellos, no obstante investigaciones científicas han abordado sobreposibles riesgos a la salud y su consumo, generando alteraciones en la señalización neurológica, la composición microbiana y la alteración en la secreción hormonal. En la actualidad no existe una postura concreta sobre estos aditivos, por lo que se ha sugerido profundizar en la búsqueda sobre sus efectos. La presente investigación se realizó con el fin de contribuir a homogenizar el conocimiento sobre los efectos de los ENN en las células intestinales, dando un acercamiento sobre sus efectos a nivel celular a través de la metodología científica experimental.

## 2 Antecedentes

Los cambios en el modo de vida generados por la urbanización, industrialización y las nuevas tendencias de hábitos como lo son el consumo de productos procesados densamente calóricos, altos en grasas saturadas, azúcares, conservadores así como la presencia de sedentarismo, tabaquismo, alcoholismo, entre otros hábitos, han contribuido como factores para el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas (ECD), caracterizadas por ser enfermedades de larga duración y lenta progresión, responsables del 63% de las muertes a nivel mundial, de acuerdo con datos estadísticos de la Organización Mundial de la Salud (1). Según distintas evidencias científicas, uno de los factores asociados más relevantes a estas enfermedades son los malos hábitos alimentarios y con ello la aparición de sobrepeso u obesidad. La obesidad, una enfermedad de alta prevalencia a nivel mundial es un padecimiento de tipo crónico, multifactorial y pluripatológica (2), caracterizada por la distribución excesiva de grasa visceral, la cual está acompañada de alteraciones hormonales, inflamatorias y cambios endoteliales que contribuyen a una serie de eventos que incrementan la resistencia a la insulina, la estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS), el sistema nervioso simpático, así como un mayor riesgo cardiovascular (3).

En cuanto al panorama general de la salud mundial, la obesidad se ha establecido como una pandemia debido a su gran prevalencia, de acuerdo con la OMS se estimó que en el 2016 el 39% de las personas adultas (18 o más años) presentaban sobrepeso y el 13% eran obesas (1). A nivel nacional, la obesidad es un grave problema de salud pública que afecta desde edades tempranas, con relación a los adultos de 20 años y más en el 2018 la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reveló que el sobrepeso y obesidad representan el 75.2% de la población total (39.1 % sobrepeso y 36.1 % obesidad) (4). Actualmente, se estima que la obesidad es responsable del 1-3% del gasto total de la atención médica en la mayoría de los países, incrementando aún más los costos debido a su relación con otras enfermedades (5). La etiología de la obesidad es catalogada de origen multifactorial, sin embargo, su desarrollo primario proviene de un desbalance entre la energía consumida y la energía gastada, determinada por distintos rasgos que están influenciados por el comportamiento, dieta, ambiente, genética y estructuras sociales (5,6).

## 2.1 Consumo de carbohidratos y obesidad.

Evidencias científicas han relacionado la predisposición a la obesidad y una mayor incidencia a la presencia de un entorno obesogénico que aunado a variables genéticas, respuestas conductuales del apetito, ingesta energética y preferencia de macronutrientes, propician un desequilibrio energético que determinará el peso corporal (7). De esta manera, distintos artículos científicos demuestran la relación que existe entre el consumo de bebidas azucaradas y el incremento del Índice de Masa Corporal (IMC), el cual es un índice antropométrico relacionado con el porcentaje de tejido graso (8).

Aunque la relación del IMC y la cantidad de tejido adiposo o graso no está lo suficientemente relacionado, puede ayudar a estimar la adiposidad corporal que representa un riesgo a la salud (9). El aumento de reservas energéticas está planteada como una inadecuada utilización de las grasas, representado por el desbalance de absorción y oxidación total de los lípidos en comparación al metabolismo que favorece la oxidación de glucosa en dietas ricas en carbohidratos, principalmente de almidón, disacáridos, monosacáridos y no de grasas, debido a su velocidad de almacenamiento (10).

Los carbohidratos son las macromoléculas más abundantes en el planeta, siendo una buena fuente de combustible para el cuerpo, sin embargo, su consumo excesivo puede condicionarnos a un catabolismo de adenosín trifosfato (ATP) bajo e inducir procesos anabólicos, como la acumulación de tejido adiposo (11). El proceso de digestión de los carbohidratos en la dieta inicia en la boca con la amilasa salival, siendo absorbidos en cantidades poco significativas en el estómago (12). Los carbohidratos son degradados en monosacáridos antes de llegar al intestino delgado donde el proceso de digestión continuará con la amilasa pancreática rompiendo los enlaces  $\alpha$ -1-4 para la obtención de glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrina límite (disacáridos); la absorción de la glucosa puede clasificarse en tres tipos, transporte activo, difusión mediada por transportes y difusión simple, favoreciendo la absorción de glucosa de forma activa en aproximadamente un 95% (12).

Los monosacáridos como la glucosa se introducen en el proceso de glucólisis por medio de la transformación en glucosa 6-fosfato por acciones dependientes de ATP usando hexoquinasas (11). El metabolismo de la glucosa se lleva a cabo dentro de los enterocitos,

donde este proceso está íntimamente relacionado con los transportadores de glucosa dentro de la célula y la concentración de carbohidratos en la dieta en el lumen intestinal (13). La glucosa se absorbe mediante el transporte activo dependiente de sodio, el transportador de glucosa SGLT1 (cotransportador sodio-glucosa) y la presencia de los transportadores de glucosa (GLUTs), GLUT 2 y GLUT 5 que facilitan su paso a través de la membrana apical y basal del enterocito. El GLUT 2 transporta la glucosa, la fructosa y la galactosa a través de la membrana, mientras que el GLUT 5, expresado en la membrana apical, regula la absorción de fructosa (13). Evidencias científicas han planteado que cuando existe una saturación de la vía de absorción de la glucosa mediante SGLT1, la sobreactividad de este cotransportador podría ser un mediador de la inserción de GLUT 2 y a su vez con la señal proporcionada por los receptores del sabor dulce, los cuales con la unión a su ligando, los carbohidratos simples y niveles de dulzor, los enterocitos coincidirán con la inserción del GLUT 2, siendo la vía del GLUT2 una vía reclutada para mayor absorción de glucosa (11,14,15).

Por otra parte, la participación y la acción de la insulina en sangre regulando los niveles de glucosa y participando en el metabolismo de lípidos y proteínas permite el transporte de la glucosa a la célula a través del receptor de insulina, localizado en la membrana celular. Dentro de la célula, la glucosa es metabolizada a piruvato y lactato en un proceso anaeróbico de fermentación para posteriormente ser oxidada en el hígado, músculo y tejido adiposo en el ciclo de Krebs (16).

La tasa de oxidación de la glucosa dependerá de la ingesta, la demanda de energía y el tejido donde tenga lugar el proceso, y si la glucosa no es utilizada, se almacenará como reserva en forma de glucógeno o tejido adiposo (12). El mantenimiento de la glucosa a nivel sanguíneo debe oscilar en 5mM, dicha concentración podrá mantenerse gracias a procesos como la gluconeogénesis y glucolisis. En caso de que los niveles de glucosa bajen por más de lo necesario podrían afectar procesos cerebrales o, por el contrario, en niveles elevados (hiperglucemia) ser perjudicial para la salud, como inducir el desarrollo de diabetes (11).

Como se ha descrito, el incremento excesivo de las reservas energéticas se refleja en el aumento de tejido adiposo, como es el caso de la obesidad, constituyendo un factor de riesgo de resistencia a la insulina que se asocia al aumento de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (induciendo un proceso inflamatorio) y almacenamiento de ácidos grasos libres (AGL) (16). Los AGL elevados en plasma pueden inducir un estado de inflamación

incrementando el grado de infiltración de macrófagos al tejido adiposo, promoviendo un perfil secretor pro-inflamatorio (16). Una de las vías de resistencia a la insulina es la saturación por ácidos grasos que propician la activación de los Receptores de Tipo Toll (TRL) y las vías de señalización del Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras Kappa de las células B activadas (**IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B**), las cuales interfieren en la señal de la insulina y el aumento de citoquinas pro-inflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$  (**TNF $\alpha$** ), que reducen los niveles de Sustrato 1 del Receptor de Insulina (IRS1) y P13 Quinasa disminuyendo la captación de la insulina, contribuyendo así a la resistencia de insulina en la obesidad y los cambios metabólicos (16,17).

Con relación a lo anterior, se ha descrito la correspondencia de la homeostasis energética y el estado catabólico (inter-digestivo/post-absortivo) y anabólico (digestivo/absorbente), los cuales están relacionados con la ingestión, digestión y absorción dependiente del sistema gastrointestinal. Por otra parte, se tiene noción de este sistema en la liberación de hormonas intestinales y señalización intestino-cerebral, por lo que la asociación de factores de riesgo metabólicos en órganos diana de este sistema, como el intestino, merecen más investigación en relación a los nuevos estilos de vida “post-industriales modernos”, ya que la obesidad y otras enfermedades metabólicas relacionadas con el sedentarismo y la dieta no pueden ser descartadas de las nuevas tendencias de alimentación (18).

## **2.2 Morfofisiología e importancia del intestino en la salud humana.**

El sistema gastrointestinal trabaja en conjunto con otros órganos activos, como el páncreas e hígado, para dirigir procesos metabólicos complejos que permiten la homeostasis del organismo humano (18). Es relevante mencionar que, con relación a las enfermedades metabólicas, se ha priorizado el estudio de sus alteraciones, anormalidades o cambios en función principalmente de órganos como el hígado, el páncreas, el tejido adiposo y muscular. Pese a eso, es importante reconocer que el sistema gastrointestinal conlleva también funciones valiosas que proveen al cuerpo de nutrientes gracias a su alta capacidad de absorción, digestión y procesos de transporte especialmente llevados a cabo en el intestino (18). En relación con el intestino, se ha demostrado relevancia, ya que se comunica directamente con órganos distales que conectan funciones metabólicas, por otra parte, se ha



destacado la interacción con el sistema nervioso central (SNC), regulando patrones de ingesta alimentaria (18).

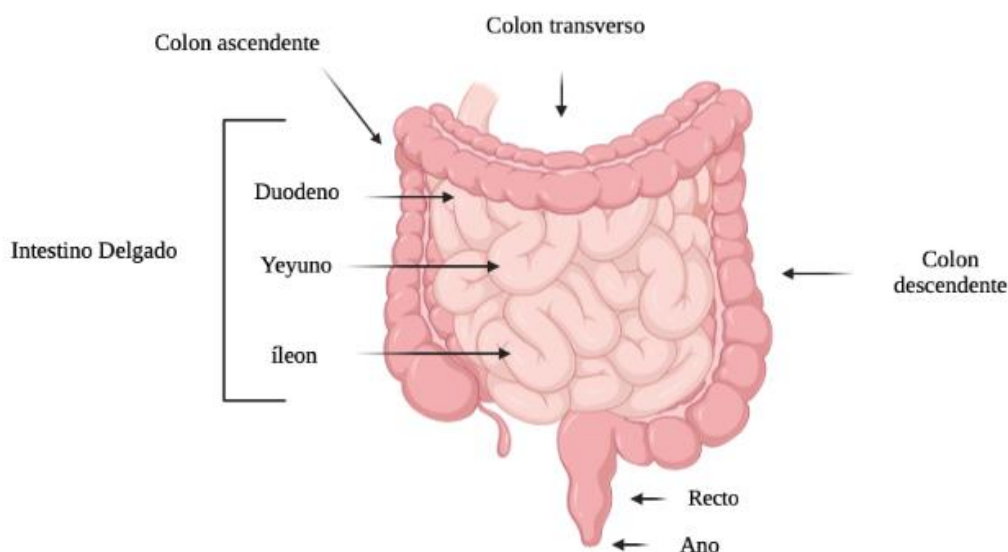
Durante varios años se han descrito funciones del sistema gastrointestinal, las cuales se relacionan en mayor medida con el proceso digestivo. En relación con ello, los nutrientes de la dieta se absorben en mayor cantidad en el intestino delgado, interactuando de manera directa con el epitelio del órgano, lo cual hace tan valioso el estudio del intestino en procesos metabólicos o enfermedades relacionadas (18,19).

El intestino se caracteriza por su alta capacidad de absorción de nutrientes, la cual puede clasificarse en diferentes mecanismos: 1) la absorción por acción pasiva, para el caso del agua y/o en menor proporción la absorción de sustancias liposolubles, 2) la absorción por difusión facilitada y 3) el transporte activo, que se encarga de la absorción de azúcares y aminoácidos, como se describió anteriormente (19). Por otra parte, el intestino no solo se encarga del proceso fisiológico de absorción, también media la digestión de nutrientes, electrolitos, agua, sales biliares y drogas, así también se conoce su función de transporte, debido al contacto directo que mantiene con el lumen intestinal permitiendo trasladar componentes de la dieta para su posterior aprovechamiento (19). Desde otro punto, el intestino apoya al organismo en procedimientos inmunológicos, de barrera y hormonales gracias a la diversidad de células que habitan en sus vellosidades, ya que las células ejecutan acciones diversas de barrera permeable y selectiva que evitan la entrada de agentes potencialmente nocivos al cuerpo (19).

En este sentido, se ha estudiado la interferencia de la coordinación del intestino y su capacidad para regular los sistemas endocrinos y nerviosos, por lo que ahora al mismo sistema gastrointestinal se le ha clasificado como un sistema endocrino. Con relación a ello, las hormonas secretadas por el sistema gastrointestinal pueden clasificarse en endócrinas, paracrinas y neuroendocrinas (20). Enfocándonos en el intestino, podemos encontrar la secreción de Colecistoquinina (CCK), Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y Péptido doble YY (PYY). La liberación de estas hormonas intestinales está mediada por la respuesta de receptores acoplados a proteínas G que tienen la capacidad de detectar cambios en el contenido del lumen intestinal, y de manera selectiva coordinan procesos de transporte, absorción y digestión; los cuales

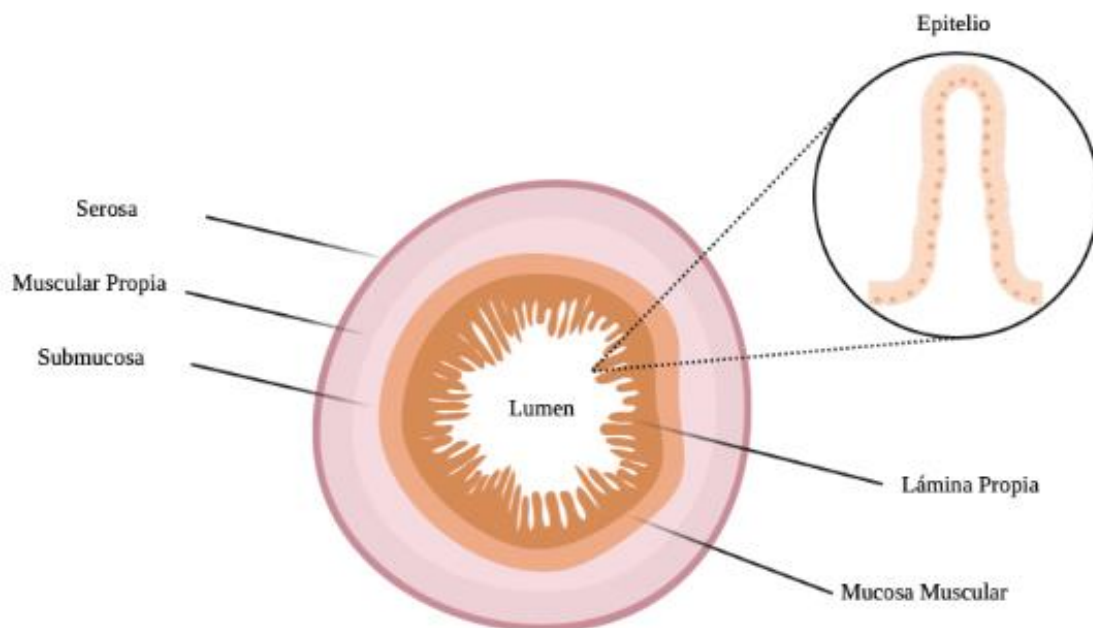
serán descritos en apartados siguientes, enfocándonos principalmente en la capacidad de detectar los componentes dulces de la dieta (20).

El intestino se divide en dos porciones principales: el intestino delgado y el intestino grueso o colon. El primero mide aproximadamente 6-7m de largo y anatómicamente la porción se ha dividido en tres fracciones: el duodeno, yeyuno e íleon (21)(Figura 1). En la porción del duodeno y yeyuno se encuentra la cantidad más alta de enzimas digestivas y se caracteriza por la absorción del 90% de las sustancias que transitan en el lumen intestinal, principalmente los monosacáridos de la dieta, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas solubles, hierro y calcio. La porción del íleon tiene la capacidad de absorber principalmente vitamina B<sub>12</sub> y la secreción de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y K<sup>+</sup> (21). El colon que es la última porción tiene una longitud de aproximadamente 1.5m, iniciando desde la separación del íleon con el esfínter ileocecal (22). El colon se divide en distintas zonas denominadas colon ascendente, colon transverso, colon descendente y por último la porción del recto y ano (22) (Figura 1).



**Figura 1: Anatomía del intestino.** El intestino se divide en dos porciones principales, el intestino delgado e intestino grueso o también conocido como colon. El intestino delgado está conformado por tres porciones: Duodeno, yeyuno e íleon. El intestino grueso está dividido anatómicamente por colon ascendente, transverso, descendente y las últimas dos porciones recta y ano.

En relación con la estructura del tracto gastrointestinal y por consiguiente del intestino se ha descrito que se conforma por cuatro capas; la mucosa, la cual es la capa más interna, la submucosa (tejido conjuntivo), la cual sostiene la mucosa, la capa muscular externa que rodea la submucosa y por último la capa serosa (21) (Figura 2). El epitelio intestinal (mucosa intestinal), es la capa más interna del intestino y se compone de una sola lámina de células, la cual modifica la forma si se compara el intestino delgado e intestino grueso, esto debido a la funcionalidad que cumple cada uno de ellos. El intestino delgado que lleva a cabo principalmente procesos de absorción tiene como característica tener vellosidades que sobresalen al lumen intestinal, mientras que, en el intestino grueso las vellosidades se tornan más aplanadas hasta formar una capa relativamente plana, donde disminuye la reabsorción de nutrientes (23).



**Figura 2: Capas y subcapas del intestino.** La estructura del intestino se ha clasificado en la capa más interna denominada mucosa, la cual está conformada del epitelio, la lámina propia y la mucosa muscular. Posteriormente encontramos la submucosa, la muscular propia y por último la capa serosa, la más externa de todas.

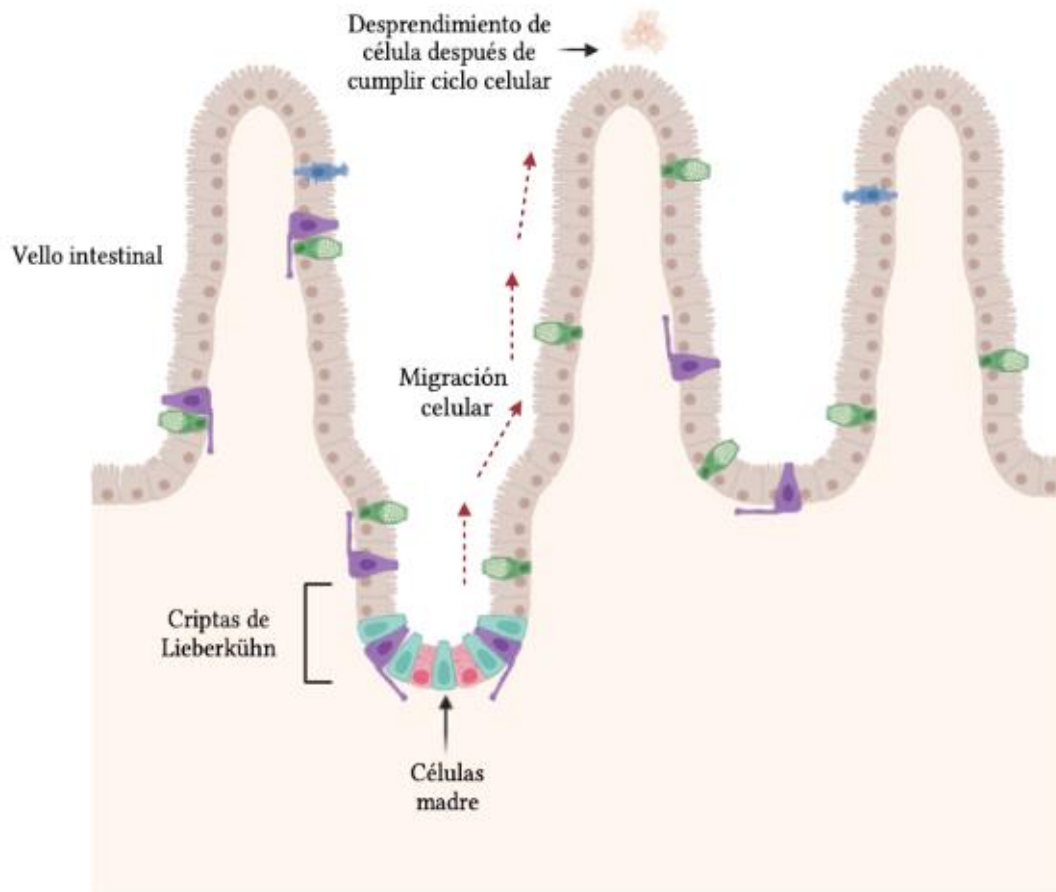
El epitelio intestinal, que no es una capa plana de células, cuenta con vellosidades que forman pliegues descritos como criptas, llamadas criptas de Lieberkühn (23). La mucosa o epitelio intestinal mantiene a las células polarizadas a las que se les ha atribuido relevancia debido a su funcionalidad como barrera reforzadora del sistema inmune del cuerpo humano (12). Otras

de las funciones importantes atribuidas al intestino que tendrán un peso relevante en el control del metabolismo es su actividad secretora, gracias a las células endócrinas que componen el epitelio, implicadas en la generación de polipéptidos que regularán en función paracrina, la actividad de otros órganos como el páncreas, el sistema nervioso, etc. (19). Por otra parte, las células que habitan en el epitelio expresan glicoproteínas llamadas lamininas que interactúan con proteínas transmembrana llamadas integrinas, lo cual será un mediador de la adhesión, el crecimiento, la polarización y la diferenciación celular en el intestino (24). El intestino que está formado de las vellosidades en el fondo de sus criptas contiene principalmente a las células madre o células proliferativas, células secretoras no diferenciadas (21), en la parte más profunda también se encuentran las células enteroendócrinas y células Paneth, mientras que a lo largo del vello se han reportado un mayor número de enterocitos con capacidad de absorción y las células Globet (21). Las células madre que residen en las criptas de Lieberkühn tienen la capacidad de dar lugar a células transitorias (células hijas), que se diferencian y maduran recorriendo las vellosidades hasta llegar al ápice del vello donde se cumple su ciclo celular, todo ello promovido por la migración celular para que después de colocarse en la cima de las vellosidades se sometan a una espontánea apoptosis (23,25,26) (Figura 3).

Las células madre no se encuentran diferenciadas, y se caracterizan por tener un núcleo grande en comparación al radio de su citoplasma, la capacidad de autorrenovación y multipotencialidad (22). El tránsito de células, por las células madre, genera la estancia de las nuevas células aproximadamente dos días en las criptas, en las cuales se dividen aproximadamente 4-5 veces antes de su última diferenciación, para cada una de las células epiteliales especializadas (25–27). Como resultado, las células diferenciadas generadas desde el fondo de las criptas se dividen en distintos tipos de células, entre las que se pueden mencionar al enterocito, células Globet, células Paneth, células Tuft y enteroendócrinas (23). Después de la diferenciación mitótica, este tipo de células pueden clasificarse en absorptivas y secretoras; las primeras solo incluyen a los enterocitos, mientras que las células Paneth, Tuft, Globet y enteroendócrinas son secretoras (27).

La principal vía que impulsa la proliferación de células epiteliales en las criptas del intestino es la vía Wnt, la cual está compuesta de un complejo de vías del co-receptor formado por proteínas relacionadas con el receptor LDL(LRP5/6) y el receptor frizzled (Fz). La función

adecuada de estas vías conlleva la activación de mecanismos de transcripción génica en el núcleo, mediado por el complejo de  $\beta$ -catenina, que regula la expresión de genes relacionados con diferenciación de células madre, proliferación celular y su función (27,28). Asimismo, se ha relacionado esta vía de señalización con procesos de embriogénesis, organogénesis, homeostasis y se ha descrito que participa en procesos de adhesión celular mediante la interacción de uniones por cadherinas y actina (27,28).



**Figura 3: Migración celular.** Las células hijas que surgen de las células madre, se diferencian durante el proceso migratorio, el cual les permite recorrer desde el fondo de las vellosidades del intestino (Criptas de Lieberkühn), hasta el ápice del vello intestinal originando un “camino” que de manera natural propicia el final de su ciclo celular. Las células se desprenden de manera espontánea gracias a su muerte programada, la apoptosis.

Una vez que las células madre se dividen, otra de las vías que propician la diferenciación de células en el epitelio intestinal es la vía Notch, en ella se modifica la morfología de las células indiferenciadas y da lugar a la regulación de la característica absorbente o secretora. Esta vía juega un papel en determinar el destino celular, y se ha descrito que la capacidad de definir el tipo celular está mediada principalmente por los receptores Notch1 y Notch2, que se

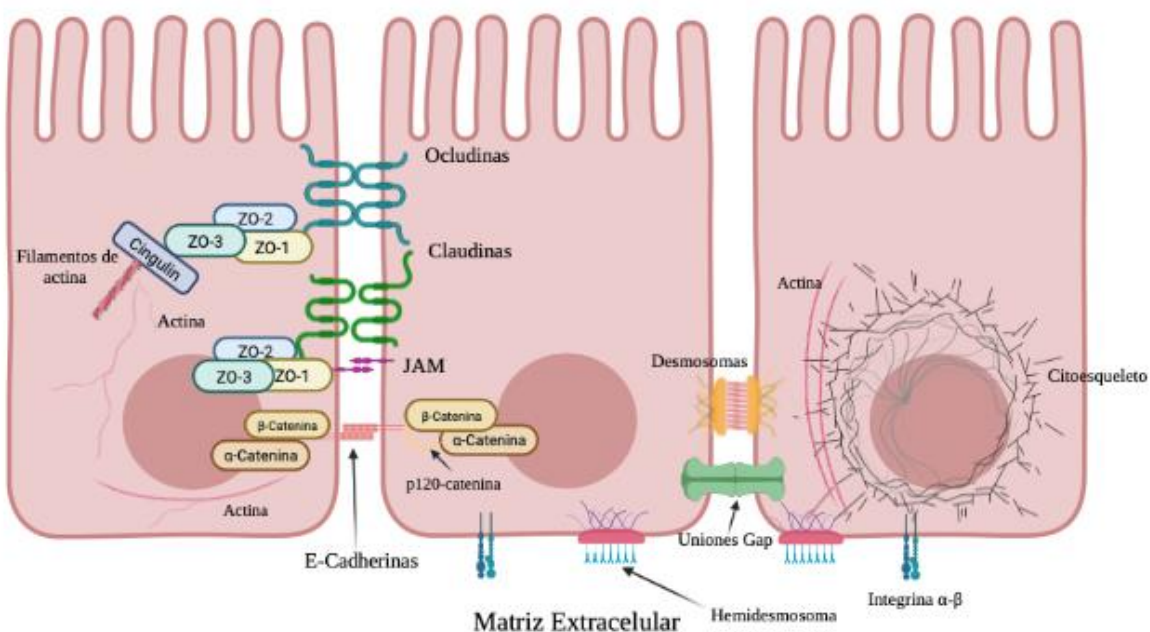
encuentran en el epitelio intestinal. En este sentido, se ha encontrado que la sobreexpresión de Notch1 genera la disminución en la diferenciación de células Globet, Paneth y enteroendócrinas, por lo que el control de esta vía permitirá el dominio de la generación de células de absorción, y en general la adecuada distribución entre células absorptivas o secretoras (21,27).

Al mismo tiempo, es importante mencionar que el equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las células madre se mantendrá de acuerdo con el microambiente generado por las otras células especializadas, las cuales se encuentran en contacto directo con los componentes de la dieta, bacterias, medicamentos y otros aditivos. Con relación a ello y la importancia de la homeostasis de su microambiente, generar cambios en sus procesos naturales con relación a factores externos podría condicionar disfunciones en todo el órgano comprometiendo funciones de barrera, secretoras, etc. (21). Como se mencionó previamente, el intestino es un órgano el cual su estudio debe tomar mayor importancia, debido a las diversas participaciones que representa en la salud humana, llevadas a cabo por cada uno de los tipos de células que lo conforman.

La literatura científica ha descrito que el intestino está compuesto por diferentes tipos celulares. Las células más abundantes son los *enterocitos absorbentes* que se encuentran en el intestino delgado y también están presentes en el colon (intestino grueso), pero en esta porción son conocidos como colonocitos. Los enterocitos representan aproximadamente el 80% de las células epiteliales del intestino, este tipo de células son responsables de la absorción de nutrientes, agua, hierro, algunas vitaminas y sales biliares no conjugadas (23, 30). Adicionalmente, se ha mencionado que las uniones estrechas entre los enterocitos también son un factor importante que sirve como “blindaje” en contra de las sustancias que pasan por el lumen intestinal, estas uniones están conformadas principalmente por proteínas transmembrana: claudinas, ocludinas y uniones asociadas a moléculas que se conectan al citoesqueleto de la célula (27,30) (Figura 4).

El enterocito o célula absorbente se caracteriza por ser una célula larga, que está estructuralmente dividida por su membrana plasmática apical y basolateral, la superficie apical está compuesta por vellosidades (microvellosidades), el cual es un borde denso similar a un cepillo. Las microvellosidades de los enterocitos pueden llegar a medir  $\sim 1 \mu\text{m}$ , la integridad de éstas se mantiene por el citoesqueleto que se integra por filamentos de actina y

proteínas como miosina I, vilina y fimbrina y genera una densa red de microfilamentos que cruzan el enterocito (19,30). Las membranas de las microvellosidades son ricas en enzimas digestivas y transportadoras, tales como las disacáridasas, peptidasas y proteínas transportadoras transmembrana. Asimismo, las membranas basolaterales de los enterocitos están unidas a otros enterocitos por un estrecho contacto que les permite la unión con otros enterocitos adyacentes (19). Las microvellosidades de este tipo de células también expresan transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  y la presencia de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y ATPasa facilitan el transporte de nutrientes en el transportador GLUT2 que se encuentra en el área basolateral de la célula propiciando el transporte transcelular de los nutrientes (19).



**Figura 4: Uniones de células epiteliales.** Las células del intestino se encuentran conectadas por una variedad de uniones que caracterizan al órgano en su selectividad de permeabilidad, por otra parte, estos complejos de unión permiten de manera coordinada el movimiento de la célula y su correcta adhesión a la matriz extracelular dando la forma característica de cada tipo celular. Las células epiteliales presentan uniones estrechas (UE) conformada por ocludinas, claudinas, la familia JAM, complejo de Zonula ocludens (ZO1, 2 y 3) y cingulin. Las uniones adherentes (UA) que están conformadas por las cadherinas, cateninas (p120,  $\alpha$ -Catenina y  $\beta$ -Catenina) y desmosomas; también encontramos los canales de unión gap que permiten, receptores de adhesión de membrana (integrinas) y hemidesmosomas que mantienen conexión con los filamentos intermedios permitiendo la comunicación con el citoesqueleto de la célula. Haz clic o pulse aquí para escribir texto.. (Modificado de Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Vol. 2, Comprehensive Physiology. 2012. p. 2382.)

Otro tipo de células que se encuentran en el epitelio intestinal son las *células Globet* (células caliciformes), estas tienen la capacidad de producir mucina y otras proteínas protectoras. Se presentan a lo largo del intestino delgado en porcentajes que oscilan entre el 4% del total de

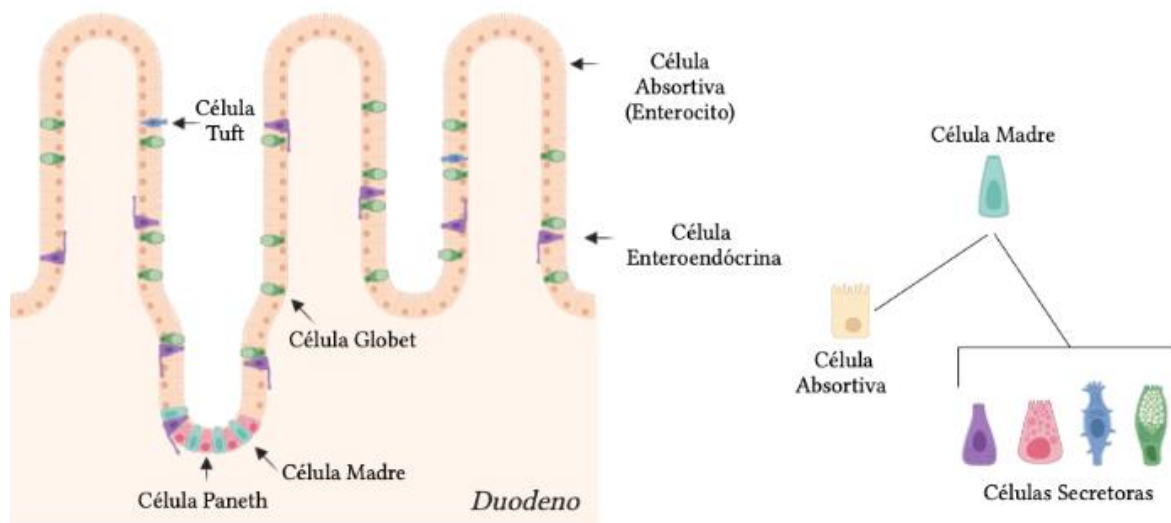
células del órgano, incrementando su población en el intestino grueso representando aproximadamente el 16% de la composición total (27). La membrana apical de las células Globet presenta gránulos secretores de moco que proveen protección al órgano (34). El moco generado por este tipo de células esta principalmente compuesto de glucoproteínas, lo cual disminuye la deshidratación, los daños mecánicos y funge acción de barrera, evitando la entrada de componentes luminare (34). El moco producido por estas células es permeable para algunas moléculas de bajo peso molecular, lo cual es relevante para facilitar su posterior absorción, por otro lado, se ha descrito que el moco generado por las células Globet y su interacción con los enterocitos, macrófagos y células dendríticas son el mayor constituyente de defensa innata del sistema (34).

La mucina, uno de los principales componentes del moco intestinal, es una sustancia polimérica, viscoelástica que confiere la acción de protección. Las mucinas son glicoproteínas compuestas de oligosacáridos unidos a aminoácidos como la serina (Ser) y treonina (Thr), estos aminoácidos a su vez proveen protección de la deshidratación y el daño mecánico generando una barrera entre el lumen intestinal y el epitelio protegiéndolo de agentes bacterianos, virus y parásitos en el agua (34). En la mucina también se ha descrito que se encuentran iones, moléculas del sistema inmunitario como inmunoglobulina A (IgA) y péptidos antimicrobianos (34). La secreción de la mucina es continua y esta mediada principalmente por la capacidad del movimiento del citoesqueleto de los gránulos secretores, en algunos casos regulado por estímulos externos como citocinas, neuropéptidos y lípidos (34).

Con relación a la composición de las células calciformes, sus orgánulos citoplasmáticos se encuentran por debajo de los gránulos generadores de moco y su núcleo se localiza abajo del aparato de Golgi. Este tipo de células también presentan microvellosidades en la membrana apical, enzimas digestivas y transportadoras, pero en cantidades muy inferiores en comparación con los enterocitos, ya que su función primordial es la producción de mucina (21). El ciclo de vida de las células Globet en ratones se identificó de entre 2-3 días, teniendo una vida corta propiciando un constante remplazo de ellas en el epitelio. Las células inmaduras de este tipo se encuentran en la base de las criptas de Lieberkühn con una morfología en forma piramidal y de gran tamaño, y conforme migran a la superficie del



intestino disminuyen su volumen y su morfología cambiando la forma a algo similar como una copa (34).



**Figura 5: Tipos de células del intestino delgado.** Cada uno de los tipos de células que habitan en el intestino son originadas por las células madre que se encuentran en las criptas de Lieberkühn. Posterior al proceso de diferenciación se conocen dos tipos de células: 1) absortivas, de las cuales se identifican a los enterocitos y/o colonocitos (en el caso del colon). 2) Las células secretoras están representadas por las células Paneth, Globet, Tuft y enteroendócrinas (Modificado de Edelblum KL, Turner JR. *Epithelial Cells: Structure, Transport, and Barrier Function*. In: *Mucosal Immunology: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 188).

Por otra parte, las *células Paneth*, son las únicas células diferenciadas en el intestino que no cumplen la capacidad migratoria como las demás células intestinales, residiendo prácticamente en las criptas del intestino delgado, ciego y colon ascendente. Estas células tienen como función primordial la inmunidad innata, defensa antibacteriana gracias a la secreción de péptidos bactericidas y lisozimas (21,27). Los antimicrobianos que son producidos por estas células son una herramienta muy útil para mantener estabilidad en la microbiota intestinal, la cual se ha mencionado tiene gran importancia en procesos de barrera, inmunidad y metabolismo. Las células Paneth morfológicamente tienen una forma piramidal con el núcleo localizado en su base, son ricas en gránulos generadoras de sustancias antimicrobianas citoplasmáticas, su forma es piramidal y muestran un extenso retículo endoplasmático y aparato de Golgi (35). De manera general, estas células se pueden describir como un componente multifactorial en el intestino, ya que contribuyen sobre efectos en el

desarrollo de la mucosa, defensa en la barrera y control en la regulación de la microbiota (35).

La *Células Tuft* o conocidas como células cepillo, tienen como característica largas y gruesas microvellosidades, en relación con este tipo celular se ha descrito que podrían estar involucradas en el reconocimiento químicos de sustancias en el lumen intestinal, ya que cuentan con proteínas que sirven como sensores del gusto y también se han relacionado con la secreción de opioides (25). Sobre estas células se sabe poco e inicialmente se encontraron en la tráquea, estomago e intestino. Actualmente, se han comparado con las células endócrinas porque estas también participan como sensores químicos, por lo que también se les ha atribuido la facultad de ser sensores de parásitos en el lumen intestinal (25,36).

Por último, encontramos a las *células enteroendócrinas* o neuroendócrinas, que tienen capacidad secretora de péptidos hormonales (37). En relación con su morfología, se ha descrito que son estrechas en su parte apical y más amplias en la base, a comparación de los enterocitos tienen pocas microvellosidades y presentan gránulos secretores en el extremo basal del citoplasma por debajo del núcleo; las células enteroendócrinas en el tracto gastrointestinal representan el 1% de la población total de células. Las células enteroendócrinas del sistema gastrointestinal de los mamíferos se clasifican en 6 tipos, células A en el estómago, células enterocromafinas expresadas también en el estómago, intestino delgado y grueso, las células I y K presentes solo en el intestino delgado, las células L que habitan tanto en el intestino delgado como colon, y por ultimo, las células P expresadas en el estómago (37,38).

Las células neuroendócrinas que tienen actividad quimiosensorial tienen la capacidad de detectar los nutrientes en el lumen intestinal, lo cual lleva a la secreción de hormonas. En este sentido, habrá correlación entre los componentes de la dieta y la actividad de estas células, por ejemplo, el dulzor o sabor dulce es detectado por los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (37), permitiendo la transmisión de señales a través de la interacción intracelular de la unión de nucleótidos de guanina (37). Estas proteínas están conformadas por proteínas G monoméricas y heterotriméricas que inician diferentes vías de señalización intracelular, consideradas como unos de los principales moderadores metabólicos intracelulares, representando aproximadamente el 2% de todas las proteínas codificadas en el genoma humano (37). Los receptores del gusto también son conocidos como proteínas de

siete dominios transmembrana (7TMR) responsables de la detección de estímulos y la selectividad de estos (37,39).

La percepción del sabor dulce que es dada por los receptores que responden a la señal son los de tipo 1 (T1R) en el miembro 2 (T1R2) y tipo 3 (T1R3), estos se encuentran tanto en las papilas gustativas como en las células enteroendócrinas del intestino, siendo activados por el azúcar, aminoácidos y otras proteínas, incluidos también los ENN (40). Los receptores del sabor dulce en la boca en intestino actúan a través de la activación de la gustducina cuando los agonistas del dulzor se unen a los receptores T1R2 y T1R3, la gustducina a su vez promueve la canalización del ATP generando un derivado llamado adenosín monofosfato cíclico (AMPC), que propicia el cierre de los canales de  $K^+$  e incrementa los canales de  $Ca^{2+}$ , causando la liberación de neurotransmisores que activarán la respuesta cefálica del sabor dulce (41).

En el tracto gastrointestinal la detección del sabor dulce es reconocida por las células L y K, las cuales inducen la actividad de segundos mensajeros afectando en particular la secreción de hormonas como GLP-1 y PYY (40). Diversos estudios han relaciona los receptores del sabor dulce en las células enteroendócrinas y se ha propuesto que la detección del sabor dulce en las células intestinales está relaciona con los T1R y gustducina, induciendo a una respuesta cefálica similar a la detección oral del dulce (40,41). Los receptores que se encuentran en estas células tienen la capacidad de “probar” el contenido del lumen intestinal cumpliendo un papel importante entre la comunicación del lumen, epitelio, estómago, músculo y fibras nerviosas para promover respuestas que afectan la función gástrica, el consumo de alimento y metabolismo de glucosa, esto a su vez también se ha descrito tendrá la capacidad de modificar la comunicación entre las demás células del intestino propiciando la homeostasis del órgano (42).

### **2.3 Migración celular y salud intestinal.**

El epitelio intestinal uno de los tejidos con mayor capacidad de auto-renovación en los mamíferos se caracteriza por un tránsito constante de células mediado por la migración celular (26). El epitelio intestinal tiene la capacidad de restaurarse cada 4-5 días, todo dependiendo del tipo celular, por ejemplo, en el caso de las células Paneth se ha reportado que sobreviven durante aproximadamente 6 semanas (26). La diferenciación de las células

del intestino durante la migración está programada, sin embargo, también puede estar modulada por la expresión de proteínas como son las integrinas y E-cadherinas, las cuales regulan la comunicación entre células permitiendo la transmisión de señales de la actina conectada al citoesqueleto y otras vías de control intracelular que permiten la movilidad de las células (21). Por otra parte, la migración es un mediador que regula la muerte de las células por apoptosis, la capacidad de trasladarse al ápice de las vellosidades promueve el llegar al final de su vida, esta muerte controlada de las células intestinales se ha definido como la expulsión de las células del epitelio, catalogado de manera más simple como un “desprendimiento ordenado” de células sin perder capacidades de unión y de barrera debido a la comunicación entre célula- célula (21).

La migración celular se ha descrito por tres mecanismos, el *flujo de membrana basal* donde la lámina basal se mueve hacia arriba desplazando el epitelio adherente, la *presión mitótica* que se refiere a que la misma proliferación de células en las criptas empuja la lámina del epitelio hacia arriba para ir marcando el ciclo celular, por último, el *movimiento activo* en donde la migración es inducida por las contracciones y locomoción de las células. El modelo de presión mitótica ha sido el mecanismo del cual se ha apoyado la migración de este epitelio, ya que se observó que la tasa de migración es proporcional al nacimiento de nuevas células en las criptas (29).

Por otro parte, se debe considerar que el epitelio intestinal es representado como una monocapa de células “columnares” que permite mantener su asociación, la cual es dependiente de complejos de unión generados en las membranas de las células, haciendo que se encuentren interconectadas y conectadas con la membrana basal dando lugar en parte a la integridad del órgano (26,29). Estas uniones pueden clasificarse en uniones estrechas y uniones de anclaje, donde se incluyen a las uniones adherentes y desmosomas, así también podemos encontrar a las uniones gap. Todos estos tipos de uniones junto con la actina, miosina y filamentos conectados al citoesqueleto de la célula son intermediarios que modularan la estructura del epitelio, mecanismos migratorios, movimientos intracelulares, etc (29).

Las uniones estrechas (UE), son estructuras intracelulares multiproteicas que se encuentran en la parte más apical de las células, manteniendo una función clave en la barrera epitelial y en la polaridad. Éstas permiten la entrada de moléculas pequeñas solubles en agua, limitando

el paso de iones, organismos extraños y toxinas. Por otra parte, estas proteínas transmembrana participan en señalizaciones del citoesqueleto (31) (Figura 4). Como se ha mencionado, el epitelio es selectivo y el transporte transepitelial puede ocurrir por dos rutas principales, transcelular o paracelular. El primero se refiere al paso que ocurre a través de la célula, cruzando desde la parte apical hacia el área basolateral, el transporte paracelular se define como el traspaso entre la unión de célula-célula (en las celdas) (32). Las UE tienen diferentes tipos de proteínas transmembranales: ocludina, claudinas y moléculas de adhesión de unión (JAM) (31) (Figura 4).

Las ocludinas juegan un papel importante en el ensamblaje y desensamblaje de las UE, de las cuales se ha descrito que cambios en su fosforilación pueden promover inestabilidad de las UE resultado también en un aumento de la permeabilidad paracelular. De esta manera, parece que el agotamiento de la ocludina incrementa el traspaso de la tasa de moléculas de mayor tamaño, disminuyendo la selectividad, por lo que se ha sugerido que la ocludina tiene la capacidad de modular el flujo paracelular (31).

Las claudinas son otro tipo de proteínas de barrera que permiten el paso de iones, están conformadas por canales similares a los canales iónicos, y al igual que las ocludinas están mediadas por la fosforilación por serina (Ser) y treonina (Thr) (31,32). Hasta ahora se han descubierto 26 claudinas humanas y se expresan en todos los epitelios humanos. En el sistema gastrointestinal se detectó que en modelos murinos la expresión de claudinas 2, 3, 7 y 15 se presentaba en mayor proporción, que la claudina-8 aumenta su expresión progresivamente del intestino delgado al colon y la claudin-15 se disminuye (32).

Por último, encontramos a las uniones JAM que son una subfamilia de inmunoglobulinas que se expresan en el epitelio, endotelio y células inmunitarias. Éstas tienen la capacidad de mediar la interacción entre células inmunitarias y células epiteliales. También se ha encontrado que tienen función en la barrera epitelial mejorando la polaridad, migración, adhesión y migración de leucocitos, por último, también se ha hablado que estas uniones ayudan a regular señales entre células (31,43).

Al mismo tiempo en las células epiteliales tenemos a las uniones de anclaje, en ellas se incluyen a las uniones adherentes, desmosomas y hemidesmosomas. Este tipo de uniones están principalmente encargadas de unir a las células con la matriz extracelular, formando una fuerte unión con los filamentos y actina que se encuentran dentro de la célula, y éstas a

su vez se conectan con el citoesqueleto. Además, con ayuda de otras proteínas de adhesión transmembrana permiten interactuar con la matriz extracelular ayudando en la señalización intracelular (31,33,43). Las uniones de anclaje se han dividido de acuerdo con su funcionalidad, por un lado, tenemos a las uniones adherentes y desmosomas que inducen la unión entre células formadas principalmente de la familia de proteínas transmembrana llamadas cadherina, por otro lado, encontramos a las adherencias focales y hemidesmosomas, las cuales permiten unir a las células a la matriz extracelular por medio de proteínas transmembranas, en donde se incluyen a la familia de integrinas (33) (Figura 4).

Otra de las uniones por las cuales las células se comunican directamente son las uniones gap o uniones de comunicación, permitiendo la interacción entre el citoplasma de las células por medio de canales a través de las membranas. Estos canales están conformados por 6 proteínas transmembrana (conexinas), controlando el paso de iones y moléculas pequeñas (>1KDa), lo cual juega un papel importante en la barrera epitelial (31). La comunicación dada por este tipo de uniones es intracelular ya que permite intercambios directos, haciendo que las células interactúen coordinadamente a ligandos, incluso si son pocas las células que presentan el receptor a cierto ligando (44).

## **2.4 Obesidad y salud intestinal.**

De manera general se ha descrito la gran importancia del intestino en la salud humana, sin embargo, sabemos que enfermedades altamente prevalentes, como la obesidad, pueden poner en peligro su estabilidad. Como se mencionó anteriormente las enfermedades crónicas, como la obesidad, se presentan debido a la corelación de varios factores que pueden involucrar cambios metabólicos donde el intestino será un órgano clave, ya que es considerado un órgano endocrino involucrado en el mantenimiento de la energía y sostener la inmunidad, por lo que su deterioro podría incrementar los daños generados por enfermedades como la obesidad (45). Respecto a ello se ha asociado la composición de la microbiota intestinal y cambios negativos en procesos patológicos como la obesidad y sus comorbilidades como la diabetes, dañando la funcionalidad del intestino (45,46). La microbiota humana está compuesta de aproximadamente 100 trillones de microbios que interactúan coordinadamente, donde estudios previos han mostrado que en su mayoría esta colonia de microbios está compuesta de *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. Por otra parte, a estos microbios se les ha atribuido

capacidad de facilitar el metabolismo de polisacáridos no digeribles, producción de vitaminas esenciales (vitamina K y componentes de vitamina B), propiciar el desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal, así como mediar la capacidad inmunológica. En este sentido, se ha detallado que su composición alterada está relacionada con la capacidad de facilitar la absorción de calorías en la dieta, el incremento de los depósitos de grasa y aumento de los procesos inflamatorios del hígado, por lo que estos efectos se han relacionado con los cambios microbianos a nivel intestinal en pacientes obesos y la prevalencia de la enfermedad (45).

Por otra lado, se ha relacionado la disminución de la permeabilidad de la membrana en pacientes obesos en relación con pacientes de un IMC normal, estos hallazgos comunicaron que en pacientes obesos había excesos de Zonulina, un mediador que regula la permeabilidad intestinal. Al parecer el consumo de grasa en pacientes obesos se asocia al incremento de la Zonulina, la cual también se relacionó con el consumo total de calorías al día. Otro de los resultados asociados son la concentración de glucosa en sangre y el incremento positivo con los niveles de zonulina, lo cual se relacionó con la cantidad total de bacterias en el intestino pero no con los porcentajes de *Bacteroides* y *Firmicutes*. Estos hallazgos fueron relacionados con la microinflamación sistémica conectada con la microbiota intestinal en pacientes obesos relacionado con la zonulina, un marcador de disminución en la permeabilidad intestinal (47). En otras revisiones se asoció cambios en el intestino y el síndrome metabólico, el cual incluye a la obesidad e hiperglucemia, donde se describió su relación con la disfunción en la barrera epitelial, tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*. En relación con ello, en un modelo celular de Caco-2 que fue expuesto a distintas concentraciones de glucosa para simular un medio hiperglucémico, se logró encontrar un deterioro de la barrera dependiente de dosis y tiempo de exposición, alterando las uniones célula- célula como ZO-1 e incrementando la tortuosidad de las células, modificando su morfología. Para confirmar esto, en un modelo murino inducido a Diabetes Mellitus tipo 1 (DM 1), los ratones resultaron con disfunción de la barrera epitelial del intestino por disminución de las uniones adherentes, decreciendo la concentración de E-cadherina y encontrando mayor susceptibilidad de infección del colon en ratones con DM 1 (48).

Adicionalmente, en un modelo de ratones con deficiencia de leptina (modelo ob/ob), se encontraron cambios en la penetrabilidad de la capa de moco del colon en ratones obesos en

comparación al control, aunque en relación con la mucosidad del intestino delegado se encontraron similitudes en los grupos. Los ratones modificados para ser genéticamente obesos demostraron una capa de moco de colon más penetrable y con un crecimiento más lento, pero cuando se realizó el análisis de composición de la microbiota intestinal no se encontraron grandes cambios, sin embargo, parece que pueden ocurrir defectos del moco bajo regímenes dietéticos de prediabetes (49). Con estos hallazgos podemos considerar que la obesidad dificulta la estabilidad intestinal, por lo que parte de tu tratamiento debería también fijar el cuidado del intestino.

## **2.5 Tratamiento Nutricional de la obesidad.**

El tratamiento de la obesidad incluye varias estrategias, como la intervención sobre el estilo de vida, la cual es la primera línea de tratamiento. La modificación de estilo de vida y comportamiento suelen ser el pilar para disminuir el sobrepeso y obesidad, sin embargo, exige un importante conocimiento de las causas que lo generan para un mejor tratamiento (50). En México la estrategia contra sobrepeso y obesidad se describe en el Acuerdo Nacional para la Salud Alimentaria y entre sus objetivos prioriza el tratamiento nutricional (5). La intervención nutricional implementa dietas hipocalóricas que fomentan la reducción del peso seguido de cambios en las conductas alimentarias que promueven dietas equilibradas con consumo de carbohidratos complejos y la disminución del porcentaje de grasas saturadas (5,51). Sin embargo, el abordaje nutricional es afectado por el estilo de vida actual y el consumo de productos procesados, los cuales son añadidos de azúcar, sal, aceites, preservantes o conservantes y/u otros aditivos, cambiando la naturaleza de los alimentos con el fin de prolongar su duración, hacerlos más agradables y atractivos (52). Estos alimentos usualmente hipercalóricos han logrado aceptación en la población generando, por otra parte, la innovación de productos y estrategias para la sustitución de las altas cantidades de azúcar contenidas en ellos, reemplazándola por edulcorantes artificiales, los cuales son aditivos alimentarios capaces de mimetizar el efecto dulce del azúcar aportando menor energía (53).



## **2.6 Industria de edulcorantes no nutritivos y su uso.**

El uso de edulcorantes inició en 1880 con un crecimiento notable en las dos últimas décadas (40). Los edulcorantes usados en la industria alimentaria se dividen en tres tipos: alta intensidad, alcohol de azúcar y endulzante naturales. En relación con su contenido calórico lo endulzantes de alta intensidad se dividen en nutritivos o calóricos y no nutritivos o no calóricos, a su vez estos se subclasifican en edulcorantes naturales o artificiales/sintéticos con relación a su origen (40,54).

Los ENN son compuestos preparados químicamente que tienen poder endulzante sin proporcionar calorías. En la actualidad se encuentran en miles de productos como potenciadores de sabor (cero-calorías y reducidos en calorías), principalmente en bebidas (55).

La mayoría de estos aditivos que son aprobados para el consumo humano son de origen sintético, entre los permitidos para su consumo por la Food and Drug Administration (FDA) son acesulfamo-K, aspartame, neotame, sacarina, sucralosa, advantame y con reciente aprobación el Stevia (edulcorante no nutritivo natural). El uso de ENN, los cuales proporcionan cientos o miles de veces más dulzor que la sacarosa, han tenido un aumento significativo en la elaboración de alimentos y bebidas (56), sin embargo, su uso ha generado cuestionamiento sobre la seguridad de su consumo y posibles efectos adversos en la salud humana. En la actualidad existe una gran variedad de ENN que se utilizan en bebidas, productos de dieta, yogurts, postres, goma de mascar por sus beneficios para proveer del sabor dulce y dar estabilidad a los productos, los cuales muchos de ellos han sido incluidos en los tratamientos para propiciar la pérdida de peso o disminuir el consumo de azúcares simples, incrementando desmedidamente su consumo debido a su aceptabilidad en los consumidores y la industria alimentaria que se ve favorecido de ellos (57).

Entre algunos de los ENN de mayor consumo o popularidad tenemos a la Stevia, aspartame y sucralosa. La stevia un edulcorante descubierto en 1931, ha tomado fama debido a sus propiedades de intensificar el sabor dulce y ser catalogado como un producto “natural”. La Stevia, que proviene de las hojas de un arbusto perenne de tamaño pequeño, contiene en su composición química glúcidos de esteviol, los cuales tienen la capacidad de dar el sabor dulce (58). Para su consumo es necesario el aislamiento de las hojas que dan origen a derivados

como los rebaudiósidos A, B, C, D y E y el dulcoside A (58–60). En relación con el derivado Rebaudiósido A, fue uno de los primeros glúcidos de esteviol en el mercado el cual tiene la capacidad de endulzar aproximadamente de 180-350 veces más que la sacarosa en 2.5-10% de solución de agua (60). Los glúcidos de steviol no son digeridos en todo el tracto gastrointestinal si no que empiezan a degradarse hasta que entran en contacto con la microbiota intestinal donde se rompen los enlaces glucosídicos, donde los *Bacteroidetes* en el intestino son los principales responsables de hidrolizar los glucósidos de steviol, gracias a la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, cuya excreción es dada principalmente en las heces fecales y en menor proporción en la orina (60). Este edulcorante ha demostrado tener una estabilidad térmica de aproximadamente 200°C. Hasta ahora ha sido aprobado el uso del extracto de alta pureza en humanos, el cual tiene 300 veces más dulzor que el azúcar, con un consumo permitido de 4mg/kg/día. En relación con el consumo de la hoja aún no existe aprobación y se ha sugerido mayor investigación (59,61).

Otro edulcorante popular en la industria alimentaria es el aspartame o aspartamo, éste es un edulcorante artificial que endulza aproximadamente 200 veces más que la sacarosa. En el intestino delgado existen enzimas que tienen la capacidad de metabolizarlo y descomponerlo en metanol, fenilalanina y ácido aspártico, este edulcorante se absorbe y metaboliza fácilmente (62) y energéticamente aporta aproximadamente 4kcal por 1 gramos del aditivo en polvo. En la actualidad, la FDA lo ha catalogado como un edulcorante que puede ser incluido en bebidas y alimentos, con un consumo permitido de 40mg/kg/día, sin embargo, su adición se ha tornado excesiva, principalmente en productos procesados como bebidas endulzadas, concentrados de fruta, bebidas energizantes, leches endulzadas, caramelos, gelatinas y helados (62,63). El aspartame presenta degradación fácilmente a altas temperaturas y su grado de degradación en medios acuosos dependerá del pH y la temperatura, donde en un ambiente muy ácido (pH <4.0) o condiciones alcalinas (pH >6.0) con elevadas temperaturas su degradación es mayor (63).

La sucralosa por su parte es un edulcorante semisintético, tiene la capacidad de endulzar aproximadamente 400-600 veces más que la sacarosa, es estable a altas temperaturas y hasta ahora ha sido aprobada por la FDA para ser utilizado en alimentos, bebidas, dietas y suplementos alimentarios con un consumo permitido de 5mg/kg/día (64). La sucralosa es un disacárido hecho de sacarosa al cual se le reemplazan químicamente los grupos hidroxilos

con 3 átomos de cloruro (62). Gran parte de la sucralosa no es absorbida (aproximadamente el 85%) y pasa intacta por el sistema gastrointestinal, aproximadamente el 15% de la sucralosa que se absorbe, se hace pasivamente debido a que es una molécula muy pequeña y soluble en agua, lo que permite su distribución en muchos tejidos. Por otro lado, se ha mencionado que para su metabolismo el aditivo no es reconocido como un carbohidrato en el cuerpo, por lo que no aporta energía o proporciona calorías, sin embargo, estudios han encontrado que este edulcorante puede ser reconocido por los receptores del dulce a nivel intestinal participando en su activación y desencadenando otros procesos metabólicos. A pesar de ello los hallazgos siguen siendo controversiales y han condicionado mayor investigación (65). La excreción de la sucralosa se ha detectado por medio de las heces y el resto por la orina, por otra parte, se ha descrito que sólo el 2% de la ingesta puede ser transformado en componentes toxicológicos sin tener efectos importantes (62,64).

## **2.7 Efecto negativos de los ENN a nivel intestinal y la perspectiva de su uso.**

Estudios recientes sugieren que el consumo de ENN origina efectos negativos a nivel neuronal e intestinal con efectos hormonales que comprometen al metabolismo (40). Por lo que el abordar los potenciales cambios en la salud intestinal y el consumo de estos aditivos podría dar un panorama mejor sustentado sobre sus riesgos de ser incluidos en la dieta o como sustitutos de azúcar, para evitar el uso de azúcar y por consiguiente su consumo frecuente en alimentos procesados y/o productos de dieta bajos en azúcares.

Con relación a ello se ha encontrado que el consumo de ENN puede elevar la secreción de hormonas intestinales, como la denominada incretina GLP-1, e incrementar la función del transportador SGLT-1, y como consecuencia promover el transporte de la glucosa y galactosa a través de la membrana apical del enterocito (53).

La red de detección del sabor dulce es mediada por los receptores de la cavidad oral y el GIT (Tracto gastrointestinal), logrando así mediar la respuesta hormonal para la absorción de nutrientes y su metabolismo. Por otro lado, se encontró que la adición de Stevia en modelos *in vitro* de intestino de ratón, al evaluar las diferencias de la secreción hormonal con relación a la administración de rebaudiósido A (derivado de la Stevia), la presencia de incretinas como el GLP1, PYY y CCK al menos en las dos primeras porciones del intestino (duodeno y yeyuno) al estimular con el edulcorante (66).

Las células endoteliales del intestino que están involucradas en la detección del sabor dulce parecen tener una relación en la secreción en las células  $\beta$ -pancreáticas, estimulando la producción de insulina y contribuyendo a trastornos metabólicos posiblemente relacionados a la diafonía o interferencia entre receptores por consumo de ENN (40,67). Con relación a ello se ha vinculado la expresión de incretinas como el GLP-1, secretada principalmente en las células L intestinales por la presencia de carbohidratos en el lumen intestinal y también con el consumo de ciertos ENN. Dentro de las funciones de esta incretina se han atribuido la homeostasis metabólica, la secreción y biosíntesis de insulina, inhibición del glucagón, inhibición del vaciamiento gástrico e ingesta de alimentos, por lo que su alteración también podría relacionarse a la ganancia de peso y trastornos de la glucosa (68).

En relación con estos estudios, en humanos sanos no consumidores de ENN se mostró la disminución en la respuesta de insulina y un incremento de GLP-1 cuando consumieron 200mg diarios de sucralosa (69), al igual que la ingestión de sucralosa combinada con acesulfamo-K en bebidas gaseosas de dieta previa a una carga de glucosa arrojó como efecto metabólico el incremento de GLP-1 (70), lo que sugiere que los ENN parecen aumentar, junto con la glucosa, la liberación de GLP-1 en humanos, lo cual podría estar mediado por la estimulación de los receptores del sabor dulce en las células L intestinales (71). De esta manera, se han vinculado los receptores del dulce de las células intestinales y papilas gustativas linguales como mediadores críticos en la secreción de hormonas, y en relación al consumo de ENN, como la sucralosa, en modelos murinos se ha mostrado un incremento de la ganancia de peso relacionado con la actividad de los receptores del dulce en el duodeno y la sobreexpresión de los transportadores de glucosa, proponiendo una mayor absorción de glucosa en el intestino propiciando así el incrementando el peso corporal (65).

Otro de los efectos mencionados a nivel intestinal generados por los ENN, reportado en estudios en roedores, es que la sucralosa tiene la capacidad de alterar la microbiota intestinal, en ratones con dieta rica en grasas y dieta normal suplementada con sucralosa de aproximadamente 3.3mg/kg/peso, encontrándose cambios en la disminución de *Bacteroidetes* (72). Otro estudio relacionado con cambios en la permeabilidad, realizado en células Caco-2, demostró que el aspartame y la sucralosa disminuyeron la expresión de claudina-3 y claudina-15, las cuales son proteínas de unión estrecha, y que estas mismas

proteínas tenían una relación con la inactivación de los receptores del dulce y el decremento de claudina-3, pero no claudina-15 (73).

En relación con las evidencias encontradas, el consumo de edulcorantes y la interacción fisiológica de estos en las células muestran distintos efectos negativos entrelazados que podrían afectar el funcionamiento celular y por consiguiente las funciones del intestino, por lo que parte del tratamiento sugerido de la obesidad con edulcorantes para disminuir el consumo de carbohidratos simples y el desmedido consumo de productos industrializados que los contienen podría condicionar al cuerpo humano a un desbalance mucho más complejo, lo cual hace dudar sobre su consumo y la forma en la que son usados actualmente. Con relación a ello es importante profundizar en el tema y evaluar otras perspectivas moleculares que permitan conocer potenciales efectos de su consumo diario.

### 3 Justificación

La obesidad, considerada una epidemia por su alta prevalencia, tiene un origen etiológico diverso, el más trascendente incluye los hábitos de vida y alimentación, siendo las dietas altas en alimentos procesados y elevado contenido de grasas y azúcar las que más influyen. Los componentes dulces de la dieta son degradados y reconocidos desde la cavidad bucal hasta el intestino debido a las células intestinales. El intestino, conformado de varias capas, se compone de la mucosa intestinal que contiene al epitelio constituido por células diferenciadas que se distribuyen en las vellosidades, las cuales tienen distintas funciones como la actividad de barrera, inmunidad, absorción, transporte y capacidad metabólica-hormonal.

Cada una de estas células de manera programada nacen desde el fondo de las criptas intestinales a partir de las células madre, y debido a su comunicación por uniones, poros y secreción de péptidos, permiten la homeostasis entre ellas y por consecuencia la del intestino, que al trabajar con otros órganos diana mejora el estudio de las EC. Diversos estudios han reportado evidencias *in vitro* e *in vivo* sobre como el acercar a estos modelos a dietas occidentales perturban el funcionamiento de las células intestinales, modificando la permeabilidad del epitelio, cambios en la absorción de nutrientes, pérdida de uniones célula-célula, disminución de la capacidad inmunitaria, etc.

Con relación a ello, el alto consumo de azúcares y el vínculo con el desarrollo de la obesidad han condicionado a la industria alimentaria a desarrollar estrategias nutricionales e introducir sustitutos de azúcar mediante aditivos inertes capaces de igualar el sabor dulce sin proporcionar calorías, que son los denominados edulcorantes no nutritivos (ENN) aprobados para su uso en diversos productos industrializados y dietas bajas en azúcares simples, y que han promovido el uso descontrolado de ellos. No obstante, investigaciones científicas han hablado sobre posibles riesgos a la salud y su consumo generando alteraciones en la señalización neurológica, composición microbiana y alteración en la secreción hormonal. En la actualidad no existe una postura concreta sobre estos aditivos, por lo que se ha sugerido mayor búsqueda sobre sus efectos. La siguiente investigación pretende contribuir a aumentar el conocimiento sobre los efectos de los ENN en las células intestinales, dando un acercamiento sobre sus efectos a nivel celular a través de la metodología científica experimental.

## **4 Hipótesis**

Los edulcorantes no nutritivos (sucralosa, aspartame y stevia) inducen cambios en las células intestinales modificando su morfología y contribuyendo a la disfunción de la migración celular.

## **5 Objetivos**

### **Objetivo general.**

Identificar si los edulcorantes no nutritivos (sucralosa, aspartame y stevia) inducen cambios en las células intestinales modificando su morfología y contribuyendo a la disfunción de la migración celular.

### **Objetivos particulares.**

1. Evaluar las diferencias morfológicas (atrofia o hipertrofia) en el enterocito con distintas concentraciones de glucosa.
2. Evaluar las diferencias morfológicas (atrofia o hipertrofia) en el enterocito con distintas concentraciones de edulcorantes no nutritivos (sucralosa, aspartame y stevia).
3. Identificar diferencias de la migración celular en el enterocito en presencia de distintos tipos y concentraciones de edulcorantes no nutritivos (sucralosa, aspartame y stevia).

## **6 Materiales y Métodos**

### **6.1 Productos químicos.**

Los productos químicos utilizados durante los procesos metodológicos provienen de Sigma-Aldrich (Toluca, México), en caso de tener un origen distinto será especificado. Los edulcorantes no nutritivos fueron mantenidos de acuerdo con el manual de conservación de la compañía Sigma-Aldrich de los reactivos rebaudiósido A, sucralosa, aspartame y D-glucosa.

### **6.2 Cultivo celular.**

La línea celular de tejido epitelial de intestino delgado de rata IEC-6 fue adquirida en American Type Culture Collection (ATCC, Virginia, EUA), cultivada en condiciones estériles y mantenida en incubación humidificada a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>/95% de aire en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biowest, Veracruz, México), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Biowest, Veracruz, México), 100 UI/ml de mezcla de antibiótico de penicilina y estreptomicina (Biowest, Veracruz, México), 1% de L-glutamina (Biowest, Veracruz, México), 1% de piruvato de sodio (Biowest, Veracruz, México) y 0.1 UI/ml de insulina humana estéril. Los subcultivos de las células IEC-6 se realizaron al alcanzar hasta el 80% de confluencia, donde fueron lavadas dos veces con solución de cloruro de sodio al 0.9% (NaCl) (Pisa, Jalisco, México) e incubadas con 1ml de tripsina-EDTA (Biowest, Veracruz, México) a 37°C aproximadamente 5 minutos. Cuando la mayoría de las células fueron desprendidas por acción de la tripsina, se agregó el triple del volumen de DMEM suplementado y fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos y re-suspendidas con medio fresco para cultivarlas.

### **6.3 Criopreservación.**

Las células para su criopreservación fueron recolectadas como se describe en el apartado 6.2. Después de la centrifugación las células fueron re-suspendidas en DMEM suplementado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% (v/v), a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  en



crioviales. Los tubos fueron mantenidos en refrigeración constante de  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 24h, para conservarlos a largo plazo se mantuvieron en nitrógeno líquido.

#### **6.4 Estímulos.**

El aditivo de D-glucosa fue diluido en MEM al 1% de SFB, 100 UI/ml mezcla de antibiótico de penicilina y estreptomicina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio y 0.1 UI/ml de insulina humana estéril con una concentración final de D-glucosa de 12.5mM, 25mM y 50mM y conservado a una temperatura de  $4-8^{\circ}\text{C}$ . Para el stock de aspartame, sucralosa y rebaudiósido A se diluyeron en solución de NaCl al 0.9% a 1mM y mantuvieron en refrigeración constante de  $4-8^{\circ}\text{C}$  (64,74–76). Los stocks de ENN para estimular, fueron diluidos en DMEM al 1% SFB, 100 UI/ml de mezcla de antibiótico de penicilina y estreptomicina, 1% de L-glutamina, 1% de piruvato de sodio e insulina humana estéril en stock de 270 UI/ml, para llevar a una concentración de 0.1 UI/ml.

#### **6.5 Modelo *in vitro* de morfología.**

Para conocer los cambios morfológicos en la línea celular IEC-6 se sembraron placas de 6 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$  entre el pase 3-25. 24h después del sembrado se mantuvieron quiescentes por 24h con DMEM al 1% de SFB. Cada pocillo fue lavado dos veces con solución de NaCl al 0.9%, estimulado con concentraciones de 1nM, 10nM, 0.1 $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{M}$  y 10 $\mu\text{M}$  de aspartame, sucralosa o rebaudiósido A. 24h después, las células fueron fijadas para mantener la estructura de las membranas y las características tisulares con paraformaldehído (PFA) al 4% (m/v) por 15 minutos en hielo. Se retiró el PFA lavando dos veces con NaCl al 0.9% y se tiñeron con cristal violeta al 2% (v/v). Las células fueron incubadas por una noche en oscuridad, se evaluó el tamaño de las células midiendo la longitud y área con el software ImageJ, versión 1.8.9\_172 (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Para cada condición, se tomaron 5 fotos por pocillo, midiendo al menos 90 células de cada uno de los grupos, sin conocimiento previo del grupo experimental al que pertenecían, fueron medidas en micras ( $\mu\text{m}$ ). Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## **6.6 Modelo *in vitro* de migración celular con edulcorantes no nutritivos (ensayo de cicatrización de herida).**

Las células fueron cultivadas en placas de 12 pocillos. Antes de sembrar las cajas de cultivo fueron marcadas con una línea de referencia en la parte posterior atravesando los pocillos por la mitad con plumón indeleble antes. Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^5$  células por pocillo entre el pase 3-25 con medio completo. 24 horas después se cambió a DMEM al 1% de SFB durante 24 horas. Para realizar la herida en la monocapa, los pocillos se lavaron con NaCl al 0.9% y se raspo con la punta de una pipeta de 200 $\mu$ l estéril en línea recta de la parte media superior hasta la media inferior, perpendicularmente a la línea de referencia. Se lavó dos veces con NaCl al 0.9% y se agregó medio fresco al 1% de SFB con los estímulos de aspartame, sucralosa o rebaudiósido A en concentraciones de 0.1 $\mu$ M y 1 $\mu$ M durante 12 y 24h. Se evaluó el tamaño del scratch midiendo el área sin crecimiento celular con el software ImageJ, versión 1.8.9\_172. Para cada condición, se tomaron dos capturas por pocillo en tiempo 0, 12 y 24h, tomando como referencia la línea media trazada en cada pocillo. Se midieron al menos 6 fotos por grupo sin conocimiento previo del grupo experimental al que pertenecían, expresando el área en  $\mu\text{m}^2$ . Los datos se representaron en porcentual para identificar el % de cerrado de la herida. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## **6.7 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).**

La viabilidad celular fue determinada por ensayo colorimétrico de MTT basado en la metabolización de este por la enzima succinato-deshidrogenasa para dar como producto formazan. Las células fueron sembradas en cajas de 6 pocillos a una concentración de  $5 \times 10^5$  con medio completo por 24h, se mantuvieron quiescentes 24h con medio DMEM con 1% de SFB, se estimularon durante 24h con cada condición de D-glucosa a 12.5mM, 25mM y 50mM, para los edulcorantes se utilizaron las concentraciones de 1nM, 10nM, 0.1  $\mu$ M, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M de aspartame, sucralosa y rebaudiósido A. Posteriormente, se añadió solución estéril de MTT con una concentración final de 0.5 mg/ml, incubando durante 2h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. Después de incubación se añadieron 1000  $\mu$ l de Solución Stop preparada al

40% (vol/vol) de dimetilformamido (DMF), 2% (vol/vol) de ácido acético glacial y 16% (m/vol) de dodecil sulfato de sodio ajustado a un pH de 4.7, para disolver los cristales de formazan. Las placas se mantuvieron en incubación durante 1h a temperatura ambiente ( $T_a$ ). La absorbancia fue mediada a 570nm (Epoch, BioTek, Santa Clara, EUA) en la misma placa.

## **6.8 Análisis estadístico.**

Los experimentos se realizaron por triplicado, en ocasiones independientes. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism (versión 9.0.1(128) (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). El análisis estadístico se realizó empleando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba post hoc Dunette, considerando diferencias significativas aquellas con valores de  $p < 0.05$ . En el caso de las diferencias de migración celular en presencia de los ENN los datos fueron representados en porcentaje. Las pruebas de normalidad de los residuales se analizaron por la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

## 7 Resultados

### 7.1 Efectos en la morfología del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones de glucosa.

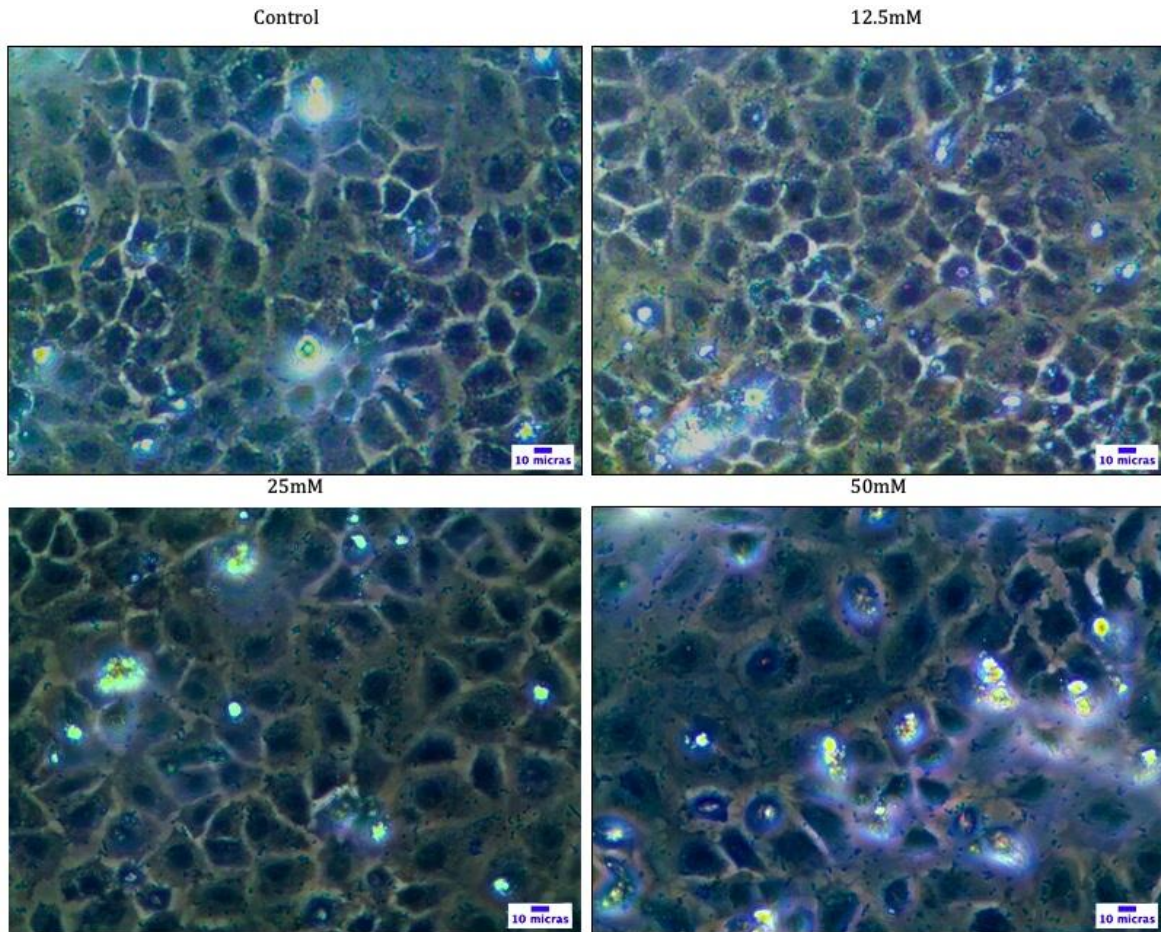
Se ha descrito que una de las funciones principales del intestino es proveer al cuerpo de energía mediante los nutrientes absorbidos de la dieta, por lo que la homeostasis de glucosa compete una acción importante para el intestino. Aunque el control intestinal de la glucemia no está solo relacionado con la concentración de glucosa si no también con otras condiciones en el intestino como la digestión de la mucosa, absorción de otros nutrientes, la microbiota, las respuestas reguladoras del eje intestino-cerebro, mediadores humorales, etc. (77). Se ha reportado que las concentraciones elevadas de glucosa impulsan la disfunción de la barrera intestinal, aumentan el estrés oxidativo (ROS), alteran la integridad de las uniones estrechas y adherentes (48,78,79). Estos hallazgos han dado paso a crear modelos que permiten conocer los efectos de la glucosa. De esta manera, establecer un modelo de “hiperglucemia” en cultivo con las células IEC-6 permitió comparar los cambios morfológicos del enterocito y dar un acercamiento sobre sus efectos.

El cultivo de enterocitos fue estimulado con diferentes concentraciones de D-glucosa, las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta para una mejor delimitación de su área, se midieron las células individualmente y de manera aleatoria para conocer los cambios en su longitud y área. En los resultados se observó que la glucosa a concentraciones de 25mM y 50mM indujo un cambio en la célula. La longitud del enterocito incremento en los grupos más altos de glucosa siendo 25mM y 50mM los que mostraron diferencia respecto al grupo control (Figura 6). En las células a concentración más baja de glucosa, 12.5mM, no se pudieron encontrar cambios en su longitud respecto al grupo control (**Control=40.8±7.54μm; 12.5mM=46.3±8.03μm; 25mM=74.2±34.2μm; 50mM=128±110μm; p<0.001**) (Figura 7). Las células estimuladas con altas concentraciones de glucosa, 50mM, mostraron un incremento en la longitud celular de aproximadamente 2.8 veces más que el grupo de 12.5mM, y 1.7 veces más que el grupo de 25mM, respecto al grupo control, por lo que podría sugerirse que a mayor concentración de glucosa el enterocito presenta un crecimiento longitudinal más evidente (Figura 7).

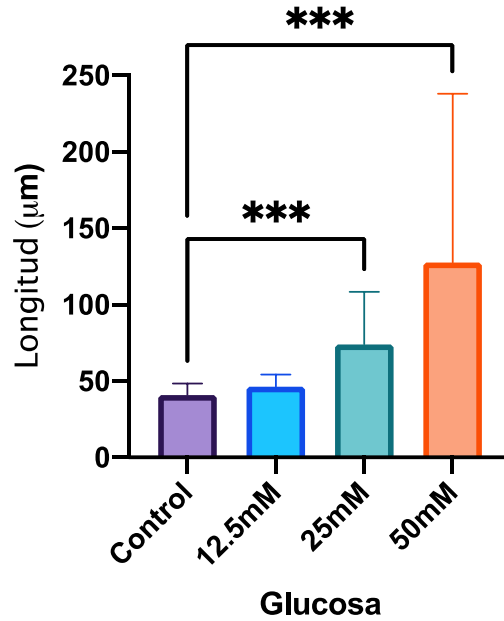
Con relación al efecto que pudo causar la glucosa en el área, los resultados demostraron diferencias importantes, aumentando el área del cultivo a concentraciones de 25mM y 50mM en paralelo al grupo control, para la concentración de 12.5mM no se observaron cambios (**Control=80.7±29.2µm; 12.5mM=122±142µm; 25mM=299±282µm; 50mM=616±241µm; p<0.001**) (Figura 8). El grupo de glucosa estimulado con 50mM presentó un crecimiento de 1.8 veces mayor que el de 25mM, respecto al grupo control (Figura 8).

En relación con estos datos donde se encontró el incremento de la longitud y área de los enterocitos en condiciones de hiperglucemia podemos demostrar un aumento en el tamaño de las células intestinales, lo cual nos sugeriría una hipertrofia en el cultivo principalmente para las condiciones de 25 y 50mM en comparación con el grupo control, (**Longitud: Control=40.8±7.54µm; 50mM=128±110µm; área: Control=80.7±29.2µm; 50mM=616±241µm**) (Figura 7 y 8). La mayor capacidad observada de hipertrofiar fue para el grupo de 50mM (Figura 6). Por otra parte, no se lograron encontrar cambios representativos con 12.5mM en contraste con el control (Figura 6), estos datos sugieren que a una mayor concentración de glucosa los enterocitos tendrán mayor capacidad de modificar su forma por la hipertrofia generada.

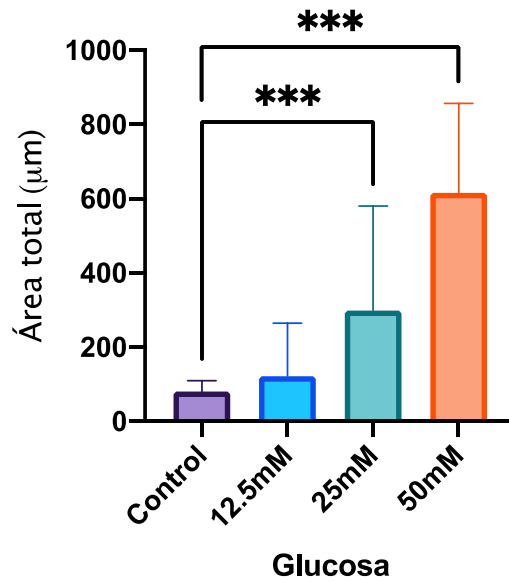
Por otro lado, en los grupos cultivados a mayor concentración de glucosa, 25mM y 50mM, las células tuvieron un cambio en su forma poligonal, característica de las células IEC-6, generando estructuras más alargadas y menos homogéneas comparado a lo que se observó en el grupo control y 12mM (Figura 6). Asimismo, en las concentraciones de glucosa más elevadas se pudo observar un alejamiento entre las células, lo que sugiere una posible pérdida de las uniones gap. Estos canales de unión son indispensables para el intercambio de iones o pequeñas moléculas, éstas a su vez permiten la correcta comunicación intracelular y por consiguiente la interacción célula-célula (80). Los cambios en presencia de hiperglucemia fueron notorios en cultivo, perdiendo la estructura en forma de panal, representativa de estas células epiteliales, principalmente en el grupo de mayor concentración de glucosa (50mM) (Figura 6).



**Figura 6. Células IEC-6 a distintas concentraciones de glucosa.** Fotos representativas de células IEC-6 estimuladas con 12.5mM, 25mM y 50mM de glucosa. En las concentraciones elevadas de glucosa (25mM y 50mM) fue notorio el aumento en la longitud y área total en comparación con el grupo control. En el grupo de 50mM se observa mayor alargamiento de las células y uniones entre células menos homogéneas (Magnificación 200x, barra de escala 10 $\mu$ m).



**Figura 7. Efecto de las distintas concentraciones de glucosa en la longitud de células intestinales (IEC-6).** Las células estimuladas con diferentes concentraciones de glucosa no demostraron cambios en la longitud entre el grupo control y 12.5mM, pero si con relación a los grupos 25mM y 50mM. \*\*\* $p < 0.001$  vs control de células sin estímulo.



**Figura 8. Efecto de las distintas concentraciones de glucosa en el área de células intestinales (IEC-6).** Las células IEC-6 estimuladas con glucosa después de ser fijadas y teñidas no mostraron cambios en el área para 12.5mM en comparación al grupo control. Los grupos de experimentación con los niveles más altos de glucosa, 25mM y 50mM, tuvieron un aumento del área celular en comparación al grupo control (\*\* $p < 0.001$  vs control, células sin estímulo).

## 7.2 Efectos en la morfología del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones edulcorantes no nutritivos.

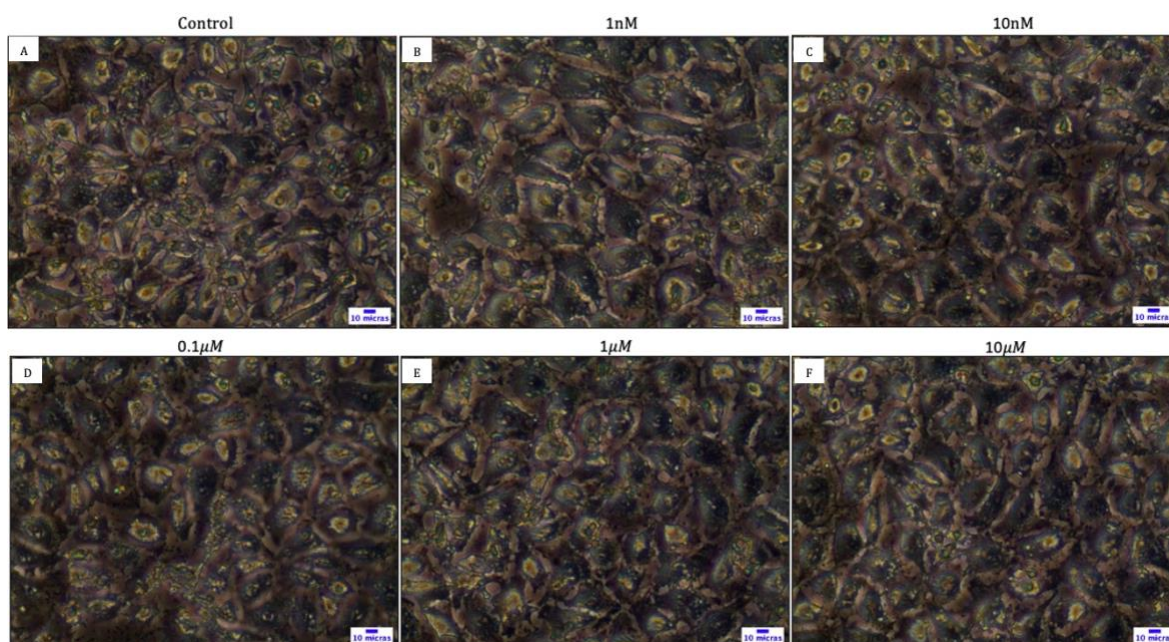
### 7.2.1 Rebaudiósido A.

Las células intestinales de rata fueron estimuladas con distintas concentraciones de rebaudiósido A (Figura 9). El Rebaudiósido A es uno de los glúcidos de steviol más abundantes en *Stevia rebaudiana Bertoni*, una planta de la que se extraen endulzantes para comida y bebidas, la cual ha tomado popularidad en los últimos años (59). La Stevia es catalogada como un edulcorante no nutritivo natural. La Stevia como su derivado, rebaudiósido A, se metabolizan en el intestino a esteviol, se hidrolizan por la microflora intestinal pero no es metabolizada por ésta, lo que resulta en un aporte calórico tan bajo del aditivo (58,59). Para conocer los cambios en la morfología en relación con los cultivos con rebaudiósido A, los enterocitos se estimularon durante 24h con las diferentes concentraciones de rebaudiósido A. Se fijaron con paraformaldehído y tiñeron con cristal violeta, para posteriormente analizar las imágenes por separado y de manera aleatoria.

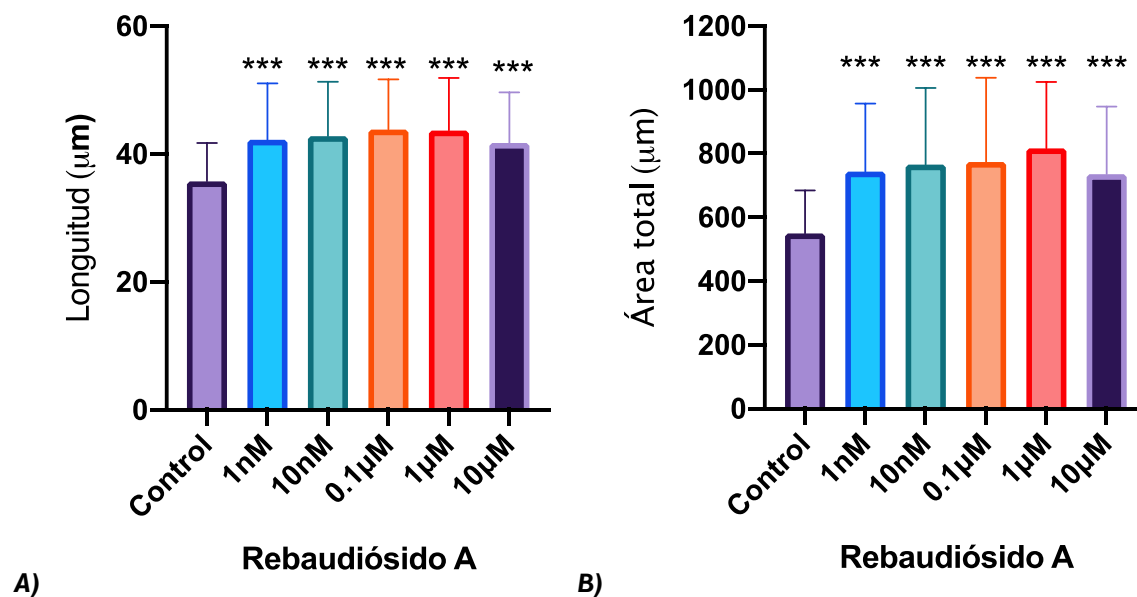
La medición de los componentes de hipertrofia (longitud y área), mostraron que todas las concentraciones de rebaudiósido A promovieron un incremento de la longitud (**Control=35.7±6µm; 1nM=42.2±8.78µm; 10nM=42.8±8.49µm; 0.1µM=43.8±6µm; 1µM= 43.7 ±6µm; 10µM= 41.7±7.90µm; p<0.001**) (Figura 9 y 10 A). Al realizar el análisis del área total de las células, se encontraron datos similares, incrementando el área de los enterocitos en todas las condiciones de rebaudiósido A (**Control=540±136µm; 1nM=743±213µm; 10nM=766±239µm; 0.1µM=774±264µm; 1µM= 816±208µm; 10µM=736±211µm; p<0.001**) (Figura 9, 10 B). El cultivo de IEC-6 que estuvo en contacto con el rebaudiósido A mostró un alargamiento de aproximadamente 1.1 veces mayor que el grupo control (Figura 10 A). Con respecto a los cambios en el área total del enterocito, se observó un aumento del área de aproximadamente 1.3 veces en todas las concentraciones de rebaudiósido A en comparación con el grupo control. Sin embargo, es importante mencionar que en el grupo de 10µM, el aumento de la longitud y área fue ligeramente menor a todos los demás grupos de intervención (Figura 10 A, B). En comparación con el cultivo estimulado con distintas concentraciones de glucosa, las células en condiciones de rebaudiósido A parecen incrementar el distanciamiento entre células, pero sin ser tan evidente como el



cultivo de glucosa, lo cual podría estar relacionado con una disfunción en la capacidad de uniones estrechas entre las células (Figura 6 y 9).



**Figura 9. Células IEC-6 estimuladas a distintas concentraciones de rebaudiósido A.** Las células epiteliales de intestino que fueron condicionadas a diferentes cantidades de rebaudiósido A mostraron un incremento en la longitud de todas las condiciones tratadas ( $p < 0.001$ ) así como para su área ( $p < 0.001$ ). Las células intestinales de epitelio con el aumento de longitud y área mostraron hipertrofia en presencia del edulcorante natural rebaudiósido A. (Magnificación 200x, barra de escala = 10µm).

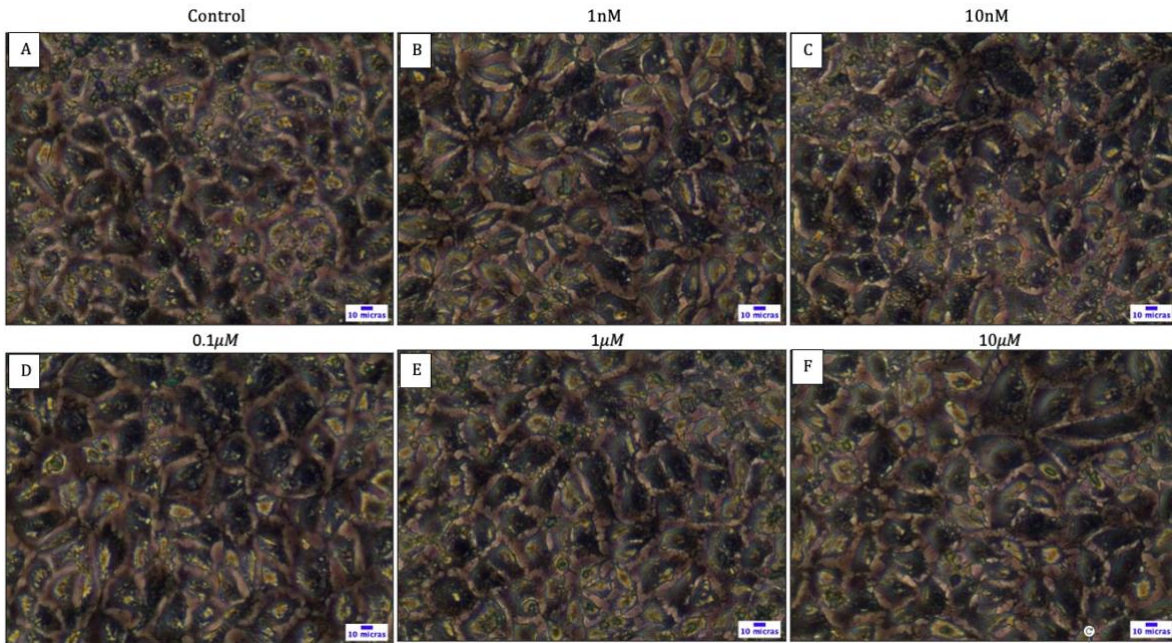


**Figura 10. Rebaudiósido A indujo hipertrofia en las células intestinales IEC-6.** A) Todas las concentraciones a las que se estimularon las células mostraron un incremento en la longitud (\*\* $p < 0.001$ ) respecto al grupo control después de 24h de estímulo. B) Los enterocitos en presencia de rebaudiósido A mostraron un incremento del área respecto al grupo control posterior a 24h (\*\* $p < 0.001$ ).

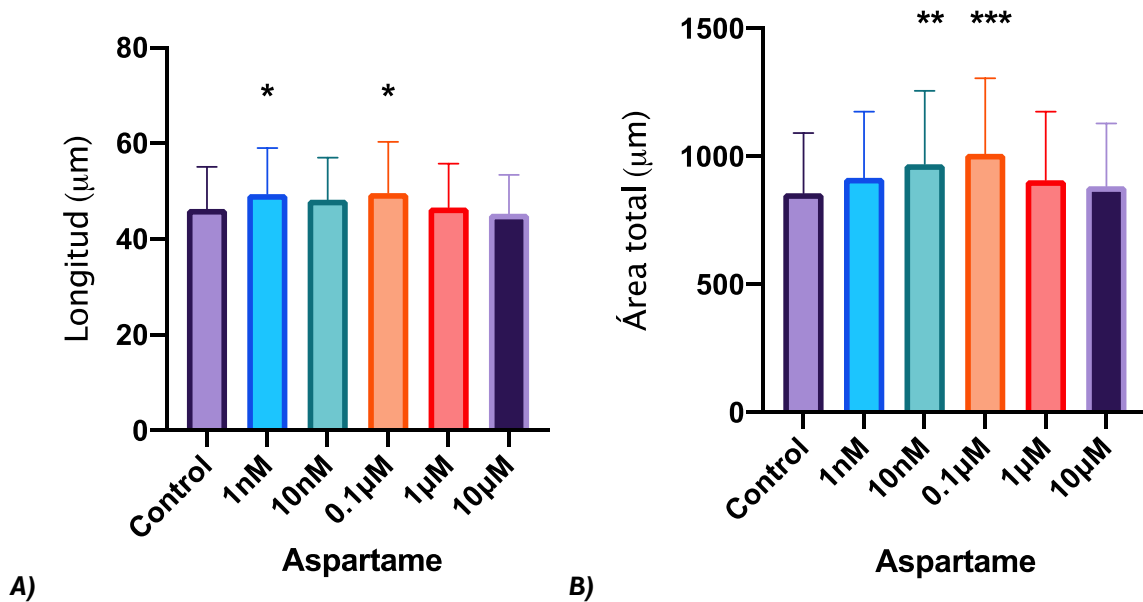
### 7.2.2 Aspartame.

El aspartame, un edulcorante no nutritivo artificial popular en la industria alimentaria por incluirse en la mayoría de las bebidas saborizadas, tiene la menor capacidad de endulzar en comparación a los demás edulcorantes usados. El aspartame es aproximadamente 200 veces más dulce que el azúcar, sin capacidad de proporcionar energía (81). Por lo que, para conocer la capacidad de este edulcorante para inducir hipertrofia, se estimularon enterocitos IEC-6 con diferentes concentraciones de aspartame durante 24h para después ser fijados y teñidos (Figura 11). Los resultados de las imágenes analizadas mostraron que a concentraciones de 1nM y 0.1μM se indujo un incremento de la longitud de las células en comparación con el grupo control (**Control=46.3±8.80μm; 1nM=49.4±9.63μm; 0.1μM=49.6±10.7μm; p<0.05**) (Figura 11 y 12), siendo aproximadamente 3.14μm mayor la longitud en 1nM que el grupo control, y aproximadamente 3.3μm para 0.1μM (Figura 12A). Las condiciones de 10nM, 1μM y 10μM mantuvieron una longitud similar al grupo control sin mostrar significancias relevantes (**Control=46.3±8.80μm; 1nM=49.4±9.63μm; 10nM=48.2±8.82μm; 0.1μM= 49.6±10.7μm; 1μM=46.7±9.11μm; 10μM=45.3±8.15μm**) (Figura 11 y 12).

En el caso del área total se observó que en el enterocito en los grupos 10nM y 0.1μM incrementaron su área en comparación al grupo control (**Control=857±236μm; 1nM=916±260μm; 10nM=971±286μm; 0.1μM=1010±295μm; 1μM=908±268μm; 10μM=884±245μm**) (Figura 11 y 12). Aunque el aspartame no mostró cambios relevantes, en todos los grupos de intervención parece demostrarse que el cultivo de 0.1 μM se tiene los mayores cambios en el cultivo, pues incrementó tanto de longitud como del área total (Figura 12). Por otra parte, este edulcorante parece tener mayor capacidad para modificar el área total de las células que genera un crecimiento longitudinal.



**Figura 11. Células IEC-6 a distintas concentraciones de aspartame.** Los enterocitos IEC-6 a los que se les añadió el aspartame, una vez fijados y teñidos mostraron un incremento de la longitud en las condiciones de 1nM y 0.1µM ( $p < 0.05$ ). En relación con el área total las células mostraron hipertrofia para 10nM ( $p < 0.01$ ) y 0.1µM ( $p < 0.001$ ). (Magnificación 200x, barra de escala = 10µm).

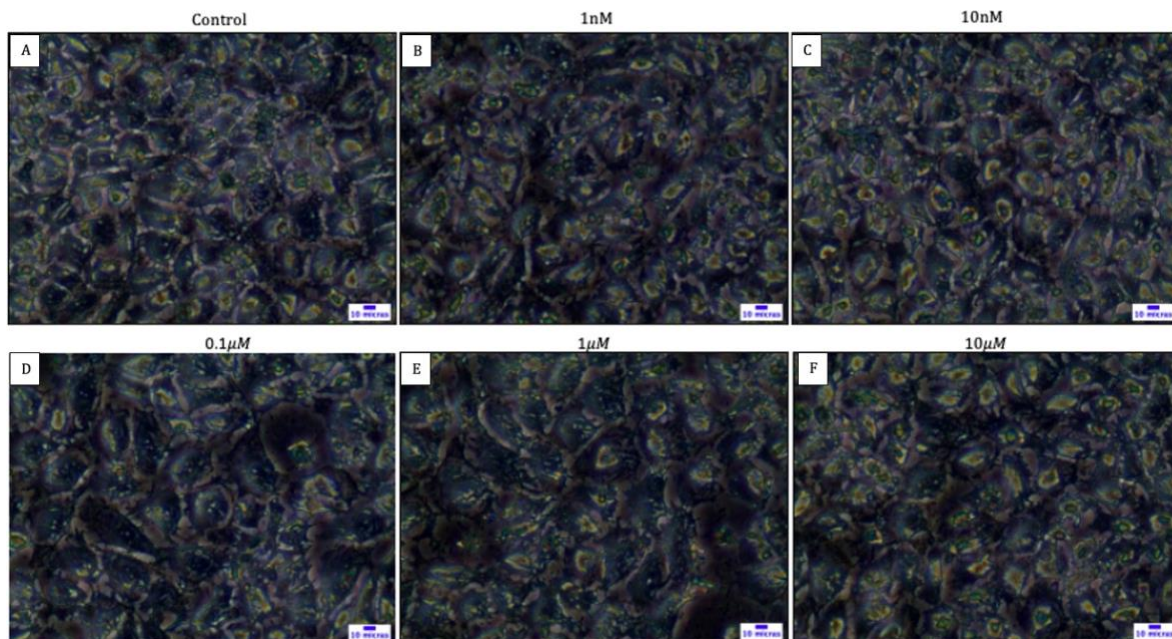


**Figura 12. Efecto de las distintas concentraciones de aspartame en la morfología de células intestinales (IEC-6).** A) Los enterocitos después de 24h de incubación a diferentes concentraciones de aspartame mostraron un efecto en la longitud con las concentraciones de 1nM y 0.1µM, en relación con el grupo control ( $p < 0.05$ ). B) La línea células IEC-6 estimulada con aspartame incremento su área en condiciones de 10nM (\*\* $p < 0.01$ ) y 0.1µM (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), en relación con el grupo control.

### 7.2.3 Sucralosa.

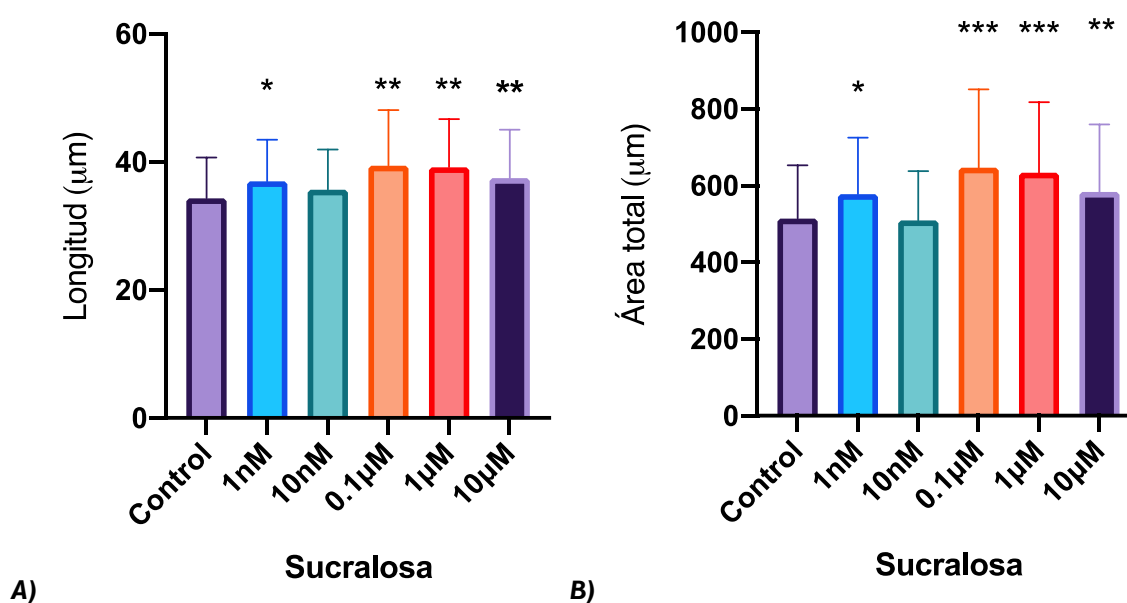
El cultivo de células epiteliales IEC-6 fue estimulado con sucralosa en las mismas concentraciones que el rebaudiósido A y aspartame. Posterior a 24h de incubación, se logró observar un incremento importante en la longitud para las concentraciones de 1nM, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M respecto al grupo control (**Control=34.3 $\pm$ 6.36 $\mu$ m; 1nM=37.0 $\pm$ 6.52 $\mu$ m; 10nM=35.7 $\pm$ 6.28 $\mu$ m; 0.1 $\mu$ M=39.4 $\pm$ 8.66 $\mu$ m; 1 $\mu$ M=39.2 $\pm$ 7.54 $\mu$ m; 10 $\mu$ M=37.5 $\pm$ 7.56 $\mu$ m**) (Figura 13 y 14) (64).

Cuando se analizó el posible efecto de este edulcorante en el área del enterocito, se observó que la sucralosa promovió un aumento del área total celular en la mayoría de las condiciones usadas, los efectos sólo fueron significativos para los casos de 1nM, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, el único grupo de experimentación que no mostró un efecto fue para 10nM (**Control=515 $\pm$ 139 $\mu$ m; 1nM=578 $\pm$ 147 $\mu$ m; 10nM=510 $\pm$ 128 $\mu$ m; 0.1 $\mu$ M=647 $\pm$ 204 $\mu$ m; 1 $\mu$ M=634 $\pm$ 185 $\mu$ m; 10 $\mu$ M=583 $\pm$ 176 $\mu$ m**) (Figura 14B). Los enterocitos que modificaron su longitud también lo hicieron en el área total, algo similar a lo que se observó en los cultivos en condiciones de rebaudiósido A. La línea celular en condiciones de 0.1 $\mu$ M y 1 $\mu$ M hipertrofió aproximadamente 1.2 veces más en comparación al grupo control (Figura 13).



**Figura 13. Células IEC-6 estimuladas a distintas concentraciones de sucralosa.** La línea celular IEC-6 fue fijada y teñida para conocer los cambios en la morfología que la sucralosa podía generar. Los enterocitos de rata hipertrofiaron en las condiciones de 1nM, 0.1 $\mu$ M, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M en comparación con el grupo control. (Magnificación 200x, barra de escala =10 $\mu$ m).

Los edulcorantes no nutritivos tanto naturales como artificiales mostraron un efecto en el incremento de la longitud y área total del enterocito, algo muy similar a lo que se observó con los grupos de glucosa *in vitro*. Aunque la acción de cada uno de los edulcorantes no nutritivos fue diferente, todos coincidieron con la hipertrofia del grupo estimulado con 0.1µM. La sucralosa y el rebaudiósido A, endulzantes no calóricos empleados en una alta gama de alimentos en el mercado fueron los que mostraron mayor porcentaje de hipertrofia, aumentando el tamaño del enterocito. Es importante destacar que, el rebaudiósido A fue el edulcorante que indujo mayor incremento de longitud y área en los enterocitos IEC-6.



**Figura 14: Efecto de las diferentes concentraciones de sucralosa en la línea celular IEC-6.** A) El efecto de las distintas concentraciones de sucralosa promovieron incremento de la longitud de células intestinales en comparación con el grupo control en todas las concentración de 1nM (\* $p < 0.05$ ) seguido de 0.1µM, 1µM y 10µM (\*\* $p < 0.01$ ) B) Las distintas concentraciones de sucralosa en el área de las células intestinales (IEC-6), mostraron un incremento en condiciones de 1nM ( $p < 0.05$ ), 0.1µM, 1µM (\*\* $p < 0.001$ ) y 10µM (\*\* $p < 0.01$ ).

### 7.3 Efectos en la migración células del enterocito en la línea celular IEC-6 con distintas concentraciones de edulcorantes no nutritivos (*ensayo de cicatrización de herida*).

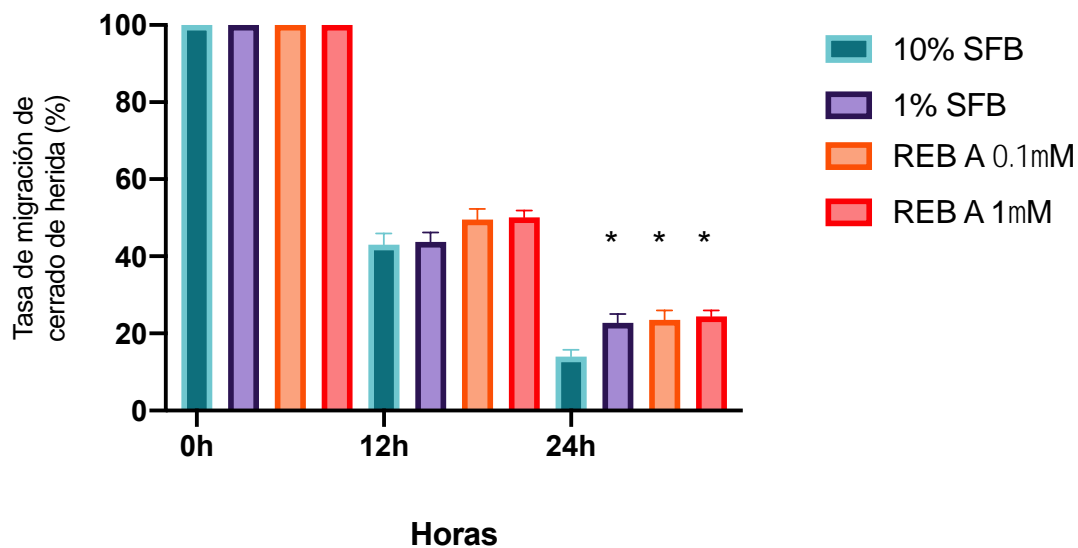
El epitelio del intestino se ha descrito como uno de los tejidos con mayor capacidad para renovarse, dentro de ello se incluye la capacidad esencial de las células para cerrar heridas (82). Esta capacidad se fundamenta en la migración celular impulsada por la división celular

o presión mitótica (82). Por otra parte, la migración de las células o su motilidad es esencial para mantener la organización de los órganos y se ha relacionado con cambios en la morfogénesis de la célula (10,82,83). Para conocer si los ENN tuvieron la facultad de disminuir la migración celular de las células IEC-6 *in vitro*, se realizó el ensayo de cicatrización de herida, e intentar relacionar si la hipertrofia de la línea celular, que anteriormente se presentó, podría vincularse con la disfunción en la motilidad del enterocito, modificando su capacidad del cerrado de herida. El efecto de los cambios en la migración del enterocito fue evaluado en condiciones de 0.1 y 1 $\mu$ M, ya que en nuestros resultados del experimento de morfología estas concentraciones de ENN mostraron un cambio en la longitud y área.

### 7.3.1 Rebaudiósido A.

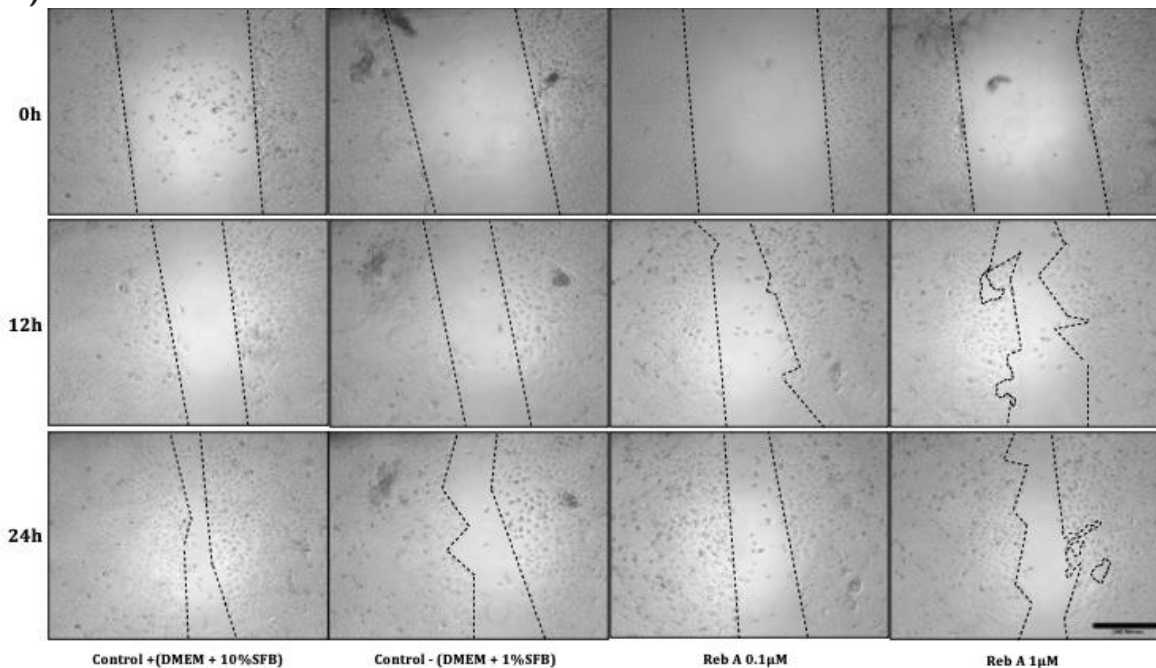
El efecto del rebaudiósido A fue evaluado en concentraciones de 0.1 y 1 $\mu$ M del edulcorante en un modelo *in vitro* monocapa de la línea celular IEC-6. Se realizó una herida o scratch (rasguño) en el cultivo. La capacidad migratoria se evaluó en relación con el tiempo 0h mediante el espacio de cierre de la herida en 12 y 24h posteriores del scratch. El análisis de las imágenes mostró que las concentraciones usadas, tuvieron un efecto inhibitorio solo después de 24h en las células IEC-6 en relación con el grupo control (**Control+=14.1 $\pm$ 6.58 $\mu$ m; Control-=22.8 $\pm$ 8.61 $\mu$ m; 0.1 $\mu$ M=23.6 $\pm$ 9.42 $\mu$ m; 1 $\mu$ M=24.5 $\pm$ 5.81 $\mu$ m; p>0.05**) (Figura 15 A). El cerrado de herida en el grupo estimulado con 0.1 $\mu$ M de Rebaudiósido A fue aproximadamente 9.48% menor que el control (Figura 15). En el grupo estimulado con 1 $\mu$ M de este edulcorante, el cerrado fue de 10.39% menor que el grupo control (Figura 15). Cuando el cultivo estuvo sometido a 12h con rebaudiósido A no se lograron encontrar cambios importantes para ninguna de las concentraciones (**Control+=43 $\pm$ 11.2 $\mu$ m; Control-=43.8 $\pm$ 9.21 $\mu$ m; 0.1 $\mu$ M=49.4 $\pm$ 10.6 $\mu$ m; 1 $\mu$ M=50.2 $\pm$ 6.62 $\mu$ m**) (Figura 15A).

### Rebaudiósido A



A)

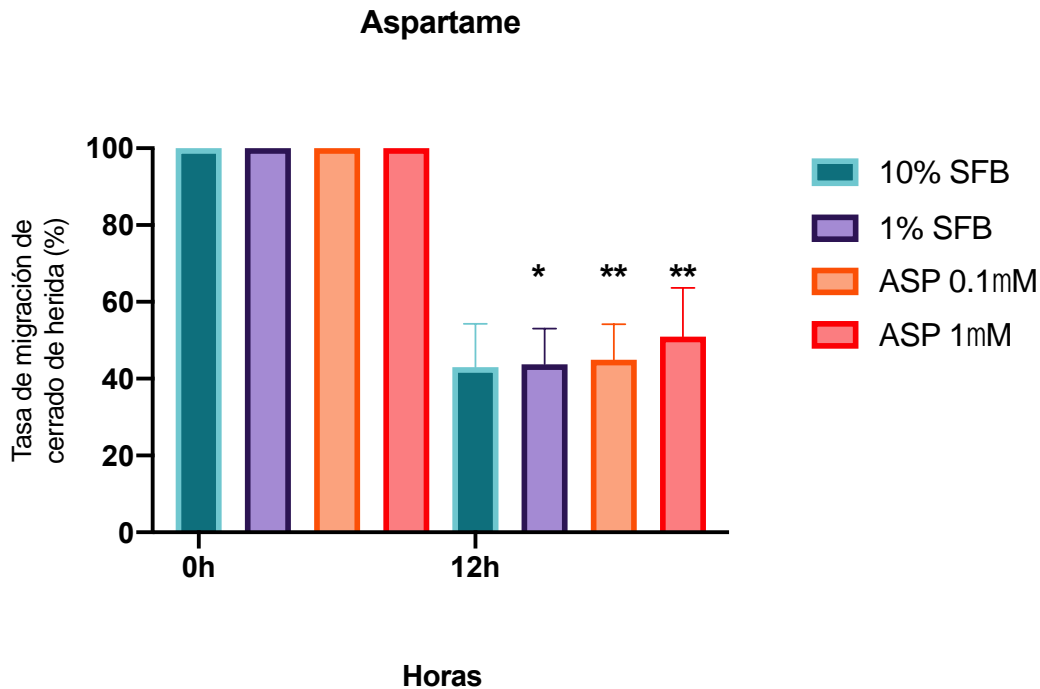
B)



**Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de rebaudiósido A en la migración de células IEC-6.** A) Efecto en la tasa de migración de las células intestinales después del ensayo de herida a 12 y 24h con concentraciones de 0.1µM y 1µM de rebaudiósido A, con cambios después de 24h en 0.1µM y 1µM de rebaudiósido A en relación al grupo control (10%SFB) (\*p<0.05), sin cambios migratorios a las 12h. B) Cambios de la migración celular a tiempo de 0, 12 y 24h con concentraciones de 0.1µM y 1µM de rebaudiósido A (Magnificación 100x, barra de escala =100µm).

### 7.3.2 Aspartame.

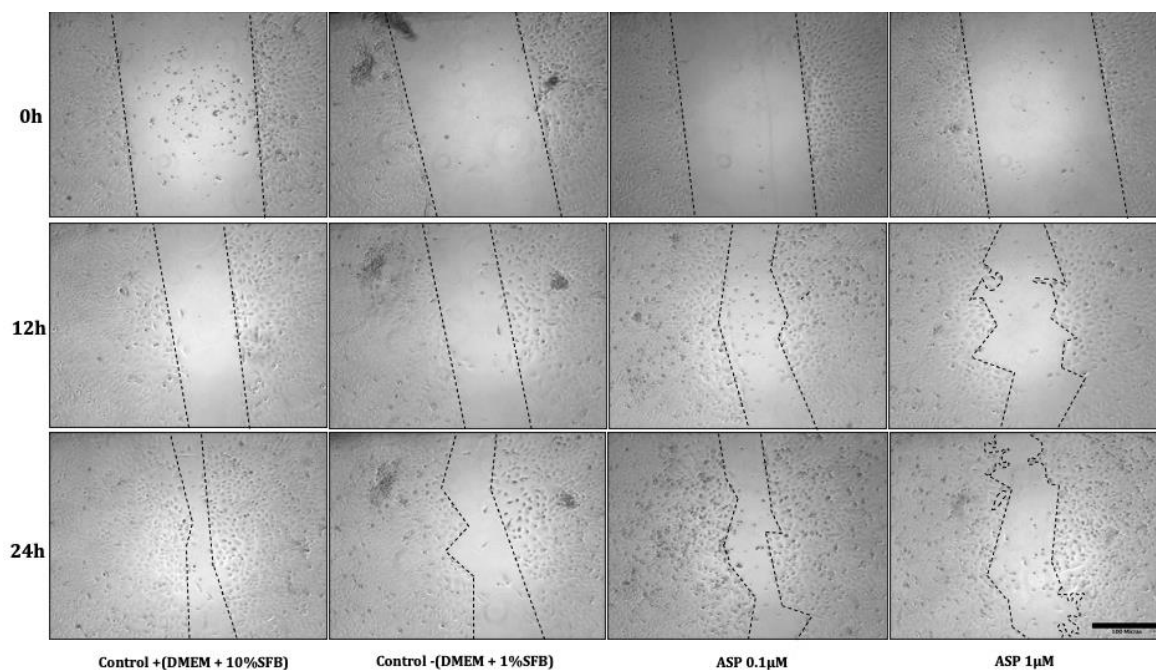
Para conocer el efecto del aspartame en la migración celular de los enterocitos, las células IEC-6 fueron estimuladas a concentraciones de  $0.1\mu\text{M}$  y  $1\mu\text{M}$  durante 24h para después realizar un ensayo de cierre de herida. El comportamiento migratorio fue evaluado a 12 y 24h después de la herida, en relación con el tiempo 0h. Las mediciones del cerrado de herida mostraron que el aspartame disminuyó la migración de los enterocitos en ambas concentraciones después de 24h con relación al grupo control (**Control+= $14.1\pm 6.58\mu\text{m}$ ; Control-= $22.8\pm 8.61\mu\text{m}$ ;  $0.1\mu\text{M}=\mathbf{25.8\pm 4.25\mu\text{m}}$ ;  $1\mu\text{M}=\mathbf{31.9\pm 8.45\mu\text{m}}$ ) (Figura 16A). La disminución de capacidad de cierre fue aproximadamente de 11.7% para el grupo  $0.1\mu\text{M}$  vs. control y de 17.8% menor para la concentración de  $1\mu\text{M}$  (Figura 16 A). Para el tiempo de 12h el grupo estimulado no mostró diferencias con el grupo control en ninguna de las condiciones (**Control+= $43.0\pm 11.2\mu\text{m}$ ; Control-= $43.8\pm 9.21\mu\text{m}$ ;  $0.1\mu\text{M}=\mathbf{45.0\pm 9.26\mu\text{m}}$ ;  $1\mu\text{M}=\mathbf{50.9\pm 12.7\mu\text{m}}$ ) (Figura 16 A).****



A)



B)

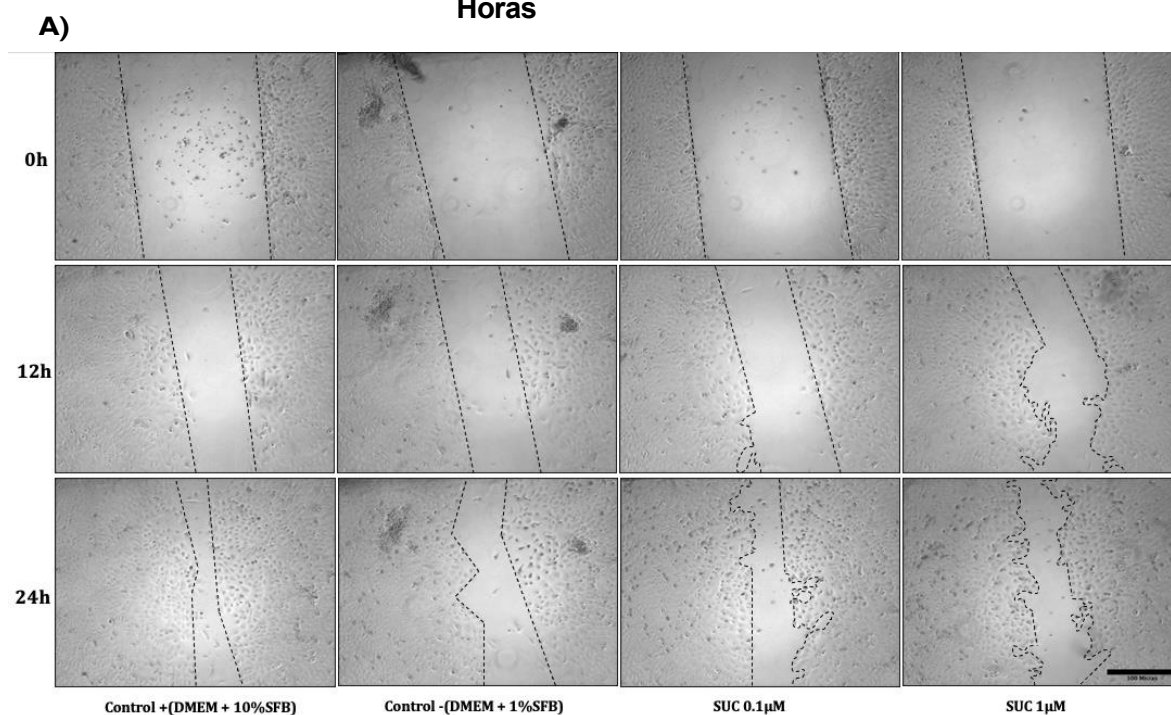
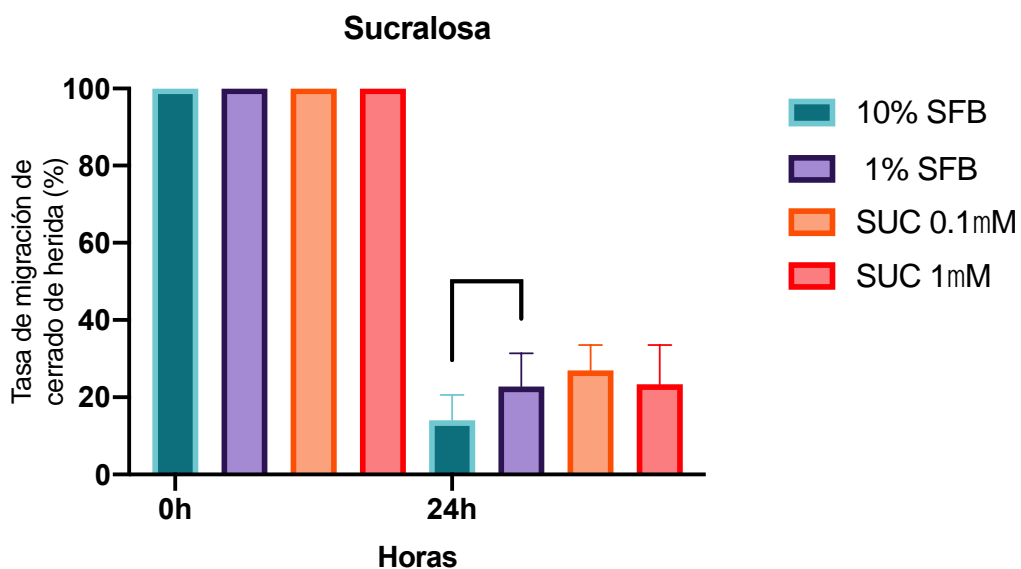


**Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de aspartame en la migración de células IEC-6.** A) Efecto en la tasa de migración de las células intestinales después del ensayo de herida a 12 y 24h con concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de aspartame, con diferencias entre el grupo control + con ambos grupos de intervención (\*\* $p < 0.01$ ). B) Cambios en la migración relativa de la línea celular IEC-6 con concentraciones de 0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$  de aspartame por 0, 12 y 24h. (Magnificación 100x, barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ ).

### 7.3.3 Sucralosa.

Por otra parte, para conocer el efecto de otro edulcorante artificial en la migración de cultivo de células epiteliales del intestino se utilizó la sucralosa en las mismas concentraciones usadas para el aspartame y rebaudiósido A (0.1  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{M}$ ). Los resultados encontrados fueron similares entre edulcorantes, ya que las células sólo mostraron cambios para el tiempo de 24h en contraste con el grupo control (**Control+=14.1 $\pm$ 6.58  $\mu\text{m}$ ; Control-=22.8 $\pm$ 8.61  $\mu\text{m}$ ; 0.1  $\mu\text{M}$ = 26.9 $\pm$ 6.64  $\mu\text{m}$ ; 1  $\mu\text{M}$ =23.4 $\pm$ 10.2  $\mu\text{m}$ ) (Figura 17 A). Las diferencias entre el grupo control y 0.1  $\mu\text{M}$  fue aproximadamente de 12.88%, mientras que para el grupo estimulado con sucralosa a 1  $\mu\text{M}$  fue de 9.29% vs control. Con relación a la exposición del cultivo durante 12h con sucralosa no se encontraron significancias, similar a lo que sucedió en el aspartame y sucralosa (**Control+=43.0 $\pm$ 11.2  $\mu\text{m}$ ; Control-=43.8 $\pm$ 9.21  $\mu\text{m}$ ; 0.1  $\mu\text{M}$ =50.5 $\pm$ 8.41  $\mu\text{m}$ ; 1  $\mu\text{M}$ =46.0 $\pm$ 12.4  $\mu\text{m}$ ) (Figura 17 A). Los resultados obtenidos por los ensayos de herida con los diferentes edulcorantes sugieren que tanto el rebaudiósido A, aspartame y sucralosa tienen un efecto en el cultivo celular retrasando el cerrado del scratch en comparación al grupo****

control a las 24h. Ninguno de los edulcorantes a las concentraciones usadas, mostró cambios significativos para el aumento o la disminución del cerrado de herida en 12h de estimulación. Los cambios para disminución del cerrado de herida fueron más evidentes en los cultivos de 24 de sucralosa a 0.1μM y aspartame a 1μM.



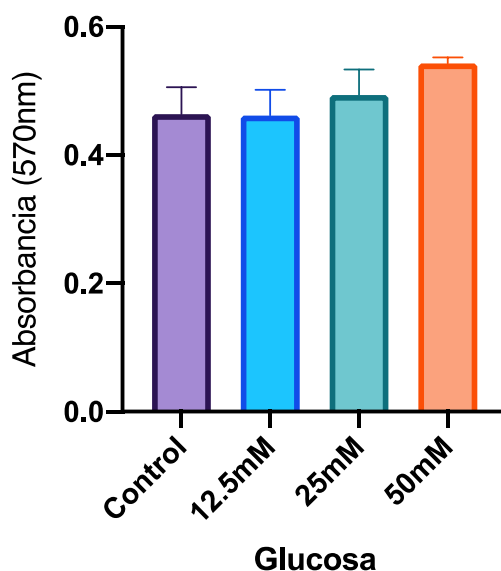
**B)**

**Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de sucralosa en la migración de células IEC-6.** A) Efecto en la tasa de migración de las células intestinales después del ensayo de herida a 12 y 24h con concentraciones de 0.1μM y 1μM de sucralosa, se demostró entre el grupo control + y con ambos grupos de intervención de 0.1μM (\*\*p>0.001) y 1μM (\*\*p>0.01). B) Cambios en la migración de la

línea celular IEC-6 con concentraciones de 0.1  $\mu$ M y 1  $\mu$ M de sucralosa a 0, 12 y 24h. (Magnificación 100x, barra de escala = 100  $\mu$ m).

#### 7.4 Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).

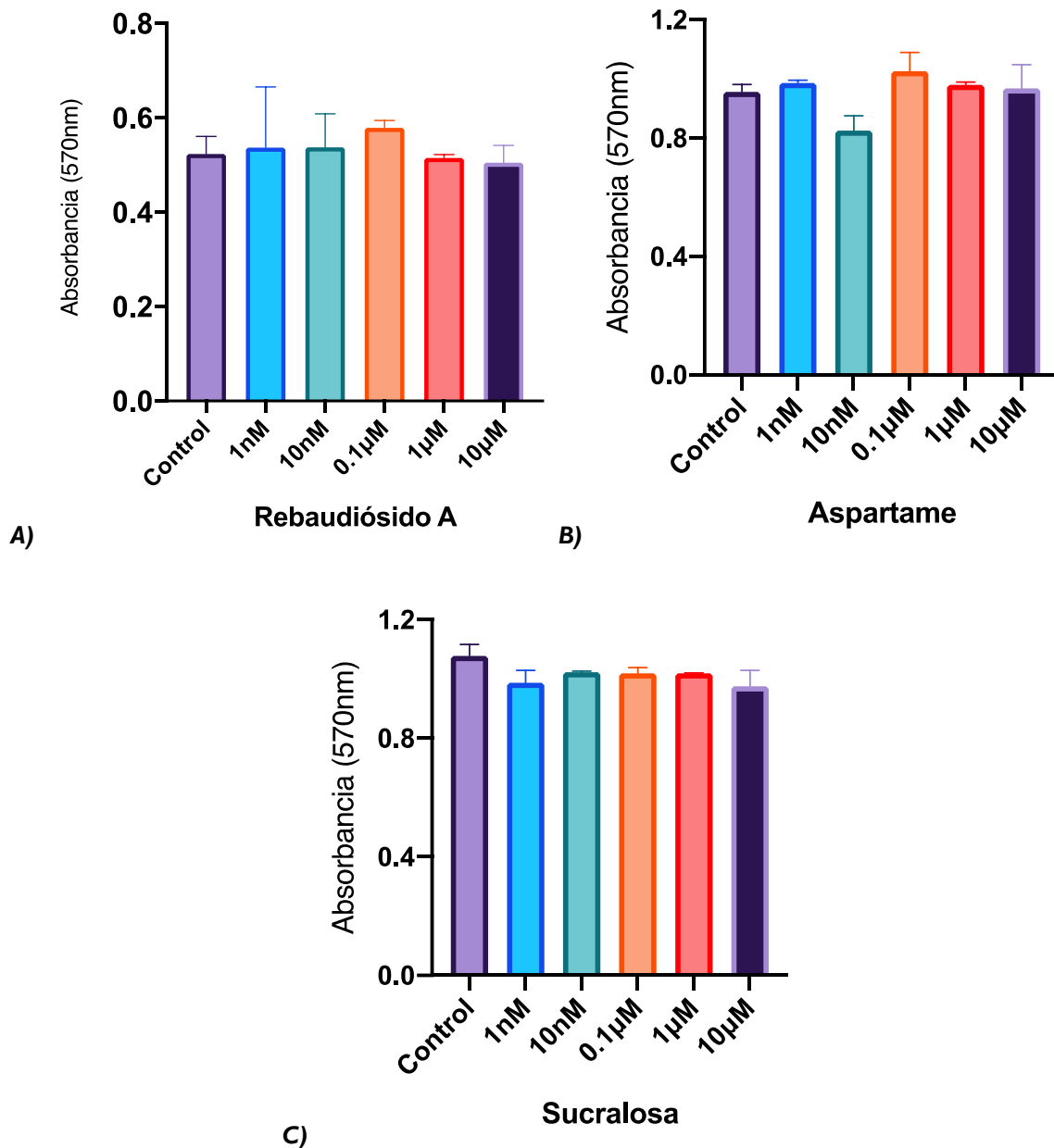
Para determinar el efecto citotóxico y conocer la viabilidad de la línea celular IEC-6 en nuestro modelo de hiperglucemia, los enterocitos fueron estimulados con distintas concentraciones de glucosa (12.5mM, 25mM y 50mM) durante 24h en incubación. El efecto tóxico de la glucosa se evaluó por ensayo de MTT. Los resultados mostraron que a ninguna de las concentraciones causó decremento significativo en la viabilidad celular en relación con el grupo control (Figura 18).



**Figura 18. Viabilidad celular del modelo de hiperglucemia.** La línea celular IEC-6 tratada con diferentes concentraciones de glucosa después de 24h no mostró efectos citotóxicos en presencia de glucosa a 12.5mM, 25mM y 50mM. La viabilidad de los enterocitos se evaluó por ensayo de MTT a una absorbancia de 570nm, el análisis se hizo con la prueba estadística ANOVA1 vía, prueba post hoc Dunnet.

Por otra parte, el análisis para evaluar la capacidad citotóxica que tienen los ENN empleados en el estudio de morfología y migración celular de los enterocitos se estimularon durante 24h con las distintas concentraciones de cada uno de los edulcorantes (rebaudiósido A, aspartame y sucralosa). El ensayo de MTT mostró que ninguno de los edulcorantes disminuyó significativamente la viabilidad de los enterocitos IEC-6 (Figura 14-A, B, C), por lo que las

concentraciones usadas en los experimentos no tuvieron una capacidad citotóxica en los cultivos de la línea celular IEC-6.



**Figura 19: Viabilidad celular de enterocitos IEC-6 con distintas concentraciones de ENN.** A) Las células tratadas con concentraciones de 1nM, 10nM, 0.1µM, 1µM y 10µM, con rebaudiósido A no mostraron un efecto citotóxico después de 24h de incubación. B) En los enterocitos sometidos durante 24h al aspartame en condiciones de 1nM, 10nM, 0.1µM, 1µM y 10µM, no mostraron citotoxicidad en presencia del ENN. C) Las concentraciones de 1nM, 10nM, 0.1µM, 1µM y 10µM de sucralosa generaron cambios importantes en la viabilidad de la línea celular IEC-6. La viabilidad celular se evaluó por ensayo de MTT a una absorbancia de 570nm.

## 8 Discusión

Las tendencias de alimentación en la población y su relación con el desarrollo de enfermedades como la obesidad y la prevalencia de ECD han generado nuevas estrategias para conocer sus alcances negativos en el organismo, así como medios para originar nuevo conocimiento que mejoren su tratamiento y proponer nuevas estrategias que promuevan mejores técnicas para disminuir su prevalencia o disminuir sus comorbilidades. En relación con ello, se ha especulado sobre el intestino y su vinculación con el deterioro o mejoramiento de enfermedades como la obesidad, ya que se ha descrito que coordina procesos metabólico-hormonales, inmunológicos, etc., por lo que parte del objetivo del primer experimento de esta investigación fue determinar si en presencia de distintas concentraciones de glucosa existía un cambio en la morfología de las células epiteliales.

El intestino delgado, constituido principalmente por enterocitos, interactúa con los nutrientes de la dieta en el lumen intestinal y tiene una importante función en la absorción de glucosa (84). La línea celular IEC-6, proveniente de intestino de rata, tiene un constante crecimiento y una forma poligonal similar a los adoquines de piedra. Este tipo de células se conecta entre sí por las membranas laterales agrupándose de manera homogénea. Las células cuentan con un núcleo alargado de forma ovoide y poseen microvellosidades principalmente en la superficie o en un polo de la célula (85,86).

En los primeros resultados obtenidos se encontró que en el grupo con alta concentración de glucosa (50mM) incrementó el tamaño, aumentando longitud y área de los enterocitos del cultivo en comparación con los demás grupos. Los cambios morfológicos de las células del grupo estimulado con 50mM de glucosa lucieron diferentes en cuanto a la estructura poligonal que caracteriza a las células IEC-6, generando enterocitos más grandes y alargados con cambios en la unión entre células lo que podría propiciar la pérdida de comunicación entre ellas o relacionarse con una disfunción de barrera. En relación con lo observado, Thaiss y colaboradores determinaron resultados similares con la adición de concentraciones elevadas de glucosa después de 24h, 48h y 72h en células Caco-2, donde las células manifestaron visualmente un aumento de la tortuosidad y una apariencia alterada de la unión entre células (48). De esta misma manera, en modelos murinos de diabetes en periodo neonatal con presencia de hiperglicemia, se mostró un incremento en el peso y el largo del intestino delgado (48). Las capas de músculo y la submucosa en duodeno de ratas con

diabetes mostraron ser más gruesas que el grupo control, por lo que podría relacionarse con el aumento del área de la célula (87). Los cambios encontrados en estudios podrían apoyar los resultados descritos en nuestro modelo de hiperglucemia estimulados a 25mM y 50mM. En queratinocitos, otro tipo de células epiteliales, también se encontró que niveles elevados de glucosa indujeron a una morfología más larga y aplanada perdiendo su orientación en comparación al grupo, con bajas concentraciones de glucosa (88). Asimismo, un estudio realizado en 2018 por Li y colaboradores demostraron que en astrocitos cultivados a concentraciones elevadas de glucosa las células se encontraban más planas y extendidas (89), lo que podría sustentar los resultados hallados en la presente investigación sobre el aumento longitudinal e incremento del área de los enterocitos a altas concentraciones de glucosa. Como parte del modelo de hiperglucemia se realizó el ensayo de viabilidad celular para conocer si alguna de las concentraciones estaba afectando a las células IEC-6 y se observó que a estas condiciones no existió un efecto citotóxico.

Por otro lado, la literatura señala que la adición de concentraciones elevadas de glucosa en células de intestino grueso Caco-2 inducen a un aumento del estrés oxidativo (ROS), disminución de la actividad antioxidante y el incremento de probabilidad de apoptosis principalmente en concentraciones a 50mM (79). El estrés oxidativo asociado a las altas concentraciones de glucosa y su relación con la sobreexpresión de TNF- $\alpha$  con respuesta inflamatoria, genera cambios en la permeabilidad intestinal y diferencias en la función de la barrera epitelial haciéndola más propensa a infecciones por bacterias, por lo que modelos de hiperglucemia en líneas celulares pueden aportar un análisis importante en relación con la viabilidad celular en presencia de glucosa y los efectos que pueda ocasionar entre las células que permitan la correcta homeostasis del intestino (79,90).

En relación con el efecto que podrían estar ocasionando los ENN en las células epiteliales del intestino delgado, el objetivo del estudio fue determinar cómo estos aditivos cambiaban la morfología del enterocito. Esto, debido a que los ENN que son comúnmente incluidos solos, en productos light o en conjunto con el azúcar en productos alimentarios industrializados como bebidas endulzadas, refrescos dietéticos, yogurts, postres, goma de mascar, entre otros (57). Su amplia utilidad se ha tornado excesiva debido a su capacidad de intensificar el sabor dulce, mejorar el sabor de los alimentos, aumentar la aceptabilidad en el consumidor y disminuir los costos de producción de muchos productos que los incluyen,

generado su popularización y, por consiguiente, formar parte de la dieta de la mayoría de los compradores de alimentos procesados y como complemento de una dieta baja en azúcares (57,91).

Para este trabajo fueron seleccionados los edulcorantes con mayor popularidad dentro de la industria alimentaria: sucralosa, aspartame y como edulcorante no nutritivo natural se eligió un derivado de la stevia, el rebaudiósido A, ya que es uno de los componentes más abundantes en esta planta, incluyéndose como un novedoso edulcorante (23). En relación con estos ENN, se evaluaron los efectos de los aditivos en la viabilidad celular de la línea celular IEC-6 por ensayo de MTT, los resultados demostraron que los ENN no tenían un efecto citotóxico en cultivo a las concentraciones establecidas. Resultados similares fueron descritos en estudios realizados en otras líneas celulares de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231) y células de derrame pleural con adenocarcinoma (SKBR3) con steviosida a concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 $\mu$ M (92). Por otra parte, la línea celular de retina humana tampoco mostró un efecto citotóxico después de exponerse 6h con 0.1mM de sucralosa (93). Con relación al aspartame, en un estudio realizado en células Caco-2 se evaluó la citotoxicidad del cultivo en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 $\mu$ M, donde después de 24h se mostró un aumento de la citotoxicidad para las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu$ M (94). En otro cultivo de Caco-2 con concentraciones comprendidas entre 0.1 y 10000 $\mu$ M de sucralosa o aspartame, sólo se encontraron cambios en el grupo de 1000 $\mu$ M de sucralosa, incrementando la viabilidad del cultivo (73).

En el presente estudio, se determinaron los cambios en la morfología del enterocito en presencia de ENN, donde rebaudiósido A mostró que las células expuestas a las distintas concentraciones incrementaron la longitud y el área total en todas las condiciones. En este sentido, se encontró que el rebaudiósido A fue capaz de inducir hipertrofia del enterocito en comparación con el grupo control. La evidencia sobre el efecto que puede tener el rebaudiosida A en la morfología celular es escasa. Sin embargo, se ha sugerido su capacidad para irrumpir la composición de la microbiota a nivel intestinal y su efecto secretor de péptidos como el GLP-1 y PYY (73). Van der Wielen y colaboradores en 2016, estimularon el intestino delgado de ratones C57BL/6J con 10mmol/L de rebaudiósido A, demostrando que después de una 1h de adicionarse el edulcorante, existió un incremento de la secreción de GLP-1 y PYY. Por otra parte, el rebaudiósido A durante 18 h incrementó la expresión de

mRNA de Cromogranina A, sugiriendo que el edulcorante tenía un efecto en el incremento del número de células enteroendócrinas (66,73).

Resultados similares fueron observados por Ngekure M.X y colaboradores (2019), en donde demostraron que en la morfología ovárica de ratones hembra suplementadas con sacarina de sodio y rebaudiósido A, incrementó el número de cuerpos lúteos (95). Además, observaron que el grupo suplementado con rebaudiósido A incrementó el peso del útero en la fase de diestro (95). Aunque aún no está descrito el mecanismo o no exista suficiente evidencia de la hipertrofia de células epiteliales de intestino en presencia de rebaudiósido A, la literatura señala que este edulcorante natural tiene efectos en las células y tienen la capacidad de generar cambios en ellas. Sin embargo, es necesario analizar más marcadores moleculares en relación con cambio morfológicos, comunicación celular y migración.

Por otra parte, los enterocitos estimulados con aspartame en el cultivo solo mostraron un incremento de la longitud a la concentración de 1nM y 100nM. De la misma forma, se encontraron cambios del área total sólo en las concentraciones de 10nM y 100nM, mostrando células que han empezado a modificar su agrupación y observándose hipertrofiadas en comparación con el grupo control. En un estudio publicado en el 2018 reportaron que la suplementación de corderos recién nacidos con 200 mg/kg de aspartame durante 35 días, propicio que el intestino incrementara de tamaño en relación con el peso total del animal (96). Por otra parte, en este mismo estudio se encontró un aumento en el peso del yeyuno y la relación del peso del yeyuno/peso vivo, sin embargo, esto no sucedió en las 2 porciones restantes del intestino (96). Aunque en el estudio no se evaluó la morfología de la célula intestinal, el incremento del peso de la porción del intestino que fue evaluado con las células IEC-6 (obtenidas de intestino delgado) puede ofrecer un acercamiento a lo que el aspartame está ocasionando en un organismo más complejo.

En el estudio de Sun y colaboradores (2019), cuyo objetivo era determinar cómo podría comportarse la morfología interna del órgano en suplementación con aspartame, encontraron que el yeyuno incrementó la profundidad de sus criptas, haciendo vellosidades aparentemente más largas (96), lo cual lo relacionaron con mayor capacidad de absorción del órgano (96). La interpretación de estos datos se asocia a que, en patologías como la obesidad parece generar un incremento de la proliferación de células intestinales, creando vellosidades más alargadas que tendrán mayor capacidad de absorción de nutrientes (97). Aunque no se puede



extrapolar este resultado en el modelo de aspartame del presente estudio, ya que no se encontró un incremento de la proliferación celular en cultivo y a pesar de que no se evaluó la capacidad de absorción del enterocito con ENN, se demostró que el aspartame está generando cambios en la células intestinales. Aunque la evidencia es limitada sobre los cambios en la morfología intestinal con ENN, un estudio realizado en células carcinógenas de colon estimuladas con aspartame reportó un decremento en el número de lamelipodias (94), las cuales están estrechamente relacionadas con el movimiento de las células, migración celular, división celular y señalización celular (16,22), siendo probablemente una de las vías para el cambio en la forma de las células (98). Sorprendentemente, hallazgos por Maghiari y colaboradores (2020), en células de cáncer de colon humano estimuladas con aspartame durante 72h en bajas concentraciones, no mostraron alteración en su forma, confluencia o la capacidad de adherirse (99). Sin embargo, las células estimuladas con altas concentraciones disminuyeron su confluencia (99).

Cuando el enterocito fue condicionado a sucralosa durante 24h, nuestros resultados mostraron cambios notables en la morfología celular. Las células se hipertrofiaron en la mayoría de las condiciones. En contraste, existen reportes contrarios a nuestros resultados en donde no se observan cambios importantes en la morfología de eritrocitos extraídos de ratas *Wistar* tratadas con sucralosa comercial por 60 y 120 minutos (100). Estas diferencias podrían existir debido al tiempo en el que fueron expuestos los animales y al hecho de que las células epiteliales intestinales se encuentran en contacto directo con los componentes de la dieta, condicionándolos a mayor interacción con estos aditivos (13).

Por el contrario, en un estudio del 2014 se demostró que en células de adenocarcinoma colorrectal (Caco-2), células de cáncer de colon humano (HT-29) y células embrionarias de riñón (HEK-293) expuestas a varias concentraciones de cinco edulcorantes artificiales entre ellos sacarina sódica, ciclamato de sodio, sucralosa, acesulfame K y aspartame en diferentes periodos (24, 48y 72h), se mostraron células más planas y con bordes menos definidos (101). En la presente investigación se encontró que las células entéricas IEC-6, tanto para las condiciones de rebaudiósido A, aspartame y sucralosa, perdían la forma poligonal características de estas células y con ello cambiaron la orientación de su agrupación en comparación con los grupos controles.

Los estudios enfocados a cambios en la morfología de la célula en presencia de estos aditivos son pocos. Sin embargo, existen marcadores importantes que pueden darnos un acercamiento sobre cómo se podrían reflejar estos procesos. En el estudio publicado por Shil y colaboradores (2020), en intestino delgado de ratón, demostraron que la expresión de Claudin-3 y 15, proteínas importantes en las uniones estrechas de las células que constituyen la formación de la barrera intestinal, disminuyó de manera significativa en presencia de sucralosa y aspartame (73), similar a lo que se observó en los cultivos de IEC-6 donde los ENN artificiales parecen generar mayor separación entre las células.

De esta manera, se podría suponer que la afección de la morfología de las células epiteliales intestinales está vinculada por la manera en que se agrupan, comunican e interactúan con sus uniones. En este sentido, se ha reportado y es bien conocida la capacidad de la capa epitelial del intestino para promover su reparación y la renovación en un corto tiempo, ya que su homeostasis evita la disminución de las capacidades intestinales y la entrada de aditivos potencialmente nocivos para la salud (102). A nivel intestinal, se conoce que las células no diferenciadas que nacen desde el fondo de las criptas recubriendo las vellosidades del intestino cumplen de manera regular un circuito, a lo que podríamos conocer como migración celular, esta capacidad de las células permite en el intestino la diferenciación y maduración favoreciendo la especialización de cada una de las células que habitan en las vellosidades intestinales y así contribuir al estado homeostático del órgano (102). Por otra parte, las células epiteliales diferenciadas que migran aproximadamente 3 días inician su viaje desde el fondo de las vellosidades hasta la parte superior, finalizando su ciclo de vida y dando paso a nuevas células que cumplirán su ciclo normal de vida (25,102).

Las células que recubren las vellosidades del intestino están en constante contacto con los componentes de la dieta. En la actualidad, los edulcorantes no nutritivos han tomado gran popularidad en la industria alimentaria y en los tratamientos nutricionales que proponen mejorar los hábitos alimenticios, pero con su consumo han provocado un incremento de la cantidad de empleo (103). En relación con la gran popularidad que los acompañan por sus características, han surgido estudios que demuestran efectos negativos a nivel intestinal de estos componentes (70,104,105). Por esto se ha planteado que, así como algunos componentes de la dieta han sido evidenciados en modificar la capacidad migratoria de las células intestinales, los edulcorantes no nutritivos podrían estar también modificando la

migración de células y por consiguiente poder relacionarse a los cambios en la morfología de la línea celular IEC-6 (103).

Para conocer si el rebaudiósido A, aspartame y sucralosa podían tener este efecto en el cultivo celular, se utilizó el ensayo de herida, uno de los ensayos más comunes para evaluar la capacidad migratoria *in vitro*. Los resultados del experimento mostraron que el aspartame fue el edulcorante que tuvo mayor capacidad de generar un descenso del cerrado de herida a las 24h. En este aspecto, datos similares fueron reportados en una línea celular de adenocarcinoma de colon humano, la cual fue tratada con diferentes concentraciones de aspartame durante 12, 24 y 48h en un modelo de cicatrización de herida (94). Se reportó una disminución del cerrado de herida a 24h, lo cual fue confirmado por el ensayo de cámara de *Boyden* donde el aspartame disminuyó la capacidad migratoria (94).

Los resultados de este estudio mostraron que el rebaudiósido A limitó el cerrado de herida en el cultivo a las 24h en comparación al grupo control. Como se mencionó, los estudios *in vitro* estudiando el rebaudiósido A son limitados. Sin embargo, se ha informado que en cerdos alimentados durante 14 días con esteviósido no se encontraron restos de éste en las heces fecales de los animales, sino restos de esteviol, sugiriendo que el edulcorante puede ser metabolizado por la microbiota del intestino, convirtiéndolo a esteviol. En este mismo estudio, se menciona la exposición de esteviósido, rebaudiósido A y esteviol en células Caco-2, los cuales según el reporte no alteraron la integridad del monocapa celular. No obstante, el esteviol tuvo la capacidad de traspasar más fácilmente la monocapa de Caco-2 comprometiendo su integridad (106), lo cual podría estar relacionado con el daño de uniones estrechas entre células y la disfunción de la barrera epitelial que podría también conectar con disminución de la migración celular en cultivo (107).

Las evidencias son escasas ante la explicación de los efectos en cambios morfológicos y la migración celular en intestino. Los datos con relación al rebaudiósido A, sugieren que actúa en las células generando cambios similares a edulcorantes artificiales más investigados como la sucralosa. En este sentido, Sánchez-Tapia y colaboradores (2019) reportaron datos interesantes comparando dietas normales y dietas ricas en grasas (HF) suplementadas con distintos endulzantes calóricos o no calóricos por separado (108). En el estudio, se logró describir que la sucralosa y los glúcidos de esteviol (SG) incrementaron la expresión de T1R2 en la boca en comparación al grupo control, también mostraron un mayor incremento de la

expresión de T1R2 en el intestino en comparación a los grupos que consumieron glucosa, fructosa y sacarosa. La sucralosa y SG mostraron tener la capacidad de estimular al cotransportador de glucosa SGLT1, dato que no se encontró en los grupos de HF con edulcorante. Por otra parte, el hecho de que ciertos edulcorantes incrementaran la expresión de T1R2 llevó al análisis de la secreción de péptidos a nivel intestinal con edulcorante no nutritivos y sólo el grupo de sucralosa mostró significancia en la secreción de GLP-1 (108). En estudios contrarios a lo que sugieren nuestros resultados de ensayo de herida con rebaudiósido A, Jiang y colaboradores (2019) mostraron que la suplementación de 250 mg/kg de esteviósido (STE) en pollos con daño en la mucosa intestinal inducido por lipopolisacáridos, el infiltrado de neutrófilos disminuyó en yeyuno e íleon y se redujo la hiperemia en relación a la dieta que fue administrada sólo con lipopolisacáridos, sin encontrar cambios en la expresión de genes relacionados con uniones estrechas como ZO-1 (Zonula ocludens-1), claudina-1 y claudina-2 (109). Estos resultados se contraponen a lo que se observó en nuestros resultados, una disminución en la capacidad del cerrado de herida en presencia del rebaudiósido A, así como lo observado con el aumento de los espacios entre células condicionadas con diferentes concentraciones de rebaudiósido A (109). Por otra parte, en este mismo estudio, se describió un incremento en la longitud de las vellosidades en íleon y yeyuno, disminuyendo la profundidad de las criptas (109). Interesantemente, este dato encontrado se relaciona a nuestros resultados de hipertrofia e incremento de la longitud del enterocito en distintas concentraciones de rebaudiósido A (36).

Asimismo, cuando se estimuló el cultivo de enterocitos con sucralosa, se observó disminución del cerrado de la herida a las 24h comparado con el grupo control, similar a lo que se reportó en el estudio en condiciones de aspartame y rebaudiósido A. En la literatura se describe que, en cultivos celulares estimulados con sucralosa, zinc y un activador de proteína quinasa B, no encuentran cambios significativos en la migración celular (93). Este estudio evaluó las diferencias de proliferación celular, adhesión y formación de vasos sin encontrarse cambios importantes. Sin embargo, se observó que la sucralosa tuvo la capacidad de activar los receptores del dulce, específicamente T1R3, bloqueando procesos de vasculogénesis, demostrando que la sucralosa tiene la capacidad de ejercer un efecto a través de los receptores del dulce (93). Estos resultados contradicen lo encontrado por Sánchez-Tapia y colaboradores en el 2019 quienes reportan actividad sólo de T1R2 en la boca e

intestino con sucralosa y no la actividad de T1R3 (108). Estos resultados podrían ser contradictorios, no obstante, es importante destacar que reportan efectos en tejidos, condiciones y modos de administración diferentes (35). Las evidencias sobre el efecto de los edulcorantes no nutritivos son controversiales. Sin embargo, a nivel intestinal se ha logrado conocer efectos negativos en la microbiota intestinal, señalización de incretinas, aumento de peso, prevalencia de diabetes y disfunción de la barrera epitelial con la adición de distintos edulcorantes (73,110), lo cual sugiere que los ENN pueden interactuar con las células del intestino generando distintas respuestas que, según los estudios descritos, afectan la salud intestinal.

Pocos estudios han utilizado la metodología de ensayo de herida en presencia de edulcorantes en células epiteliales. Sin embargo, resultados que describen parámetros moleculares de adhesión celular, actividad de receptores, proteínas relacionadas con el citoesqueleto, migración celular y cambios en la morfogénesis, pueden otorgar un acercamiento a los efectos intracelulares de los edulcorantes. Entre algunos de estos parámetros, se mencionan a las proteínas de uniones adherentes y uniones estrechas, así como datos reportados en modelos animales sometidos al consumo “crónico” de ENN, los cuales han demostrado disfunción en el intestino dando un mayor alcance sobre lo observado en los cultivos de IEC-6 (25,43,111). En un estudio anteriormente mencionado, donde se encontraron cambios en la migración celular con aspartame, los resultados se asociaron a una disminución de los niveles de integrina  $\alpha$ V, integrina  $\beta$ 1, integrina  $\beta$ 3, proteínas importantes en la unión de la célula al ambiente extracelular e intracelular, así como participar en la unión entre la matriz extracelular (MEC), esenciales en la migración celular (94). Otro hallazgo importante en este mismo estudio fue el descenso de la actividad de FAK (Quinasa de adhesión focal) y proteínas de Akt, las cuales tienen un efecto importante en la señalización de migración celular (94).

Resultados reportados en un experimento *in vitro* en células Caco-2 con distintas concentraciones de aspartame, sacarina y sucralosa se logró demostrar que una concentración de 100 $\mu$ M indujo una disminución en la capacidad de la permeabilidad del cultivo (73). Esta concentración de edulcorantes también demostró tener la capacidad de modificar los receptores del dulce (T1R2 y T1R3), los cuales fueron bloqueados en el cultivo al añadir 100 $\mu$ M de sucralosa o aspartame. Los resultados sugirieron una disminución de la capacidad

de estos edulcorantes para irrumpir la permeabilidad del cultivo por el bloqueo de T1R2 y T1R3, proponiendo que la sobre-activación de los receptores del dulce en las células puede estar relacionada con aumentos de la permeabilidad en el intestino. Esto fue confirmado en el mismo experimento cuando se reportó la disminución de las uniones estrechas en el cultivo, específicamente claudinas-3 y claudina-15 en presencia de sucralosa (73). En este mismo sentido, en un estudio realizado en ratonas embarazadas suplementadas con sucralosa (igual al límite superior de ingesta diaria permitido por la FDA) se observó que las crías de las madres suplementadas con sucralosa mostraron una expresión menor de claudina-1, claudina-3 y ZO-1, así como una disminución preocupante de inmunoglobulina A (IgA), la cual cumple una función importante evitando la entrada de patógenos por medio del moco intestinal (112). Este hallazgo también fue relacionado con disfunción de la barrera epitelial de las crías de las madres suplementadas con sucralosa, encontrando desbalance de la microbiota intestinal con disminución de *Bacteroides* en las madres ratonas suplementadas (112). La concentración de *Bacteroides*, las cuales conforman una parte importante de la microbiota del intestino, actúan procesando moléculas complejas y contribuyendo a la digestión de los componentes dietéticos (31).

Apoyando las anteriores investigaciones descritas, un estudio aleatorizado en jóvenes con sobrepeso consumidores regulares de bebidas endulzadas artificialmente, mostró que después de 12 semanas de eliminar el consumo de estas bebidas existió una disminución del peso corporal, grasa corporal, índice de resistencia a la insulina, niveles séricos de glucosa, triglicéridos y colesterol, por lo que los resultados descritos pueden revelar más parámetros que se acerquen a lo que los ENN pueden generar con su consumo diario sin alejarse de las nuevas formas de dieta (46). Con estos datos expuestos, parece más evidente que la introducción de estos aditivos endulzantes propicia respuestas no favorable en padecimientos, y comprometen procesos complejos como la resistencia a la insulina, dislipidemias, etc.

Aunque sería complicado extrapolar a nivel *in vivo* las concentraciones añadidas al cultivo en relación con el consumo humano, debido a situaciones como lo es la capacidad de absorción, la interacción con la barrera celular, moco intestinal, la capacidad de transporte, la interacción de macromoléculas celulares, así como la exposición al ambiente externo y la respuesta interna del cuerpo humano (113), los resultados encontrados y otros estudios

publicados en modelos distintos al nuestro nos afirman que los edulcorantes están provocando cambios en la célula, no solo del intestino si no en tejidos variados. Las explicaciones de mucha de la evidencia en tejidos intestinales estimulados con diferentes tipos de ENN parecen demostrar una relación con la activación de mecanismos intracelulares que pueden afectar la homeostasis intestinal por medio de receptores, como los receptores del dulce, por lo que su consumo debe seguir siendo investigado. Por otro lado, los resultados ayudarán a dar un panorama más amplio de su efecto y, por consiguiente, promover investigaciones más profundas que permitan valorar si los aditivos como el rebaudiósido A, aspartame y sucralosa, que demostraron afectar las capacidades intestinales como los cambios en la morfología y migración de la línea celular IEC-6, podrían no estar alejados de comprometer el funcionamiento del intestino en organismo complejos, así como comprometer otros órganos relacionados con el metabolismo humano. Por todo lo anterior, será necesario plantear bases más sólidas que permitan controlar el uso de los ENN y mediar su adición por parte de la industria alimentaria.

## 9 Conclusiones

- El modelo de hiperglucemia no mostró efectos en la muerte celular, sin embargo, fueron notorios los cambios en su agrupación y morfología (hipertrofia) en la línea IEC-6.
- Los resultados apuntaron que el rebaudiósido A, aspartame y sucralosa no tuvieron un efecto citotóxico en nuestro cultivo a las concentraciones usadas. El cultivo en condiciones de los sustitutos de azúcar de 1nM-10μM mostraron células que incrementan su longitud y área, sugiriendo de nuevo la hipertrofia de los enterocitos.
- Los cambios en la morfología del enterocito *in vitro* con ENN podrían asociarse con los cambios en la orientación de las células, deformación e hipertrofia de ellas en relación con los hallazgos de otros estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran la pérdida de uniones entre células, vinculándose también con disfunción de la barrera epitelial.
- La hipertrofia del grupo de rebaudiósido A se presentó en todas las concentraciones, aunque las evidencias son escasas, se menciona el incremento de la altura de las vellosidades intestinales e incremento del peso del órgano en animales, lo cual se ha relacionado con una mayor capacidad de absorción y evidente asociación a la secreción de ciertos péptidos intestinales en presencia de receptores del sabor dulce.
- Los hallazgos descritos deben de ser reforzados con el análisis de marcadores moleculares relacionados con la expresión de uniones celulares, las cuales se comunican con el citoesqueleto y por consiguiente regulan el movimiento celular, para poder conocer si los cambios en la expresión de proteínas asociadas a uniones adherentes y estrechas promueven disminución en el cerrado de herida, lo cual podría vincularse también a la disfunción en la permeabilidad y regeneración celular.
- Los cambios observados en el enterocito que se encuentran en el intestino, un órgano vinculado a los procesos metabólicos, con la inclusión de los ENN podría estar exacerbando el daño del intestino. Los mecanismo sobre cómo pueden estar generándose estas alteraciones en la célula en presencia de ENN aún son controversiales, por lo que se han propuesto vías que pueden vincularse a sus efectos, como lo son, cambios en la microbiota intestinal, actividad de receptores del dulzor



en el intestino y procesos neurológicos. Por lo que es necesario profundizar sobre los hallazgos encontrados, los cuales sólo son una vertiente para conocer posibles vías celulares por los cuales los ENN pueden representar un daño a la salud.

## 10 Perspectivas de la tesis

A partir de los resultados obtenidos y la discusión presentada en la tesis, las perspectivas de trabajos futuros deben de estar orientadas en primer plano al análisis cuantitativo de la expresión de ciertas proteínas que puedan vincularse con cambios en la migración celular y actividad del citoesqueleto. Con relación a ello se podrían estudiar los cambios generados en proteínas como las ocludinas y su capacidad de fosforilación (actividad) por medio de anticuerpos en presencia de los ENN. Por otra parte, sería complementario el conocer si existen cambios en la expresión de E-Cadherina, ya que su sobreexpresión parece estar relacionada con el retraso en la migración y cambios en la diferenciación celular. Por último, el conocer la capacidad de estos edulcorantes para modificar la expresión de FAK, ya que esta cinasa participa en procesos de uniones de adherencia y procesos de movimiento celular que también estarán vinculados con la expresión de integrinas.

Con relación a otro de los puntos que fueron mencionado en la discusión, sería pertinente estudiar la relación de los edulcorantes y su capacidad de modificar la permeabilidad de la membrana por medio de ensayos *in vitro* mediante la técnica de Resistencia Eléctrica Transepitelial/Endotelial (TEER) o en su defecto evaluar la expresión de claudina (específicamente claudina 1, 2, 3, 4 y 10b, que se encuentran en el epitelio de rata), ya que median el paso de iones pequeños y agua.

Finalmente, sería interesante y trascendental evaluar tratamientos establecidos con relación a las concentraciones permitidas por las organizaciones mundiales (FDA), de cada uno de los edulcorantes en modelos murinos, que permitan conocer de manera más cercana que es lo que estos edulcorantes están ocasionando en la morfología del epitelio intestinal y si se encuentran relacionados con la disminución o sobreexpresión de marcadores en la migración celular. Por otro lado, sería relevante evaluar otros órganos accesorios involucrados en el metabolismo que puedan verse afectados, como son el páncreas e hígado. Por último, considero sería provechoso conocer si estos edulcorantes tienen efecto sobre la composición corporal del modelo (comportamiento del tejido adiposo y masa muscular), control de glucosa, consumo de agua y alimento, lo cual permitiría conocer de manera indirecta como es que los ENN afectan el metabolismo en modelos murinos.

## **II Consideraciones éticas y de bioseguridad**

El proyecto en líneas celulares fue realizado bajo estándares estrictos de cuarto de cultivo, el cual cuenta con el ambiente idóneo de esterilidad, incubación, preparación, lavado y almacenamiento. El laboratorio de Medicina Transnacional del ICS en la UV donde se llevó a cabo la investigación es clasificado de riesgo bajo por ser un espacio destinado a la enseñanza y entrenamiento de técnicas de biología molecular el cual usa microorganismos viables no conocidos como nocivos para la salud humana o animal manipulados por equipos especializados(114).

La investigación limitó estrictamente la contaminación del ambiente a través de métodos de bioseguridad de desecho de residuos, los cuales deben ser regidos por la NOM-087-ECOL-SSA-2002, la cual estipula los requisitos para el transporte, tratamiento y disposición final de residuos biológicos-infecciosos que se presenten durante el experimento (115). El uso de líneas celulares fue regulado por la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados encargada de evaluar la utilización de este tipo de organismos (116). La línea celular fue adquirida a través de ATCC (American Type Culture Collection), la principal organización mundial de expedición en materiales biológicos que respalda la investigación científica bajo la certificación ISO 9001:2008, ISO 13485:2003, ISO 17025:2005 e ISO Guía 34:2009. La línea celular IEC-6 con origen en células epiteliales de intestino delgado de rata fueron depositadas por Un Quaroni y fueron clasificadas en nivel 1 de bioseguridad basado en las pautas de servicios de salud pública de E.U.A (disponible en <https://www.atcc.org/>).

## 12 Bibliografía

1. OMS. Prevalencia de Obesidad y sobrepeso [Internet]. Obesidad y sobrepeso. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
2. Sabán J et al. La obesidad como entidad pluripatológica. *Diaz De Sa*. 2012.
3. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacological Research*. 2017 Aug;122:1–7.
4. Secretaría de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición [Internet]. Vol. 1, Ensanut. 2018. p. 47. Available from: [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf)
5. Dávila-Torres J, De Jesús González-Izquierdo J, Barrera-Cruz A. Medicina social Panorama de la obesidad en México. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(2):240–9.
6. Mathes WF, Kelly SA, Pomp D. Advances in comparative genetics: influence of genetics on obesity. *British Journal of Nutrition* [Internet]. 2011 Oct 12;106(S1):S1–10. Available from: [https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114511001905/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0007114511001905/type/journal_article)
7. Heianza Y, Qi L. Gene-diet interaction and precision nutrition in obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(4).
8. Qi Q, Chu AY, Kang JH, Jensen MK, Curhan GC, Pasquale LR, et al. Sugar-Sweetened Beverages and Genetic Risk of Obesity. *New England Journal of Medicine*. 2012;367(15):1387–96.
9. Goossens GH. The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obesity Facts*. 2017;10(3):207–15.
10. Carvajal, C. et al. Aspectos Fisiopatológicos. In: Universidad del Rosario, editor. *Obesidad: Un enfoque integral*. 2000. p. 41–62.
11. Chandel NS. Carbohydrate metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2021;13(1):1–15.
12. Patiño JF. *Metabolismo, Nutricion y Shock*. Médica Panamericana, editor. 2006. 87–91 p.
13. Chen C, Yin Y, Tu Q, Yang H. Glucose and amino acid in enterocyte: Absorption, metabolism and maturation. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2018;23(9):1721–39.

14. Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, Helliwell P, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *Journal of Physiology*. 2009;587(1):195–210.
15. Morgan EL, Mace OJ, Affleck J, Kellett GL. Apical GLUT2 and Cav1.3: Regulation of rat intestinal glucose and calcium absorption. *Journal of Physiology*. 2007;580(2):593–604.
16. Ros Pérez M, Medina-Gómez G. Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinología y Nutrición*. 2011;58(7):360–9.
17. Engin AB, Engin A. Obesity, Persistent Organic pollutants and Related Health Problems. In: *Obesity and lipotoxicity*. 2017. p. 81–110.
18. Fändriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. Vol. 281, *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 319–36.
19. Gasbarrini G, Montalto M, Santoro L, Curigliano V, D’Onofrio F, Gallo A, et al. Intestine: Organ or apparatus? Vol. 26, *Digestive Diseases*. 2008. p. 92–5.
20. Amish P, Claudwardyne T. *Physiology, Gastrointestinal Hormonal Control*. StatPearls. 2022.
21. Shen L. Functional morphology of the gastrointestinal tract. Vol. 337, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Verlag; 2009. p. 1–35.
22. Williams R, Dickey J. *Physiology of the Colon and Rectum*. *AJS*. 1969 Jun 1;117(6):849–53.
23. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. Vol. 39, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 677–96.
24. Hall EJ, German AJ, Willard MD, Lappin MR, Cave N, Washabau RJ, et al. Small Intestine. In: *Canine and Feline Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2012. p. 651–728.
25. Noah TK, Donahue B, Shroyer NF. Intestinal development and differentiation. Vol. 317, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2011. p. 2702–10.
26. Stange DE. Intestinal Stem Cells. In: *Digestive Diseases*. 2013. p. 293–8.
27. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. Vol. 71, *Annual Review of Physiology*. 2009. p. 241–60.
28. Mantilla C. Mecanismos de señalización por Beta-catenina y su papel en la carcinogénesis. *Revista CES Medicina*. 2019;29(1):109–28.
29. Heath JP. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biology International*. 1996;20(2):139–46.

30. Miron N, Cristea V. Enterocytes: Active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. Vol. 167, *Clinical and Experimental Immunology*. 2012. p. 405–12.
31. Salvo-Romero E, Alonso-Cotoner C, Pardo-Camacho C, Casado-Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev esp enferM Dig (Madrid)*. 2015;107(11):686–96.
32. Günzel D, Yu ASL. Claudins and the modulation of the tight junction permeability. *Physiol Rev [Internet]*. 2013;93:525–69. Available from: [www.prv.org](http://www.prv.org)
33. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cell Junctions. In: *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
34. Kim JJ, Khan WI. Goblet cells and mucins: Role in innate defense in enteric infections. Vol. 2, *Pathogens*. MDPI AG; 2013. p. 55–70.
35. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. Vol. 9, *Nature Reviews Microbiology*. 2011. p. 356–68.
36. Gerbe F, Jay P. Intestinal tuft cells: Epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. Vol. 9, *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group; 2016. p. 1353–9.
37. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. Vol. 78, *Annual Review of Physiology*. Annual Reviews Inc.; 2016. p. 277–99.
38. Lee AA, Owyang C. Sugars, sweet taste receptors, and brain responses. In: *Molecular Nutrition Carbohydrates*. Elsevier; 2019. p. 265–83.
39. Seyedabadi M, Hossein M, Albert PR. Pharmacology & Therapeutics Biased signaling of G protein coupled receptors ( GPCRs ): Molecular determinants of GPCR / transducer selectivity and therapeutic potential. *Pharmacology and Therapeutics*. 2019;200:148–78.
40. Liauchonak I, Qorri B, Dawoud F, Riat Y, Szewczuk MR. Non-nutritive sweeteners and their implications on the development of metabolic syndrome. *Nutrients*. 2019;11(3):1–19.
41. Han P, Bagenna B, Fu M. The sweet taste signalling pathways in the oral cavity and the gastrointestinal tract affect human appetite and food intake: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition [Internet]*. 2019;70(2):125–35. Available from: <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1492522>
42. Depoortere I. Taste receptors of the gut: Emerging roles in health and disease. *Gut*. 2014;63(1):179–90.
43. Edelblum KL, Turner JR. Epithelial Cells: Structure, Transport, and Barrier Function. Structure, Transport, and Barrier Function. In: *Mucosal Immunology: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2015. p. 187–210.

44. Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2018 Jan 1;1860(1):5–8.
45. Gomes AC, Hoffmann C, Mota JF. The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. Vol. 9, *Gut Microbes*. Taylor and Francis Inc.; 2018. p. 308–25.
46. Viveros-Watty PE, López-Franco Ó, Zepeda RC, Aguirre G, Rodríguez-Alba JC, Gómez-Martínez MA, et al. Efectos en los factores de riesgo cardiometabólico tras la reducción del consumo de bebidas endulzadas artificialmente en sujetos con sobrepeso. Un ensayo aleatorizado. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. 2022 Apr 5;69(3).
47. Zak-Gołąb A, Kocełak P, Aptekorz M, Zientara M, Juszczyk Ł, Martirosian G, et al. Gut microbiota, microinflammation, metabolic profile, and zonulin concentration in obese and normal weight subjects. *International Journal of Endocrinology*. 2013;2013.
48. Thaiss CA, Levy M, Grosheva I, Zheng D, Soffer E, Blacher E, et al. Hyperglycemia drives intestinal barrier dysfunction and risk for enteric infection [Internet]. 2018. Available from: <https://www.science.org>
49. Schroeder BO, Birchenough GMH, Pradhan M, Nyström EEL, Henricsson M, Hansson GC, et al. Obesity-associated microbiota contributes to mucus layer defects in genetically obese mice. *Journal of Biological Chemistry*. 2020 Nov 13;295(46):15712–26.
50. Julia A, Milian G, David E, García C. La obesidad como factor de riesgo , sus determinantes y tratamiento Obesity as a risk factor , its determinants and treatment. *Revista Cubana de Medicina General Integral* 2016; 32(3) ARTÍCULO. 2016;32(3):1–13.
51. Gil A. Cereales y Productos Derivados. In: *Tratado de Nutrición*. 2010. p. 90–1.
52. Organización Panamericana de la Salud. Clasificación de los alimentos y su implicación en la salud. [Internet]. 2020. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/obesity-andoverweight>.
53. Cernuda Martínez J, Fernández García A. Los edulcorantes y su papel sobre el metabolismo humano. *RqR Enfermería Comunitaria*. 2016;4(2):13–22.
54. García-Almeida JM, Fdez GMC, Alemán JG. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutricion Hospitalaria*. 2013;28(SUPPL.4):17–31.
55. González C. Posición de consenso sobre bebidas con edulcorantes no caloricos y su relacion con la salud. *Rev Mex Cardiol*. 2013;24(2):55–68.
56. Lohner S, Toews I, Meerpohl JJ. Health outcomes of non-nutritive sweeteners: Analysis of the research landscape. *Nutrition Journal*. 2017;16(1):1–21.

57. Gardner C, Wylie-Rosett J, Gidding SS, Steffen FLM, Johnson FRK, 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. 35, Diabetes Care. 2012. p. 1798–808.
58. Carakostas MC, Curry LL, Boileau AC, Brusick DJ. Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. Food and Chemical Toxicology. 2008 Jul;46(7 SUPPL.).
59. Curry LL, Roberts A. Subchronic toxicity of rebaudioside A. Food and Chemical Toxicology. 2008 Jul;46(7 SUPPL.).
60. Samuel P, Ayoob KT, Magnuson BA, Wölwer-Rieck U, Jeppesen PB, Rogers PJ, et al. Stevia Leaf to Stevia Sweetener: Exploring Its Science, Benefits, and Future Potential. Vol. 148, The Journal of nutrition. NLM (Medline); 2018. p. 1186S-1205S.
61. Aidrete-Velasco J, Lopez-García R, Zúñiga-Guajardo S, Riobó-Serván P, Serra-Majem L, Suverza-Fernández A, et al. Análisis de la evidencia disponible para el consumo de edulcorantes no calóricos. Documento de expertos. Medicina Interna de Mexico. 2017;33(1):61–83.
62. Ahmad SY, Friel JK, MacKay DS. Effect of sucralose and aspartame on glucose metabolism and gut hormones. Nutrition Reviews. 2020 Sep 1;78(9):725–46.
63. Choudhary AK, Pretorius E. Revisiting the safety of aspartame. Nutrition Reviews. 2017 Sep 1;75(9):718–30.
64. AlDeeb OAA, Mahgoub H, Foda NH. Sucralose. In: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Academic Press Inc.; 2013. p. 423–62.
65. Shi Q, Zhu X, Deng S. Sweet Taste Receptor Expression and Its Activation by Sucralose to Regulate Glucose Absorption in Mouse Duodenum. Journal of Food Science. 2019;00:1–6.
66. van der Wielen N, ten Klooster JP, Muckenschnabl S, Pieters R, Hendriks HFJ, Witkamp RF, et al. The noncaloric sweetener rebaudioside a stimulates glucagon-like peptide 1 release and increases enteroendocrine cell numbers in 2-dimensional mouse organoids derived from different locations of the intestine. Journal of Nutrition. 2016;146(12):2429–35.
67. Lehmann A, Hornby PJ. Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. 2016;310(11):G887–98.
68. Kanoski SE, Hayes MR, Skibicka KP. GLP-1 and weight loss: Unraveling the diverse neural circuitry. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology. 2016;310(10):R885–95.



69. Lertrit A, Srimachai S, Saetung S, Chanprasertyothin S, Chailurkit L or, Areevut C, et al. Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition*. 2018;55–56:125–30.
70. Sylvetsky AC, Brown RJ, Blau JE, Walter M, Rother KI. Hormonal responses to non-nutritive sweeteners in water and diet soda. *Nutrition and Metabolism [Internet]*. 2016;13(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12986-016-0129-3>
71. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Ingestion of diet soda before a glucose load augments glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes Care*. 2009;32(12):2184–6.
72. Wang QP, Browman D, Herzog H, Gregory Neely G. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS ONE*. 2018 Jul 1;13(7).
73. Shil A, Olusanya O, Ghufloor Z, Forson B, Marks J, Chichger H. Artificial sweeteners disrupt tight junctions and barrier function in the intestinal epithelium through activation of the sweet taste receptor, t1r3. *Nutrients*. 2020 Jun 1;12(6):1–19.
74. Bell LN, Wetzel CR. Aspartame Degradation in Solution As Impacted by Buffer Type and Concentration. Vol. 43, *J. Agric, Food Chem*. 1995.
75. Berset JD, Ochsenbein N. Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere*. 2012;88(5):563–9.
76. Gong Q, Bell LN. Degradation kinetics of rebaudioside A in various buffer solutions. *International Journal of Food Science and Technology*. 2013 Dec;48(12):2500–5.
77. Fändriks L. Roles of the gut in the metabolic syndrome: an overview. Vol. 281, *Journal of Internal Medicine*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 319–36.
78. Dutton JS, Hinman SS, Kim R, Attayek PJ, Maurer M, Sims CS, et al. Hyperglycemia minimally alters primary self-renewing human colonic epithelial cells while TNF $\alpha$ -promotes severe intestinal epithelial dysfunction. *Integrative Biology* . 2021 Jun 1;13(6):139–52.
79. Morresi C, Cianfruglia L, Sartini D, Cecati M, Fumarola S, Emanuelli M, et al. Effect of High Glucose-Induced Oxidative Stress on Paraoxonase 2 Expression and Activity in Caco-2 Cells. 2019;8(12):1–18.
80. Beyer EC, Berthoud VM. Gap junction gene and protein families: Connexins, innexins, and pannexins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 2018 Jan 1;1860(1):5–8.
81. Czarnecka K, Pilarz A, Rogut A, Maj P, Szymańska J, Olejnik Ł, et al. Aspartame—true or false? Narrative review of safety analysis of general use in products. Vol. 13, *Nutrients*. MDPI AG; 2021.

82. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Vol. 2, Comprehensive Physiology. 2012. p. 2369–92.
83. Krndija D, el Marjou F, Guirao B, Richon S, Leroy O, Bellaiche Y, et al. Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut [Internet]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
84. Boztepe T, Gulec S. Investigation of the influence of high glucose on molecular and genetic responses: An in vitro study using a human intestine model. *Genes and Nutrition*. 2018;13(1):1–8.
85. Chopra DP, Dombkowski AA, Stemmer PM, Parker GC. Intestinal epithelial cells in vitro. *Stem Cells and Development*. 2010;19(1):131–41.
86. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Kurt J. Characterization CULTURES FROM RAT Criteria INTESTINE by Morphologic and Immunologic From the Departments of Medicine and Pathology , Harvard Medical School ; the Gastrointestinal Unit , Massachusetts General Hospital ; and the Shriners Burns Institute . JCB. 1979;80(February).
87. Zhao, M. Liao, D. Zhao J. Diabetes induced mechanophysiological changes in the small intestine and colon. *WJD*. 2017;8(6):230–310.
88. Spravchikov N, Sizyakov G, Gartsbein M, Accili D, Tennenbaum T, Wertheimer E. Glucose Effects on Skin Keratinocytes. *Diabetes*. 2001;50(7):1627 LP – 1635.
89. Li W, Choudhury GR, Winters A, Prah J, Lin W, Liu R, et al. Hyperglycemia alters astrocyte metabolism and inhibits astrocyte proliferation. *Aging and Disease*. 2018;9(4):674–84.
90. Aviello G, Knaus UG. ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue Or Sabotage? *British Journal of Pharmacology*. 2017;174(12):1704–18.
91. Mooradian AD, Smith M, Tokuda M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. Vol. 18, *Clinical Nutrition ESPEN*. Elsevier Ltd; 2017. p. 1–8.
92. Khare N, Chandra S. Stevioside mediated chemosensitization studies and cytotoxicity assay on breast cancer cell lines MDA-MB-231 and SKBR3. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019 Nov 1;26(7):1596–601.
93. Lizunkova P, Enuwosa E, Chichger H. Activation of the sweet taste receptor T1R3 by sucralose attenuates VEGF-induced vasculogenesis in a cell model of the retinal microvascular endothelium. *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2019 Jan 28;257(1):71–81.
94. Sawadsopanon T, Meksawan K, Chanvorachote P. Aspartame inhibits migration of human intestinal epithelial cells. *Journal of Food Biochemistry*. 2017 Jun 1;41(3).

95. Ngekure M.X K, Jiang J, Enayatullah H, Ennab W, Mustafa S, Rodeni S, et al. Sweet taste receptor agonists alter ovarian functions and ovarian cycles in aged mice. *Reproductive Biology*. 2019 Sep 1;19(3):230–6.
96. Sun D, Liu L, Mao S, Zhu W, Liu J. Aspartame supplementation in starter accelerates small intestinal epithelial cell cycle and stimulates secretion of glucagon-like peptide-2 in pre-weaned lambs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2019 Sep 1;103(5):1338–50.
97. Dailey MJ. Nutrient-induced intestinal adaption and its effect in obesity. Vol. 136, *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc.; 2014. p. 74–8.
98. Mandrekar N, Su B, Habas R. Cell Polarity in Morphogenesis-Planar Cell Polarity. In: *Cell Polarity in Development and Disease*. Elsevier Inc.; 2018. p. 103–19.
99. Maghiari AL, Coricovac D, Pinzaru IA, Macaşoi IG, Marcovici I, Simu S, et al. High concentrations of aspartame induce pro-angiogenic effects in ovo and cytotoxic effects in ht-29 human colorectal carcinoma cells. *Nutrients*. 2020 Dec 1;12(12):1–15.
100. Rocha GS, Pereira MO, Benarroz MO, Frydman JNG, Rocha VC, Pereira MJ, et al. Sucralose sweetener in vivo effects on blood constituents radiolabeling, red blood cell morphology and radiopharmaceutical biodistribution in rats. *Applied Radiation and Isotopes*. 2011 Jan;69(1):46–51.
101. van Eyk AD. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology*. 2015 Jul 3;38(3):318–27.
102. Krndija D, el Marjou F, Guirao B, Richon S, Leroy O, Bellaiche Y, et al. Active cell migration is critical for steady-state epithelial turnover in the gut [Internet]. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
103. Suzuki T. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. Vol. 91, *Animal Science Journal*. Blackwell Publishing; 2020.
104. Liauchonak I, Qorri B, Dawoud F, Riat Y, Szewczuk MR. Non-nutritive sweeteners and their implications on the development of metabolic syndrome. *Nutrients*. 2019;11(3).
105. Tovar AP, Navalta JW, Kruskall LJ, Young JC. The effect of moderate consumption of non-nutritive sweeteners on glucose tolerance and body composition in rats. 2017;1227(February):1225–7.
106. Geuns JMC, Augustijns P, Mols R, Buyse JG, Driessen B. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. *Food and Chemical Toxicology*. 2003 Nov 1;41(11):1599–607.

107. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. Vol. 9, *Nature Reviews Immunology*. 2009. p. 799–809.
108. Sánchez-Tapia M, Martínez-Medina J, Tovar AR, Torres N. Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose tissues of rats. *Nutrients*. 2019 Apr 1;11(4).
109. Jiang J, Qi L, Lv Z, Jin S, Wei X, Shi F. Dietary stevioside supplementation alleviates lipopolysaccharide-induced intestinal mucosal damage through anti-inflammatory and antioxidant effects in broiler chickens. *Antioxidants*. 2019 Dec 1;8(12).
110. Nettleton JE, Cho NA, Klancic T, Nicolucci AC, Shearer J, Borgland SL, et al. Maternal low-dose aspartame and stevia consumption with an obesogenic diet alters metabolism, gut microbiota and mesolimbic reward system in rat dams and their offspring. *Gut*. 2020 Oct 1;69(10):1807–17.
111. Trepap X, Chen Z, Jacobson K. Cell migration. Vol. 2, *Comprehensive Physiology*. 2012. p. 2369–92.
112. Dai X, Guo Z, Chen D, Li L, Song X, Liu T, et al. Maternal sucralose intake alters gut microbiota of offspring and exacerbates hepatic steatosis in adulthood. *Gut Microbes*. 2020 Jul 3;11(4):1043–63.
113. Dusinska M, Rundén-Pran E, Schnekenburger J, Kanno J. Toxicity tests: In vitro and in vivo. In: *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials: Exposure, Toxicology, and Impact on Human Health: Second Edition*. Elsevier Inc.; 2017. p. 51–82.
114. Otero M, Favero M, Dragomir C, Hachem K El, Hashimoto K, Plumb DA, et al. *Human Cell Culture Protocols*. 2012;806:301–36.
115. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo [Internet]. DOF. 2002. Available from: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=757789](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=757789)
116. Secretaria de Servicios Parlamentarios. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. [Internet]. DOF. 2020. p. 1–49. Available from: <https://www.gob.mx/profepa/documentos/ley-de-bioseguridad-de-organismos-geneticamente-modificados>