



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina

Maestría en Ciencias de la Salud

TESIS

“Comparación del efecto del consumo prolongado de edulcorantes en ratones CD1 sometidos a estrés crónico en linfocitos de sangre, bazo y placas de Peyer”

Que para Obtener el Grado de

Maestra en Ciencias de la Salud

Presenta:

L.N Lucia García Iniesta.

Comité de Tutores

Tutor Académico: Dra. Beatriz Elina Martínez Carrillo.

Tutor Interno: Dra. Roxana Valdés Ramos.

Tutor Externo: Dra. Rosa Adriana Jarillo Luna.

Toluca, Estado de México Noviembre de 2016.

ÍNDICE

	No.	Página
Resumen.....	1	
Abstract.....	2	
1 Antecedentes		
1.1. Edulcorantes.....	3	
1.1.2 Sacarosa.....	3	
1.1.3 Sucralosa.....	4	
1.1.4 Estevia.....	4	
1.2 Estrés.....	5	
1.2.1 Eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA).....	5	
1.2.2 Hormonas del estrés.....	6	
1.2.3 Glucocorticoides.....	6	
1.2.4 Corticosterona.....	7	
1.2.5 Agentes estresantes.....	7	
1.3 Proteínas carboniladas como marcador biológico del estrés oxidante.....	7	
1.4 Estrés oxidante.....	8	
1.5 Linfocitos.....	10	
1.6 Placas de Peyer.....	11	
1.7 Bazo.....	12	
2 Planteamiento del Problema.....	13	
3. Hipótesis.....	14	
4. Objetivos.....	14	
5. Justificación.....	15	
6. Material y Métodos.....		
6.1 Diseño de estudio.....	16	
6.2 Procedimientos.....	16	
6.3 Variables de Estudio.....	19	
6.4 Implicaciones Bioéticas.....	22	
6.5 Recolección y análisis de Datos.....	22	
7 Resultados		
7.1 Título corto del artículo enviado.....	23	
7.1.1 Página frontal.....	24	

7.1.2	Carta de envío.....	25
7.1.3	Resumen.....	26
7.1.4	Abstract.....	27
7.1.5	Background.....	28
7.1.6	Material and methods.....	29
7.1.7	Results.....	32
7.1.8	Discussion.....	34
7.1.9	References.....	41
7.1.10	Figures and tables.....	46
8	Resultados adicionales.....	48
8.1	Discusión adicional.....	52
9	Conclusiones generales	
9.1	Conclusiones.....	53
9.2	Limitaciones.....	53
9.3	Recomendaciones.....	54
10	Referencias.....	55

Resumen

La vida actual ha traído cambios en los estilos de vida, como la modificación en los hábitos alimentarios y el estrés en la vida cotidiana. Las dietas mal equilibradas y la exposición a estrés aumentan el estrés oxidante, específicamente los daños a las proteínas producen un daño irreversible como la carbonilación de proteínas. El objetivo fue determinar si el consumo de edulcorantes y la exposición a estrés aumentan las proteínas carboniladas en linfocitos de sangre placas de Peyer y bazo. Se utilizaron 136 ratones CD1 machos, divididos en 17 grupos, se les administró edulcorante (Sacarosa; Sucralosa y Estevia) y fueron sometidos a estrés durante 6 y 9 semanas. Se determinó el IMC, glucosa, linfocitos totales de sangre periférica, placas de Peyer y bazo, se cuantificó la concentración de proteínas carboniladas. El IMC en la etapa intermedia ($F=19.27$ $p<0.001$) fue mayor para el grupo SUC+E y menor para el grupo SAC+E, pero en la etapa final ($F=11.37$ $P<0.001$) todos los grupos presentaron un IMC menor en contraste con el grupo CL. La glucosa en la etapa intermedia ($F=13.41$ $p<0.001$) y final ($F=17.24$ $p<0.001$) los grupos CL+E, SAC+E, SUC+E y EST+E presentaron concentraciones mayores que el control. El conteo total de linfocitos de sangre la etapa intermedia ($F=52.83$ $p<0.001$) disminuyó en los grupos SAC, SUC Y EST CL+E,; en la etapa final ($F=38.5$ $p<0.001$) el número de células disminuyó en los grupos SAC, CL+E, SAC+E y SUC+E. Los linfocitos en placas de Peyer durante la etapa intermedia ($F=43.67$ $p<0.001$) disminuyeron en los grupos SAC, SUC, SAC+E y SUC+E, pero aumentaron en el CL+E; en la etapa final ($F=36.67$ $p<0.001$) el número de células disminuyó en los grupos SUC y CL+E, pero aumentó en EST y SUC+E. Los linfocitos de bazo en la etapa intermedia ($F=259.87$ $p<0.001$) disminuyeron en los grupos SAC, SUC, CL+E, SAC+E y SUC+E, pero aumentó en el grupo EST, en la etapa final ($F=249.22$ $p<0.001$) el número de células aumentó para los grupos SAC, SUC, EST, CL+E, SAC+E, SUC+E y EST+E en contraste con el grupo CL. La concentración de proteínas carboniladas aumentó en la etapa intermedia en linfocitos de sangre ($F=80.471$ $p<0.001$), placas de peyer ($F=57.75$ $p<0.001$) y bazo ($F=45.74$ $p<0.001$) en los grupos a expensas de edulcorante y estrés, situación similar en la etapa final sangre ($F=222.88$ $p<0.001$), placas de Peyer ($F=220.70$ $p<0.001$) y bazo ($F=188.69$ $p<0.001$) Conclusión: Es necesario evaluar otros biomarcadores de estrés oxidante en los linfocitos para determinar su presencia como consecuencia del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés crónico.

Abstract

Modern life has brought changes in lifestyle, such as changing dietary habits and stress in everyday life. Badly balanced diets and exposure to stress increase oxidative stress, specifically damage to produce irreversible damage proteins as the protein carbonylation. The objective was to determine whether consumption of sweeteners and exposure to stress increase carbonylated proteins in blood, Peyer's patches and spleen lymphocytes. 136 male mice CD1, divided into 17 groups, they were given sweetener (Sucrose sucralose and stevia) and were subjected to stress for 6 and 9 weeks. Determined BMI, glucose, total lymphocytes in peripheral blood, Peyer's patches and spleen and was quantitated the carbonylated proteins concentration. BMI in the intermediate stage ($F = 19.27$ $p < 0.001$) was higher for the SUC + E group and minor for the SAC + E group, but in the final stage ($F = 11.37$ $P < 0.001$) all groups had a BMI lower in contrast to the CL group. Glucose in the intermediate ($F = 13.41$ $p < 0.001$) and final ($F = 17.24$ $p < 0.001$) stage had higher concentrations the CL + E, SAC + E, SUC + E and EST + E groups than the control. The total blood lymphocyte count in the intermediate stage ($F = 52.83$ $p < 0.001$) decreased in the SAC, SUC, EST and CL + E groups; in the final step ($F = 38.5$ $P < 0.001$) the number of cells decreased in the SAC, CL + E, SAC + E and SUC + E groups. Lymphocytes in Peyer's patches during the intermediate stage ($F = 43.67$ $p < 0.001$) decreased in the SAC, SUC, SAC + E and SUC + E groups, but increased in the CL + E; in the final stage ($F = 36.67$ $p < 0.001$) decreased the number of cells in the SUC and CL + E groups, but increased in EST and SUC + E. The spleen lymphocytes in the middle stage ($F = 259.87$ $p < 0.001$) decreased in the SAC, SUC, CL + E, SAC + E and SUC + E groups, but increased in the EST group, in the final stage ($F = 249.22$ $p < 0.001$) the number of cells increased to the SAC, SUC, EST, CL + E, SAC + E, SUC + E and EST + E groups in contrast to the CL group. The carbonylated protein concentration increased in the intermediate stage in blood l ($F = 80,471$ $p < 0.001$), Peyer's patches ($F = 57.75$ $p < 0.001$) and spleen ($F = 45.74$ $p < 0.001$) lymphocytes in the groups at the expense of sweetener and stress, similar situation in blood at the final stage ($F = 222.88$ $p < 0.001$), Peyer's patches ($F = 220.70$ $p < 0.001$) and spleen ($F = 188.69$ $p < 0.001$). Conclusion: It is necessary to evaluate other biomarkers of oxidative stress in cells to determine their presence as a result of chronic use of sweeteners and exposure to chronic stress.

1. Antecedentes:

1.1. EDULCORANTES

Los edulcorantes son compuestos que al gusto provocan un sabor dulce, forman parte de los alimentos que se ingieren de forma común y algunos de ellos son considerados aditivos alimentarios ⁽¹⁾. Se clasifican de acuerdo a su origen en naturales o artificiales y en relación al aporte energético en nutritivos y no nutritivos ⁽²⁾.

El aumento de enfermedades metabólicas ha convencido a los individuos sobre el daño que pueden provocar los alimentos con elevado contenido en hidratos de carbono y en su lugar buscan alimentos con bajo o nulo aporte de energía pero sin sacrificar la dulzura que desean percibir ⁽³⁾. En consecuencia el consumo de edulcorantes no calóricos o bajos en calorías ha aumentado notablemente en los últimos años ⁽⁴⁾.

Para proteger la seguridad en el consumo de los aditivos alimentarios se establece la ingestión diaria admisible (IDA), que determina por medio de experimentos en animales la cantidad de aditivo que un individuo puede consumir, todos los días de su vida, sin que exista riesgo y generalmente esta expresada en mg/Kg/día ⁽⁵⁾.

1.1.2 SACAROSA

El azúcar de mesa o sacarosa es el edulcorante natural más utilizado desde la antigüedad, tiene un aporte energético de 4 Kcal por gramo. Su estructura está conformada por una molécula de glucosa y una de fructosa, su fórmula es $C_{12}H_{22}O_{11}$. Se usa comúnmente en la preparación de alimentos cotidianos e industrializados como bebidas, conservas, panificación y postres ⁽⁶⁾.

A pesar de ser un edulcorante natural, su consumo se ha asociado a la formación de caries dental, la diabetes mellitus, el cáncer y la obesidad; razón por la cual se indica disminuir o eliminar de la dieta ^(7,8). En algunos países el consumo de azúcar representa la mayor parte de la ingestión energética total en las personas, sin embargo la Organización Mundial de la

Salud (OMS), recomienda una ingestión del 5% de azúcares del total de la energía consumida ⁽⁹⁾.

1.1.3 SUCRALOSA

La sucralosa o mejor conocida en el mercado como ® Splenda es un edulcorante artificial, con un poder endulzante aproximadamente 600 veces mayor que la sacarosa. Fue descubierta por Shashikant Phadnis en 1976 de forma accidental. Se fabrica por alogenación selectiva de la sacarosa, donde los tres grupos hidroxilo se reemplazan por cloro dando como resultado el compuesto químico 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-β-D-fructofuranosil 4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido ⁽¹⁰⁾.

Al momento existe polémica acerca del consumo de este edulcorante y los últimos estudios señalan que existen efectos adversos como el aumento en las concentraciones pico de glucosa y secreción de insulina, esto a través de la activación de receptores del gusto dulce en el páncreas ^(11,12); además se sugiere que este producto si se metaboliza en el tracto gastrointestinal ^(13, 14, 15).

Además se ha asociado a la disminución general de la microbiota existente, encontrándose una disminución mayor en las bacterias benéficas como lactobacilos y bifidobacterias en comparación con las bacterias patógenas, además este daño persistió hasta los tres meses posteriores al estudio ⁽¹⁶⁾.

1.1.4 STEVIA

La stevia es un edulcorante natural no calórico que fue aislado por primera vez en 1931 por Bridel y R Lavieille ⁽¹⁷⁾, su extracción se hace a partir de las hojas de una planta originaria de Paraguay denominada *Stevia rebaudiana bertonii*; presenta un poder endulzante 300 veces mayor que la sacarosa y ha sido utilizado como una opción para personas con dietas bajas en hidratos de carbono ⁽¹⁸⁾. Su uso no se ha limitado solo como aditivo alimentario, también es utilizado en la medicina tradicional como antiinflamatorio, inmunomodulador y antidiarreico, además de efectos antiapoptóticos ^(19,20).

Al ingerir la stevia, el organismo inicia la degradación en la microbiota intestinal en esteviol, esteviolbiónido y glucosa, que son absorbidos y metabolizados. Hasta el momento el consumo de la stevia no ha mostrado efectos secundarios que afecten al individuo por lo que en junio de 2008 el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), en conjunto con la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) aprobaron su uso como edulcorante y establecieron una ingestión diaria admisible para glucosidos de esteviol de hasta 4 mg/Kg de peso corporal ⁽²¹⁾.

1.2 ESTRÉS

El origen del concepto de estrés, parte de las investigaciones que realizó Hans Selye en el año de 1936 que dieron lugar al llamado “síndrome general de adaptación” que consta de tres fases: 1) de alarma, 2) de resistencia, 3) de agotamiento ^(22, 23). Chrousos y Gold, en 1992, sugieren la noción de un sistema como el efector del estrés, proponiendo que sobre un umbral de intensidad, cualquier agente estresante puede causar el síndrome del estrés, definiéndolo como un estado de discordancia o amenaza de la homeostasis que provoca una respuesta, la cual interactúa con el ambiente, experiencias previas así como determinantes de respuestas individuales al estrés ⁽²⁴⁾.

Además durante el estrés el organismo se prepara para un estado de “lucha o huida” por medio de respuesta físicas, fisiológicas y psicológicas que promueven la supervivencia del individuo; sin embargo cuando el estrés se prolonga de forma crónica existen efectos adversos como supresión del sistema inmunológico ⁽²⁵⁾.

1.2.1 EJE HIPOTALAMO HIPOFISIS ADRENAL (HHA).

El estrés fisiológico son todas las respuestas que suceden en el organismo ante un factor estresante interno o externo, con el objetivo de mantener la homeostasis en el cuerpo, lo cual lleva a la activación del eje Hipotálamo- Hipófisis- Adrenal (HHA) y el Sistema Nervioso Autónomo (SNA) ⁽²⁶⁾.

La activación del eje HHA es importante como parte de la adaptación del sistema neuroendocrino, en el que existe liberación de glucocorticoides, que es fundamental en la

respuesta a los factores estresantes. El eje HHA involucra una serie de procesos en los que el hipotálamo libera hormona corticotropina (CRH) y arginina vasopresina (AVP), las cuales actúan sobre la hipófisis, que en respuesta libera hormona adrenocorticotropica (ACTH) y cuyo blanco es la corteza renal, donde se liberan glucocorticoides, principalmente cortisol en seres humanos y corticosterona en roedores. Los glucocorticoides actúan en receptores del cerebro y tejidos periféricos que desencadenan cambios metabólicos, neuromoduladores e inmunológicos que ayudan al organismo a afrontar el estrés ⁽²⁷⁾.

1.2.2 HORMONAS DEL ESTRÉS.

Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que el estrés provoca un incremento en la secreción de hormonas glucocorticoides y catecolaminas debido a la activación del eje HHA y el SNA ⁽²⁸⁾.

1.2.3 GLUCOCORTICOIDES

Los Glucocorticoides (GC), son hormonas producidas en la corteza suprarrenal, son una clase de hormonas esteroides que se unen al receptor de glucocorticoides (GR), que está presente en casi todas las células de animales vertebrados. El nombre de glucocorticoides se deriva de su papel en la regulación del metabolismo de la glucosa, su síntesis en la corteza suprarrenal, y su estructura esteroidea. Los GC son parte del mecanismo de retroalimentación en el sistema inmunitario que disminuye su actividad (inflamación) ⁽²⁹⁾.

Los agentes estresantes pueden inducir la producción y secreción de la hormona relacionada con la corticotropina (CRH), así el hipotálamo, regula la secreción de ACTH por la hipófisis anterior, y ésta a su vez regula la actividad de células adrenocorticales de la zona glomerular y fascicular. Específicamente en la zona fascicular, la ACTH estimula la producción de cortisol en humanos o corticosterona en roedores. El incremento de ACTH induce a hipertrofia de la glándula suprarrenal ⁽³⁰⁾.

1.2.4 CORTICOSTERONA

Es un glucocorticoide, liberado junto al cortisol en la zona fascicular de la corteza suprarrenal. En los humanos se secreta en menor cantidad y, aunque sus efectos no sean importantes, constituye un precursor de la aldosterona. En otras especies la corticosterona es el principal glucocorticoide, involucrándose en la regulación del metabolismo, las reacciones inmunológicas y las respuestas de estrés. En situaciones de estrés, los incrementos de corticosterona plasmática que caracterizan a la respuesta de estrés en modelos animales, generalmente ejercen un efecto depresor sobre el sistema inmunológico⁽³¹⁾.

1.2.5 AGENTES ESTRESANTES.

La clasificación de los agentes estresantes según su categoría pueden ser divididos en:

- Estresantes físicos (la inmovilización, el frío, el calor, el ruido).
- Estresantes psicológicos (la inmovilización en animales).
- Estresantes sociales (la muerte y la dominancia).
- Estresantes biológicos (los virus, las bacterias y los hongos).
- Estresantes que modifican la homeostasis metabólica o cardiovascular (la hipoglucemia, la hipertensión y la hemorragia)⁽³²⁾

En experimentos con modelos murinos se pueden utilizar como agentes estresantes: la inmovilización o restricción, los cambios en el ciclo circadiano, la exposición a un predador, el ruido, el frío, el calor y el aislamiento, entre otros. De los modelos antes mencionados la restricción de movimiento y la inmovilización son los procedimientos más utilizados en el laboratorio, implican tanto estrés físico como psicológico y puede ser utilizado en estudios con exposición aguda o crónica dependiendo del diseño de estudio.^(33, 34)

1.3 PROTEÍNAS CARBONILADAS COMO MARCADOR BIOLÓGICO DE ESTRÉS OXIDANTE.

La carbonilación de proteínas es el proceso no enzimático irreversible y más perjudicial, que sucede cuando las proteínas no pueden ser reparadas y son inactivadas para su posterior

acumulación o degradación y el más perjudicial ^(35, 36); es considerada como una característica primordial en problemas relacionados con el estrés oxidante. Este proceso puede ser generado de forma directa por oxidación de los aminoácidos de la vía α -amidación o de forma indirecta mediante la formación de aductos con productos de la peroxidación de lípidos o glicación y los productos finales de la glicación avanzada ⁽³⁷⁾.

En la oxidación directa de proteínas se producen carbonilos altamente reactivos de la que resulta la oxidación de cadenas laterales de arginina, prolina, lisina y residuos de treonina por medio de un proceso catalítico con metales. La carbonilación por vía α -amidación se lleva a cabo por medio de la escisión de los residuos de glutamilo, semialdehído glutámico y semialdehído aminoadípico. Estas modificaciones oxidativas de proteína son causadas por reacciones entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS) y los residuos de aminoácidos de la proteína; este proceso de inestabilidad es conocido como estrés oxidante ⁽³⁸⁾.

1.4 ESTRÉS OXIDANTE.

El estrés oxidante es una condición de desequilibrio bioquímico que ocurre cuando existe un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y el sistema antioxidante endógeno, lo que induce una serie de reacciones en cadena que tienen como consecuencia un daño celular y el posterior desarrollo de enfermedades como la hipertensión arterial, el Alzheimer y el Parkinson entre otras. En una reacción de óxido-reducción existe un intercambio de electrones en el que participa un oxidante que se define como un compuesto químico que se reduce ganando electrones y un reductor que se oxida, es decir pierde electrones ⁽³⁹⁾. Los organismos aerobios, derivado del metabolismo normal, generan moléculas oxidantes denominadas especies reactivas, de las cuales las de oxígeno son las predominantes. Sin embargo también existen condiciones externas que aumentan las ERO como el tabaco, el consumo de alcohol, la exposición a químicos y el estrés ⁽⁴⁰⁾.

Las ERO incluyen los radicales superóxido ($O_2\cdot$), radical hidroxilo (OH), peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y radical nitrilo (NO) ⁽⁴¹⁾. Aunque estas especies reactivas de oxígeno tienen un papel primordial en la señalización celular normal ⁽⁴²⁾, el aumento de sus

concentraciones por un tiempo prolongado puede tener como consecuencia cambios a nivel celular en el ADN, el ARN, los lípidos, los hidratos de carbono y las proteínas ⁽⁴³⁾. Estas modificaciones se encuentran ligadas a apoptosis y cambios en el metabolismo celular ⁽⁴⁴⁾.

Como parte de la función reguladora del organismo existen defensas antioxidantes endógenas que se encargan de mantener las concentraciones de ERO como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), el glutatión reducido (GSH), y la glutatión peroxidasa (GPx). A pesar de ello, cuando las especies reactivas de oxígeno están elevadas de manera crónica el organismo no es capaz de regular estas condiciones y se genera daño celular ^(45, 46).

Considerando la intensidad y el grado de alteración a la salud del individuo, el estrés oxidante se clasifica en tres etapas: Adaptación al estrés oxidante, estrés oxidante agudo y estrés oxidante crónico.

1.- Adaptación al estrés oxidante: Durante este proceso ya existe una sobreproducción de ERO y en consecuencia una presencia de estrés oxidante, pero el organismo todavía es capaz de neutralizar los daños por medio de procesos de sobreexpresión genética y activación enzimática. Si este proceso de adaptación no es posible o se agota la reserva antioxidante, se presenta un daño que puede variar en la intensidad y la duración.

2.- Estrés oxidante agudo: En esta etapa generalmente participan especies reactivas de oxígeno menos reactivas como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que en condiciones normales tienen un papel importante en la fisiología. Los cambios presentados a nivel fisiológico y anatómico son sutiles en comparación con los procesos crónicos.

3.- Estrés oxidante crónico: El radical hidroxilo ($HO\bullet$) es parte fundamental en este proceso en el que se presenta hidroxilación, que desencadena la liberación de una segunda generación de productos de oxidación, que se caracterizan por ser moléculas muy reactivas que aumentan el daño celular y tisular reflejado en el rompimiento o modificación de

moléculas y organelos celulares, cuyos productos se incorporan a la circulación para que sean sometidos a procesos de desintoxicación en el hígado y eliminación renal. Por otro lado las moléculas producidas por el daño oxidante pueden interactuar con otras biomoléculas, afectando su estructura y función; que en consecuencia crea estrés oxidante intracelular y se manifiesta principalmente por alteraciones funcionales locales y sistémicas.

El daño provocado por el estrés oxidante puede presentarse por un proceso de oxidación directa o indirecta, no obstante la diferencia que existe entre el estrés agudo y el crónico radica en la eliminación del agente oxidante. Mientras en el estrés oxidante agudo existe la recuperación celular y del organismo, en el estrés oxidante crónico el daño es comúnmente irreversible ⁽⁴⁷⁾.

1.5 LINFOCITOS

Los linfocitos son los agranulocitos más abundantes de los leucocitos sanguíneos, siendo las únicas células del organismo capaces de reconocer y diferenciar antígenos diferentes, por lo cual son responsables de dos características primordiales en el sistema inmunitario adaptativo: La especificidad y la memoria. De acuerdo a su tamaño se pueden identificar tres tipos de linfocitos: Linfocitos pequeños, que se encuentran en fase de reposo; los linfocitos medianos y los linfocitos grandes o linfoblastos que poseen receptores en la superficie, que tienen la función de interactuar con un antígeno específico o bien linfocitos NK (Natural killer).

Por su función pueden ser clasificados en linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK. Los linfocitos B se diferencian en la médula ósea o en el GALT, participan en la síntesis y secreción de anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas como la IgM e IgD durante su etapa madura, que son inmunoproteínas asociadas con la inmunidad humoral. Los linfocitos T son células efectoras de la inmunidad mediada por células, sus precursores se originan en la médula ósea, pero el timo es el órgano donde maduran, se subdividen en linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos; expresan marcadores CD2, CD3 y CD7; sin embargo se subclasifican por la presencia de los marcadores superficiales CD4 y

CD8. La principal función de los linfocitos NK o también llamados linfocitos granulares grandes es la inmunidad innata, estas células han sido programadas genéticamente para identificar células alteradas, como células infectadas y células tumorales, posterior al reconocimiento de estas células proceden a liberar perforinas y granzimas; que crean canales en la membrana plasmática de la célula, lo cual induce a apoptosis.

En general los linfocitos al inicio son programados genéticamente para reconocer un solo antígeno, denominado proliferación y diferenciación antígeno-independiente. Estas células inmunocompetentes posteriormente entran a circulación sanguínea y linfática, para dispersarse en tejido conjuntivo para su posterior activación en órganos linfáticos secundarios para convertirse en linfocitos efectores y linfocitos con memoria ^(48, 49).

1.6 PLACAS DE PEYER.

Estas son un cúmulo de tejido linfático macroscópico que se localiza a lo largo de la pared del intestino delgado ⁽⁵⁰⁾, existiendo una diferencia importante en el número de las placas de Peyer encontradas en cada organismo, en el ser humano el número es mayor a 100 PP mientras que en ratones se encuentran entre 6 y 12 PP ⁽⁵¹⁾.

En este tejido se encuentran localizados folículos de células T y células B, los cuales se encuentran separados de la luz intestinal por una capa de epitelio folicular que contiene células que son infiltradas por un número importante de células T, células B, células dendríticas y macrófagos ^(52, 53). Su función inmunológica la cumplen al estar a lo largo de todo el intestino, donde se encuentran en contacto continuo con antígenos como: los alimentos, los medicamentos y la microflora intestinal. Su capacidad de mantener las condiciones apropiadas de homeostasis reside en identificar entre agentes nocivos y agentes benéficos para el organismo. Cuando se presentan antígenos en las placas de Peyer, son activadas las células B y T, las cuales migran a circulación sanguínea y posteriormente al bazo donde se diferencian y proliferan para regresar a la lámina propia y a las zonas de la mucosa. Las células B blásticas sufren diferenciación terminal a células plasmáticas, la mayoría de las cuales secretan IgA ⁽⁵⁴⁾.

Las PP forman parte del tejido linfático asociado a intestino (GALT) y comparten características con los ganglios linfáticos secundarios como la presencia folicular de células B y regiones parafoliculares de células T. Sin embargo también tienen características únicas como la presencia de antígenos específicos en el lumen intestinal, contienen eferentes linfáticos pero no aferentes, razón por la cual no tienen entrada de antígenos por vía sistémica ⁽⁵⁵⁾.

1.7 BAZO.

El bazo es un órgano linfoide secundario localizado en el cuadrante izquierdo del hipogastrio, inmediatamente por debajo del diafragma, su lado cóncavo se encuentra en contacto con el colon, el riñón izquierdo y el estómago. En esta zona cóncava se localiza el hilio esplénico que forma parte de la entrada y salida de vasos linfáticos, nervios y la ruta venosa y arterial. Su color es normalmente café, presenta forma de frijol y el tamaño varía según el organismo y la edad, presentando en una persona adulta un peso aproximado de 150 gramos ⁽⁵⁶⁾.

Este órgano se integra por la pulpa roja y la pulpa blanca, que se encuentran separadas por la zona marginal. La pulpa roja tiene como función el filtrado de sangre en el que son eliminados los microorganismos, los glóbulos rojos defectuosos o viejos y los antígenos. En la pulpa blanca existe producción de linfocitos, células plasmáticas y anticuerpos ^(57, 58). Otra función importante del bazo es la producción de tuftina y propertina, que tienen un papel importante en la fagocitosis de las bacterias con cápsula ⁽⁵⁹⁾

2. Planteamiento del Problema:

La modernización en la vida cotidiana ha traído como consecuencia cambios en los estilos de vida, como el sedentarismo, el trabajo en exceso, los cambios en la alimentación, la modificación de hábitos y el estrés constante; lo cual ha ocasionado un aumento en el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

Dentro de la modificación de hábitos en lo referente a la alimentación se ha observado un incremento considerable en el consumo de edulcorantes no nutritivos, que aportan un sabor dulce sin aumentar el contenido energético de la dieta; esta situación ha favoreciendo la comercialización de diversos sustitutos del azúcar, tanto naturales (estevia) como artificiales (sucralosa).

Existen estudios que favorecen ampliamente el uso de edulcorantes no nutritivos¹, su uso se enfoca principalmente en la prevención de enfermedades metabólicas crónicas y reducción de caries. El efecto en el sistema inmunitario ha sido poco explorado y la respuesta en el organismo depende de cada edulcorante. Por ejemplo, la sucralosa ha sido relacionada con la enfermedad inflamatoria intestinal, mientras que a los esteviosidos se les ha relacionado con un aumento en la actividad fagocítica y estimulación en la proliferación de células T.

Por otro lado el estilo de vida actual uno de los factores de riesgo que tiene mayor presencia y trascendencia es el estrés, el cual está ampliamente documentado que afecta al sistema inmunitario, provocando un incremento en la secreción de hormonas glucocorticoides y aumento en el estrés oxidante. En los animales las situaciones de estrés llevan a un incremento de corticosterona plasmática, que generalmente ejerce un efecto depresor sobre el sistema inmunológico. El efecto conjunto del consumo de edulcorantes y la exposición al estrés crónico no ha sido estudiado en relación al efecto sobre los linfocitos, por ello surge la pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto del consumo prolongado de edulcorantes en ratones CD1 sometidos a estrés crónico en los linfocitos de sangre, placas de Peyer y bazo?

3. Hipótesis:

Hipótesis alterna:

- El consumo prolongado de Sucralosa y la exposición a estrés crónico en ratones CD1 aumentará la carbonilación de proteínas en los linfocitos de sangre, bazo y placas de Peyer; en comparación con los otros grupos de estudio.

Hipótesis nula:

- El consumo prolongado de Sucralosa y la exposición a estrés crónico en ratones CD1 no aumentará la carbonilación de proteínas en los linfocitos de sangre, bazo y placas de Peyer; en comparación con los otros grupos de estudio.

4. Objetivos:

General:

- Comparar la carbonilación de proteínas en los linfocitos de sangre, placas de Peyer y bazo de ratones CD1 que consumen edulcorantes y son sometidos a estrés crónico

Específicos:

- Analizar el índice de masa corporal (IMC).
- Comparar la ingestión de alimento y agua ingerida entre los grupos.
- Medir la concentración de glucosa en la semana tres, seis, nueve, doce y quince del tratamiento para comparar entre los grupos.
- Aislar linfocitos de sangre, bazo y placas de Peyer para su conteo.
- Determinar la concentración de proteínas carboniladas para establecer el estrés oxidante.

5. Justificación

La vida actual ha traído como consecuencia cambios en los estilos de vida del ser humano, los cuales se ven reflejados en el sedentarismo, el tabaquismo, el trabajo en exceso, el estrés en la vida cotidiana y la modificación en los hábitos alimentarios, que en consecuencia han ocasionado la aparición de múltiples enfermedades crónicas.

Una de las modificaciones trascendentes en los hábitos alimentarios es la inclusión en la dieta de edulcorantes bajos en calorías, los cuales son consumidos de forma indiscriminada no sólo por personas que así lo desean; sino también por la población que no sabe que los está ingiriendo; debido a que diversos alimentos, bebidas y medicamentos que se consumen comúnmente lo tienen en su contenido.

Otro componente en la vida actual del ser humano es la exposición a situaciones estresantes como la presión en el trabajo, la escuela, el tráfico, las condiciones sociales, políticas y económicas; condiciones que sin duda se convierten en factores de riesgo para el individuo.

Si se analiza el contexto en el que se desarrolla el ser humano en la actualidad, se percibe de una forma clara que el consumo de edulcorantes y la exposición a situaciones estresantes son condiciones en las cuales el individuo está viviendo.

Existen estudios sobre el estrés oxidante relacionado con el estrés crónico, pero la mayoría ha evaluado el daño en moléculas de lípidos y no de proteínas, además no existen estudios que relacionen el consumo prolongado de edulcorantes y exposición crónica a estrés en el daño a los linfocitos

6. Material y Métodos:

6.1 Diseño de estudio

Se utilizaron 136 ratones CD1 machos, divididos en 17 grupos de 8 ratones cada uno de la siguiente manera: a) grupo basal (BAS 3), grupos que iniciaron la intervención a las 3 semanas de vida y fueron sacrificados a las 9: b) Control sin edulcorante (CL9), c) Sacarosa (SAC9), d) sucralosa (SUC9), e) estevia (EST9), f) control con estrés (CL+E9), g) sacarosa más estrés (SAC+E9), h) sucralosa más estrés (SUC+E9) y i) estevia más estrés (EST+E9). Grupos que iniciaron la intervención a las 3 semanas de vida y fueron sacrificados a las 15: j) Control sin edulcorante (CL15), k) Sacarosa (SAC15), l) sucralosa (SUC15), m) estevia (EST15), n) control con estrés (CL+E15), o) sacarosa más estrés (SAC+E15), p) sucralosa más estrés (SUC+E15) y q) estevia más estrés (EST+E15).

Todos los ratones fueron alimentados con dieta para ratón de la marca Rodent Laboratory Chow 5001 de Purina (3.02Kcal/gr)⁽⁶⁰⁾, se les administró la comida y el agua *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12/12 h. Se consideraron las especificaciones de la “NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999”⁽⁶¹⁾ para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.2 Procedimientos

Administración del edulcorante.

La administración de los edulcorantes se realizó vía oral con una pipeta graduada, en un horario entre las 11:00 y 13:00 hrs. Las soluciones se prepararon con agua ultrapura y el edulcorante correspondiente, a razón de 10g/240mL (SAC), 1g/240mL (SUC), y 1g/240mL (EST); esto de acuerdo a las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011 para bebidas saborizadas no alcohólicas⁽⁶²⁾.

Modelo de estrés.

Se utilizó un modelo de restricción de movimiento, manteniendo a cada uno de los animales en un cilíndrico de acrílico con un tamaño y ventilación adecuados, se ejecutó 2hrs/día 5 veces a la semana ^(63,64).

Ingestión de energía

El consumo de energía se determinó por cada ratón en KJ/día, incluyendo el aporte energético del alimento y el edulcorante correspondiente. En lo referente al alimento, el cálculo se realizó tomando en cuenta lo especificado en la ficha técnica proporcionada por el fabricante con la siguiente formula:

$$\text{Ingestión de energía} = (\text{Consumo de alimento}) (\text{Energía metabolizable de la dieta})$$

Índice de masa corporal (IMC)

La obtención del índice de masa corporal, se efectuó a partir del peso corporal en gramos y la longitud del cuerpo en cm, con la siguiente formula:

$$\text{IMC} = \frac{(\text{Peso corporal})}{(\text{Longitud del cuerpo})^2}$$

La longitud del cuerpo fue medida con una cinta de fibra de vidrio tomando como puntos de referencia la nariz y el ano. Mientras que para la obtención del peso se utilizó una balanza granataria con cesta para ratones (Ohaus, triple beam balance 700 series) ⁽⁶⁵⁾.

Medición de la concentración de glucosa.

Se cuantificó la glucosa plasmática utilizando un glucómetro One Touch de Bayer, en un horario entre 12:00 y 13:00 hrs, esto posterior a la administración del edulcorante y la exposición a estrés. Estas mediciones se realizaron en la semana 3, 6, 9, 12 y 15 (edad), obteniéndose la sangre por punción en la zona distal de la cola.

Obtención y procesamiento de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical ⁽⁶¹⁾. Se obtuvo 1 mL de sangre periférica mediante punción cardiaca directa utilizando jeringas impregnadas con 10µl de heparina; para el aislamiento de los linfocitos se utilizaron gradientes de densidad con Lymphoprep™ (Axis-Shield)⁽⁶⁶⁾. Una vez obtenida la sangre, se procedió a remover el bazo y el intestino delgado.

El bazo fue removido y homogeneizado manualmente en una caja Petri con 3 mL de solución RPMI (pH 7.4), la mezcla fue filtrada con organza para eliminar el tejido conectivo remanente y finalmente fue centrifugada a 2500 rpm/5 min, se lisaron los glóbulos rojos con buffer ACK ⁽⁶⁷⁾.

El intestino delgado fue removido y lavado con solución salina. Las placas de Peyer fueron recuperadas y homogeneizadas manualmente en una caja Petri con 3 mL de solución RPMI (pH 7.4); posteriormente la mezcla fue centrifugada a 2500 rpm/5min.

Las pastillas celulares obtenidas fueron resuspendidas en medio RPMI para su conteo celular en un microscopio óptico, utilizando una cámara de Neubauer, finalmente se congelaron a -70°C para su posterior análisis.

Conteo de Células en Cámara de Neubauer.

Se tomó una alícuota de la suspensión que contenía las células. Se depositaron 25µL de muestra en la cámara de Neubauer, se procedió a cubrir con el cristal cubre cámara y se llevó al microscopio óptico para proceder al conteo ⁽⁶⁸⁾.

Determinación de proteínas carboniladas

Para determinar el daño oxidante en proteínas se utilizó un método espectrofotométrico de carbonilación en muestras de linfocitos de la sangre periférica, el bazo y las placas de Peyer; los botones celulares de linfocitos diluidos en 500 µL de solución salina, se homogenizaron, centrifugaron y se utilizó el sobrenadante para la medición de las proteínas carboniladas; se utilizó de cada muestra un tubo blanco y otro problema, se incubaron

durante 1h en condiciones de oscuridad, agitando en vórtex cada 15 minutos. Luego de la incubación se agregó a cada tubo 1mL de Ácido Tricloroacético (TCA) al 10% y se centrifugó durante 5 minutos a 2500rpm, desechando el sobrenadante (quedando una pastilla). Posteriormente se agregó 1mL de TCA al 5% y se disolvió la pastilla, se centrifugó durante 5 minutos a 2500rpm, se desechó el sobrenadante y se agregaron 2 mL de solución de etanol-acetato de etilo (1:1), se centrifugó durante 5 minutos a 2500rpm, eliminando el sobrenadante, después de que la pastilla estuvo perfectamente seca, se disolvió en 1 mL de guanidina y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, posterior a esto se realizó la lectura de las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 370nm, utilizando guanidina para calibrar ⁽⁶⁹⁾. Paralelamente se realizó la determinación de proteínas por la técnica de Lowry con reactivo de Folin Fenol, ⁽⁷⁰⁾ se agregaron 50uL de muestra a cada tubo, 1mL de solución cuproalcalina y finalmente 100ul de Folin 1N agitando en vortex para evitar la formación de precipitados, se incubó por 45 min y la lectura de las muestras fueron por medio de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm. Para conocer la carbonilación de las proteínas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{[(\text{Blanco-Problema}) \times 45.45] \times 1000\text{mL de muestra utilizados}}{(\text{Proteínas de Lowry} \times 10)} = \text{pmoles/dL}$$

6.3 Variables de Estudio

Independientes:

- Consumo crónico de edulcorantes
- Exposición a estrés crónico.

Dependientes:

- Índice de masa corporal.
- Consumo energético.
- Ingestión de agua.

- Concentración de glucosa
- Linfocitos en la sangre.
- Linfocitos en el bazo.
- Linfocitos en las placas de Peyer.
- Proteínas carboniladas en linfocitos de sangre
- Proteínas carboniladas en bazo
- Proteínas carboniladas en placas de Peyer.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERATIVA	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS
VARIABLES INDEPENDIENTES					
Consumo crónico de edulcorantes.	Acción y efecto de ingerir un edulcorante.	Consumo crónico del edulcorante correspondiente a cada grupo, de acuerdo al peso semanal de cada uno de los ratones: 1.- Sacarosa 41mg/mL 2. Sucralosa 4.1 mg/mL 3.- Estevia 4.1 mg/mL	Catagórica policotómica nominal cuantitativa	- Consumo de sacarosa. - Consumo de sucralosa. - Consumo de estevia.	Variable de agrupación.
Estrés crónico.	Acción y efecto de exponerse a estrés.	Exposición a estrés crónico por un modelo de restricción de movimiento por 2 hrs/día, de lunes a viernes.	Catagórica, nominal.	Con estrés Sin estrés	Variable de agrupación.
VARIABLES DEPENDIENTES.					
Índice de masa corporal	Indicador simple de la relación entre el peso y la talla.	IMC= (Peso corporal en gr)/ (longitud del cuerpo cm) ²	Cuantitativa continua	g/cm ²	ANOVA
Ingestión de agua	Acción y efecto de consumir agua.	Ingestión semanal de agua por ratón.	Cuantitativa continua	ml/semana	ANOVA
Ingestión de alimento	Acción y efecto de consumir alimento.	Ingestión semanal de alimento por ratón.	Cuantitativa continua	g/sem	ANOVA
Concentración de glucosa	Cantidad de glucosa que contiene la sangre.	Concentración de glucosa en cada uno de los grupos de estudio.	Cuantitativa continúa.	mg/dL.	ANOVA.
Linfocitos en sangre	Células presentes en sangre	- Linfocitos en sangre	Cuantitativa discreta	Numero de células x 10 ⁶	ANOVA
Linfocitos en bazo	Células presentes en el bazo	- Linfocitos en bazo	Cuantitativa discreta.	Número de células x 10 ⁶	ANOVA
Linfocitos en placas de Peyer	Células presentes en las placas de Peyer	- Linfocitos en placas de Peyer	Cuantitativa discreta.	Número de células x 10 ⁶	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos de sangre	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de sangre.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos del bazo	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de sangre.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA
Proteínas carboniladas en linfocitos de las placas de Peyer	Biomarcador de estrés oxidante	Presencia de proteínas carboniladas en linfocitos de sangre.	Cuantitativa continúa.	Nmol/mg de proteína.	ANOVA

6.4 IMPLICACIONES BIOÉTICAS

El estudio se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio ⁽⁷¹⁾. Con previa autorización del comité de Bioética e Investigación de la Facultad de Medicina de la UAEMex.

6.5 RECOLECCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se recabaron en el programa estadístico SPSS versión 19 para Windows. Se aplicaron pruebas estadísticas de tendencia central (media) y de dispersión (desviación estándar) y para la comparación de medias se analizó por medio de ANOVA.

7. Resultados

7.1 Título corto del artículo enviado

“ RELATIONSHIP BETWEEN PROLONGED SWEETENER CONSUMPTION AND CHRONIC STRESS IN THE PRODUCTION OF CARBONYL PROTEINS IN BLOOD LYMPHOCYTES ”

7.1.1 Página frontal

Relationship between prolonged sweetener consumption and chronic stress in the production of carbonyl proteins in blood lymphocytes

1. Lucía García-Iniesta¹; lgi2285@hotmail.com
2. Beatriz Elina Martínez-Carrillo^{1*}; martinez_elina9@hotmail.com
3. Roxana Valdés-Ramos¹; rvaldesr@uaemex.mx
4. Rosa Adriana Jarillo-Luna²; rosana1112@yahoo.com.mx
5. Jorge Alberto Escoto-Herrera¹; jescotoh@gmail.com
6. Albor Reséndiz-Albor²; alrealdo@yahoo.com.mx

¹Laboratorio de Investigación en Nutrición, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esquina Jesús Carranza s/n, Colonia Moderna de la Cruz, C.P. 50180, Toluca, MEX., México.

²Sección de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de San Luis y Díaz Mirón 11340, Ciudad de México, DF, México.

*Correspondence should be addressed to Beatriz Elina Martínez-Carrillo;
martinez_elina9@hotmail.com

Keywords: sweetener, stress, lymphocytes, carbonylated proteins.

Abbreviations list:

Non Nutritive Sweeteners: NNS

Reactive Oxygen Species: ROS

Basal Group: BG

Without Stress Group: WSG

Stress Group: SG

Control: CL

Sucrose: Suc

Sucralose: Sucl

7.1.2 Carta de envío

De: em.nuam.0.4eeb33.1249440f@editorialmanager.com

<em.nuam.0.4eeb33.1249440f@editorialmanager.com> en nombre de Nutrition & Metabolism Editorial Office <em@editorialmanager.com>

Enviado: lunes, 31 de octubre de 2016 10:48 p. m.

Para: Beatriz Elina Martinez-Carrillo

Asunto: Confirmation of your submission to Nutrition & Metabolism NUAM-D-16-00246

NUAM-D-16-00246

RELATIONSHIP BETWEEN PROLONGED SWEETENER CONSUMPTION AND CHRONIC STRESS IN THE PRODUCTION OF CARBONYL PROTEINS IN BLOOD LYMPHOCYTES.

Lucía García-Iniesta; Beatriz Elina Martinez-Carrillo, PhD; Roxana Valdés-Ramos; Rosa Adriana Jarillo-Luna, Dr; Jorge Alberto Escoto-Herrera; Aldo Reséndiz-Albor

Nutrition & Metabolism

Dear Dr Martinez-Carrillo,

Thank you for submitting your manuscript 'RELATIONSHIP BETWEEN PROLONGED SWEETENER CONSUMPTION AND CHRONIC STRESS IN THE PRODUCTION OF CARBONYL PROTEINS IN BLOOD LYMPHOCYTES.' to Nutrition & Metabolism.

The submission id is: NUAM-D-16-00246

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://nuam.edmgr.com/>

7.1.3 Resumen

Antecedentes: El estilo de vida moderno ha causado cambios en los hábitos alimenticios, inactividad física y aumento del estrés en la vida cotidiana; estas condiciones de vida en conjunto, favorecen la producción de estrés oxidante, particularmente generando proteínas carboniladas, este daño a las proteínas en el cuerpo, resulta de un aumento en las especies reactivas de oxígeno, produciendo un daño irreversible a la estructura de las proteínas en las células y matriz extracelular; todavía no está claro, si el aumento en la concentración de estas proteínas es el origen o la consecuencia de la enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar en un modelo de ratones jóvenes sanos, si existe correlación entre el consumo prolongado de edulcorantes y la presencia de estrés fisiológico crónico, con la producción de proteínas carboniladas en linfocitos de sangre periférica.

Métodos: se utilizaron 72 ratones machos CD1 de 21 días de edad, divididos en tres grupos: a) Grupo Basal, b) con estrés y c) sin estrés, cada grupo se conformó para cuatro subgrupos: i) Control, ii) Sacarosa, iii) Sucralosa y Stevia; el edulcorante y la sesión de estrés por inmovilización se aplicaron durante 6 semanas. Se determinaron el índice de masa corporal, la glucosa, la ingesta de alimentos, el número de linfocitos periféricos en sangre y la concentración de proteínas carboniladas en los linfocitos.

Resultados: La concentración de glucosa aumentó ($F = 17,47$ $p < 0,01$) en todos los grupos; el peso aumentado ($F = 47,11$ $p < 0,01$) en el subgrupo de Sucl + S; los linfocitos de sangre periférica ($F = 19,97$ $p < 0,01$) aumentaron en todos los subgrupos. La concentración de proteínas carboniladas en los linfocitos de la sangre periférica ($F = 51,16$ $p < 0,01$) aumentó en todos los grupos.

Conclusiones: La combinación de estrés y uso prolongado de sacarosa, modifica el número de linfocitos y aumenta la concentración de proteínas carboniladas, a diferencia de la stevia que aumenta el número de células y reduce la producción de proteínas carboniladas.

7.1.4 Abstract

Background: The modern lifestyle has caused change in eating habits, physical inactivity and increased stress in daily life; these living conditions together, favor the production of oxidative stress, particularly generating carbonylated proteins, this damage to proteins in the body, resulting from an increase in reactive oxygen species, producing irreversible damage to structural proteins in cells and extracellular matrix; it is not yet clear, whether the rise in the concentration of these proteins is the origin or consequence of the disease. Therefore the objective of this study is to determine in a model of healthy young mice, if exist correlation between prolonged consumption of sweeteners and the presence of chronic physiological stress, with production carbonylated proteins in peripheral blood lymphocytes.

Methods: were used 72 CD1 male mice of 21 days old, divided into three groups: a) Basal Group, b) with stress and c) without stress, each group was conformed for four subgroups: i) Control, ii) Sucrose, iii) Sucralose and Stevia; sweetener and immobilization stress session were applied for 6 weeks. Were determined body mass index, glucose, food intake, number of blood peripheral lymphocytes and concentration of carbonylated proteins in lymphocytes.

Results: The glucose concentration increased ($F = 17.47$ $p < 0.01$) in all groups; weight increased ($F = 47.11$ $p < 0.01$) in the subgroup of Sucl + S; blood peripheral lymphocytes ($F = 19.97$ $p < 0.01$) increased in all subgroups. Carbonylated protein concentration in peripheral blood lymphocytes ($F = 51.16$ $p < 0.01$) increased in all groups.

Conclusions: the combination of stress and prolonged use of sucrose, modifies the number of lymphocytes and increases the concentration of carbonylated proteins, unlike stevia that increases the number of cells and reduces the production of carbonylated proteins.

7.1.5 Background

Sweeteners are substances which cause sweet taste and stimulate psychobiologically human beings. This sweetness is pleasant and promotes excessive intake of foods rich in simple carbohydrates [1,2]. Sucrose or sugar, is widely used as a natural sweetener, it is extracted from the root of the beet or sugarcane and provides 4 kcal per gram [3]; however, non-nutritive sweeteners (NNS) have been sought as a replacement of sweetness; actually the most used sweeteners are sucralose and stevia [4]. Sucralose, commercially known as Splenda[®] is an artificial sweetener [5], produced by selective halogenation of sucrose where the three hydroxyl groups are replaced by chlorine [6]; steviol glycosides, are natural sweeteners derived from the purification of *Stevia Rebaudiana Bertoni*, also known as "honey leaf" because of its high sweetening power [7]. The metabolism of each of these sweeteners is performed differently, sucrose is hydrolyzed in the intestine to monosaccharides glucose and fructose, and transported through the apical membrane of the intestinal epithelial cells by facilitated transport (GLUT5), hence, both glucose and fructose pass through the basolateral membrane into the circulation (GLUT2) [8,9]. Unlike sucrose, sucralose is not used in the body as an energy substrate, because it is not recognized as a carbohydrate, about 2% of the ingested sucralose is biotransformed into negligible toxic components which are excreted in the urine [10]. Steviol glycosides, are hydrolyzed by the intestinal microbiota to steviol metabolites, which are absorbed in the form of steviol and this is transformed in the liver to steviol glucuronide and eliminated through feces [11]. Sucrose consumption has been associated with diseases such as dental caries, diabetes mellitus, cancer and obesity among others; so it has been suggested to decrease their consumption in the diet [12]. Regarding the consumption of sucralose, its effects are still controversial; in recent studies they have reported adverse effects on glucose tolerance as a result of alteration in the intestinal microbiota [5,13,14]. The crude extracts of stevia leaf, are associated with infertility, kidney and cardiovascular damage [15], but the pure extracts are related to anti-inflammatory, immunomodulatory and antiapoptotic effects [16]. There is controversy about the effects on the immune system, secondary to the consumption of these sweeteners; sucrose consumption is related to increased concentrations of inflammatory markers such as haptoglobin, transferrin and C-reactive protein [17]. It has

been found that sucralose suppresses the secretion of interleukin-6 and 10 (IL-6 and IL-10) [18], it also modifies the composition of the intestinal microbiota and is associated with the presence of allergies, Crohn's disease and inflammatory bowel disease [5]. In addition, immunomodulatory effects of stevia are attributed to the stimulation of cellular and humoral immunity, phagocyte function, hemagglutination, delayed type hypersensitivity and B and T cell proliferation [19]. Individuals are currently living under physiological stress, accelerated by different situations such as work, emotional and psychological stress situations, etc. Stress is defined as a state of dissonance or threat of homeostasis that elicits a response, which interacts with the environment, previous experiences and determinants of individual responses to stress [20]. When exposure to stress is prolonged, it has physiological and psychological consequences for the individual [21,22], such as hyperglycemia, neuronal cell death and immunosuppression [23], among others. In exogenous conditions such as excessive alcohol consumption [24], environmental pollution [25] and stressful situations [26], stress contributes to the excessive production of reactive oxygen species (ROS). A biomarker that reflects the damage caused by excess production of ROS, is the carbonylation of proteins characterized by a non-enzymatic and irreversible reaction which has adverse effects on cells as a result of the change in the structure and function of proteins [27,28]. Therefore the objective of this study is to determine in a model of healthy young mice, if exist correlation between prolonged consumption of sweeteners and the presence of chronic physiological stress, with production carbonylated proteins in peripheral blood lymphocytes.

7.1.6 Material and methods

Animals. The present experimental, prospective, controlled, and randomized study was conducted with weanling 21-day old male CD1 mice obtained from the bioterium of the Faculty of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de México. Animal care and experimental procedures were carried out in accordance to the standards of the International Regulation for the Use of Laboratory Animals of the Universidad Autónoma del Estado de México, as well as the guidelines of the Mexican Secretary of Health for the production and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999 Ministry of Agriculture, Mexico City,

Mexico). Animals were housed in individual cages during the entire experiment; a normal diet (Rodent Laboratory Chow 5001 Purina, 3.02Kcal/gr) and water *ad libitum* were offered from the 4th to the 9th week of life. All animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle.

Experimental Groups. Mice were randomly assigned to one of three experimental groups: i) Basal Group, n=8 (BG), ii) Without Stress Group, n=32 (WSG), iii) Stress Group n=32 (SG). Group ii (WSG) and iii (SG) were divided into four subgroups for the administration of different sweeteners: a) Control (CL), b) Sucrose (Suc), c) Sucralose (Suc1), and d) Stevia (St); a) Control + Stress (CL + S), b) Sucrose + Stress (Suc + S), c) Sucralose + S (Suc1 + S), Stevia + S (St + S). At 21 days of age, weanling mice were sacrificed n=8 (BG), the other groups (WSG and SG) were maintained for 6 weeks (4th to 9th week of life). Glucose concentration (mg/dL), weight gain per week (g), body mass index (BMI), and food and water consumption were measured.

Quantification of Body Mass Index (BMI). The BMI of animals was calculated at the beginning (week 4) and at the end (week 9) of the study by using the formula $BMI = \text{mass (g)}/\text{length (cm)}^2$. Length was determined by measuring the animal from the nose to the anus [29,30]. Afterwards, the difference between the BMI of the animals at week 9 and week 4 was calculated and recorded as the increase.

Sweetener Administration. The solution with sweeteners, was administered and prepared with ultrapure water at a concentration of 41 mg/ml/g of weight/week (Suc), and 4.1 mg/ml/g of weight/week (Suc1 and St). The sweeteners were administered in the morning (8 at 10 am), for direct oral deposition (500µl) with a graduated pipette.

Quantification of Glucose. The concentration of glucose was determined in peripheral blood per week (3, 6 and 9), by puncturing the distal portion of the tail, using a One Touch Bayer glucometer (7 – 8 h am), after sweetener administration and stress exposure.

Stress Model. An immobilization model was used for inducing stress; mice were introduced into an acrylic tube, suitable in size and ventilation, fixing the tail of the mouse to the outer surface with adhesive tape. Exposure to stress was performed daily 2h (10-12 pm) for 5 days a week (Monday at Friday) [25,26].

Collection of Biological Samples. At the end of the 9th week of life and after sweetener administration and exposure to stress cycles, the animals were anaesthetized with pentobarbital (80mg/kg), bled by direct cardiac puncture (using a syringe with heparin), and sacrificed by cervical dislocation. From the blood samples, leukocytes were purified utilizing Ficoll-Hypaque Plus (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden). Cells were maintained in a cold RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, USA); then centrifuged at 2500 rpm/5 min; the button of blood cells obtained was placed in a hypotonic buffer solution (8.26g/L of NH_4Cl , 1g/L of KHCO_3 and 0.037 g/L of EDTA-4Na, pH de 7.4) to lyse erythrocytes. The single-cell suspension of blood was washed with PBS. Cell viability was assessed with trypan blue assay and counted in a Neubauer chamber; after the count, the number of cells per milliliter of PBS was reported.

Determination of Carbonylated Proteins. Protein carbonyl groups were detected and quantified using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [31]. Briefly, 0.5 mL serum (1 mg protein/mL) were treated with 0.5 mL 10 mM DNPH in 2M HCL, or with 0.5 mL 2 M HCL alone for the blank. Samples were incubated for 1 h at room temperature in the dark and then treated with 10% trichloroacetic acid and centrifuged. The pellet was washed three times in ethanol/ethyl acetate and solubilized in 1 mL of 6 M guanidine with 20mM potassium phosphate, adjusted to pH 2.3 with trifluoroacetic acid. The resulting solution was incubated at 37° C for 15 min. The Carbonyl concentration was determined from the difference in absorbance at 370 nm between DNPH-treated and HCL-treated samples, with $\epsilon_{370} = 22,000 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The carbonyl content was expressed as nanomoles of carbonyl per milligram of protein.

Statistical Analysis. Data are presented as mean \pm SD. Comparison between more than two groups was performed by two-way ANOVA. If a significant main effect or association was

identified, the means of the respective groups were compared using the Bonferroni *t*-test. Correlations between variables were established with the Pearson Product Moment Correlation. In all cases, a *p* value < 0.05 was considered significant. All analyses and graphics were performed with SPSS software 20.0 (SPSS Inc.).

7.1.7 Results

Stress and sweetener consumption modified the body mass index (BMI). In the groups with and without stress, BMI at the 3rd week showed no significant differences (*p* = 1.00); the same conduct was observed at the 9th week in the group without stress (F=1.05, *p*=0.385). On the other hand, the SG, presented significant differences (F = 71.55, *p* <0.001) between all subgroups Suc + S (*p* < 0.001), Suc1 + S (*p* < 0.005) and St + S (*p* <0.002) compared with CL + S (Table 1). When both groups with and without stress were compared to the 9th week, there were significant differences between them (F = 19.27, *p* < 0.001); decreased BMI in the subgroup of Suc + S (*p* < 0.031) and increased in the Suc1 + S subgroup (*p* < 0.006) compared with CL subgroup. The CL + S subgroup showed significant differences with decreasing BMI between subgroups of Suc1 (*p* < 0.010) and St (*p* <0.001) (Table 1).

Stress decreased the weight in mice at the 9th week. The basal weight of the animals at the 3rd week (21 days old) was homogeneous in all groups, with a mean of 13g ± 0.866 (F = 0.263, *p* = 0.965). At the end of treatment (9 weeks of life animals), the WSG showed no significant differences in weight in any subgroup (F = 1.19, *p* = 0.329), compared with CL (Table 1). The group with stress, showed a significant decrease in weight (F = 77.58, *p* < 0.001), these differences were found at the expense of Suc and St Subgroups (*p* < 0.001 and 0.007 respectively) compared to the CL. When comparing the groups with and without stress, a significant difference (F = 23.52, *p* < 0.001) was observed, the weight decreased in the subgroup of Suc + S (*p* < 0.001) and increased in the subgroup of Suc1 + S (*p* < 0.005), both compared with the CL group (Table 1).

Glucose concentration increased with stress, independent of sweetener consumption. The concentration of the basal glucose at 3rd week was unchanged (F = 1.87, *p* = 0.156); in the

group without stress on the 9th week, glucose increased ($F = 3.46$, $p = 0.029$) in the Suc subgroup ($p = 0.047$). In the SG, no differences were found between subgroups in the 9th week ($F = 2.05$, $p = 0.128$). When comparing the groups with and without stress we found differences between the groups ($F = 13.41$, $p < 0.001$), increased glucose concentrations in Suc + S, Sucl + S and St + S subgroups ($p < 0.001$) (Figure 1).

Both groups of Sucralose decreased food intake. In the WSG at the 4th week, there was difference between subgroups ($F = 70.56$, $p < 0.005$), lower consumption was found in the subgroup of Sucl ($p < 0.001$) and an increase in the St subgroup ($p = 0.016$). In the 9th week of treatment, the difference was also significant ($F = 636.48$, $p < 0.001$), with a reduction in the subgroup of Sucl ($p < 0.001$) and increased consumption in St subgroup ($p < 0.011$) (Table 1). In the SG at the 4th week, feed intake increased ($F = 87.40$, $p < 0.001$) in the Suc + S and St + S subgroups ($p = 0.005$ and 0.001 respectively) compared with the CL + S. When comparing the groups with and without stress at the end of the 4th week, the group with stress reduced feed intake in all subgroups (CL + S, Suc + S, Sucl + S, $p < 0.001$, respectively), except in the subgroup with St + S ($p = 1.00$) compared to the CL. At the 9th week, the behavior was similar, because consumption continued to decrease in subgroups of Sucl and Sucl + S ($p < 0.001$) and to increase in St and St + S subgroups ($p < 0.001$) (Table 1).

Sucralose and Stevia reduced the percentage of peripheral blood lymphocytes in the group without stress. The percentage of lymphocytes was quantified in peripheral blood of mice (BG) in the 3rd week and immediately after weaning, no statistically significant differences ($F = 3.33$, $p = 0.054$) were found. In the 9th week, WSG ($F = 103.14$, $p < 0.001$) reduced the percentage of lymphocytes in Sucl ($p < 0.001$) and St ($p < 0.001$) subgroups; the SG increased the percentage of lymphocytes ($F = 22.92$, $p < 0.001$), particularly in the Sucl + S ($p < 0.001$) and St + S ($p < 0.001$) subgroups (Figure 2). Comparing the groups with and without stress ($F = 52.83$, $p < 0.001$) we found a decrease in the percentage of lymphocytes in WSG (Suc: $p < 0.001$, Sucl: $p < 0.001$ and St: $p < 0.001$), with no significant differences in the subgroups with stress (Suc + S: $p = 1.00$, Sucl + S: $p < 0.164$ and St + S: $p < 1.00$) compared with the CL (Figure 2).

Sucralose increased carbonylated protein concentration in peripheral blood lymphocytes but stevia decreased them. In the 3rd week, there were no significant differences in carbonylated protein concentration in blood lymphocytes ($F = 0.089$, $p = 1.00$). At the 9th week, the WSG increased carbonylated protein concentration in blood lymphocytes by Suc ($p < 0.001$) and Sucl ($p < 0.001$) subgroups, but remained unchanged in the St ($p = 1.00$) subgroup (Figure 3). In the SG, carbonylated proteins increased ($F = 21.42$, $p < 0.001$) in all subgroups (Suc + S: $p = 0.034$, Sucl + S: $p < 0.001$ and St + S: $p < 0.004$). By comparing the groups with and without stress ($F = 80.47$, $p < 0.001$) in both cases, an increase in carbonylated protein concentration was observed (Suc and Sucl: $p < 0.001$; Suc + S, Sucl + S: $p < 0.001$), while St and St + S did not change with respect to their own controls (Figure 3).

Correlations

To discern if stress changed the biochemical parameters or if the observed effect was due to the consumption of sweeteners, a correlation was performed finding that stress reduces feed intake ($P = -0,570$, $p < 0.001$), and BMI ($P = -0305$, $p < 0.014$) after 6 weeks of treatment.

7.1.8 Discussion

Glucose concentration increased with stress and non-nutritive sweeteners with changes in body weight.

In the group without stress after 6 weeks of sweetener administration, glucose concentrations increased in the Sucl subgroup, as opposed to a decrease in the St subgroup. On the other hand, in the stress group, glucose concentration increased in all groups, particularly in the Sucl + S subgroup (Figure 1). This behavior may be explained by the fact that chronic stressed subjects show glucocorticoid (GC) hypersecretion, which causes hyperinsulinemia [32], hypersecretion of steroid hormones, visceral adiposity, muscle loss, hypertension, glucose intolerance, dyslipidemia and metabolic syndrome, all of which antagonize insulin and increase blood glucose independently from their effects on insulin. Hyperglycemia as a response to stress [33], is generated by a reduction of tissue sensitivity to insulin and its concentrations, which shows that the stress model used was adequate.

There have been reports where this type of behavior in glucose is generated depending on the type and intensity of stress used in the experiment [34].

There are several variations of the chronic low grade stress protocol (CLGS) that can be used for research of stress induced anxiety and depression conduct in rodents, in which the unpredictable physical and psychological stressors induce behavioral changes, measurable through modifications in body weight [35]. The results of our study show that the animals without stress did not change their body weight nor their BMI, even when consuming sweeteners. Weight and BMI decreased in the stressed with stevia subgroup, but increased in the sucralose with stress animals; stress increased weight and BMI of those consuming sucralose (Suc1 + S). Abo Elnaga et.al., in 2016, reported that the administration of stevia reduced food intake, in a dose dependent way, with a reduction in body weight in all study groups, independent from the dose after 12 weeks of treatment [36].

It is known that non-nutritive sweeteners are not physiologically inert; they can affect energy balance and some metabolic functions, as well as the taste perception, hormonal secretion and cognitive processes such as memory and reward learning [37]. Stress on the other hand, may modify food intake as well as weight and BMI, conditioning an increase in non-nutritive sweeteners. Weight changes may also be attributed to the effects of stress, and not to the sweetener; although the combination of stress and sucralose could modify this pattern, causing weight increase of the mice. Chronic physiologic stress has been associated to a number of psychologic, neurodegenerative, cardiovascular and immunological diseases, as an emerging risk factor that prospectively predicts the development of the metabolic syndrome, diabetes, abdominal fat and obesity, leading to excess intake of food [38]. In mice, high fat or carbohydrate diets together with chronic stress, lead to increases in visceral adiposity and metabolic syndrome at a higher rate than in the non-stressed counterparts. Physiological stress has been associated to weight loss as well as to weight gain and energy homeostasis alterations; there is yet a need to find the link in the understanding of how and when stress contributes to metabolic dysfunction [39]. On the other hand, Kubera et.al., have shown that cortisol increases the effects of neuropeptide Y (NPY), which acts on visceral adipocytes, leading to hyperplasia [40], thus favoring the

increase in abdominal fat and BMI. Non-nutritive sweeteners have been associated to an increase in BMI, suggesting that they can promote weight gain by themselves [41]. The role of non-nutritive sweeteners in weight control and health is still controversial [42]. Our results show that chronic stress together with prolonged non-nutritive sweetener intake, specifically sucralose, may cause a weight increase in rodents.

Decrease of food intake with sucralose administration

Food intake in study groups with and without stress decreased with sucralose consumption but increased with Stevia intake during the 6 weeks of treatment. According to Pepino et.al., (2015) this may be due to the fact that non-nutritive sweeteners promote metabolic dysregulation, weakening the ability of sweetness to predict energy and evoke autonomous and endocrine acquired responses that prepare the gut for optimal processing of food ingested; such is the case of the cephalic response that interacts with intestinal microbiota inducing glucose intolerance. They also interact with sweetness receptors expressed along the Gut, which participate in glucose absorption and initiate insulin secretion. These effects have been described in studies that evaluate the effect of non-nutritive sweeteners from beverages in the diet [43]. In another study, Ross et.al., reported a significant increase in body weight without changes in BMI, development of obesity, insulin resistance and steatosis, in mice injected with epinephrine to induce stress and an elevated intake of sucrose and lard for 5 days. They also showed that this type of diet increases the ability of epinephrine to increase blood glucose concentrations, particularly in rats that become obese with the diet [32]. In our study, the intake of sucrose and of stevia decreased body weight in mice subjected to stress, while increasing food intake and blood glucose; on the other hand sucralose intake with stress increased weight and blood glucose, with a decrease in food intake. Additionally, mice decreased their water intake while consuming sucralose without stress; while the stressed group increased water intake with sucralose and stevia, most probably caused by stress and an increase in glycaemia.

Sucralose decreases blood lymphocyte percentage and increases carbonylated protein concentrations.

Percentage of blood lymphocytes decreased with Suc and Sucl without stress, related to an increase in carbonylated protein concentrations; in the case of St, even though there is a reduction in the percentage of lymphocytes, carbonylated proteins did not increase. Sehar et.al., described that the administration of steviosides increases T and B lymphocyte proliferative responses to mitogens in a dose dependent manner [19]. Although we did not stimulate lymphocytes, the percentage of peripheral blood lymphocytes increased with stevia as opposed to sucrose and sucralose. Steviosides have demonstrated to be potent immunostimulators; they stimulate lymphocyte proliferation and increase humoral B and T-cell dependent responses [19]. On the other hand, orally administered sucralose is rapidly absorbed, with variations between species (mice, rats, rabbits, dogs and humans) that range between 18 and 48% of the administered dose (being of approximately 30% in mice). Several organs may be affected by the intake of high doses of sucralose although the majority is excreted through the urine without change. [10] Thus it is necessary to evaluate the effects of prolonged intake of sucralose, especially as the population tends to consume several products with the sweetener with the objective of reducing energy intake. In our stressed mice, there was an increase in lymphocytes and carbonylated proteins in all groups (Suc + S, Sucl + S and St + S); this effect may be attributed to the effect of stress and not necessarily to the sweetener. Chronic physiologic stress acts as a risk factor for several diseases, such as the metabolic syndrome [44] and obesity [5]. Thus, stress, an increase in carbonylated protein concentration and hyperglycemia may contribute to the decrease in lymphocytes, causing a state of oxidative stress. Ceriello & Motz observed that when reducing hyperglycemia, one can also decrease oxidative stress [46]. A decrease in physiological stress may improve glycemic control in patients with diabetes [47], but its presence alone promotes an increase in food intake [48] and activates certain mechanisms in adipose tissue that increase fat accumulation [49]. This effect has been reported in mice fed diets high in sugar and fat, exposed to chronic stress, which developed visceral adiposity and metabolic syndrome considerably faster than their non-stressed mice [49]. Excessive intake of sugar leads to higher energy substrates, increasing ROS production by the mitochondria and causing oxidative stress [50]. Although sucralose has no energy, it

does lead to an increase in food intake and may generate an increase in energy uptake, not necessarily derived from the sweetener; this could result in higher carbonylation of proteins. Elevated indicators of oxidative stress are associated with obesity, diabetes (51), cardiovascular mortality [52], fatty liver and insulin resistance [46,53].

As an indicator of oxidative stress, we measured the concentration of carbonylated proteins that represent an irreversible damage leading to the loss of protein function; it is considered as measurement of generalized oxidative damage caused by ageing; these proteins are resistant to degradation. It is not yet clear if these are produced because of the diseases or tissue damage [54]. In the present study, we found that the administration of non-nutritive sweeteners, particularly sucralose to young healthy mice, causes hyperglycemia, alters food intake and increases carbonylated protein concentrations in blood with and without stress. With respect to stevia, glucose, weight gain, BMI and carbonylated protein concentrations did not change, with an increase in percentage of lymphocytes and food intake. Our results suggest that the presence of carbonylated proteins causes oxidative stress before the development of clinical disease.

The group with stevia did not increase the concentrations of carbonylated proteins, probably due to the additional benefits that have been reported for this particular sweetener, such as decreases in hyperglycemia, hypertension, inflammation, tumorigenesis, diarrhea, diuresis and modulation of the immune system. Some components of the plant eliminate ROS with pharmacological benefits reported for extracts of stevia leaves. These effects imply that the extracts from the leaves of *E. Rebaudiana* may be used not only as a non-nutritive sweetener, but also as a natural antioxidant with possible health benefits to consumers. [55]. The administration of stevia leaves or steviosides decreases plasma glucose of diabetic rats and reduced thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in a dose-dependent manner. [36]. Stevia's intake is increasing as a non-nutritive sweetener, however its effects as an antioxidant are still under investigation [56].

On the other hand, there are no studies associating the intake of non-nutritive sweeteners with the presence of physiological stress or oxidative stress in blood lymphocytes. It has

been demonstrated that chronic hyperglycemia favors the development of oxidative stress and inflammation. Chronic stress has been related to the presence of oxidative stress in liver, kidney, heart, lungs and brain [57]. The majority of studies focus on evaluating carbonylated protein concentrations in human pathologic states; for example in plasma of children with juvenile rheumatoid arthritis, in tracheal aspirates of premature infants with mechanical ventilation, in severe sepsis, in patients with important trauma and acute pancreatitis, in brains of subjects with mild cognitive impairment and recently diagnosed and non-complicated diabetes. The results of these studies suggest that the increase in oxidative stress may be not really due to complications of these diseases but may be contributors to their development as they all are at advanced stages of inflammation. [27]. Studies evaluating the effect of non-nutritive sweeteners on oxidative stress in healthy subjects are scarce. The participation of ROS is still controversial in pathologies such as type 2 diabetes mellitus, where they may be responsible for endothelial, renal and neuronal complications associated to hyperglycemia in the late stages of the disease. These complications may cause an increase in ROS and secretion of TNF- α and glucocorticoids, inducing insulin resistance as a determinant factor during the loss of insulin sensitivity and mitochondrial function [58]. The production of mitochondrial O₂^{•-} may represent the relation between mitochondrial function and insulin resistance, suggesting that the latter may be part of a defense mechanism to protect cells from further oxidative damage. Thus insulin resistance may be viewed as an protective response against nutrient accumulation in which cells are trying to return to a neutral energy situation [53]. In our study, we administered the sweeteners to healthy mice, independently from the dose and age, we observed that the chronicity of exposure with or without stress caused hyperglycemia and an increase in carbonylated proteins, which in the long-term could be detrimental to the organism, causing cellular dysfunction and tissue damage. [27]. Even though the literature on the biological consequences of non-nutritive sweeteners is still controversial, particularly in humans, the evidence suggests that they are not physiological inert and may affect nutrition and metabolism through a variety of peripheral and central mechanisms [37]. The way in which they function with the gastrointestinal, neuronal and endocrine systems to regulate energy balance is not yet well understood, particularly with sucralose and stevia. Research is still needed at all levels in this area.

Conclusions

Sucralose causes changes in body weight, it decreases the number of lymphocytes and increases the concentration of carbonylated proteins; in contrast, stevia improves parameters such as the number of lymphocytes, decreasing carbonylated proteins.

7.1.9 References

1. Fernstrom JD, Navia JL. Workshop Summary. *J Nutr*. 2012;1170–2.
2. Ifland JR, Preuss HG, Marcus MT, Rourke KM, Taylor WC, Bureau K, et al. Refined food addiction: A classic substance use disorder. *Med Hypotheses*. 2009;72(5):518–26.
3. Gulati S, Misra A. Sugar Intake, Obesity, and Diabetes in India. *Nutrients*. 2014;6(12):5955–74.
4. Garcia-Almeida JM, Casado Fdez GM, Garcia Aleman J. [A current and global review of sweeteners. Regulatory aspects]. *Nutr Hosp*. 2013;28(Suppl 4):17–31.
5. Schiffman SS, Rother KI. Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *J Toxicol Environ Heal Part B*. 2013;16(7):399–451.
6. Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners - a review. *J Food Sci Technol*. 2014;51(4):611–21.
7. Ferrazzano GF, Cantile T, Alcidi B, Coda M. Is Stevia rebaudiana Bertoni a Non Cariogenic Sweetener ? A Review. 2015;21(1):E38.
8. Sun SZ, Empie MW. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. *Nutr Metab*. 2012;9(1):89.
9. Tasevska N. Urinary Sugars—A Biomarker of Total Sugars Intake. *Nutrients*. 2015;7(7):5816–33.
10. AlDeeb OA, Mahgoub H, Foda NH. Sucralose. Vol. 38, Profiles of Drug Subst, Excip Relat Methodol. 2013;38:423-62.
11. Shannon M, Rehfeld A, Frizzell C, Livingstone C, McGonagle C, Skakkebaek NE, et al. In vitro bioassay investigations of the endocrine disrupting potential of steviol glycosides and their metabolite steviol, components of the natural sweetener Stevia. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;427:65–72.
12. Brouns F. WHO Guideline: “Sugars intake for adults and children” raises some question marks. *Agro Food Ind Hi Tech*. 2015;26(4):34–6.
13. Schiffman SS, Abou-Donia MB. Sucralose revisited: Rebuttal of two papers about Splenda safety. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2012;63(3):505–8.
14. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaïss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota.

- Nature. 2014;514(7521):181–6.
15. Barriocanal LA, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez JT, Jimenez N, et al. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008;51(1):37–41.
 16. Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, Williamson DA. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*. 2010;55(1):37–43.
 17. Bray GA. Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. *Adv Nutr*. 2013;4(2):220–5.
 18. Rahiman F, Pool EJ. The in vitro effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *J Immunoass Immunochem*. 2014;35(1):26–36.
 19. Sehar I, Kaul A, Bani S, Pal HC, Saxena AK. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem Biol Interact*. 2008;173(2):115–21.
 20. Chrousos GP, Gold PW. The Concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 1992;267(9):1244–52.
 21. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev*. 2007;87(3):873–904.
 22. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: Prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol*. 2006;572(1):31–44.
 23. Cyr NE, Romero LM. Identifying hormonal habituation in field studies of stress. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;161(3):295–303.
 24. Zimatkin SM, Buben AI. Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol Alcohol*. 2007;42(6):529–32.
 25. Poljšak B, Fink R. The protective role of antioxidants in the defence against ROS/RNS-mediated environmental pollution. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:671539.
 26. Kelly GS. Nutritional and botanical interventions to assist with the adaptation to

- stress. *Altern Med Rev*. 1999;4(4):249–65.
27. Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):389–406.
 28. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*. 1997;10(5):485–94.
 29. Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FR, Almeida FQ, Galhardi CM, Filho JL, Mani F, Novelli EL. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. *Int J Cardiol*. 2008;124(1):92–9.
 30. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111–9.
 31. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*. 1994;233:357–63.
 32. Ross AP, Darling JN, Parent MB. Excess intake of fat and sugar potentiates epinephrine-induced hyperglycemia in male rats. *J Diabetes Complications*. 2015;29(3):329–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.12.017>
 33. Gesto M, Otero-Rodiño C, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL, Conde-Sieira M. Is plasma cortisol response to stress in rainbow trout regulated by catecholamine-induced hyperglycemia? *Gen Comp Endocrinol*. 2014;205:207–17.
 34. Fernando HA, Chin HF, Ton SH, Abdul Kadir K. Stress and its effects on glucose metabolism and 11 β -HSD activities in rats fed on a combination of high-fat and high-sucrose diet with glycyrrhizic acid. *J Diabetes Res*. 2013;2013:190395. doi: 10.1155/2013/190395.
 35. Gross M, Pinhasov A. Chronic mild stress in submissive mice: Marked polydipsia and social avoidance without hedonic deficit in the sucrose preference test. *Behav Brain Res*. 2016;298(Pt B):25–34.
 36. Abo Elnaga NIE, Massoud MI, Yousef MI, Mohamed HHA. Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats. *Ann Agric Sci*. 2016;61(1):155-

37. Burke M V, Small DM. Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt B):381–8.
38. Ha HY, Kim KS, Yeom YI, Lee JK, Han PL. Chronic restraint stress massively alters the expression of genes important for lipid metabolism and detoxification in liver. *Toxicol Lett.* 2003;146(1):49–63.
39. Aschbacher K, Kornfeld S, Picard M, Puterman E, Havel PJ, Stanhope K, et al. Chronic stress increases vulnerability to diet-related abdominal fat, oxidative stress, and metabolic risk. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;46:14–22.
40. Kubera B, Hubold C, Wischnath H, Zug S, Peters A. Rise of ketone bodies with psychosocial stress in normal weight men. *Psychoneuroendocrinology.* 2014;45:43–8.
41. Peters JC, Beck J. Low Calorie Sweetener (LCS) use and energy balance. *Physiol Behav.* 2016;164(Pt B):524-8. Doi: 10.1016/j.physbeh.2016.03.024
42. Sylvetsky AC, Rother KI. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav.* 2016;164(Pt B):446-50.
43. Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav.* 2015;152(Pt B):450–5.
44. Pyykkönen AJ, Rääkkönen K, Tuomi T, Eriksson JG, Groop L, Isomaa B. Stressful life events and the metabolic syndrome: the prevalence, prediction and prevention of diabetes (PPP) -Botnia Study. *Diabetes Care.* 2010;33(2):378–84.
45. Brunner EJ, Chandola T, Marmot MG. Prospective effect of job strain on general and central obesity in the Whitehall II Study. *Am J Epidemiol.* 2007;165(7):828–37.
46. Ceriello A, Motz E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):816–23.
47. Ismail K, Winkley K, Rabe-Hesketh S. Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials of psychological interventions to improve glycaemic control in patients with type 2 diabetes. *Lancet.* 2004;363(9421):1589–97.
48. Epel E, Jimenez S, Brownell K, Stroud L, Stoney C, Niaura R. Are stress eaters at

- risk for the metabolic syndrome? *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1032:208–10.
49. Kuo LE, Kitlinska JB, Tilan JU, Li L, Baker SB, Johnson MD, et al. Neuropeptide Y acts directly in the periphery on fat tissue and mediates stress-induced obesity and metabolic syndrome. *Nat Med.* 2007;13(7):803–11.
 50. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin C Te, et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009;119(3):573–81.
 51. Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, et al. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(3):434–9.
 52. Roest M, Voorbij HA, Van der Schouw YT, Peeters PH, Teerlink T, Scheffer PG. High levels of urinary F₂-isoprostanes predict cardiovascular mortality in postmenopausal women. *J Clin Lipidol.* 2008;2(4):298–303.
 53. Hoehn KL, Salmon AB, Hohnen-behrens C, Turner N, Hoy AJ, Maghzal GJ, et al. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;106(42):17787–92.
 54. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329(1-2):23–38.
 55. Álvarez-Robles MJ, López-Orenes A, Ferrer MA, Calderón AA. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. *Ind Crops Prod.* 2016;87:273–9.
 56. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Esteve MJ, Frígola A. Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chem.* 2015;184:122–30.
 57. López-López AL, Jaime HB, Escobar Villanueva M del C, Padilla MB, Palacios GV, Aguilar FJ. Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats. *Physiol Behav.* 2016;161:15–23.
 58. Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest.* 2009; 119(3): 573-81.

7.1.10 Figures and tables

Table 1. Effect of sweeteners consumption and physiological stress on morphometric values and food intake.

Subgroups	Without Stress Group				With Stress			
	CL	Suc	Sucl	St	CL + S	Suc + S	Sucl + S	St + S
3 weeks								
Weight (gr)	13.3±0.9	13.3±1	13.2±0.9	13.5±1	13.1±1	13.3±1	13.4±1	13.3±0.9
+BMI (gr/cm ²)	23.4±1	23.4±1	23.4±1	23.4±1	23.4±1	23.4±1	23.4±1	23.4±1
Food Intake (g/day)	40.05±3	43.4±5	22.8±1*	45.8±2*	26.2±3	29.9±1*	25.6±0.5	39.8±2*
9 weeks								
Weight (gr)	35.0	34.9±1.9	35.5±2.9	33.5±2.1	38.8±0.7	29.5±1*	40.3±2.0	35.0±1*
+BMI (gr/cm ²)	28.7±2	27.6±3	29±2.4	26.9±2.4	31.9±1	24.9±1*	36±1*	28.6±2*
Food Intake (g/day)	54.4±1	48.2±1	26.0±1*	58.9±2*	66.2±1	64.2±1	46.8±1*	73.9±1*

Values represent the mean ± SD of the CL (Control), Suc (Sucrose), Sucl (Sucralose), St (Stevia), CL + S (Control + Stress), Suc + S (Sucrose + Stress), Sucl + S (Sucralose + Stress), and St + S (Stevia + Stress). One way ANOVA* was performed to identify differences between subgroups, they were considered significant with a *p* value of < 0.05. +BMI (body mass index).

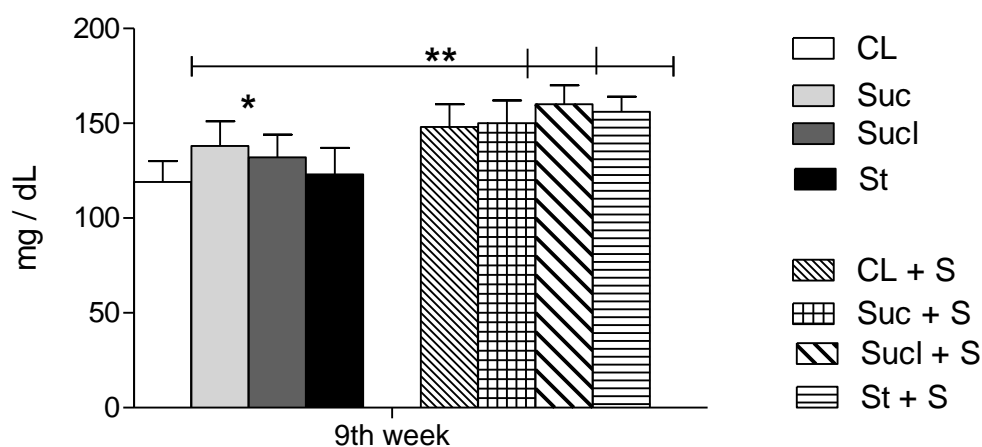


Figure 1. Glucose concentration in CD1 mice, with and without stress for 6 weeks of sweeteners consumption. Values represent the mean ± SD of the CL (Control), Suc (Sucrose), Sucl (Sucralose), St (Stevia), CL + S (Control + Stress), Suc + S (Sucrose + Stress), Sucl + S (Sucralose + Stress), and St + S (Stevia + Stress). One way ANOVA* was performed to identify differences between subgroups and two way ANOVA** was performed to compare the groups with and without stress; they were considered significant with a *p* value < 0.05.

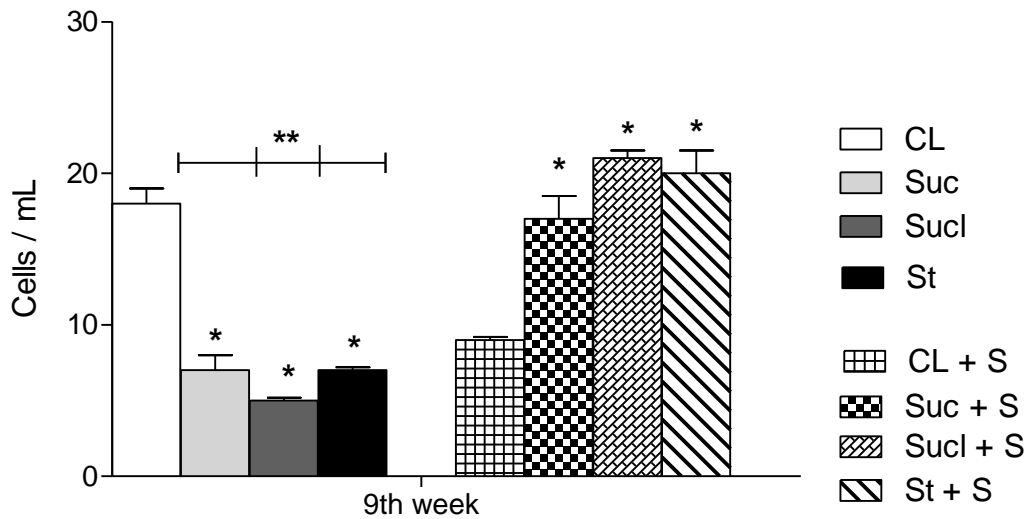


Figure 2. Number of peripheral blood lymphocytes of CD1 mice with and without stress and sweetener consumption. Values represent the mean \pm SD of the CL (Control), Suc (Sucrose), Sucl (Sucralose), St (Stevia), CL + S (Control + Stress), Suc + S (Sucrose + Stress), Sucl + S (Sucralose + Stress), and St + S (Stevia + Stress). One way ANOVA* was performed to identify differences between subgroups and two way ANOVA** was performed to compare the groups with and without stress; they were considered significant with a p value <0.05 .

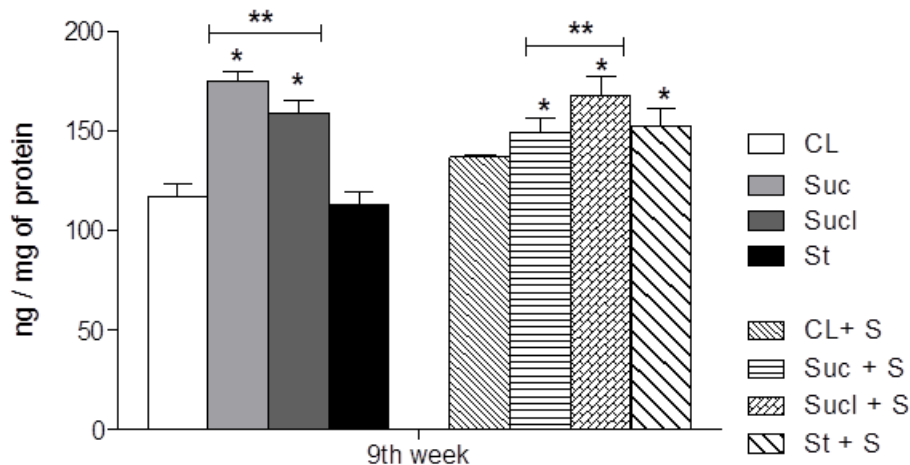


Figure 3. Concentration of carbonyl proteins in lymphocytes, with and without stress and sweetener consumption. Values represent the mean \pm SD of the CL (Control), Suc (Sucrose), Sucl (Sucralose), St (Stevia), CL + S (Control + Stress), Suc + S (Sucrose + Stress), Sucl + S (Sucralose + Stress), and St + S (Stevia + Stress). One way ANOVA* was performed to identify differences between subgroups and two way ANOVA** was performed to compare the groups with and without stress; they were considered significant with a p value <0.05 .

8. Resultados adicionales

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el índice de masa corporal. El índice de masa corporal (Ver tabla 2) al inicio del estudio no mostro diferencia entre los grupos, sin embargo a las 15 semanas de vida etapa final ($F= 19.276$ $p<0.001$), los grupos sacarosa (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E) tuvieron un IMC menor que el control (CL).

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el consumo energético. El consumo energético al inicio del estudio ($F= 80.529$ $p<0.001$) fue mayor en el grupo estevia (EST) y menor en los grupos control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E), Sin embargo al final de la intervención ($F= 4540.57$ $p<0.001$) se presentó un consumo mayor en los grupos sacarosa más estrés (SAC+E) y estevia más estrés (EST+E) y una disminución del consumo en los grupos (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E) y sucralosa mas estrés (SUC+E), lo anterior en comparación con el grupo control (CL). (Tabla 2)

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el consumo agua. Al inicio del estudio el consumo de agua ($F=44.01$ $p<0.001$) fué menor en los grupos sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E), lo anterior en comparación con el grupo control (CL). Al final de la intervención ($F=108.45$ $p<0.001$), todos los grupos disminuyeron su ingestión de agua respecto al grupo control (CL). (Tabla 2)

Tabla 2. Índice de masa corporal, consumo de energía y agua en ratones CD1 con suministro de edulcorantes y exposición a estrés.

	CL Media ± D.E	SAC Media ± D.E	SUC Media ± D.E	EST Media ± D.E	CL+E Media ± D.E	SAC+E Media ± D.E	SUC+E Media ± D.E	EST+E Media ± D.E	Valor p*
Inicial									
IMC (g/cm ²)	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	23.4±1.2	1.000
Consumo energético (kjoul/día)	505±46	548 ±65	288±21	578±32	331±41	378±13	323±7	502±25	0.001*
Consumo de agua (ml/día)	69±7.0	64.5±2.0	47±4.0	58±3.0	39±7.0	54±4.0	61±1.0	59.5±1.0	0.001*
Final									
IMC (g/cm ²)	33.6±1.3	27.8±2.3	29.4±1.4	29.2±1.4	30.6±1	28.4±2	27.9±2	27.9±1.7	
Consumo energético (kjoul/día)	962±18	694±17	438±12	679±11	731±8	1440±11	712±10	1102±14	0.001*
Consumo de agua (ml/día)	95±9.0	57±3.0	46±7.0	50±3.0	70±2.0	40±5.0	49±3.0	73±2.0	0.001*

Los valores representan la media±DE de los grupos control (CL), sacarosa (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E). El índice de masa corporal se reporta en gramos sobre centímetros cuadrados (g/cm²), el consumo energético en kilojoules sobre día (Kjoul/día) y el consumo de agua en mililitros sobre día (ml/día). Se realizó ANOVA de una vía (*) para observar las diferencias entre los subgrupos y la prueba post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de p<0.05*.

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en la concentración de glucosa en sangre. No se mostraron diferencias en la concentración de glucosa al inicio de la intervención, pero en la etapa final (F=17.24 p<0.001), los grupos control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E) presentaron una concentración de glucosa mayor que el grupo control (CL). (Tabla 3)

Tabla 3. Concentración de glucosa en sangre de ratones CD1 con suministro de edulcorantes y exposición a estrés.

	CL Media ± D.E mg/dl	SAC Media ± D.E mg/dl	SUC Media ± D.E mg/dl	EST Media ± D.E mg/dl	CL+E Media ± D.E mg/dl	SAC+E Media ± D.E mg/dl	SUC+E Media ± D.E mg/dl	EST+E Media ± D.E mg/dl	Valor p*
Inicial	128±23	123±19	110±11	127±12	107±12	110±12	118±19	118±19	0.092
Final	157±18	166±17	158±14	169±10	198±15	201±18	219±17	195±14	0.001*

Los valores representan la media±DE de los grupos control (CL), sacarosa (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E). La concentración de glucosa se reporta en miligramos sobre decilitro (mg/dl). Se realizó ANOVA de una vía (*) para observar las diferencias entre los subgrupos y la prueba post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de p<0.05*.

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el conteo de linfocitos de sangre. Los valores al inicio de la intervención en los linfocitos de sangre (Tabla 4) no muestran diferencia entre los grupos, pero en la etapa final ($F=38.50$ $p<0.001$) el conteo celular aumentó en los grupos sucralosa (SUC) y estevia más estrés (EST+E) y disminuyó en los grupos sacarosa (SAC), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E) y sucralosa más estrés (SUC+E), esto en comparación con el grupo control (CL).

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el conteo de linfocitos de placa de Peyer. Al empezar la intervención no se encontró diferencia en el número de células presentes en la placas de Peyer (Ver tabla 4), para la etapa final ($F=36.67$ $p<0.001$) el número de células disminuyeron en los grupos sucralosa y control más estrés, pero aumentaron en los grupos estevia (EST) y sucralosa mas estrés (SUC+E), lo anterior en oposición con el grupo control (CL).

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en el conteo de linfocitos de bazo. No se mostró diferencia en el conteo total de linfocitos durante la etapa inicial, en la etapa final ($F=249.22$ $p<0.001$) los linfocitos aumentaron en todos los grupos respecto al control (CL). (Tabla 4)

Tabla 4. Conteo total de linfocitos en sangre, placas de Peyer y Bazo de ratones CD1 con suministro de edulcorantes y exposición a estrés.

	CL	SAC	SUC	EST	CL+E	SAC+E	SUC+E	EST+E	Valor
	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	p*
	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	
Inicial									
Sangre	19±4	19±4	19±4	19±4	19±4	19±4	19±4	19±4	1.000
Placas de Peyer	38±9	38±9	38±9	38±9	38±9	38±9	38±9	38±9	1.000
Bazo	89±11	89±11	89±11	89±11	89±11	89±11	89±11	89±11	1.000
Final									
Sangre	16±4	9±2	21±4	16±1	7±2	10±2	7±1	21±3	0.001
Placas de Peyer	43±7	46±8	30±7	60±9	17±6	35±10	64±5	51±4	0.001*
Bazo	97±5	125±5	154±6	214±5	178±9	166±7	124±9	124±6	0.001*

Los valores representan la media±DE de los grupos control (CL), sacarosa (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E). El conteo de células se reporta en número de células por 10⁶. Se realizó ANOVA de una vía (*) para observar las diferencias entre los subgrupos y la prueba post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p<0.05$ *.

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en la carbonilación de proteínas de linfocitos de sangre. Los valores al inicio de la intervención no muestran diferencias entre los grupos y para la etapa final del estudio (F=222.88 p<0.001) la carbonilación aumentó para todos los grupos en comparación con el grupo control (CL). (Tabla5)

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en la carbonilación de proteínas de linfocitos de placas de Peyer. La carbonilación de proteínas en linfocitos de placas de Peyer (Ver tabla 5) al inicio del estudio no mostró diferencia entre los grupos, sin embargo en la etapa final (F=220.70 p<0.001) la carbonilación aumentó para todos los grupos, excepto para el grupo estevia (EST), todo lo anterior en relación con el grupo control (CL).

El efecto del consumo crónico de edulcorantes y la exposición a estrés en la carbonilación de proteínas de linfocitos de bazo. En los linfocitos de bazo la carbonilación de proteínas no mostró diferencia entre los grupos, en la etapa intermedia (F=45.74 p<0.001) pero para la etapa final (F=45.74 p<0.001) todos los grupos presentaron concentraciones mayores en contraste con el grupo control (CL). (Tabla5)

Tabla 5. Carbonilación de proteínas en linfocitos de sangre, placas de Peyer y Bazo de ratones CD1 con suministro de edulcorantes y exposición a estrés.

	CL	SAC	SUC	EST	CL+E	SAC+E	SUC+E	EST+E	Valor p*
	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E	
	Nmol/mL	Nmol/mL	Nmol/mL	Nmol/MI	Nmol/mL	Nmol/mL	Nmol/mL	Nmol/mL	
Inicial									
Sangre	22±6	22±6	22±6	22±6	22±6	22±6	22±6	22±6	1.000
Placas de Peyer	19±8	19±8	19±8	19±8	19±8	19±8	19±8	19±8	1.000
Bazo	25±7	25±7	25±7	25±7	25±7	25±7	25±7	25±7	1.000
Final									
Sangre	64±5	127±2	129±4	115±13	136±6	185±13	183±2	142±3	0.001
Placas de Peyer	24±1.6	48±1.8	49±2.1	28±3.6	33±3.6	64±5.3	75±2	53±4.8	0.001*
Bazo	26±2.1	32±3.1	39±1.8	35±4.9	41±1.6	59±1.1	74±4.1	50±4.3	0.001*

Los valores representan la media±DE de los grupos control (CL), sacarosa (SAC), sucralosa (SUC), estevia (EST), control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E). La carbonilación de proteínas se reporta en nanomoles sobre mililitro (Nmol/mL). Se realizó ANOVA de una vía (*) para observar las diferencias entre los subgrupos y la prueba post hoc de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de p<0.05*.

8.1 Discusion adicoinal

El estrés es una condición que aumenta el catabolismo en los organismos, lo que tiene como consecuencia una disminución de la masa corporal, al final de la intervención de este estudio el grupo sucralosa mas estrés (SUC+E) tuvo una mayor ganancia de peso, lo cual se puede explicar a partir del edulcorante administrado, ya que el grupo control más estrés (CL+E) no mostró diferencia respecto al control. Estudios en los que se utilizó sucralosa tanto en roedores ^(73,74) como en humanos ^(75,76) han reportado un incremento en el peso, esto se puede explicar con lo sugerido en estudios realizados con roedores en los que se reportó que la sucralosa modula procesos fisiológicos involucrados en la absorción de nutrimentos y la regulación del peso corporal ⁽⁷⁷⁾ a través de la interacción con los receptores del sabor dulce, localizados en células neuroendocrinas del tracto gastrointestinal ^(78,79), las células beta del páncreas ^(80, 81) y el hipotálamo ⁽⁸²⁾

La concentración de glucosa en la medición intermedia se elevó en los grupos sacarosa más estrés (SAC+E) y sucralosa mas estrés (SUC+E), lo que permite especular si el consumo de un edulcorante no nutritivo como la sucralosa en realidad beneficia a los consumidores. Estudios realizados con sacarosa en ratones ^(83,84) y en seres humanos ⁽⁸⁵⁾ elevan la concentración de glucosa en sangre, lo cual concuerda con el presente estudio, esto se puede explicar debido a que es un edulcorante nutritivo, que se ha relacionado con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 ^(86,87). En lo referente a la sucralosa estudios realizados en ratones ⁽⁸⁸⁾, y en seres humanos ^(89,90) concuerdan con los resultados de este estudio, lo cual se puede explicar tomando en cuenta que la sucralosa es un edulcorante no calórico que puede alterar la homeostasis de la glucosa por la activación de los receptores de sabor dulce localizados en el intestino ⁽⁹¹⁾ y la modificación de la microbiota intestinal ⁽⁹²⁾

Al final de la intervención aumentó la concentración de glucosa en el grupo control más estrés (CL+E) y en los grupos sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa mas estrés (SUC+E) y estevia mas estrés (EST+E), sin embargo no se presentó diferencia entre el consumo de un edulcorante u otro, lo cual se puede justificar a partir de la variable estrés, situación en la que existe liberación de hormonas glucocorticoides que intervienen en el metabolismo basal, aumentando la gluconeogénesis y lipólisis ^(93,94).

La carbonilación de proteínas al terminar la intervención se elevó en los grupos control más estrés (CL+E), sacarosa más estrés (SAC+E), sucralosa más estrés (SUC+E) y estevia más estrés (EST+E), situación que se puede relacionar con la elevada concentración de glucosa en comparación con el grupo control (CL). Existe evidencia de que el aumento en la glucosa eleva el estrés oxidante ^(95,96), aumentando la carbonilación de proteínas ^(97,98).

9. Conclusiones generales

9.1 Conclusiones

El aumento en la demanda de edulcorantes no nutritivos ha dado como resultado una amplia variedad de marcas en el mercado, disponibles para la población en general, que buscan mejorar sus condiciones de salud pero sin sacrificar el sabor dulce. Sin embargo existe discrepancia acerca de los beneficios e inconvenientes que puede tener el consumo de estos productos, a pesar de que estos productos son evaluados toxicológicamente antes de permitir su consumo en la población.

Además de lo anterior, la población en general se encuentra en constantes situaciones de estrés, lo cual está bien documentado que aumenta las afecciones físicas, biológicas y psicológicas de los individuos.

La ingestión de edulcorantes y la exposición a estrés son condiciones en la que la población está inmersa, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el consumo de los edulcorantes no nutritivos y la exposición a estrés necesitan especial atención para dilucidar los efectos a nivel celular.

9.2 Limitaciones

Se utilizó solo un modelo de estrés, que tiene como inconveniente una adaptación al estímulo, asimismo no se midió el cortisol para poder confirmar el efecto estresante en el organismo.

En lo referente al estrés oxidativo no se midió el comportamiento del sistema antioxidante interno y de otros biomarcadores relacionados al daño oxidante, lo cual nos daría un panorama más amplio de lo que sucede en el organismo.

Además como parámetro antropométrico el IMC puede encubrir datos importantes sobre la composición corporal

9.3 Recomendaciones

Se recomienda un estudio donde se utilicen diferentes modelos de estrés, con el objetivo de evitar la adaptación al estímulo, además se sugiere determinar la concentración del cortisol para confirmar el estado de estrés.

Además se propone determinar las enzimas del sistema antioxidante interno como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa; conjuntamente con otros biomarcadores de estrés oxidante como la peroxidación lipídica y glicación avanzada

Respecto a los valores antropométricos se propone determinar la composición corporal, ya que puede dar un mejor panorama de lo que sucede en el organismo.

10. Referencias

1. Tran C, Tappy L. Sucrose, glucose, fructose consumption: what are the impacts on metabolic health?. *Rev Med Suisse*. 2012;8(331):513, 515-8.
2. Grembecka M. Natural sweeteners in a human diet. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2015;66(3):195-202.
3. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States. 2015. Available from: www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm
4. Greenly L. A doctor's guide to sweeteners. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2003;2(2):80-86.
5. Fitch C, Keim K. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 2012;112(5):739-758.
6. García JM, Gracia M, Casado J, García A. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp* 2013;28(4):17-31
7. Basu S, McKee M, Galea G, Stuckler D. Relationship of Soft Drink Consumption to Global Overweight, Obesity, and Diabetes: A Cross-National Analysis of 75 Countries. *Am J Public Health*. 2013;103(11):2071-2077.
8. Greenwood D, Threapleton D, Evans C, Cleghorn C, Nykjaer C, Woodhead C et al. Association between sugar-sweetened and artificially sweetened soft drinks and type 2 diabetes: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *British Journal of Nutrition*. 2014;112(05):725-734.
9. Sugars intake for adults and children. 2015. Available from: http://www.who.int/nutrition/publications/guidelines/sugar_intake_information_not_e_en.pdf.
10. Schiffman S, Rother K. Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2013;16(7):399-451.
11. The Potential Toxicity of Artificial Sweeteners. *AAOHN J*. 2008;56(6):260-261.
12. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev V et al. Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5106.
13. Schiffman S, Abou-Donia M. Sucralose revisited: Rebuttal of two papers about Splenda safety. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2012;63(3):505-508.
14. Sims J, Roberts A, Daniel J, Renwick A. The metabolic fate of sucralose in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38:115-121.
15. Roberts A, Renwick A, Sims J, Snodin D. Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food and Chemical Toxicology*. 2000;38:31-41.
16. Prashant G. The Antimicrobial Activity of the Three Commercially Available Intense Sweeteners against Common Periodontal Pathogens: An in vitro Study. *JCDP*. 2012;:749-752.
17. Rajasekaran T, Ramakrishna A, Udaya Sankar K, Giridhar P, Ravishankar G. Analysis of Predominant Steviosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni by Liquid

- Chromatography/ Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Food Biotechnology*. 2008;22(2):179-188.
18. Shatnawi M, Shibli R, Abu-Romman S, Al-Mazra'awi M, Al Ajlouni Z, Shatanawi W et al. Clonal propagation and cryogenic storage of the medicinal plant *Stevia rebaudiana*. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 2011;9(1):213.
 19. Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells. *J Agric Food Chem*. 2006;54(3):785-789.
 20. Pariwat P, Homvisasevongsa S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. A Natural Plant-Derived Dihydroisosteviol Prevents Cholera Toxin-Induced Intestinal Fluid Secretion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;324(2):798-805.
 21. Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*. 2013;29(11-12):1293-1299-
 22. Selye H. The stress concept. *Can Med Assoc J*. 1976; 23;115(8):718.
 23. Selye H. Stress and the General Adaptation Syndrome. *BMJ*. 1950;1(4667):1383-1392.
 - 24.
 25. Chrousos G. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1992;267(9):1244-1252.
 26. Dhabhar F. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*. 2014;58(2-3):193-210.
 27. Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23:451-466.
 28. Liu J, Buisman-Pijlman F, Hutchinson M. Toll-like receptor 4: innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. *Front Neurosci*. 2014;8.
 29. Pacak K. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*. 2001;22(4):502-548.
 30. Rhen TCidlowski J. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*. 2005;353(16):1711-1723.
 31. Stahn CButtgereit F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008;4(10):525-533.
 32. Freeman B. Stress and the domestic fowl: A physiological appraisal. *World's Poultry Science Journal*. 1971;27(3):263-275.
 33. Pacak K. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocrine Reviews*. 2001;22(4):502-548.
 34. Padovan CGuimarães F. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33(1).
 35. Campos A, Ferreira F, Guimarães F, Lemos J. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience*. 2010;167(2):238-246.
 36. Cai L, Yan J, Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res*. 2013; 1(1): 15–26.

37. Stadtman E. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990;9(4):315-325.
38. Madian A, Regnier F. Proteomic Identification of Carbonylated Proteins and Their Oxidation Sites. *J Proteome Res*. 2010;9(8):3766-3780.
39. Ogino K¹, Wang DH. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta Med Okayama*. 2007;61(4):181-9.
40. Zeng X, Li Q, Xu Q, Li F, Liu C. Acupuncture Mechanism and Redox Equilibrium. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:1-7.
41. Piedrafita G, Keller M, Ralser M. The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions. *Biomolecules*. 2015;5(3):2101-2122.
42. Wang T, Liu C, Yu J, Jiang W, Han J. Acupuncture protected cerebral multi-infarction rats from memory impairment by regulating the expression of apoptosis related genes Bcl-2 and Bax in hippocampus. *Physiology & Behavior*. 2009;96(1):155-161.
43. Hamanaka R, Chandel N. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2010;35(9):505-513.
44. Frohnert Bernlohr D. Protein Carbonylation, Mitochondrial Dysfunction, and Insulin Resistance. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2013;4(2):157-163.
45. Schaur R. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine*. 2003;24(4-5):149-159.
46. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*. 2003;42(4):318-343.
47. Poljšak B, Fink R. The Protective Role of Antioxidants in the Defence against ROS/RNS-Mediated Environmental Pollution. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014;2014:1-22.
48. Haffner S. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism*. 2000;49(2):30-34.
49. Stites D, Terr A, Parslow T, Méridio Jane J. *Inmunología básica y clínica*. México: El Manual Moderno; 1998.
50. Zambrano Villa S. *Inmunología*. México: McGraw-Hill; 2007.
51. Mowat A. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(4):331-341.
52. Schmidt T, Bannard O, Gray E, Cyster J. CXCR4 promotes B cell egress from Peyer's patches. *The Journal of Experimental Medicine*. 2013;210(6):1099-1107.
53. Pyo M, Park B, Choi J, Yang M, Yang H, Cha J et al. Pheophytin a and Chlorophyll a Identified from Environmentally Friendly Cultivation of Green Pepper Enhance Interleukin-2 and Interferon- γ in Peyer's Patches ex Vivo. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(11):1747-1753.
54. Kunisawa J, Nochi T, Kiyono H. Immunological commonalities and distinctions between airway and digestive immunity. *Trends in Immunology*. 2008;29(11):505-513.
55. Hill D, Artis D. Intestinal Bacteria and the Regulation of Immune Cell Homeostasis. *Annual Review of Immunology*. 2010;28(1):623-667.

56. Eberl George R. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol.* 2009;2(6):478-485.
57. Palas J, Matos A, Ramalho M. The Spleen Revisited: An Overview on Magnetic Resonance Imaging. *Radiology Research and Practice.* 2013;2013:1-15.
58. Caremani M, Occhini U, Caremani A, Tacconi D, Lapini L, Accorsi A et al. Focal splenic lesions: US findings. *Journal of Ultrasound.* 2013;16(2):65-74.
59. Tarantino G. Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infections and metabolism. *World Journal of Gastroenterology.* 2013;19(23):3534.
60. Anuracpreeda P, Srirakam T, Pandonlan S, Changklungmoa N, Chotwiwatthanakun C, Tinikul Y et al. Production and characterization of a monoclonal antibody against recombinant cathepsin L1 of *Fasciola gigantica*. *Acta Tropica.* 2014;136:1-9.
61. Technology I. Rodent Lab Chow 5001 - Productos - Línea Animales de Laboratorio - Nutrimentos Purina México Líder en Nutrición Animal [Internet]. *Nutrimentospurina.com.* 2016 [cited 13 May 2016]. Available from: <http://www.nutrimentospurina.com/linea-animales-de-laboratorio/productos/ratas-ratones-y-hamsters/3/rodent-lab-chow-5001.html>
62. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.[Internet]. 1999. Available from: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
63. Norma Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2012 para bebidas saborizadas no alcohólica. DOF - Diario Oficial de la Federación [Internet]. *Dof.gob.mx.* 2016. Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5233379&fecha=10/02/201263.
64. Campos A, Fogaca M, Aguiar D, Guimaraes F. Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev Bras Psiquiatr.* 2013;35:S101-S111.
65. Campos A, Ferreira F, Guimarães F, Lemos J. Facilitation of endocannabinoid effects in the ventral hippocampus modulates anxiety-like behaviors depending on previous stress experience. *Neuroscience.* 2010;167(2):238-246.
66. Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals.* 2007;41(1):111-119.
67. Lymphoprep™ [Internet]. axis-shield-density-gradient-media. 2016 [cited 6 November 2016]. Available from: <http://Lymphoprep™>
68. Gorodezky C. Manual de procedimientos serologicos y celulares de histocompatibilidad. Mexico, D.F: Mexico. Secretaria de Salud; 1999.
69. Fuentes Arderiu X, Castiñeiras Lacambra M, Queraltó Compañó J. Bioquímica clínica y patología molecular. Barcelona: Reverté; 1998.
70. Evans P, Lyras L, Halliwell B. Measurement of protein carbonyls in human brain tissue. *Methods in Enzymology.* 1998;300:145-156.
71. Loewenberg J. Cyanide and the determination of protein with the folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry.* 1967;19(1):95-97.
72. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) [Internet]. 2016. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2002/gm023n.pdf>.

73. 34. Turnbaugh P, Ley R, Mahowald M, Magrini V, Mardis E, Gordon J. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006;444(7122):1027-131.
74. 35. Swithers S, Baker C, Davidson T. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*. 2009;123(4):772-780.
75. 36. Pepino M, Tiemann C, Patterson B, Wice B, Klein S. Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2530-2535.
76. 37. Fowler S, Williams K, Resendez R, Hunt K, Hazuda H, Stern M. Fueling the Obesity Epidemic? Artificially Sweetened Beverage Use and Long-term Weight Gain. *Obesity*. 2008;16(8):1894-1900.
77. 38. Schiffman S, Rother K. Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2013;16(7):399-451.
78. 39. Jang H, Kokrashvili Z, Theodorakis M, Carlson O, Kim B, Zhou J et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(38):15069-15074.
79. 40. Meyer-Gerspach AC, Wölnerhanssen B, Beglinger C. Gut sweet taste receptors and their role in metabolism. *Front Horm Res*. 2014;42:123-33
80. 41. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev V et al. Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *PLoS ONE*. 2009;4(4):e5106.
81. 42. Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Medina A, Nagasawa M. Sweet Taste-Sensing Receptors Expressed in Pancreatic β -Cells: Sweet Molecules Act as Biased Agonists. *Endocrinol Metab*. 2014;29(1):12.
82. 43. Ren X. Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 2009;3.
83. 44. Kendig M, Rooney K, Corbit L, Boakes R. Persisting adiposity following chronic consumption of 10% sucrose solution: Strain differences and behavioural effects. *Physiology & Behavior*. 2014;130:54-65.
84. 45. Kendig M, Boakes R, Rooney K, Corbit L. Chronic restricted access to 10% sucrose solution in adolescent and young adult rats impairs spatial memory and alters sensitivity to outcome devaluation. *Physiology & Behavior*. 2013;120:164-172.
85. 46. Hamel C, Stevens A, Singh K, Ansari M, Myers E, Ziegler P et al. Do sugar-sweetened beverages cause adverse health outcomes in adults? A systematic review protocol. *Systematic Reviews*. 2014;3(1):108.
86. 47. Malik V, Popkin B, Bray G, Despres J, Hu F. Sugar-Sweetened Beverages, Obesity, Type 2 Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease Risk. *Circulation*. 2010;121(11):1356-1364.
87. 48. Malik V, Hu F. Sweeteners and Risk of Obesity and Type 2 Diabetes: The Role of Sugar-Sweetened Beverages. *Curr Diab Rep*. 2012;12(2):195-203.
88. 49. Swithers S, Laboy A, Clark K, Cooper S, Davidson T. Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behavioural Brain Research*. 2012;233(1):1-14.

89. 50. Pepino M, Tiemann C, Patterson B, Wice B, Klein S. Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2530-2535.
90. 51. Pepino M, Tiemann C, Patterson B, Wice B, Klein S. Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care*. 2013;36(9):2530-2535.
91. 52. Raben ARichelsen B. Artificial sweeteners. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2012;15(6):597-604.
92. 53. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss C, Maza O et al. Artificial Sweeteners Induce Glucose Intolerance by Altering the Gut Microbiota. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2015;70(1):31-32.
93. 54. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37(5):589-601.
94. 55. Lee do Y, Kim E, Choi MH.. Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress . *BMB Rep*. 2015;48(4): 209–216.
95. 56. Yan L. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *Journal of Diabetes Research*. 2014;2014:1-11.
96. 57. Yan L, Zheng H, Wu J, Jin Z. Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications. *Biochemistry Insights*. 2016;:1.
97. 58. Naudi A, Jove M, Ayala V, Cassanye A, Serrano J, Gonzalo H et al. Cellular Dysfunction in Diabetes as Maladaptive Response to Mitochondrial Oxidative Stress. *Experimental Diabetes Research*. 2012;2012:1-14.
98. 59. Yan L, Zheng H, Wu J, Jin Z. Protein Modifications as Manifestations of Hyperglycemic Glucotoxicity in Diabetes and Its Complications. *Biochemistry Insights*. 2016;:1.