



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**“Efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales
sobre parámetros inflamatorios y antioxidantes en el riñón,
en un modelo de obesidad inducida por dieta”**

T E S I S

Que presenta

L.N.C.A. KATHERINE ADRIANA ROSAS VILLEGAS

Para obtener el Grado de
MAESTRA EN CIENCIAS

En la especialidad de
BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la tesis:
Dra. Nimbe Torres y Torres
Dra. Isaura Meza Gómez Palacio

México, D.F.

Agosto, 2017

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría de la Dra. Nimbe Torres y Torres y la co-tutoría de la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio perteneciente al Departamento de Biomedicina Molecular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Con asesoría de la Dra. Ma. Teresa Estrada García y el Dr. Vianney Ortiz Navarrete pertenecientes al Departamento de Biomedicina Molecular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.



Se extiende un agradecimiento a la Dra. Nimbe Torres y Torres y al Dr. Armando Roberto Tovar Palacio por su contribución, guía y apoyo a lo largo del proyecto.

A la Dra. Isaura Meza Gómez Palacio por su asesoría y consejos.

A la Dra. Azalia Ávila Nava y a la Dra. Victoria Ramírez por su asesoría experimental y técnica.

Un agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico durante la realización de mis estudios.

A Andrei, los mejores 9 años de mi vida.

A mi hermano por su apoyo incondicional, porque es muy sabio e increíblemente modesto.

A mi mamá, el mundo sería mejor con más personas como ella.

A mi papá por ser un gran ejemplo de esfuerzo y trabajo, sin el cuál no habría podido tener la educación que tanto disfruto, gracias por todo tu cariño.

A mi abuela, qué fortuna tener tu compañía

A mis primos y familia, hacen que todos se sientan bienvenidos, queridos y me siento afortunada por ser parte de ello.

A todos mis amigos de Logos, de nutrición, la universidad, primaria, secundaria, el laboratorio, bioquímica, biomedicina o cualquier otro lugar. Amo reír y con ustedes eso es una garantía, que la vida siempre les traiga lo mejor.

A Guby, Azor y Pino. He aprendido tanto de ustedes y algún día nos veremos de nuevo.

A la n=60, los héroes de cualquier trabajo experimental.

ÍNDICE

ÍNDICE -----	4
ÍNDICE DE FIGURAS -----	6
ÍNDICE DE TABLAS -----	6
NOTACIÓN -----	7
RESUMEN -----	9
ABSTRACT -----	10
I. INTRODUCCIÓN -----	11
1.1 Obesidad -----	11
1.2 Efectos de la obesidad sobre el riñón -----	12
1.3 Edulcorantes -----	14
1.4 Mecanismos moleculares de los edulcorantes durante la obesidad -----	16
1.5 Edulcorantes y enfermedad renal -----	23
II. JUSTIFICACIÓN -----	25
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	25
IV. HIPÓTESIS -----	25
V. OBJETIVO GENERAL -----	26
VI. OBJETIVOS PARTICULARES -----	26
VII. METODOLOGÍA -----	27
7.1 Modelo experimental -----	27
7.2 Composición de la dieta sólida -----	28
7.3 Composición del agua de bebida -----	28
7.4 Ganancia de peso y composición corporal -----	28
7.5 Sacrificio -----	29
7.6 Extracción de proteínas -----	29
7.7 Western blot -----	30
7.8 RT-PCR -----	30
7.9 Análisis histológico -----	32
7.10 Análisis de función renal -----	32

7.11 Análisis de estrés oxidativo -----	33
7.12 Análisis estadístico -----	33
VIII. RESULTADOS -----	34
8.1 Una dieta alta en grasa saturada añadida con 10% de sacarosa promueve la mayor ganancia de peso y mayor porcentaje de grasa corporal -----	34
8.2 Una dieta alta en grasa saturada adicionada con sucralosa promueve el daño renal -----	36
8.3 Una dieta alta en grasa adicionada con sucralosa o sacarosa promueven mayor expresión de parámetros de la vía inflamatoria de los TLR's -----	38
8.4 La miel, el mascabado y los GE son los edulcorantes con mayor actividad antioxidante -----	42
8.5 El consumo de edulcorantes modifica diferencialmente el metabolismo de lípidos -----	46
8.6 El consumo de edulcorantes con menor actividad antioxidante causa un mayor daño renal -----	48
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS -----	50
X. CONCLUSIONES -----	57
XI. PERSPECTIVAS -----	59
XII. BIBLIOGRAFÍA -----	60
XIII. ANEXOS -----	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Diagrama 1: Translocación de NF- κ B hacia el núcleo para la transcripción de marcadores inflamatorios -----	19
Diagrama 2: Mecanismo de acción de TLR4 para la transcripción de moléculas inflamatorias -----	20
Diagrama 3: Mecanismo de respuesta de Nrf2 ante el estímulo de ERO --	22
Diagrama 4. Diseño experimental -----	27
Diagrama 5. Resumen gráfico del estudio -----	57
Figura 1. Curva de peso promedio y análisis de composición corporal ----	35
Figura 2. Parámetros séricos de creatinina y BUN, KIM-1 en tejido renal -	37
Figura 3. Parámetros inflamatorios de la vía de los TLR's -----	39
Figura 4. Citocinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno -----	41
Figura 5. Nrf2y actividad antioxidante de los edulcorantes -----	43
Figura 6. Enzimas antioxidantes -----	45
Figura 7. Moléculas involucradas en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono -----	47
Figura 8. Daño renal -----	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la dieta sólida -----	28
Tabla 2. Composición de buffer de lisis RIPA sin activar -----	29
Tabla 3. Composición reactivos para extracción citoplasmática-nuclear ---	29
Tabla 4: Anticuerpos y concentraciones utilizadas -----	30
Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción RT -----	31
Tabla 6. Primers utilizados en el PCR en tiempo real -----	31

NOTACIÓN

?: porcentaje

AIN-93: American Institute of Nutrition-93 (dieta purificada para roedores de laboratorio)

Bcl-2: linfoma células- β 2

BUN: nitrógeno ureico en sangre

Cat: catalasa

DE: desviación estándar

DNA: ácido desoxirribonucleico

ECV: enfermedad cardiovascular

EE: error estándar

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

ERC: enfermedad renal crónica

ERO: especies reactivas de oxígeno

g: gramos

GE: glucósidos de esteviol

GPx: glutatión peroxidasa

H&E: hematoxilina y eosina

HFD: dieta alta en grasa

Hrs: horas

I- κ B: inhibidor κ B

IKK: complejo cinasa I- κ B

IL-1 β : interleucina 1 β

IL-6: interleucina 6

IMC: índice de masa corporal

Kcal: kilocalorías

Keap1: proteína asociada a ECH similar a Kelch

Kg: kilogramos

KIM-1: kidney injury molecule 1

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

m: metros

mM: milimolar

mTOR: blanco de rapamicina en mamíferos

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos

MyD88: factor de diferenciación mieloide 88

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nrf2: factor nuclear relacionado al factor eritroide 2

OID: obesidad inducida por dieta

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

RNAm: RNA mensajero

SOD: superóxido dismutasa

SREBP-1c: proteína de unión al elemento regulador de esterol 1

TLR's: receptores tipo Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral

TRIF: adaptador que contiene el dominio TIR e induce interferón β

RESUMEN

Los edulcorantes se consumen ampliamente debido a su propiedad de brindar sabor dulce. El estudio del efecto de los edulcorantes sobre el organismo arroja resultados inconsistentes que resaltan la necesidad de más investigaciones, particularmente sobre órganos como el riñón, que han recibido poca atención a pesar de que la enfermedad renal es una comorbilidad de la obesidad, ampliamente relacionada con el consumo de edulcorantes. El objetivo del presente trabajo es la evaluación del efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre el daño renal, evaluado mediante parámetros inflamatorios y la respuesta antioxidante. Durante 4 meses, se administró a ratas Wistar una dieta alta en grasa (HFD) en combinación con distintos edulcorantes en el agua de bebida (sacarosa, fructosa, glucosa, mascabado, glucósidos de esteviol, Svetia®, miel y sucralosa). El grupo control consumió la dieta AIN93 y agua simple. El tratamiento HFD+Agua provocó daño renal, modificaciones en el metabolismo de lípidos e inflamación, su combinación con los diferentes edulcorantes incrementó éstos parámetros y en otros casos los mejoró. El consumo de HFD+Sucralosa provocó la menor ganancia de peso y el menor porcentaje de masa grasa, sin embargo incrementó los parámetros bioquímicos asociados a daño renal, los parámetros inflamatorios y las alteraciones en el metabolismo de lípidos. La actividad antioxidante de los edulcorantes naturales parece jugar un papel importante en la disminución del daño renal, ya que la miel, el mascabado y los glucósidos de esteviol en combinación con una dieta alta en grasa causaron menor inflamación y daño renal. Los resultados indican que los diferentes edulcorantes contribuyen de manera diferencial al daño renal e indican la necesidad de estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuáles actúan.

ABSTRACT

Sweetener consumption is very common given its property to provide sweet flavor. The study of sweeteners on metabolism has delivered conflicting results and pointed to the need for more research particularly of organs like the kidney that has received little attention, even though kidney disease is a comorbidity of obesity that is strongly associated with the consumption of sweeteners. The objective of the present work is the evaluation of the effect of natural and artificial sweeteners on kidney damage, assessed through inflammatory parameters and the antioxidant response. During 4 months, a high-fat diet (HFD) was given to Wistar rats in combination with different sweeteners administered in drinking water (sucrose, fructose, glucose, brown sugar, steviol glycosides, Svetia®, honey and sucralose). The control group was given AIN-93 diet and water. HFD+Water treatment caused kidney damage, modification in lipid metabolism and inflammation; its combination with the sweeteners increased or in some cases decreased these parameters. HFD+Sucralose caused minor weight gain and minimal body fat mass, nevertheless increased biochemical parameters related to kidney damage, inflammatory parameters and modifications in lipid metabolism. The antioxidant activity of sweeteners seems to be a key factor in decreased renal damage, sweeteners like honey, brown sugar and steviol glycosides in combination with a high-fat diet showed less inflammation and kidney damage. These findings indicate that different sweeteners have a differential effect on kidney damage and the need of more studies to determine the molecular mechanisms involved in these effects.

Efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre parámetros inflamatorios y antioxidantes en el riñón, en un modelo de obesidad inducida por dieta

I. INTRODUCCIÓN

1.1 OBESIDAD

La obesidad se considera un estado metabólico patológico caracterizado por un exceso de tejido adiposo blanco. La obesidad comúnmente ocurre como resultado de un desequilibrio entre la ingesta alimentaria y el gasto energético [1]. Dicho desequilibrio frecuentemente se debe al consumo de dietas altas en grasa e hidratos de carbono simples. En éstas dietas, una de las principales fuentes de hidratos de carbono añadidos son los edulcorantes (sustancias que aportan dulzor), los más comúnmente consumidos son la sacarosa y el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa. El consumo de fructosa añadida se ha asociado como un componente principal en la epidemia de obesidad y con un incremento de ácido úrico y triglicéridos en suero [2-4]. Por otra parte, se ha sugerido que la relación entre el incremento de peso y el consumo de edulcorantes añadidos se debe al incremento total de la energía consumida y probablemente no a un nutrimento en específico [2, 5]. En condiciones fisiológicas normales, el tejido adiposo blanco almacena los ácidos grasos como energía de reserva. Sin embargo, en la obesidad, la capacidad de almacenamiento es insuficiente y los ácidos grasos libres son hidrolizados y liberados del tejido acumulándose en órganos que no son específicos para ello, como el hígado y el músculo, proceso conocido como lipotoxicidad. La lipotoxicidad es un proceso involucrado en el desarrollo de resistencia a la insulina y de diabetes tipo 2, las cuáles son altamente prevalentes en la población mundial [6].

La obesidad se acompaña de un estado de inflamación crónica que tiene consecuencias metabólicas importantes en diferentes tejidos como el hígado, el hipotálamo, el páncreas y el músculo [3, 7]. El riñón posee diversas funciones como la filtración de la sangre, la eliminación de los

productos de desecho a través de la orina, el balance de electrolitos, la excreción de urea, la regulación de la presión arterial, la secreción de hormonas, el equilibrio ácido-base y la contribución a la homeostasis de glucosa [8]. La pérdida de función del tejido renal se ha asociado a la obesidad e implica alteraciones en los procesos previamente mencionados. Sin embargo, no hay suficientes estudios acerca del impacto del consumo de diferentes dietas, y particularmente de edulcorantes, sobre este tejido vital.

1.2 EFECTOS DE LA OBESIDAD SOBRE EL RIÑÓN

La incidencia de la enfermedad renal crónica (ERC) ha incrementado en los últimos años, la prevalencia de adultos que la padecen a nivel mundial es mayor al 14% [9]. La ERC es la pérdida gradual de función renal que incrementa con la edad (>50 años), y se exacerba con condiciones como diabetes, obesidad e hipertensión. A su vez, la ERC se asocia con la enfermedad cardiovascular (ECV) y su agravamiento. La ECV es la primer causa de mortalidad a nivel mundial, los pacientes que cursan con ERC tienen mayor mortalidad por un evento cardiovascular que por falla renal terminal [10, 11].

La ERC involucra factores genéticos y ambientales. Puede clasificarse como aguda o crónica e impacta sobre la función del tejido, por lo mismo en sus últimas fases requiere terapias de reemplazo o trasplante de tejido; terapias costosas y no accesibles a la mayoría de la población. El estrés oxidativo contribuye al desarrollo de enfermedad renal crónica y aguda, contribuyendo al estado inflamatorio [12]. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se forman normalmente en el metabolismo aerobio. En el caso de un desequilibrio en la cantidad de ERO y la respuesta antioxidante puede ocurrir el estrés oxidativo que puede oxidar lípidos, proteínas y dañar al DNA. En la inflamación, las ERO actúan como segundos mensajeros de la respuesta inmune celular y en grandes concentraciones pueden incrementar la respuesta inflamatoria, dañando los tejidos [13].

El incremento de la adiposidad visceral se relaciona positivamente con

la ERC y con las comorbilidades de la obesidad (diabetes, hipertensión, ECV, dislipidemia y resistencia a la insulina) que a su vez, incrementan aún más la incidencia de la ERC. El tejido adiposo visceral produce adipocinas y citocinas que contribuyen a la generación del ambiente inflamatorio y al desarrollo de las lesiones renales [14-16]. Una de las adipocinas es la adiponectina, que actúa como activador de las vías inflamatorias a través del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), contribuyendo al incremento de las lesiones observadas en la patología renal [17].

Durante la obesidad se desarrollan lesiones glomerulares y se acumulan lípidos en las estructuras del riñón. Las lesiones renales pueden apreciarse inicialmente por la modificación en la tasa de filtración glomerular y de manera indirecta a través de la excreción de proteína en la orina [15]. La molécula KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) se utiliza como marcador de daño renal, debido a que se encuentra mínimamente expresada en el tejido sano y se considera más sensible que la creatinina y el nitrógeno ureico en sangre (BUN) para evaluar el daño renal [18]. Ambas moléculas son productos proteicos del metabolismo. La creatinina es el producto del catabolismo muscular mientras que el BUN es el metabolito del catabolismo de la urea [19].

En modelos animales de obesidad se observa un crecimiento del riñón de hasta un 40%, un incremento en el tamaño del glomérulo que resulta en esclerosis del tejido y modificaciones en la actividad del sistema renina-angiotensina. Estudios en ratas genéticamente obesas, presentan cambios hemodinámicos que provocan una mayor filtración glomerular y que progresan a albuminuria. Los estudios macromoleculares proponen que éstas alteraciones ocurren debido a cambios en la dilatación de las arterias renales. En cuanto a los estudios en humanos, la obesidad se relaciona estrechamente con el crecimiento glomerular, con albuminuria e hiperfiltración, que generan el cuadro denominado glomerulopatía asociada a la obesidad. Lo anterior se agrava, cuando también se presenta hipertensión

arterial que puede complicarse debido a que la obesidad se asocia también a mayor riesgo de carcinoma renal [16].

Las estrategias dietarias para disminuir el sobrepeso y la obesidad se enfocan principalmente hacia la pérdida de peso, debido a que revierte el estado inflamatorio y disminuye significativamente las comorbilidades. La pérdida de tejido adiposo implica una disminución en la concentración de las citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF α), interleucinas (IL-1 β e IL-6) y CCL2 o MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos), que incrementan en la obesidad [3]. Para alcanzar un peso saludable, así como la disminución de masa grasa se debe generar un desequilibrio energético negativo: mayor gasto energético que ingesta energética. Debido a lo anterior se han propuesto diversas estrategias como el incremento de actividad física y/o la disminución del consumo energético a través de dietas hipocalóricas y el control de porciones. Generalmente éstas estrategias implican el aumento en el consumo de alimentos “light” que aportan menos energía, lípidos y/o hidratos de carbono, aunque surge la interrogante sobre su eficacia y utilidad [20].

1.3 EDULCORANTES

Los edulcorantes, comúnmente conocidos como azúcares, son sustancias que poseen sabor dulce y por ello son utilizados como endulzantes o para brindar ciertas propiedades en el procesamiento de alimentos. Las moléculas que pueden producir sensación de dulzor poseen estructuras moleculares muy diversas ya que son monosacáridos, disacáridos, aminoácidos, polioles, glucósidos, entre otros. El sabor dulce, evolutivamente se asocia con alimentos inocuos que brindan un aporte energético, por lo que son preferidos por las personas [21]. El consumo de edulcorantes promueve alteraciones metabólicas y aunque existen resultados conflictivos sobre su efecto metabólico y sobre la ganancia de peso, su uso continúa siendo ampliamente distribuido en la población.

Históricamente, el uso de la sacarosa como lo conocemos es relativamente reciente, inicialmente se consideraba como un producto de lujo y su uso no estaba extendido entre la población. Con la expansión de su producción regional y hacia diversos países y la eliminación de aranceles, se volvió un producto al alcance de la mayoría de las personas. Interesantemente, su uso ha incrementado con los años contrastando un consumo anual per cápita de aproximadamente 1.8 Kg en el siglo XIX y un consumo de 67.6 Kg en la actualidad; un incremento significativo que coincide con el aumento en la incidencia de diversas patologías [22]. Por ello, hay un interés actual hacia el consumo de los mismos, y sobre la proporción que representan de los hidratos de carbono totales consumidos.

Debido a la gran variedad de edulcorantes disponibles para el consumo humano, surgen las siguientes clasificaciones de acuerdo a su origen o a su aporte energético. De acuerdo a su origen, los edulcorantes pueden clasificarse como:

- Naturales: Aislados de tejidos vegetales, frutas y lácteos. Por su origen suelen estar acompañados de antioxidantes. Ejemplos de éstos edulcorantes son la glucosa, fructosa, sacarosa, miel, néctar de agave, mascabado o glucósidos de esteviol derivados de la planta *Stevia rebaudiana*.
- Artificiales: son aditivos sintetizados o procesados que imitan el sabor dulce de los edulcorantes naturales. Suelen tener una intensidad de dulzor mayor a la sacarosa (sucralosa, aspartame y sacarina) por lo que se utilizan en pequeñas cantidades.

De acuerdo a su aporte energético, los edulcorantes también se pueden clasificar como:

- Nutritivos: contienen hidratos de carbono digeribles por el humano y por ello proveen energía aportando 4 Kcal/g o en el caso de los polioles 2 Kcal/g.

- No nutritivos: contienen una cantidad mínima o no contienen hidratos de carbono digeribles y como consecuencia no aportan energía [23-26].

El elevado consumo de edulcorantes nutritivos se ha asociado con el desarrollo de irregularidades metabólicas como la ganancia de peso, el aumento en la adiposidad, mayor riesgo de síndrome metabólico, obesidad y otras enfermedades crónico degenerativas [2, 27]. También se pueden atribuir ciertas propiedades benéficas a los edulcorantes como son las propiedades anticariogénicas (*Stevia rebaudiana*, sucralosa y aspartame) y las propiedades antioxidantes (*Stevia rebaudiana*, mascabado y miel) [3].

El consumo >20% de la energía total proveniente del consumo de edulcorantes nutritivos incrementa el riesgo de ECV mediante el incremento de triglicéridos séricos y de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad); particularmente en dietas hipercalóricas. Debido a lo anterior, el desarrollo de los edulcorantes no nutritivos se postuló como una opción para disminuir la ingesta energética y para reducir el peso corporal sin perder el sabor dulce [2]. A pesar de la disponibilidad de estos compuestos bajos en energía y el incremento en su consumo, la epidemia mundial de obesidad continúa en aumento y la controversia acerca de la asociación entre su ingesta y el desarrollo de obesidad y patologías genera la necesidad de más investigaciones [28, 29].

1.4 MECANISMOS MOLECULARES DE LOS EDULCORANTES DURANTE LA OBESIDAD

Uno de los mecanismos que recientemente se ha propuesto es el impacto de los edulcorantes sobre la composición de la microbiota intestinal, cuya alteración se ha denominado disbiosis [30]. La disbiosis se acompaña de un incremento de los niveles séricos de lipopolisacárido (LPS), el cual es un constituyente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas,

que juega un papel importante en la interacción con el hospedero y la respuesta inmune. La endotoxemia se refiere al incremento de LPS circulante, causada por la translocación bacteriana derivada de una mayor permeabilidad intestinal, estado observado durante la obesidad. A través de éste mecanismo se incrementa la actividad inflamatoria y el estrés oxidativo sistémico [31]. La endotoxemia se presenta comúnmente en etapas tardías de la ERC, exacerbando la inflamación metabólica [32]. El LPS administrado intraperitonealmente a un modelo murino provoca daño renal y fibrosis, mediados por la activación de mTOR (blanco de rapamicina en mamíferos), proteína que media la respuesta inmune de los macrófagos y su incremento en el tejido renal [33]. Se ha reportado una correlación entre una mayor cantidad de LPS circulante y un incremento en la mortalidad de los pacientes con ERC, debido a un incremento de riesgo cardiovascular [34].

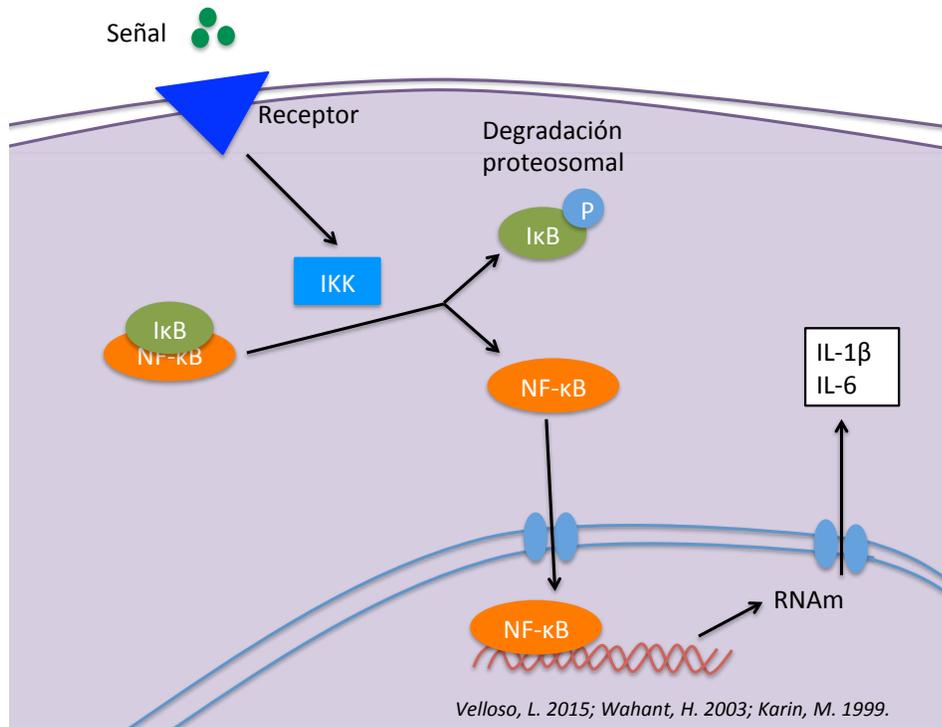
Los pacientes que cursan con enfermedad renal muestran alteraciones en la composición de la microbiota intestinal, cambios histológicos y modificaciones en la permeabilidad intestinal, a comparación de pacientes sanos. La uremia promueve la permeabilidad intestinal, la translocación bacteriana y endotoxemia. La urea fluye hacia el tracto gastrointestinal en donde actúa como sustrato para bacterias que la convierten a amoníaco y generan metabolitos tóxicos (indoxil sulfato y p-cresol) que agravan la disbiosis. Los metabolitos ingresan a la circulación, se eliminan a través del riñón y promueven la progresión del daño; aumentando también el riesgo de enfermedad cardiovascular. promoviendo un estado de inflamación y estrés oxidativo sistémico [35, 36]. Por lo que el consumo de los diferentes edulcorantes administrados en éste estudio, pueden estar impactando sobre el riñón de manera indirecta a través de la modificación de la microbiota intestinal. Edulcorantes como la sacarina pueden provocar cambios en la composición de la microbiota intestinal e inducir intolerancia a la glucosa en roedores [37].

Como consecuencia de éstas alteraciones, los edulcorantes junto con el

consumo de una dieta alta en grasa saturada pueden modular diferentes vías de señalización, como son las vías de: NF- κ B, los TLR's y Nrf2.

A) Vía de NF- κ B: Uno de los factores de transcripción que puede ser activado por las dietas altas en grasa e hidratos de carbono es NF- κ B. Ésta molécula es un factor heterodimérico formado por dos elementos de su familia: p50, p52, p65/RelA, RelB y/o c-Rel. Éste factor se une al DNA de manera específica y regula la transcripción de varios genes involucrados en diversas funciones metabólicas y la supervivencia celular. La regulación de NF- κ B a nivel de citoplasma ocurre porque posee un sitio de unión al inhibidor κ B (I- κ B), que bloquea estéricamente la translocación nuclear de NF- κ B y retiene al complejo NF- κ B:I- κ B en el citoplasma. El punto crítico para la activación de la vía ocurre a través de IKK (complejo cinasa I- κ B). IKK es un complejo heterotrimérico compuesto por las subunidades α , β y γ (NEMO), que regula al factor de transcripción NF- κ B y su acción sobre la transcripción de citocinas inflamatorias. La fosforilación de IKK sobre el inhibidor citoplasmático I- κ B interrumpe al complejo y permite la liberación del factor de transcripción. A través de ésta fosforilación se promueve la ubiquitinación de I- κ B y su degradación proteosomal, mientras que NF- κ B ingresa al núcleo y se une al DNA incrementando la expresión de moléculas inflamatorias como IL-1 β e IL-6. Otras moléculas que promueven la activación de NF- κ B son TNF α , la citocina inflamatoria IL-1 β y el LPS. También se ha reportado que el incremento en los niveles séricos de LPS inducen la fosforilación de IKK, permitiendo el ingreso de NF- κ B al núcleo [7, 38, 39].

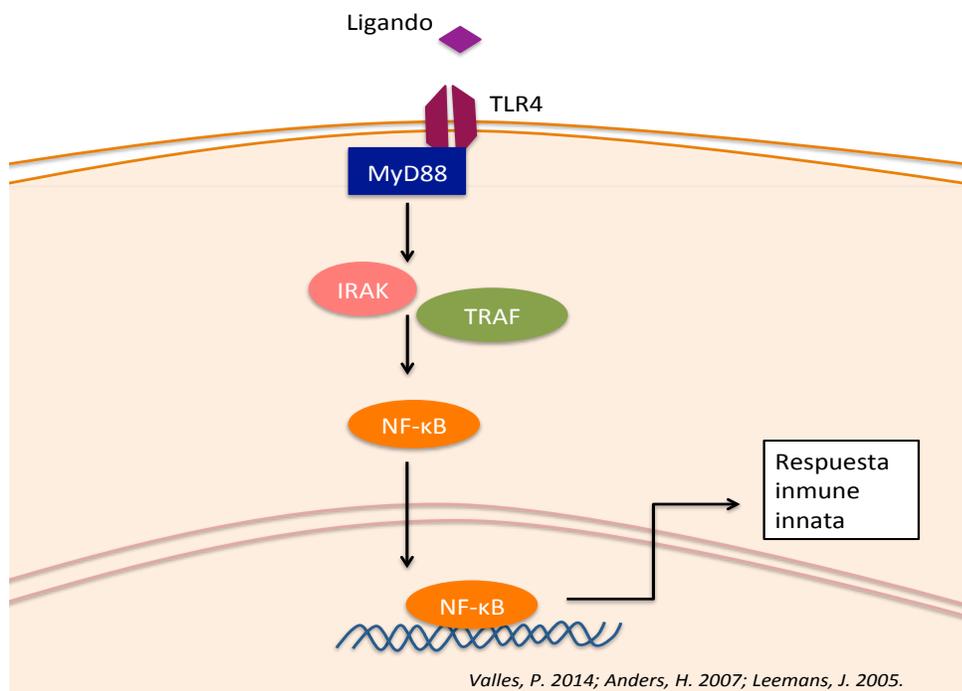
Diagrama 1: Translocación de NF- κ B hacia el núcleo para la transcripción de marcadores inflamatorios



B) Vía de los TLR's: Otra de las vías que puede ser activada por el LPS sérico es a través de los receptores tipo Toll (TLR's). En la obesidad, así como en el daño renal, se observa un aumento en la activación de estos receptores. Los TLR's son receptores transmembranales, que reconocen diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs); de los cuáles el TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 tienen la capacidad de reconocer y activarse por algunos ligandos lipídicos [40, 41]. TLR4, en particular, se asocia con la enfermedad renal aguda y crónica [42]. Éstos receptores, son parte importante de la respuesta inmune innata. Tras su activación, reclutan proteínas adaptadoras como MyD88 (factor de diferenciación mielóide 88) o TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR e induce la inducción del interferón β), que permite el inicio de la cascada de señalización, para la producción de citocinas inflamatorias e interferones del tipo I.

El TLR4, cuya activación ocurre en respuesta al LPS o a ácidos grasos saturados provenientes de la dieta, promueve la activación de los receptores y la actividad proinflamatoria. La interacción de los ácidos grasos libres con el receptor TLR4 ocurre de manera indirecta, está mediada por la molécula llamada fetuina-A que se une a los ácidos grasos y mediante ésta unión, permite la señalización a través del TLR4 [3, 7]. En el daño renal, los TLR's contribuyen al estado proinflamatorio a través del reclutamiento de células del sistema inmune [41] y la producción de moléculas inflamatorias. Antagonistas de TLR4 mejoran el daño renal asociado a la obesidad mediante la supresión de citocinas inflamatorias, a través de la vía que involucra a NF- κ B [43]. En un modelo animal deficiente de TLR2, TLR4 y MyD88, se observa una disminución en la nefropatía [44, 45]. Otros estudios demuestran que la ausencia o falta de funcionalidad del TLR4 previene el desarrollo de fibrosis renal, reforzando su contribución en el desarrollo de la ERC [46].

Diagrama 2: Mecanismo de acción de TLR4 para la transcripción de moléculas inflamatorias



C) Vía de Nrf2: El estrés oxidativo y la inflamación sistémica juegan un papel central en el desarrollo y progresión de la enfermedad renal [36]. El estrés oxidativo se asocia con el consumo de una dieta alta en grasa, y con un incremento en la peroxidación de lípidos en el tejido hepático, el músculo cardíaco y en el riñón. La peroxidación de lípidos se incrementa por la presencia de citocinas inflamatorias y un aumento en las ERO, que en el riñón provocan daño tisular y contribuyen a la progresión de la ERC [47]. El estrés oxidativo también contribuye al desarrollo de hipertensión, debido a que induce cambios en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, modificando la homeostasis de sodio y la presión arterial [48].

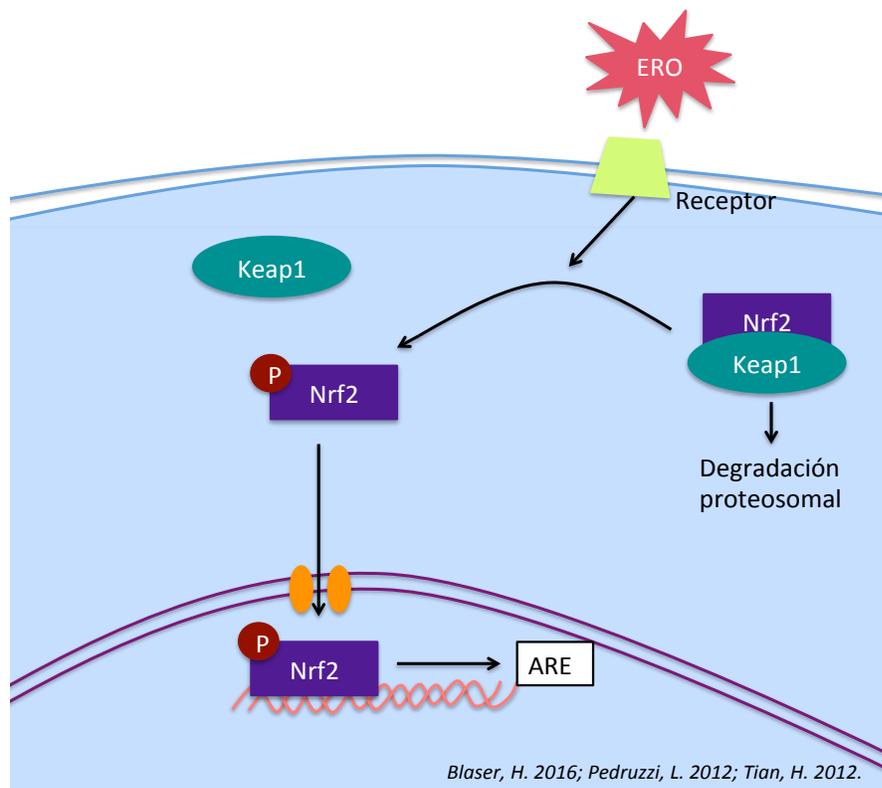
Las ERO se producen en respuesta a dietas altas en lípidos e hidratos de carbono en tan sólo unas cuantas horas [3] por lo que el consumo frecuente de antioxidantes puede contrarrestar sus efectos nocivos. Se ha reportado que edulcorantes calóricos no refinados, como el azúcar mascabado y la miel, aportan más antioxidantes que el azúcar refinada (sacarosa), y que pueden impactar positivamente evitando el desarrollo de las patologías antes mencionadas [24, 28]. Las citocinas inflamatorias producidas en el estado inflamatorio de la obesidad también contribuyen a la generación de ERO [49]. Ante la presencia de ERO, la respuesta antioxidante celular tiene la función de inhibir las citocinas inflamatorias producidas por NF- κ B [50].

Entre los elementos de respuesta antioxidante que poseen las células se encuentra Keap1 (proteína asociada a ECH similar a Kelch) que se encarga de responder ante desequilibrios de las reacciones de oxidación y reducción, y regular la activación de Nrf2 (factor nuclear relacionado al factor eritroide 2) en respuesta al estrés oxidativo. Keap1 actúa sobre IKK que resulta en la inhibición de la acción de NF- κ B y también actúa sobre Bcl-2 (linfoma células- β 2) promoviendo la apoptosis celular. La acción de Nrf2 es sobre la transcripción de genes citoprotectores; el factor de transcripción normalmente se encuentra en el citoplasma e interactúa con Keap1, quién lo lleva cíclicamente a degradación proteosomal mediante ubiquitinación. Sin

embargo, ante el daño oxidativo, el complejo se disocia permitiendo la entrada de Nrf2 al núcleo donde lleva a cabo su acción como factor de transcripción al unirse a los elementos de respuesta antioxidante en el DNA, que incrementan la transcripción de genes de detoxificación de fase II como son las enzimas glutatión transferasa, glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat), entre otras; cuya acción evita la acumulación de las especies reactivas de oxígeno [51].

La activación de Nrf2 atenúa la glomeruloesclerosis y el daño en los podocitos [52], mientras que la activación anómala de Nrf2 promueve la inflamación renal mediante la activación de NF- κ B a través de moléculas como los lipoperóxidos e hidroperóxidos. Se ha propuesto que NF- κ B impide la disociación de Nrf2:Keap1 y por lo tanto interfiere con su función antioxidante [53].

Diagrama 3: Mecanismo de respuesta de Nrf2 ante el estímulo de ERO



1.5 EDULCORANTES Y ENFERMEDAD RENAL

El consumo de “azúcares libres”, es decir, aquellos monosacáridos o disacáridos añadidos en el procesamiento de un alimento o aquellos presentes en jugos de frutas; debe reducirse a <10% de la ingesta energética total, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) como estrategia preventiva debido a la asociación entre el consumo de los mismos y el desarrollo de patologías [54].

Los edulcorantes nutritivos se han propuesto como posibles responsables del desarrollo de ERC. La fructosa promueve la obesidad visceral, dislipidemia, e incrementa los niveles circulantes de ácido úrico que posiblemente a través de alteraciones en la presión arterial dañan el tejido renal. Estudios en animales que fueron alimentados con una dieta alta en fructosa, desarrollaron hipertrofia renal e hipertensión glomerular [14, 55].

La sacarina administrada en el agua de bebida a un modelo murino, incrementó la ingesta de alimento, a comparación del grupo control [56]. En otro estudio, los animales que consumieron sacarina muestran un incremento en la urea y creatinina séricas, y a nivel hepático, una disminución de enzimas antioxidantes [57]. La adición de *Stevia rebaudiana* a la dieta de roedores en los que se indujo diabetes, mejoró los parámetros de glucosa sérica, favoreció a las enzimas antioxidantes en hígado y en el riñón se observó un menor daño renal en comparación con el control, que presentó filtración glomerular disminuida [58]. En otro estudio, con el consumo de *S. rebaudiana*, se observó una disminución del consumo de alimento, disminución en las concentraciones de colesterol, triglicéridos y glucosa, no se observaron signos de daño renal ni cambios en el tamaño del tejido [59].

Las alteraciones en el metabolismo de lípidos contribuyen a la progresión del daño renal e incrementan el riesgo de ECV. Una dieta alta en grasa impacta sobre la estructura renal mediante la acumulación de lípidos, cuantificable a través de SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador de esterol 1), que se encuentra incrementado en condiciones de

hiperglicemia como lo es la nefropatía diabética [60].

Los estudios epidemiológicos que han relacionado el consumo de edulcorantes (en forma de bebidas dulces o carbonatadas) con la enfermedad renal en humanos arrojan resultados conflictivos. Se ha reportado una correlación positiva entre el consumo de edulcorantes y la enfermedad renal, pero pocos estudios reportan resultados estadísticamente significativos debido a que en ocasiones no se toma en cuenta el estilo de vida o el efecto de otros componentes dietarios [14]. Estudios epidemiológicos realizados en la población americana durante 23 años, relacionan el consumo de bebidas endulzadas con edulcorantes no nutritivos y el desarrollo de enfermedad renal en etapa terminal [61]. El consumo de dos o más bebidas al día endulzadas con sacarosa, se ha asociado significativamente con microalbuminuria [62], y el consumo de bebidas endulzadas con edulcorantes no nutritivos se asocia a un incremento de pérdida de la función renal en mujeres [63].

De acuerdo a lo anterior, el estudio de los efectos de los edulcorantes naturales o artificiales añadidos a la dieta, compuestos que son metabólicamente activos y pueden actuar de manera diferencial sobre la respuesta inflamatoria, la respuesta antioxidante y su impacto sobre tejidos como el riñón, ayudará a entender los mecanismos que se activan en los tejidos y hacer una recomendación apropiada para su uso.

II. JUSTIFICACIÓN

Los edulcorantes pueden actuar de manera diferencial sobre la respuesta inflamatoria y la respuesta antioxidante en el riñón. Su estudio ayudará a entender los mecanismos que se activan en los tejidos por su consumo y más adelante poder hacer una recomendación apropiada para su uso.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe una gran confusión en la literatura científica acerca de si algunos tipos de edulcorantes ya sea naturales o artificiales pueden tener un efecto benéfico o perjudicial para el organismo. Se ha asociado el consumo de algunos edulcorantes naturales como la glucosa y fructosa con un mayor daño renal, por otro lado edulcorantes naturales como los glucósidos de esteviol, tienen un efecto benéfico o nulo sobre el daño tisular. Por lo que es de gran importancia evaluar el efecto de los diferentes tipos de edulcorantes sobre el riñón y obtener mayor evidencia sobre su efecto en la salud para beneficio de los consumidores.

IV. HIPÓTESIS

El consumo de edulcorantes impactará de manera diferencial sobre parámetros de inflamación y la respuesta antioxidante en el riñón.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales en el riñón en un modelo animal de obesidad inducida por dieta

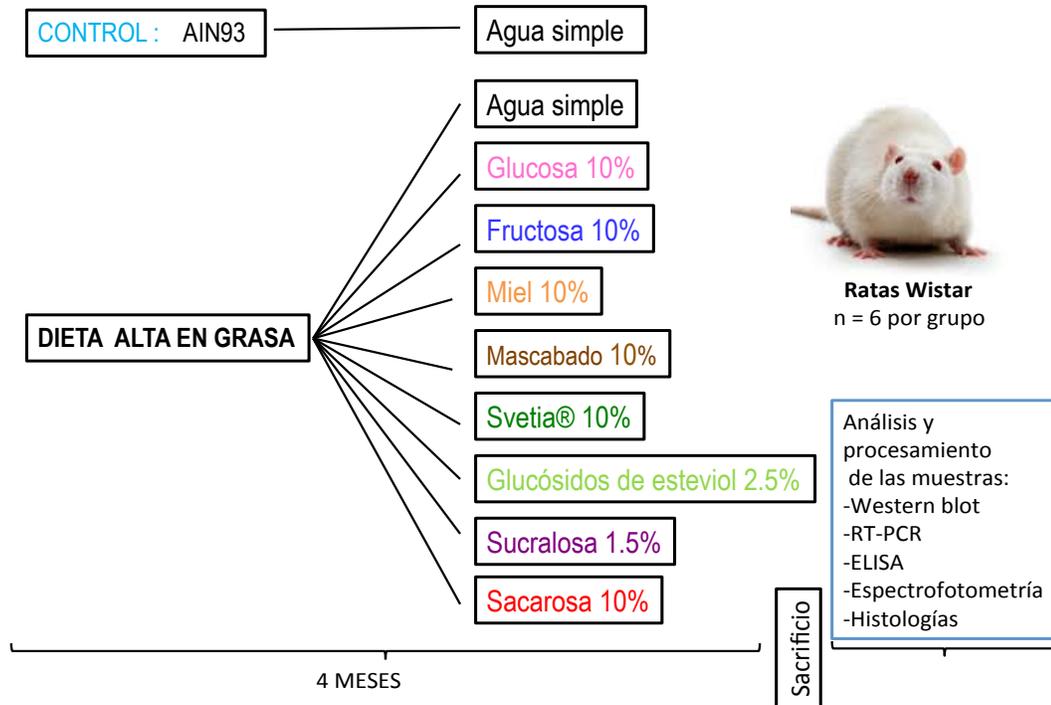
VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ganancia de peso y la composición corporal en un modelo murino con obesidad inducida por dieta utilizando ratas de la cepa Wistar
2. Evaluar la concentración sérica de creatinina, BUN y KIM-1 en tejido renal como marcadores de daño.
3. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales en el riñón sobre la activación del receptor TLR4, sobre la abundancia de marcadores inflamatorios como NF- κ B, la expresión de IL-1 β e IL-6, y especies reactivas en tejido.
4. Evaluar el efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la respuesta antioxidante en riñón mediante Nrf2 y la expresión de enzimas antioxidantes
5. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales en el riñón sobre la expresión de los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP, moléculas relacionadas al metabolismo de lípidos e hidratos de carbono.
6. Evaluar los cambios a nivel de estructura renal mediante el análisis histológico.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Modelo experimental: Ratas macho de cepa Wistar n=6 por grupo. Las ratas utilizadas tenían una edad inicial de 3-4 semanas con un peso de 180-226 gr.

Diagrama 4. Diseño experimental



7.2 Composición de la dieta sólida: el grupo control consumió una dieta basada en los lineamientos de la AIN-93 que no contiene grasa saturada [64] y se administró una dieta alta en grasa (HFD) con la composición que se muestra a continuación (Tabla 1):

Tabla 1. Composición de la las dietas control y alta en grasa saturada

	AIN-93M	HFD
Ingredientes	%	%
Caseína	14	24
L-Cistina	0.30	0.30
Almidón	45.01	24.75
Maltodextrina	16.94	10.5
Sacarosa	10	4.7
Aceite de soya	4	7
Celulosa	5	5
Minerales	3.5	3.5
Vitaminas	1	1
Colina	0.25	0.25
Manteca de cerdo	0	19
TBHQ	0.0014	0.0014

7.3 Composición del agua de bebida: se administraron los edulcorantes de origen natural o artificial en el agua de bebida en una concentración al 1.5% (sucralosa), 2.5% (GE: glucósidos de esteviol) y 10% (sacarosa, fructosa, glucosa, mascabado, miel, Svetia®). El grupo control y el grupo que consumió HFD consumieron agua simple.

7.4 Ganancia de peso y composición corporal: los animales recibieron el tratamiento durante 4 meses, durante los cuales se realizó el registro del peso corporal y el consumo de alimento, dos veces por semana. Utilizando resonancia magnética nuclear (EchoMRI™) se analizó la composición corporal cada dos semanas.

7.5 Sacrificio: se realizó a los 4 meses de tratamiento bajo anestesia con sevoflurano para la obtención del tejido renal. El tejido se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70 °C.

7.6 Extracción de proteínas: la extracción de proteínas totales del riñón se realizó de acuerdo al protocolo establecido en el laboratorio de acuerdo a lo siguiente:

A) Extracción de proteínas totales

Se realizó mediante la homogenización de 300 mg de tejido almacenado a -70°C con 300 mL de buffer de lisis celular RIPA (Tabla 2) en una relación 1:1. Se homogenizaron las muestras y se colocaron en agitación a 4°C por 40 minutos. Se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se obtuvo el sobrenadante, se homogenizó y se almacenó a -70°C.

Tabla 2. Composición de buffer de lisis RIPA sin activar

	10 mL buffer de lisis RIPA
PBS 1x	9.9 mL
NP-40 al 1.0%	0.1 mL
Deoxicolato de sodio al 0.5%	0.05 g
SDS al 0.1%	0.01 g
Azida de sodio al 0.006%	0.0006 g

Al buffer de lisis RIPA, se añade: una pastilla de inhibidores (complete mini), 100 uL NaF 100 mM, 200 uL Na₃VO₄ 100 mM/10 mL, previo a la homogenización del tejido.

B) Extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares

Se homogenizaron 100 mg de tejido con buffer de lisis hipotónico 1x (Tabla 2). Se centrifugó a 10 000 g por 20 minutos y el sobrenadante obtenido se almacenó como la fracción citoplasmática -70°C. Al precipitado se le añadieron 147 uL de buffer de extracción (Tabla 3), 1.5 uL de DTT 0.1 M, 1.5 uL de inhibidor de proteasas. Se homogenizó y se mezcló suavemente durante 30 minutos. La muestra se centrifugó por 5 minutos a 20 000 g y el sobrenadante se almacenó como la fracción nuclear -70°C.

Tabla 3. Composición reactivos para extracción citoplasmática-nuclear

Buffer lisis hipotónico 10x (10 mL)	Buffer de extracción (15 mL)
100 mM HEPES pH 7.9	20 mM HEPES pH 7.9
15 mM MgCl ₂	1.5 mM MgCl ₂
100 mM KCl	0.42 M NaCl

0.2 mM EDTA

25% (V/V) Glicerol

C) Cuantificación de proteínas

Utilizando el extracto de proteínas totales, citoplasmáticas o nucleares; se cuantificaron mediante el ensayo de Lowry (Bio-Rad). Realizando la lectura a 750 nm y utilizando una curva de albúmina como standard de concentraciones 0-1 mg/mL.

7.7 Western blot: se analizaron las proteínas de MyD88, Nrf2, p-IKK, TLR4 y NF- κ B utilizando anticuerpos específicos.

A) Western Blot

La proteína de “pools” de tejido renal se detectó a través de electroforesis en SDS-PAGE y transferencia a membranas de PVDF. Las membranas de PVDF se bloquearon con leche de bloqueo al 5% (Bio-Rad, Hercules CA, USA) por 60 minutos a temperatura ambiente e incubados a 4°C con los siguientes anticuerpos y concentraciones (Tabla 4):

Tabla 4: Anticuerpos y concentraciones utilizadas

Anticuerpos	No. Catálogo	Concentración
Actina	sc-1615	1 : 5 000
Keap1	sc-33569	1 : 2 500
Lámina β	sc-6216	1 : 2 000
MyD88	sc-74532	1 : 3 000
NF- κ B p65	sc-372	1 : 2 000
Nrf2	sc-722	1 : 2 000
p-IKK α/β	sc-23470	1 : 2 500
TLR-4	sc-293072	1 : 10 000

Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo, anti-cabra o anti-ratón conjugados con peroxidasa en una concentración 1 : 3 500. Se utilizó actina (1 : 5000) para normalizar la carga de proteína en el análisis densitométrico de las bandas reveladas por los diferentes anticuerpos. Las imágenes se analizaron con el equipo ChemiDoc™ XRS y con el software System Image Lab™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA). Los ensayos se realizaron por triplicado en experimentos independientes.

7.8 RT-PCR: Se extrajo el RNA, se realizó la retrotranscripción, mediante PCR en tiempo real se determinó la expresión de los RNAm de las citocinas

inflamatorias *IL-1 β* e *IL-6*, enzimas antioxidantes y moléculas involucradas en el metabolismo de lípidos.

A) Extracción del RNA

Se homogenizaron 100 mg de tejido con 1 mL de TRIzol, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se añadieron 200 μ L de cloroformo 100% a cada muestra y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se añadió isopropanol en una proporción 1:1, se mezcló por inversión y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 14 000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante por inversión. Se añadió 1 mL de etanol frío al 75% y se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante por inversión, permitiendo que el precipitado se secase durante una hora aproximadamente. El precipitado se resuspendió en agua libre de exonucleasas y endonucleasas (Sigma-Aldrich), se incubó a 65°C por 5 minutos. Se cuantificó la abundancia de RNA de acuerdo a las indicaciones del fabricante (NanoDrop 2000, ThermoScientific).

B) Retrotranscripción

Se realizó la retrotranscripción de las muestras en una concentración de 3 000 ng de RNA en 7 μ L. La mezcla de reacción con un volumen final de 20 μ L (Tabla 5). En el termociclador (Bio-Rad Mycycler™ 170-9701) se realizaron los siguientes ciclos para la RT (42°C por 70 minutos, 94°C por 5 minutos y enfriamiento a 4°C)

Tabla 5. Composición de la mezcla de reacción RT

	uL/muestra
Buffer 5x	4.0
dNTP's 2 mM	4.0
Oligo DT 1/5	2.0
DTT	2.0
Inhibidor de RNAsas	0.5
Enzima RT	0.5

C) PCR en tiempo real

La abundancia de RNAm se midió por PCR cuantitativo en tiempo real utilizando sondas de Taqman (Tabla 6), utilizando ciclofilina y HPRT como referencia de normalización (Roche-Light Cycler 480 Instrument II).

Tabla 6. Primers utilizados en el PCR en tiempo real

Sondas TaqMan	
<i>IL-1β</i>	Rn00580432_m1
<i>IL-6</i>	Rn00561420_m1

<i>Catalasa (Cat)</i>	Rn00560930_m1
<i>Glutación peroxidasa (Gpx)</i>	Rn00577994_m1
<i>Glutación reductasa (Gsr)</i>	Rn00588153_m1
<i>Superóxido dismutasa 1 (SOD1)</i>	Rn00566938_m1
<i>Superóxido dismutasa 2 (SOD2)</i>	Rn99999088_g1
<i>SREBP-1c</i>	Rn01495769_m1
<i>ChREBP</i>	Rn00591943_m1
<i>ACC α</i>	Rn00573474_m1
<i>HPRT</i>	Rn01527840_m1
<i>Ciclofilina</i>	Rn00690933_m1

7.9 Análisis histológico: se procesó el tejido renal mediante fijación, deshidratación y su inclusión en parafina. En los cortes se visualizó la integridad de la estructura renal con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) [65] utilizando el microscopio Leica DM750 (Leica, Wetzlar, Alemania). Las características consideradas incluyeron cambios en el espacio de la cápsula de Bowman, morfología celular, cambios en la luz tubular, la conservación de la estructura celular en el endotelio tubular y la morfología glomerular.

El análisis de daño renal consistió en determinar el porcentaje (%) de daño mediante el promedio de 10 imágenes (5 corteza y 5 de médula renal) por roedor. Los resultados se muestran como el porcentaje promedio por grupo con su respectivo análisis estadístico. Para determinar el daño se utilizó la siguiente fórmula, y el valor obtenido se convirtió a porcentaje:

$$\text{Área tubular de daño} = (\text{Área total} - (\text{Glomérulo} + \text{luz tubular} + \text{espacio intersticial})) - \text{Daño renal}$$

7.10 Análisis de función renal: en suero se cuantificó urea y creatinina, en tejido se analizó KIM-1 mediante ensayo de ELISA.

A) KIM-1: Se midió KIM-1 en tejido renal de acuerdo a las instrucciones del fabricante con Rat KIM-1 TIM-1 ELISA Kit (ab119597), (Abcam, Cambridge, UK) y se realizó la lectura a 450 nm.

B) Creatinina y BUN: la creatinina y el BUN sérico se determinaron mediante espectrofotometría con el equipo COBAS c111 de acuerdo a las instrucciones del

fabricante (Roche, Suiza).

7.11 Análisis de estrés oxidativo: ERO y actividad antioxidante

A) ERO en tejido: para la detección intracelular de ERO se colocaron 300 μ L del tejido renal homogeneizado y 100 μ L de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DC-FDA 5 mM: molécula fluorescente). Lo anterior se incubó a 37°C durante una hora. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en un espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, VA) a emisión de 525 nm y excitación de 495 nm.

B) Actividad antioxidante de las bebidas administradas: se determinó mediante el método ORAC (capacidad de absorbanza de los radicales de oxígeno). Utilizando las bebidas administradas a los animales con los edulcorantes en las concentraciones especificadas, se colocaron 25 μ L de muestra + 150 μ L de fluoresceína (40 nM) + 25 μ L de AAPH (150 mM). Durante 90 min se obtuvieron las mediciones en el espectrofluorómetro Biotek Sinergy HT (Biotek, VA) a longitudes de excitación de 485 nm y de emisión de 520 nm.

7.12 Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se presentan como el promedio \pm desviación estándar para todos los experimentos, excepto los ensayos de Western Blot que se muestran en unidades relativas como el promedio \pm error estándar de la media. El análisis densitométrico de la inmunotransferencia de proteína y el análisis histológico de daño renal se realizó con el Software ImageJ (NIH).

Los datos se evaluaron con el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y análisis post-hoc de Bonferroni, utilizando el software de Graphpad Prism 6 (San Diego, CA). La significancia corresponde a un valor de $p < 0.05$ y en las gráficas las letras a>b>c>d>e>f>g iguales o compartidas entre grupos indican que no hay diferencia significativa, mientras que las letras diferentes indican una diferencia con $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

8.1 Una dieta alta en grasa saturada añadida con 10% de sacarosa promueve la mayor ganancia de peso y el mayor porcentaje de grasa corporal

Para analizar el efecto del consumo de edulcorantes sobre el riñón, se alimentaron a ratas Wistar con una dieta control (AIN-93) o una dieta alta en grasa (HFD) y en el agua de bebida se adicionaron los diferentes edulcorantes. Este tratamiento se administró durante 4 meses y durante este periodo, se registró la ganancia de peso y se evaluó la composición corporal.

La figura 1A muestra que el grupo que consumió HFD+Sacarosa presentó la mayor ganancia de peso corporal, mientras que los grupos que consumieron los edulcorantes no nutritivos (HFD+GE y HFD+Sucralosa) presentaron un peso corporal muy similar al grupo control. Hay que aclarar que durante los primeros 14 días de tratamiento, ambos grupos estaban consumiendo edulcorantes a una concentración del 10%, sin embargo, la alta concentración de dulzor provocó una disminución en el consumo del agua de bebida, por lo que se ajustaron las dosis de GE al 2.5% y la de sucralosa al 1.5%. Estas dosis se mantuvieron hasta la conclusión del experimento (4 meses).

Debido a que la ganancia de peso puede resultar del incremento en masa magra o masa grasa fue necesario evaluar la composición corporal. En la figura 1B podemos observar que el grupo que consumió HFD+Sacarosa tuvo el mayor porcentaje de masa grasa, mientras que HFD+Sucralosa tuvo el menor porcentaje de masa grasa, que coincide con la menor ganancia de peso mostrado en la figura 1A. En la figura 1C podemos observar el comportamiento inverso, en donde se muestra el porcentaje de masa magra.

Estos datos muestran que, un edulcorante nutritivo como el grupo HFD+Sacarosa promueve la mayor ganancia de peso corporal y el mayor porcentaje de masa grasa. Por lo contrario, un edulcorante no nutritivo como HFD+Sucralosa presenta la menor ganancia de peso corporal y el menor porcentaje de masa grasa.

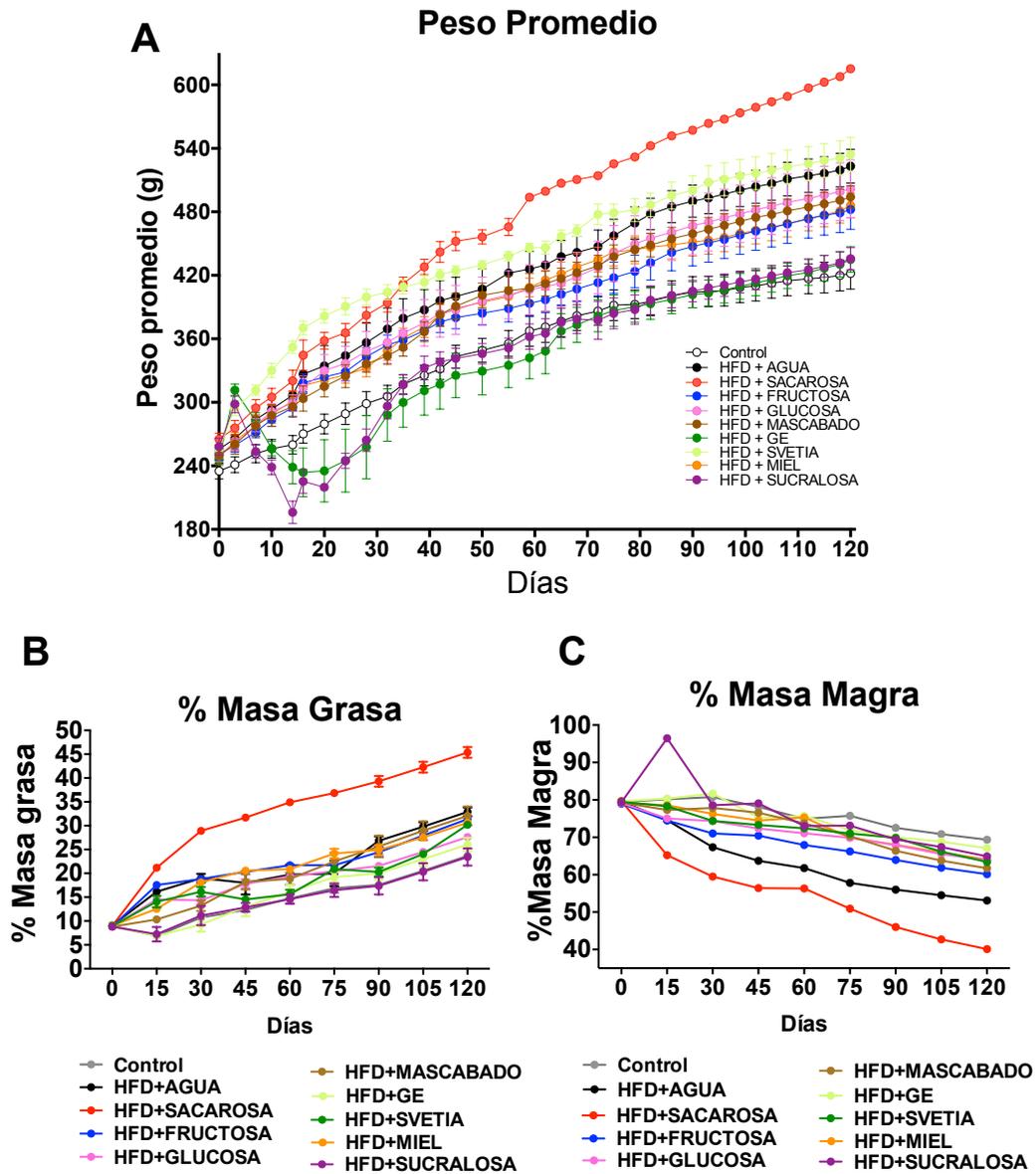


Figura 1. Curva de peso promedio y análisis de composición corporal. (A) Peso promedio (B) Porcentaje (%) de masa grasa (C) Porcentaje (%) de masa magra. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE.

8.2 Una dieta alta en grasa saturada adicionada con sucralosa promueve el daño renal

Los resultados de la figura 1 sugieren que la sucralosa podría ser un edulcorante adecuado por lo tanto se analizó la relación entre un mayor porcentaje de masa grasa y el daño renal determinado mediante parámetros séricos o por la expresión de KIM-1.

La figura 2A muestra que los grupos que consumieron HFD+Sucralosa o HFD+Fructosa presentan niveles elevados de creatinina sérica a comparación con los del grupo control. En la figura 2B, en donde se muestran los valores de BUN, sólo el grupo HFD+Sucralosa está significativamente incrementado. Debido a que tanto la creatinina como el BUN pueden verse alterados por diversos factores como la dieta, la actividad física y el grado de hidratación, se determinó la expresión de KIM-1 (Figura 2C). Se encontró que los grupos que consumieron HFD+Agua, HFD+Sacarosa, HFD+Glucosa, HFD+GE, HFD+Svetia®, HFD+Miel y HFD+Sucralosa mostraron un incremento de KIM-1 en comparación con el grupo control, lo que mostró que la dieta HFD en combinación con éstos edulcorantes promueve la expresión de KIM-1 en el riñón.

Debido a que los tres parámetros (creatinina, BUN y KIM-1) se encuentran incrementados en el grupo HFD+Sucralosa, podemos sugerir que HFD+Sucralosa promueve la mayor expresión de moléculas caracterizadas como marcadores de daño renal.

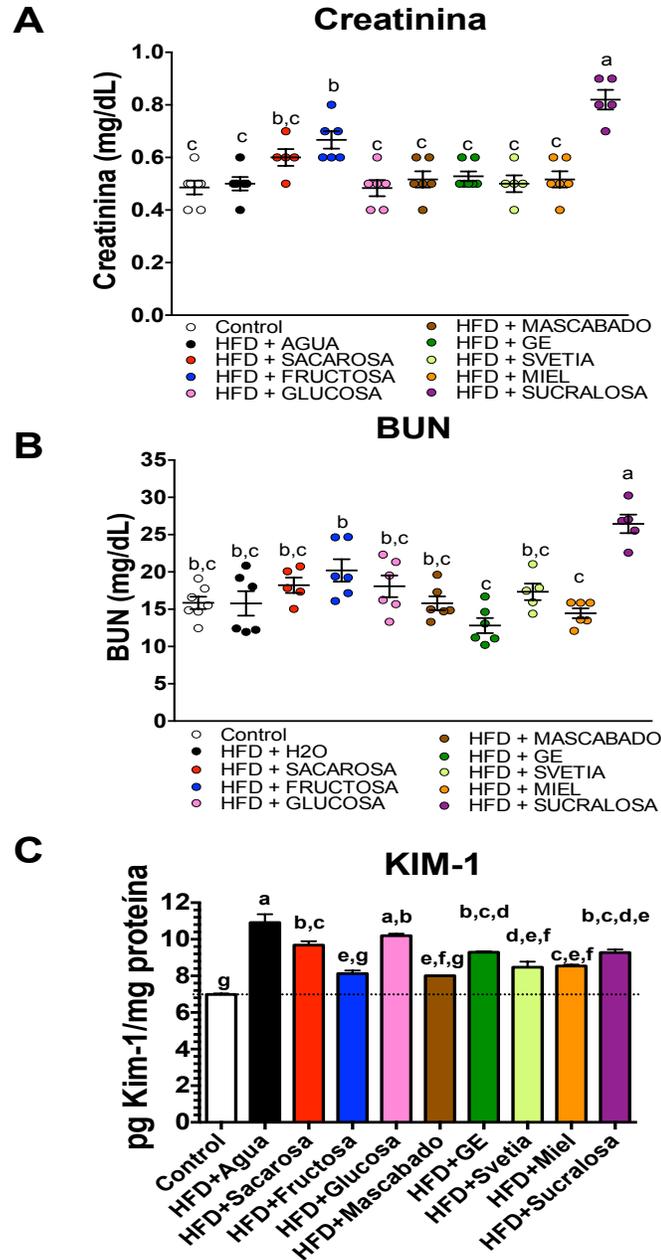


Figura 2. Parámetros séricos de creatinina, BUN y KIM-1 en tejido renal. (A) Valores séricos de creatinina (mg/dL) (B) Valores séricos de BUN (mg/dL) (C) KIM-1 en tejido (pg KIM-1/mg proteína) determinado por ELISA. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE, las diferencias se indican como a>b>c>d>e>f>g con una p<0.05.

8.3 Una dieta alta en grasa adicionada con sucralosa o sacarosa promueve mayor expresión de parámetros de la vía inflamatoria de los TLR's

Los resultados anteriores que sugerían posible daño renal en la dieta adicionada de sucralosa nos llevaron al análisis de parámetros inflamatorios en el riñón, particularmente en la vía de los TLR's que se ha reportado activa en el daño renal. Mediante análisis de Western blot, se determinó la expresión relativa de TLR4 (figura 3A). El grupo que consumió HFD+Sucralosa se encontró significativamente incrementado, mientras que los niveles de la proteína MyD88 (proteína adaptadora en la vía de señalización de los TLR's), se encontró significativamente incrementada en los grupos que consumieron HFD+Agua, HFD+Fructosa, HFD+Svetia® y HFD+Miel (figura 3B).

Para evaluar la expresión relativa de NF- κ B, se obtuvo la fracción nuclear para determinar por Western blot los niveles de su expresión. La figura 3C, muestra en el grupo que consumió HFD+Sucralosa una mayor expresión relativa de NF- κ B, sugiriendo en este grupo una mayor inflamación debida a la activación de la vía de TLR4. En la fracción citoplasmática, la proteína p-IKK (cinasa que regula la cascada de señalización de NF- κ B), se encontró incrementada en el grupo que consumió HFD+Sacarosa (figura 3D).

Estos resultados muestran que la dieta con HFD+Sucralosa incrementó significativamente los niveles de TLR4 y NF- κ B, sugiriendo su participación como mediadoras del daño renal mostrado en la figura 2.

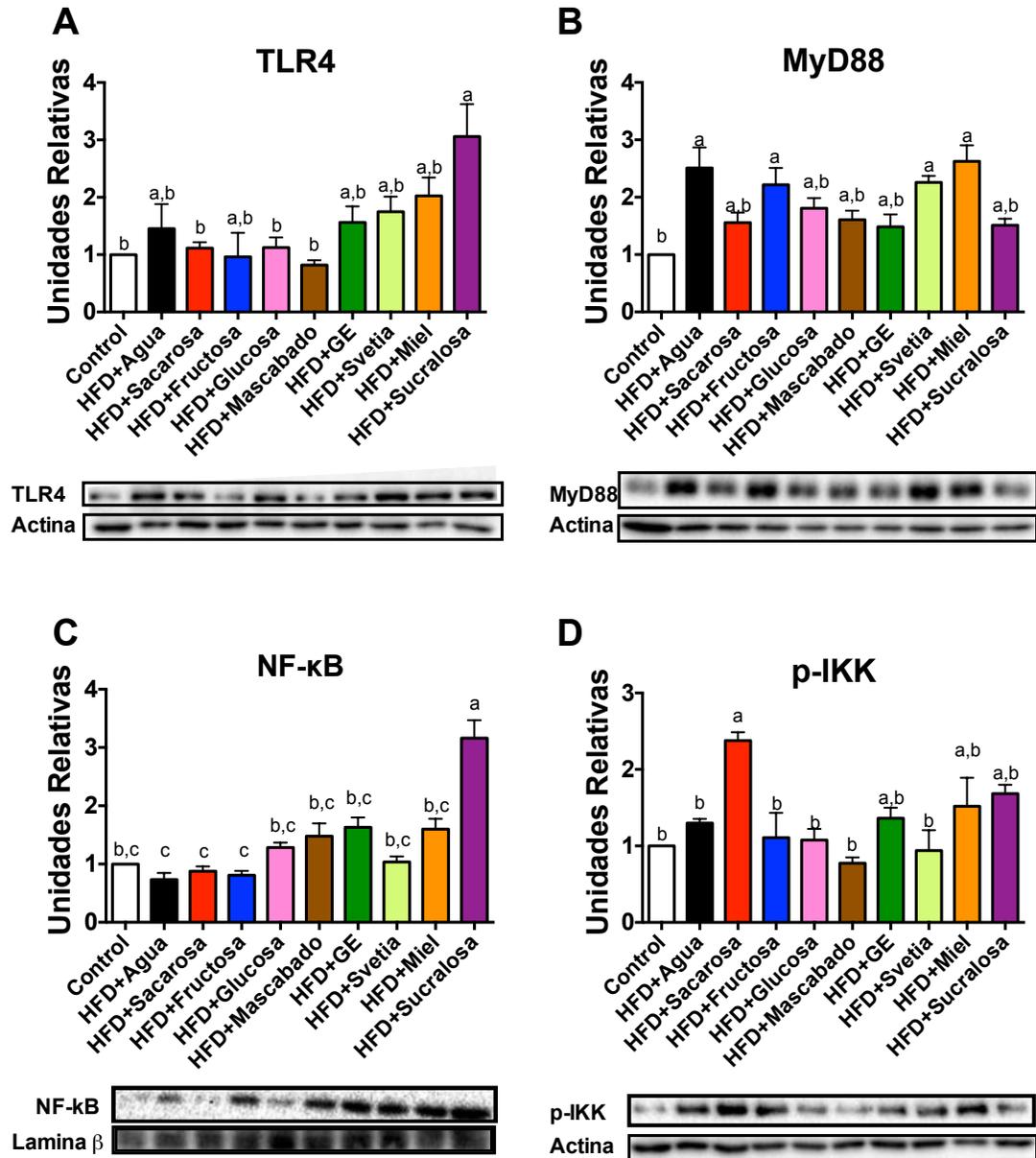


Figura 3. Parámetros inflamatorios de la vía de los TLR's. (A) Abundancia relativa de TLR4; (B) MyD88; (C) NF-κB; (D) p-IKK. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media ± EE, las diferencias se indican como a>b>c con una p<0.05.

Para corroborar esta posibilidad, se evaluaron los niveles de dos de las citocinas inflamatorias reguladas en la vía de señalización de NF- κ B.

Se cuantificó la expresión relativa del RNAm de las citocinas IL-1 β e IL-6 y ambas se encontraron incrementadas en el grupo que consumió HFD+Agua. Mientras que la IL-6 se encontró disminuida en el grupo que consumió HFD+Fructosa (figura 4A y 4B). Sorprendentemente, el grupo que consumió HFD+Sucralosa no mostró un incremento en las citocinas inflamatorias.

Las ERO actúan como segundos mensajeros de la respuesta inmune celular y en grandes concentraciones pueden incrementar la respuesta inflamatoria, dañando los tejidos [13]. En la cuantificación de éstas moléculas en tejido renal (figura 4C), el grupo HFD+Sacarosa mostró un incremento significativo a comparación del grupo control. El grupo que consumió HFD+Sucralosa no presentó una mayor cantidad de ERO en tejido renal.

La dieta alta en grasa promueve un incremento en la expresión de las citocinas inflamatorias. Si la dieta alta en grasa es administrada en combinación con sacarosa incrementa las ERO intracelulares, que participan en el daño a la estructura renal.

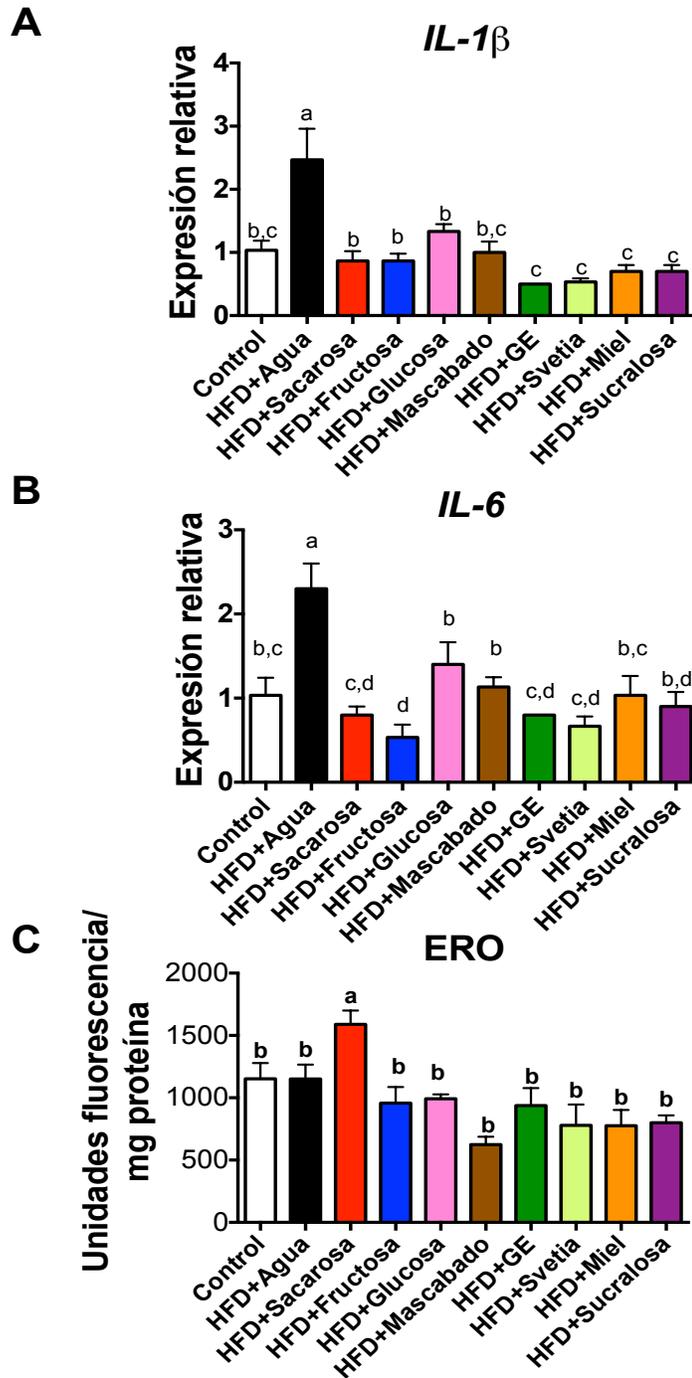


Figura 4. Citocinas inflamatorias y especies reactivas de oxígeno. (A) Expresión relativa de IL-1 β ; (B) IL-6; (C) ERO en tejido renal. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE, las diferencias se indican como a>b>c>d con una p<0.05.

8.4 La miel, el mascabado y los GE son los edulcorantes con mayor actividad antioxidante

Los resultados anteriores indican que era necesario evaluar la respuesta antioxidante y la actividad antioxidante de las bebidas con edulcorantes administradas en el modelo experimental, para conocer la contribución de las mismas a la expresión de ERO en tejido renal y a la inflamación.

Tras el análisis de los parámetros inflamatorios, se analizó la respuesta antioxidante celular analizando la expresión relativa del factor de transcripción Nrf2 mediante el análisis por Western blot del extracto nuclear de la proteína (figura 5A).

El grupo HFD+Sucralosa incrementó significativamente la expresión de Nrf2 a comparación del control, mientras que el análisis del regulador citoplasmático de Nrf2, Keap1, se encuentra disminuido en los grupos que consumieron HFD+Agua, HFD+Fructosa, HFD+Mascabado, HFD+Svetia® y HFD+Miel (figura 5B).

La actividad antioxidante de las bebidas con edulcorantes se determinó mediante el método ORAC (figura 5C). La miel, el azúcar mascabado y los GE tuvieron la mayor actividad antioxidante (>500 equivalentes trolox μ moles/mL), mientras que la sucralosa y Svetia® tuvieron la menor actividad antioxidante (40 equivalentes trolox μ moles/mL).

Estos resultados muestran que edulcorantes naturales como la miel, el azúcar mascabado y los GE tienen una mayor actividad antioxidante, sugiriendo su contribución para la prevención de la inflamación y el daño renal. A pesar de que la sucralosa tiene la mínima actividad antioxidante, incrementa la expresión del factor de transcripción Nrf2.

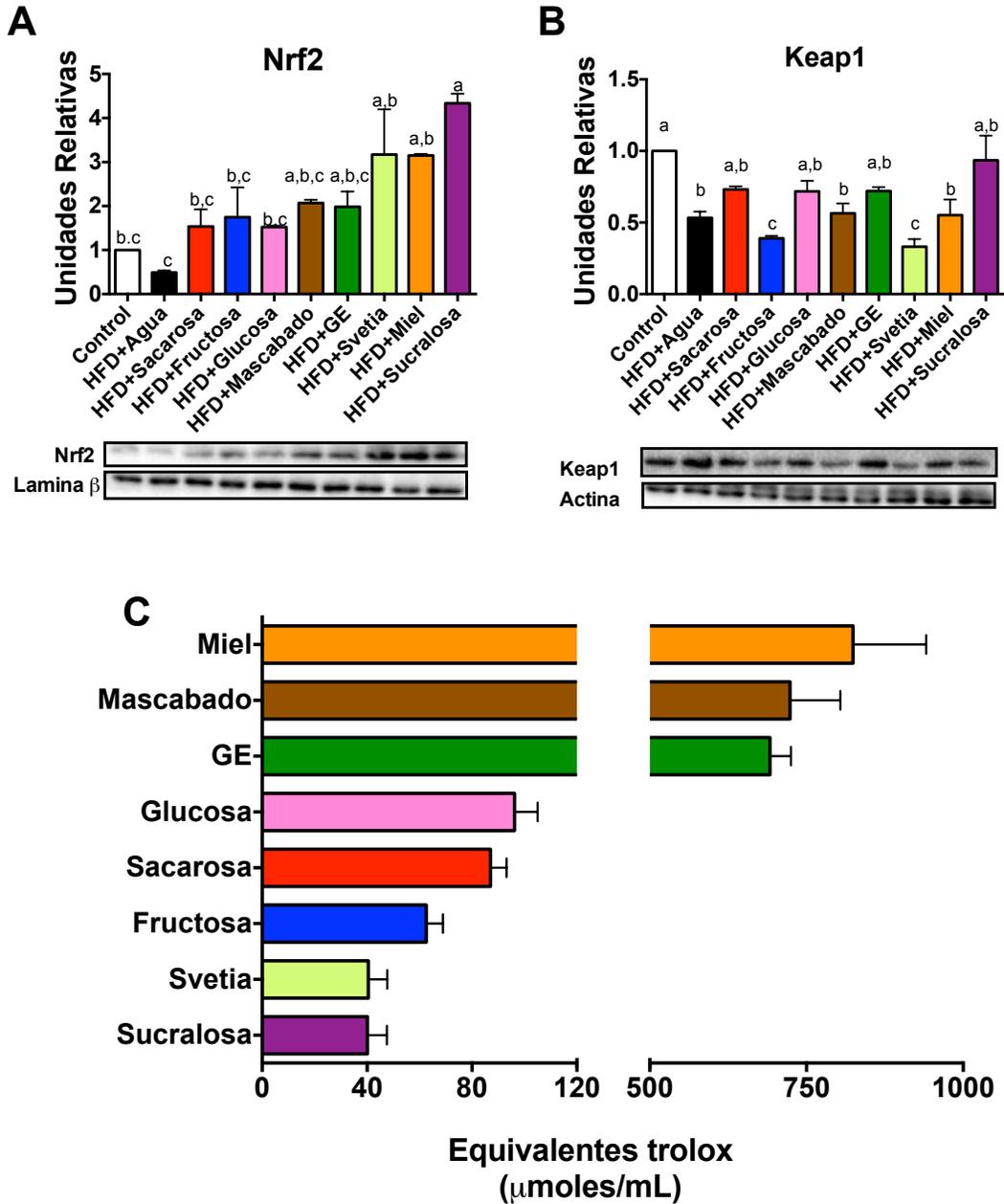


Figura 5. Nrf2 y actividad antioxidante de los edulcorantes. (A) Abundancia relativa de proteína Nrf2; (B) Keap1. (C) Equivalentes trolox ($\mu\text{moles/mL}$). El análisis estadístico se hizo con una $n=6$ por grupo. Las barras de error indican media \pm EE en (A) y (B), mientras que indican media \pm DE en (C). Las diferencias se indican como $a>b>c$ con una $p<0.05$.

Considerando el incremento de la expresión de Nrf2, se cuantificó la expresión relativa de los RNAm de cinco enzimas antioxidantes, debido a que éste factor de transcripción promueve la transcripción de los genes que codifican para enzimas involucradas en la respuesta antioxidante celular.

En las figuras 6A y 6B se puede observar que los grupos que consumieron HFD+GE, HFD+Svetia® y HFD+Sucralosa mostraron una menor expresión de SOD1 y SOD2. Un comportamiento similar se observó para la glutatión reductasa (GSR) y glutatión peroxidasa (GPX) (figuras 6C y 6D). La catalasa mostró un incremento en el grupo HFD+Sucralosa, (figura 6E). Este aumento podría estar posiblemente relacionado con el incremento de Nrf2 en el mismo grupo.

Estos resultados muestran que edulcorantes naturales con una gran actividad antioxidante como los GE causan una disminución en la expresión de las cinco enzimas antioxidantes, posiblemente por su gran capacidad antioxidante exógena, y contribuyen a la disminución del daño renal.

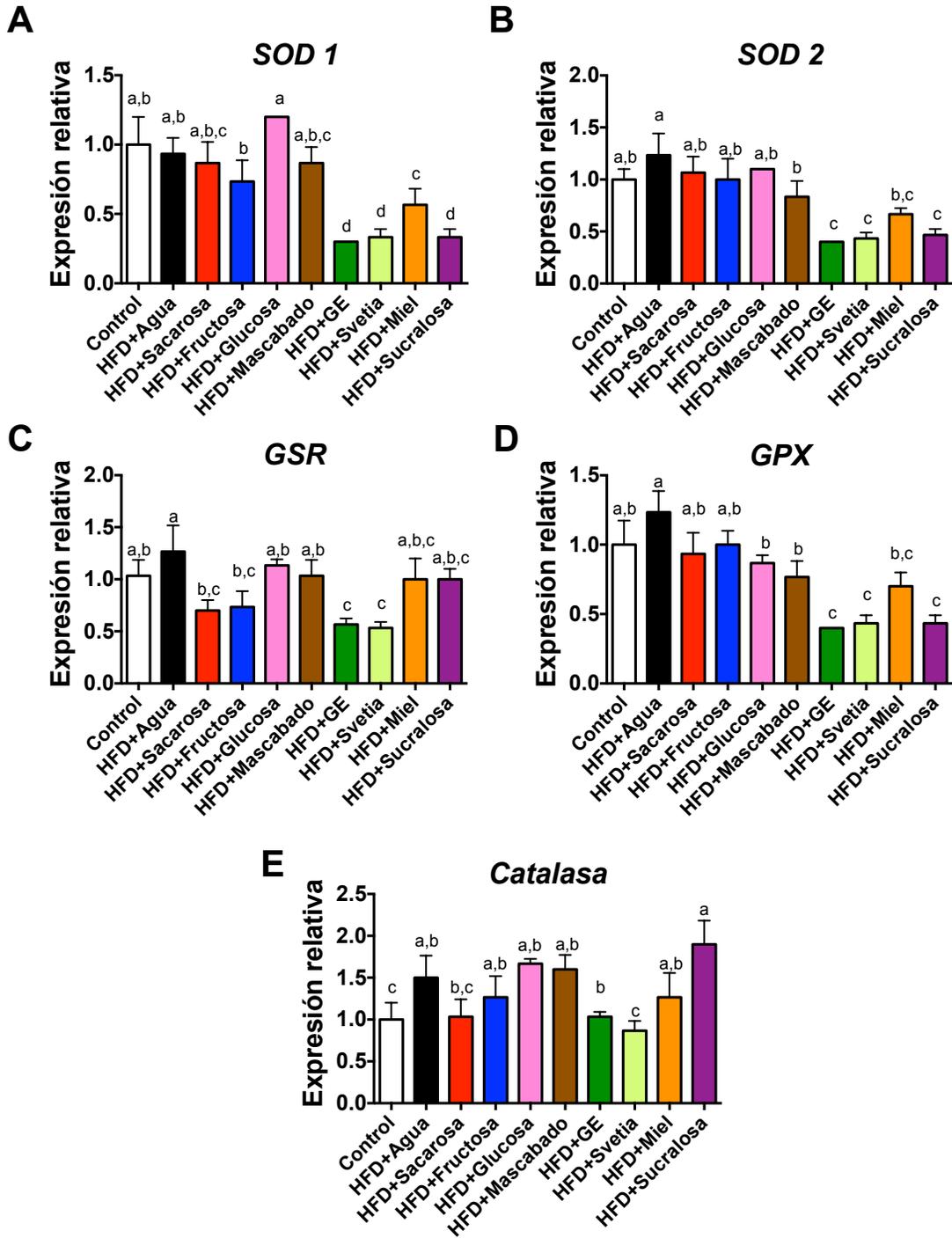


Figura 6. Enzimas antioxidantes. Expresión relativa de RNAm de (A) SOD1: superóxido dismutasa 1 (B) SOD2: superóxido dismutasa 2 (C) GSR: glutación reductasa (D) GPX: glutación peroxidasa (E) Catalasa. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE, las diferencias se indican como a>b>c>d con una p<0.05.

8.5 El consumo de edulcorantes modifica diferencialmente el metabolismo de lípidos

Como se ha demostrado que la administración de una dieta alta en grasa impacta sobre el metabolismo, en este estudio se contrastó el efecto de diferentes edulcorantes con el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono en el riñón. Se midieron factores de transcripción involucrados como marcadores de lipogénesis como SREBP-1c y la enzima ACC.

Los diferentes tratamientos mostraron incrementos en la expresión relativa de SREBP-1c y ACC α para los grupos que consumieron HFD+Sucralosa y HFD+Fructosa (figura 7A y 7C). La expresión de SREBP-1c también incrementó con el consumo de una dieta HFD+Sacarosa. El metabolismo de hidratos de carbono se ve modificado con la disminución de ChREBP en los grupos que consumieron HFD+GE y HFD+Svetia® (figura 7B).

El tratamiento con edulcorantes naturales como HFD+Sacarosa, HFD+Fructosa y edulcorantes artificiales como HFD+Sucralosa, promueven un incremento en las moléculas asociadas al metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, incrementando la acumulación de lípidos en la estructural renal y favoreciendo el daño.

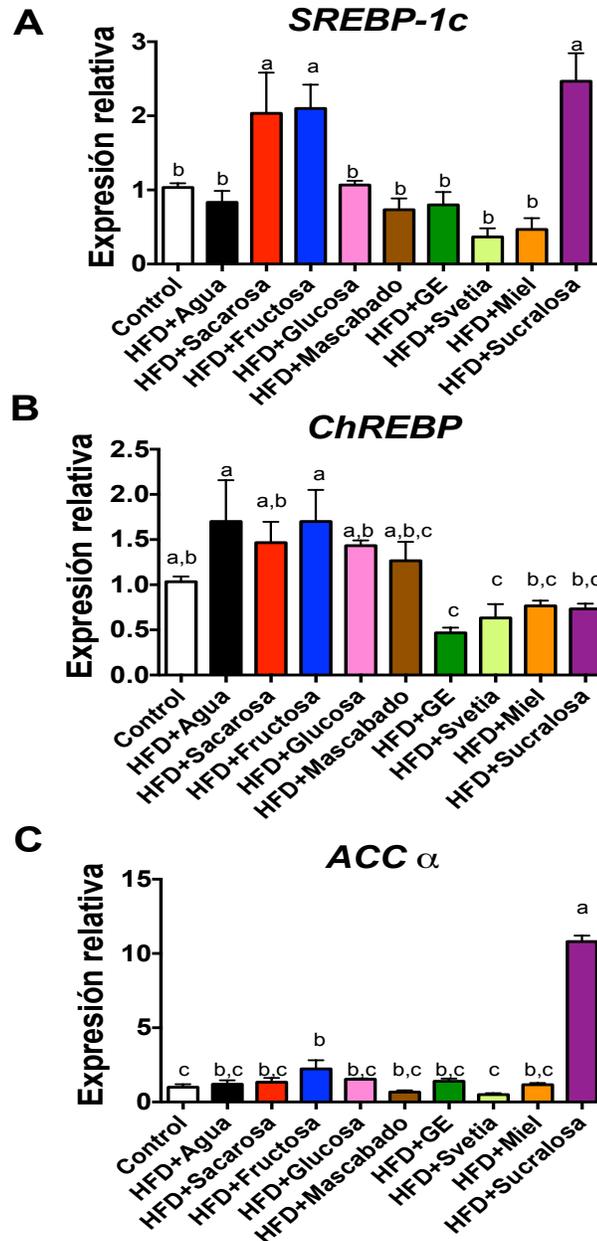


Figura 7. Moléculas involucradas en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono. Expresión relativa de (A) SREBP-1c: proteína de unión al elemento regulador de esterol; (B) ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta de los hidratos de carbono; (C) ACC α : acetil CoA carboxilasa. El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE, las diferencias se indican como a>b>c con una p<0.05.

8.6 El consumo de edulcorantes con menor actividad antioxidante causa un mayor daño renal

Para evaluar el daño en la estructura renal, se realizó el análisis histológico mediante tinción con hematoxilina y eosina. La figura 8A muestra imágenes representativas de la corteza renal de los riñones de los animales de los diferentes grupos. El daño se analizó comparando cambios en el espacio de la cápsula de Bowman, morfología celular, cambios en la luz tubular, la conservación de la estructura celular en el endotelio tubular y morfología glomerular; entre el grupo control y los grupos experimentales observando

La cuantificación del daño renal (figura 8B), mostró que los edulcorantes nutritivos como la sacarosa, la fructosa, la glucosa y Svetia® en combinación con una dieta alta en grasa producen un daño significativamente mayor al tejido renal en comparación con el grupo control. El mayor daño (37.2%) ocurrió con una dieta alta en grasa en combinación con sucralosa.

Estos resultados corroboran que tratamientos con edulcorantes naturales que tienen una mayor actividad antioxidante como son el mascabado, los GE y la miel; causaron el menor daño tisular, en ciertos casos comparable con el daño observado en el grupo control.

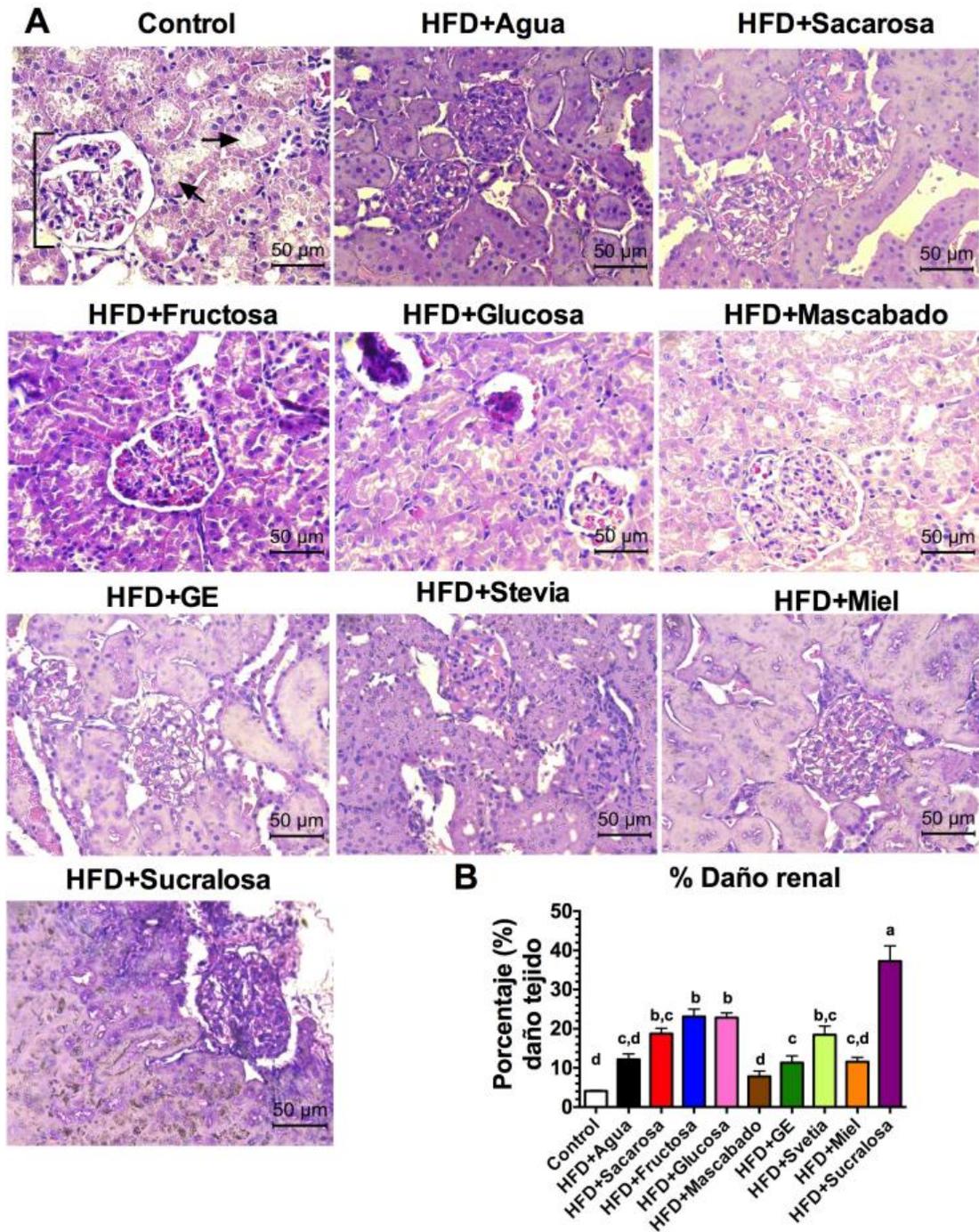


Figura 8. Daño renal. (A) Tinción con H&E de cortes representativos de corteza renal. (B) Cuantificación del daño renal expresado como porcentaje. Nomenclatura en (A) Control: [] indica el glomérulo; las flechas indican los túbulos.

El análisis estadístico se hizo con una n=6 por grupo. Las barras de error indican media \pm DE, las diferencias se indican como a>b>c>d con una p<0.05.

IX. DISCUSIÓN

El consumo de edulcorantes se encuentra ampliamente distribuido en la población mundial, particularmente en poblaciones con sobrepeso u obesidad. Los estudios sobre los efectos de los edulcorantes en el organismo son contradictorios y en muchos de ellos no se hacen comparaciones con otros edulcorantes ampliamente utilizados como son el mascabado o la miel [24]. Además no se reportan datos sobre los efectos causados por los edulcorantes sobre órganos vitales poco estudiados como el riñón. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre parámetros inflamatorios y antioxidantes, en el riñón.

Nuestros resultados mostraron que el consumo de HFD+Sacarosa promueve la mayor ganancia de peso, acompañada de la mayor ganancia de masa grasa (>45%). La sacarosa se compone de un dímero de fructosa + glucosa. Su consumo ha sido asociado con intolerancia a la glucosa y modificación de la composición corporal [66, 67]. Estudios previos en el Departamento de Fisiología de la Nutrición del INCMNSZ (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán), también reportan una ganancia de masa grasa significativamente mayor con el consumo de sacarosa en comparación con el consumo de fructosa [66]. El consumo de edulcorantes no nutritivos como los GE y la sucralosa promueven una ganancia de peso similar a la del grupo control. En el caso de la sucralosa, ésta promueve la menor ganancia de masa grasa (23.4%) a pesar de que el edulcorante se administra en combinación con una dieta alta en grasa. El tratamiento con los demás edulcorantes nutritivos promovió una ganancia de peso similar entre los grupos.

Para entender mejor estos mecanismos, se analizaron los parámetros bioquímicos relacionados a la función renal. Se encontró que la creatinina sérica incrementó con el consumo de HFD+Fructosa y HFD+Sucralosa. En la

literatura se reporta mayor excreción de creatinina con el consumo de dietas altas en fructosa [68]. La fructosa se metaboliza de manera distinta a la glucosa, generando ácido úrico, por lo que se asocia con cambios metabólicos inflamatorios y la progresión del daño renal [69]. La sucralosa es un edulcorante que tiene un dulzor de 380 a 650 veces más alto que la sacarosa. No aporta energía debido a que no es metabolizable por tener tres sustituciones en los grupos -OH por cloro. Es uno de los principales edulcorantes utilizados por la industria de alimentos y los resultados sobre sus efectos fisiológicos son conflictivos [70]. En la literatura se reporta que las células renales modifican su morfología en presencia de sucralosa administrada en concentraciones de 50 mM por 72 hrs [71], por lo que se piensa que la sucralosa podría afectar la estructura del riñón y por lo tanto su función. Nuestros resultados muestran modificaciones en los niveles de creatinina sérica y BUN además de un incremento en los niveles de la molécula de daño renal KIM-1. Indicando que la dieta alta en grasa adicionada con sucralosa constituye una combinación perjudicial para la estructura y funcionamiento normal del riñón y además produce alteraciones metabólicas como el incremento de moléculas inflamatorias. Sin embargo, para confirmar el efecto de la sucralosa será necesario analizar los mecanismos involucrados ya que la sucralosa es un edulcorante no absorbible.

Los niveles de KIM-1 también incrementaron por el consumo de una dieta alta en grasa sin edulcorantes, ésta dieta provoca cambios sobre la estructura del riñón como la disminución en el espacio de la cápsula de Bowman y modificaciones en la morfología tubular. Se ha reportado que el consumo de una dieta alta en grasa produce atrofia del glomérulo, mayor volumen renal y engrosamiento de la membrana basal [72]. Nuestros datos indican que KIM-1 incrementó con los tratamientos de HFD+Sacarosa, HFD+Glucosa, HFD+GE, HFD+Svetia® y HFD+Miel. También se ha reportado que KIM-1 aumenta en las células tubulares proximales de humano en presencia de albúmina glicada [73]. Los productos de glicación

avanzada, como la albúmina glicada, se forman en ambientes con estrés oxidativo y alteran la estructura y función de las proteínas. Su acumulación provoca daño al endotelio vascular y contribuye a la falla renal [74]. En nuestro estudio no se utilizó un control con dieta normal de modo que se debe considerar la contribución de la dieta alta en grasa al daño renal para obtener datos conclusivos. Sin embargo nuestros datos indican que la dieta HFD+Fructosa y la dieta HFD+Mascabado no indujeron diferencias significativas en la expresión de KIM-1.

TLR4 es un receptor involucrado en la progresión de la inflamación y el daño renal, mediante la señalización en la que participa el factor de transcripción NF- κ B, que regula la expresión de citocinas inflamatorias. De nuestro análisis de los marcadores de daño en el riñón, podría esperarse que el grupo con la dieta HFD+Sucralosa tuviera el mayor incremento de las moléculas que participan en una respuesta inflamatoria. Se encontró que TLR4 y NF- κ B incrementaron significativamente con esta dieta, sugiriendo la activación de la señalización de ésta vía. Adicionalmente MyD88, la proteína adaptadora en la vía de NF- κ B, se encontró incrementada en los tratamientos HFD+Agua, HFD+Fructosa, HFD+Svetia® y HFD+Miel. Éste resultado sugiere la activación de los TLR's y deberá corroborarse utilizando p-MyD88 que es la forma activa de MyD88 para analizar la activación de la vía. Continuando río abajo de la vía se encontró que respecto a las citocinas inflamatorias IL-1 β e IL-6, el grupo HFD+Agua mostró la mayor expresión relativa de ambas citocinas. Otros estudios han reportado el incremento de citocinas inflamatorias cuando se consume una dieta alta en grasa [75].

Las ERO son moléculas que se producen fisiológicamente e incrementan en respuesta a dietas altas en lípidos e hidratos de carbono y al ambiente inflamatorio [3]. En la literatura se describe que la hiperglicemia induce ERO intracelulares mediante la vía que involucra a PKC en riñón,

contribuyendo a la progresión de la nefropatía diabética. Los productos de glicación avanzada, también presentes en condiciones de hiperglicemia, contribuyen a la inducción de ERO [76]. Nosotros encontramos que el grupo que consumió HFD+Sacarosa mostró un incremento significativo a comparación del control en cuanto a expresión de ERO.

Por lo anterior, se midió la respuesta antioxidante celular utilizando Nrf2. Nrf2 incrementó significativamente en el grupo HFD+Sucralosa, aunque no sabemos si la sucralosa induce de manera directa la activación del factor de transcripción. La mayor actividad de Nrf2 está relacionada con modificaciones en la expresión de las enzimas antioxidantes. En el caso de HFD+Sucralosa los resultados indican un incremento significativo en la expresión de catalasa, enzima involucrada en la conversión del peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno. Está reportado que la expresión de SOD1 y SOD2, encargadas de la formación de peróxido de hidrógeno y oxígeno; GSH y GPX involucradas en el metabolismo de glutatión, el antioxidante celular más importante en el organismo [77]; y que éstas moléculas sufren modificaciones de acuerdo al edulcorante administrado.

En nuestros resultados, puede observarse un patrón entre la expresión de éstas enzimas con los grupos que consumieron HFD+GE, HFD+Svetia® y HFD+Miel. Esto puede deberse al origen de estos edulcorantes, que son naturales y provienen de plantas cuyas propiedades antioxidantes se han descrito. En el caso de los GE, extracto de la planta *Stevia rebaudiana*, éste posee componentes fitoquímicos y un gran contenido de antioxidantes (fenoles 91 mg/g). Su intensidad de dulzor es 300 veces mayor que la sacarosa pero como no se absorbe, no aporta energía; tienen propiedades anticariogénicas, anti-inflamatorias e hipoglucemiantes [78, 79].

Svetia® es una de las marcas comerciales ofrecidas en el mercado que contiene glucósidos de esteviol + dextrosa. La dextrosa se utiliza como aditivo para dar volumen y para disminuir el sabor amargo inherente de los glucósidos de esteviol. A pesar de comercializarse como un edulcorante no

nutritivo, un gramo de producto aporta 4 Kcal [80], la misma cantidad que un gramo de hidratos de carbono. Por la adición de dextrosa se esperaría que el consumo de HFD+ Svetia® resultara en un perfil inflamatorio y antioxidante similar al grupo que consumió HFD+Glucosa. Sin embargo, los resultados indican un menor daño renal, por lo que parece ser que su contenido de glucósidos de esteviol mejora los parámetros inflamatorios y antioxidantes.

La miel es un edulcorante que al igual que la sacarosa y el mascabado, se compone de glucosa y fructosa, pero con menores concentraciones de glucosa (31%), fructosa (38.5%), sacarosa (3.8%) y maltosa (2.8%). Debido a su origen natural posee aminoácidos, vitaminas, minerales, flavonoides y fenoles [81, 82]. Posee un pH bajo que puede impactar sobre la composición de la microbiota intestinal, y contiene peróxido de hidrógeno que actúa como agente antimicrobiano [83]. En la literatura, ratas alimentadas con miel presentan modificaciones en las enzimas antioxidantes, incluyendo una disminución no significativa en la enzima SOD [84].

Por lo anterior, se determinó la actividad antioxidante de los edulcorantes utilizados en el modelo experimental. Los resultados muestran que los 3 edulcorantes con mayor actividad antioxidante son la miel, el mascabado y los GE; y contienen más de 500 equivalentes trolox ($\mu\text{moles/mL}$). Como referencia de comparación, el té verde posee una actividad antioxidante de aproximadamente 1300 equivalentes [85]. En los resultados también se apreció que la actividad antioxidante de Svetia® disminuye considerablemente con su industrialización, aproximadamente a 40 equivalentes trolox ($\mu\text{moles/mL}$), muy similar a la sucralosa. Con estos resultados es posible relacionar el patrón inflamatorio con la actividad antioxidante: la sucralosa que tiene la menor actividad antioxidante presenta el mayor número de marcadores inflamatorios; mientras que los edulcorantes con mayor actividad antioxidante presentan muy bajos valores de marcadores inflamatorios, aunque no inducen mayor actividad de Nrf2. Éste mecanismo podría sugerir una disminución en la actividad endógena de Nrf2 debido a la presencia exógena de antioxidantes, esta sugerencia queda

abierta para futuros estudios.

Debido a que se administra una dieta alta en grasa a nuestro modelo experimental, se evaluó también el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono a nivel renal. SREBP-1c es un factor de transcripción involucrado en la lipogénesis que se ha reportado incrementado en dietas altas en grasa con adición de sacarosa [66]. En nuestro estudio, encontramos un incremento en su expresión relativa en los grupos que consumieron HFD+Sacarosa, HFD+Fructosa y HFD+Sucralosa. ChREBP está involucrado en el metabolismo de hidratos de carbono, incrementa en particular con la administración de fructosa y se ha relacionado con la resistencia a la insulina [86]. Nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de ésta molécula con los edulcorantes nutritivos como sacarosa y fructosa, mientras que los edulcorantes con gran actividad antioxidante como GE, Svetia® y miel tuvieron una expresión menor; y HFD+Sucralosa no tuvo impacto sobre la expresión de ésta molécula. Sin embargo, la expresión de ACC α , molécula involucrada en la síntesis de ácidos grasos [87], incrementa más de 10 veces con la sucralosa. Por lo que, a pesar de ser un edulcorante no nutritivo y no metabolizable, está teniendo un efecto agonista en las vías metabólicas relacionadas con el balance energético y que requieren más estudios.

Para corroborar los datos obtenidos, es necesario evaluar el daño renal a nivel de estructura. Esto se realizó mediante histologías en donde se comprobó que los edulcorantes nutritivos como la sacarosa (daño 19%), fructosa (23.1%) y glucosa (22.8%), así como una dieta alta en grasa (12.2%), tienen un efecto negativo sobre la estructura renal. Aunque esto ya ha sido reportado [67], nuestro estudio hace la comparación directa con la sucralosa que es el edulcorante que provocó el mayor daño renal (37.2%). Comparado con que los edulcorantes con mayor actividad antioxidante como el mascabado (7.8%), los GE (11.3%) y la miel (11.5%) que causaron menor daño. En el caso del mascabado, el daño fue muy similar al control. El mascabado es el edulcorante intermediario entre las melazas y el azúcar

refinada o blanca (sacarosa), la diferencia radica en la cantidad de melazas que posee que le aportan el color marrón. Por esta contribución, tiene más antioxidantes (0.500 mmol/porción ensayo FRAP) que el azúcar refinada, y aporta el mismo contenido energético [24]. Debido a que diversos estudios con antioxidantes arrojan resultados conflictivos, nuestros resultados son de los primeros en reportar que los antioxidantes o la ausencia de refinación del producto, ayudan a prevenir la inflamación y el daño renal. Cabe añadir que Svetia®, que contiene *Stevia rebaudiana*, aunque tiene una capacidad antioxidante disminuida y contiene glucosa en su formulación, disminuye el daño renal en comparación con el grupo que consumió HFD+Glucosa. De ésta observación surge la hipótesis de que el tipo de antioxidante podría actuar con efecto benéfico, y este no depende tanto de la concentración del mismo.

X. CONCLUSIONES

El consumo de edulcorantes naturales y artificiales produce una respuesta diferencial, actuando sobre diversas vías metabólicas que modifican los parámetros inflamatorios y antioxidantes, con impacto en la estructura renal. Esto depende del edulcorante administrado y de las propiedades del mismo como se muestra en el diagrama 5.

Diagrama 5. Resumen gráfico del estudio

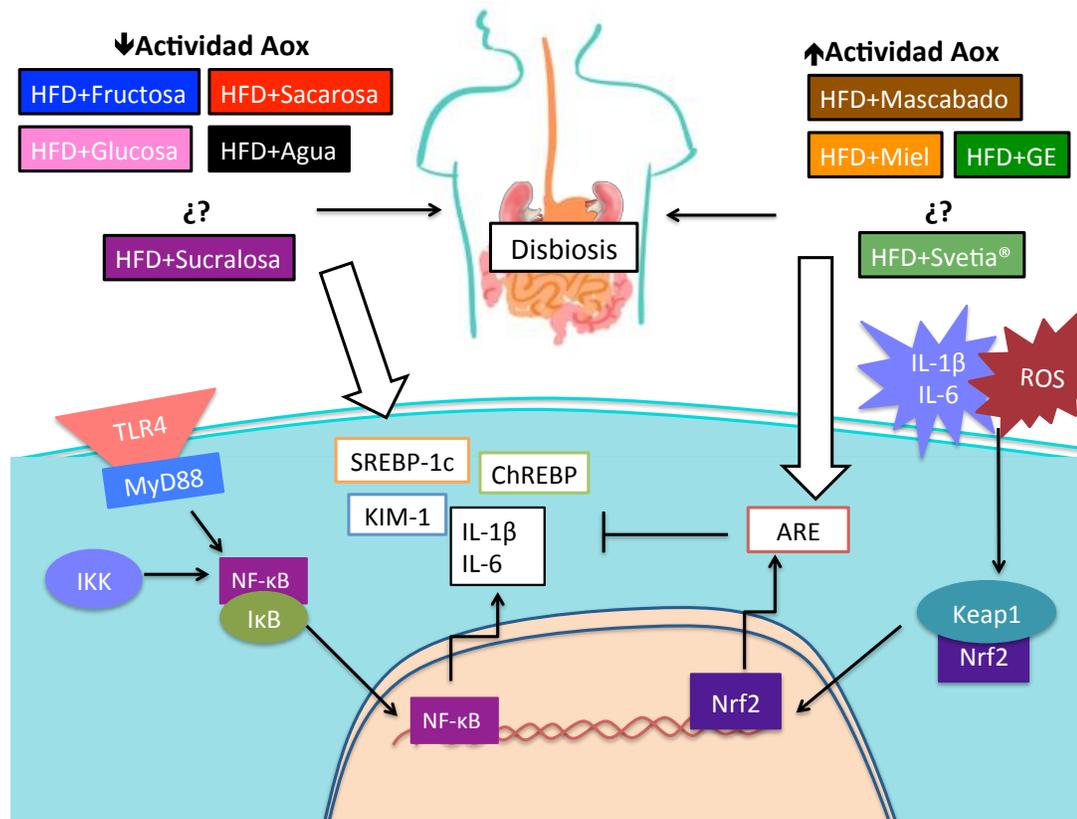


Diagrama 5. El consumo de edulcorantes con menor actividad antioxidante: fructosa, sacarosa, glucosa, agua o sucralosa (que posee mínima actividad antioxidante pero incrementa a Nrf2) promueven la señalización de vías inflamatorias involucrando a TLR4, NF-κB, la síntesis de citocinas inflamatorias, ERO y modificación del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, impactando sobre la estructura renal. Fisiológicamente, la célula responde a dichos estímulos con la respuesta antioxidante mediada por Nrf2. El consumo de edulcorantes con una gran actividad antioxidante como son el mascabado, miel, GE o Svetia® (que posee mínima actividad antioxidante pero proviene de *Stevia rebaudiana*) disminuye la presencia de éstas moléculas inflamatorias previniendo el daño a la estructura renal.

El consumo de una dieta alta en grasa en combinación con edulcorantes no nutritivos como los GE y la sucralosa promueven una menor ganancia de peso y menor porcentaje de masa grasa. Sin embargo, los parámetros bioquímicos de daño se ven incrementados con el consumo de HFD+Fructosa y HFD+Sucralosa. La molécula KIM-1, marcador de daño renal, se incrementa con el consumo de una dieta alta en grasa en combinación con los edulcorantes, excepto con el consumo de fructosa y azúcar mascabado.

Los marcadores inflamatorios TLR4 y NF- κ B se ven modificados por el consumo de edulcorantes con menor actividad antioxidante como HFD+Sucralosa que los incrementa. HFD+Sacarosa aumenta las ERO y una dieta alta en grasa incrementa la expresión de IL-1 β e IL-6.

La expresión de enzimas antioxidantes y el daño a tejido renal se ven incrementados con el consumo de edulcorantes con menor actividad antioxidante, así como la lipogénesis.

El consumo de HFD+Sucralosa produjo el mayor número de alteraciones deletéreas, mientras que el consumo de HFD+Mascabado, HFD+GE y HFD+Miel mejoraron los parámetros inflamatorios y disminuyeron el daño renal.

Nuestros resultados sugieren el consumo de edulcorantes naturales con mayor actividad antioxidante y menor proceso de refinamiento como el azúcar mascabado, la miel y los glucósidos de esteviol; como auxiliares en la prevención del daño renal.

XI. PERSPECTIVAS

-Analizar en modelos animales otros edulcorantes con mayor actividad antioxidante como melazas y piloncillo para evaluar su papel en el daño renal

-Contrastar diferentes tipos de miel debido a que su composición varía de acuerdo al tipo de néctar recogido por las abejas y a su proceso de industrialización

-Cuantificar los productos de glicación avanzada como marcadores de daño renal y su modificación ante los diferentes edulcorantes

-Determinar las moléculas antioxidantes que componen a cada edulcorante y evaluar su actividad

- Para evaluar la activación de los TLR's, analizar p-MyD88 y proteínas de la cascada de señalización en la vía

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Castoldi, A., et al., *The Macrophage Switch in Obesity Development*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 637.
2. Rippe, J.M. and T.J. Angelopoulos, *Added sugars and risk factors for obesity, diabetes and heart disease*. Int J Obes (Lond), 2016. **40 Suppl 1**: p. S22-7.
3. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, *Inflammatory mechanisms in obesity*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 415-45.
4. van Buul, V.J., L. Tappy, and F.J. Brouns, *Misconceptions about fructose-containing sugars and their role in the obesity epidemic*. Nutr Res Rev, 2014. **27**(1): p. 119-30.
5. Rippe, J.M. and L. Tappy, *Sweeteners and health: findings from recent research and their impact on obesity and related metabolic conditions*. Int J Obes (Lond), 2016. **40 Suppl 1**: p. S1-5.
6. Lyons, C.L., E.B. Kennedy, and H.M. Roche, *Metabolic Inflammation-Differential Modulation by Dietary Constituents*. Nutrients, 2016. **8**(5).
7. Velloso, L.A., F. Folli, and M.J. Saad, *TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation*. Endocr Rev, 2015. **36**(3): p. 245-71.
8. Triplitt, C.L., *Understanding the kidneys' role in blood glucose regulation*. Am J Manag Care, 2012. **18**(1 Suppl): p. S11-6.
9. Ene-Iordache, B., et al., *Chronic kidney disease and cardiovascular risk in six regions of the world (ISN-KDDC): a cross-sectional study*. Lancet Glob Health, 2016. **4**(5): p. e307-19.
10. Schiffrin, E.L., M.L. Lipman, and J.F. Mann, *Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system*. Circulation, 2007. **116**(1): p. 85-97.
11. Hill, N.R., et al., *Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0158765.
12. Sureshbabu, A., S.W. Ryter, and M.E. Choi, *Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury*. Redox Biol, 2015. **4**: p. 208-14.
13. Schieber, M. and N.S. Chandel, *ROS function in redox signaling and oxidative stress*. Curr Biol, 2014. **24**(10): p. R453-62.
14. Karalius, V.P. and D.A. Shoham, *Dietary sugar and artificial sweetener intake and chronic kidney disease: a review*. Adv Chronic Kidney Dis, 2013. **20**(2): p. 157-64.
15. Redon, J. and E. Lurbe, *The kidney in obesity*. Curr Hypertens Rep, 2015. **17**(6): p. 555.
16. Eknoyan, G., *Obesity and chronic kidney disease*. Nefrologia, 2011. **31**(4): p. 397-403.
17. Sharma, K., *Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. **4**(1): p. 113-117.
18. Bonventre, J.V., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(11): p. 3265-8.
19. Ferguson, M.A. and S.S. Waikar, *Established and emerging markers of kidney function*. Clin Chem, 2012. **58**(4): p. 680-9.
20. Seagle, H.M., et al., *Position of the American Dietetic Association: weight management*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(2): p. 330-46.
21. Schiffman, S., *Natural and artificial sweeteners*. Lancet, 1987. **2**: p. 41-42.
22. Johnson, R.J., et al., *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. Am J Clin Nutr, 2007. **86**(4): p. 899-906.

23. Fitch, C., et al., *Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners*. J Acad Nutr Diet, 2012. **112**(5): p. 739-58.
24. Phillips, K.M., M.H. Carlsen, and R. Blomhoff, *Total antioxidant content of alternatives to refined sugar*. J Am Diet Assoc, 2009. **109**(1): p. 64-71.
25. Chattopadhyay, S., U. Raychaudhuri, and R. Chakraborty, *Artificial sweeteners - a review*. J Food Sci Technol, 2014. **51**(4): p. 611-21.
26. Yarmolinsky, D.A., C.S. Zuker, and N.J. Ryba, *Common sense about taste: from mammals to insects*. Cell, 2009. **139**(2): p. 234-44.
27. Wang, Q.P., et al., *Sucralose Promotes Food Intake through NPY and a Neuronal Fasting Response*. Cell Metab, 2016. **24**(1): p. 75-90.
28. Pepino, M.Y., *Metabolic effects of non-nutritive sweeteners*. Physiol Behav, 2015. **152**(Pt B): p. 450-5.
29. Meyer-Gerspach, A.C., B. Wolnerhanssen, and C. Beglinger, *Functional roles of low calorie sweeteners on gut function*. Physiol Behav, 2016. **164**(Pt B): p. 479-81.
30. Glendinning, J.I., *Do low-calorie sweeteners promote weight gain in rodents?* Physiol Behav, 2016. **164**(Pt B): p. 509-13.
31. Neves, A.L., et al., *Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk*. J Mol Endocrinol, 2013. **51**(2): p. R51-64.
32. Nohr, M.K., et al., *LPS-Enhanced Glucose-Stimulated Insulin Secretion Is Normalized by Resveratrol*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146840.
33. Chen, H., et al., *Lipopolysaccharide Induces Chronic Kidney Injury and Fibrosis through Activation of mTOR Signaling in Macrophages*. Am J Nephrol, 2015. **42**(4): p. 305-17.
34. McIntyre, C.W., et al., *Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(1): p. 133-41.
35. Ramezani, A. and D.S. Raj, *The gut microbiome, kidney disease, and targeted interventions*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(4): p. 657-70.
36. Vaziri, N.D., et al., *High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease*. PLoS One, 2014. **9**(12): p. e114881.
37. Suez, J., et al., *Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota*. Nature, 2014. **514**(7521): p. 181-6.
38. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
39. Karin, M., *How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6867-74.
40. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
41. Valles, P.G., et al., *Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play?* Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 241-51.
42. Feng, Y., et al., *Role of Toll-like receptors in diabetic renal lesions in a miniature pig model*. Sci Adv, 2015. **1**(5): p. e1400183.
43. Min, H.S., et al., *Effects of Toll-like receptor antagonist 4,5-dihydro-3-phenyl-5-isoxasole acetic acid on the progression of kidney disease in mice on a high-fat diet*. Kidney Res Clin Pract, 2014. **33**(1): p. 33-44.
44. Anders, H.J. and D. Schlondorff, *Toll-like receptors: emerging concepts in kidney disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007. **16**(3): p. 177-83.
45. Leemans, J.C., et al., *Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2894-903.

46. Souza, A.C., et al., *TLR4 mutant mice are protected from renal fibrosis and chronic kidney disease progression*. *Physiol Rep*, 2015. **3**(9).
47. Noeman, S.A., H.E. Hamooda, and A.A. Baalash, *Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats*. *Diabetol Metab Syndr*, 2011. **3**(1): p. 17.
48. Luo, H., et al., *Oxidative stress causes imbalance of renal renin angiotensin system (RAS) components and hypertension in obese Zucker rats*. *J Am Heart Assoc*, 2015. **4**(2).
49. Blaser, H., et al., *TNF and ROS Crosstalk in Inflammation*. *Trends Cell Biol*, 2016. **26**(4): p. 249-61.
50. Pedruzzi, L.M., et al., *Nrf2-keap1 system versus NF-kappaB: the good and the evil in chronic kidney disease?* *Biochimie*, 2012. **94**(12): p. 2461-6.
51. Tian, H., et al., *Keap1: one stone kills three birds Nrf2, IKKbeta and Bcl-2/Bcl-xL*. *Cancer Lett*, 2012. **325**(1): p. 26-34.
52. Miyazaki, Y., et al., *Keap1 inhibition attenuates glomerulosclerosis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2014. **29**(4): p. 783-91.
53. Aminzadeh, M.A., et al., *Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. **28**(8): p. 2038-45.
54. Organization, W.H., in *Guideline: Sugars Intake for Adults and Children*. 2015: Geneva.
55. Campos, V.C. and L. Tappy, *Physiological handling of dietary fructose-containing sugars: implications for health*. *Int J Obes (Lond)*, 2016. **40 Suppl 1**: p. S6-11.
56. Tordoff, M.G. and M.I. Friedman, *Drinking saccharin increases food intake and preference--III. Sensory and associative factors*. *Appetite*, 1989. **12**(1): p. 23-36.
57. Amin, K.A., H.M. Al-muzafar, and A.H. Abd Elsttar, *Effect of sweetener and flavoring agent on oxidative indices, liver and kidney function levels in rats*. *Indian J Exp Biol*, 2016. **54**(1): p. 56-63.
58. Shivanna, N., et al., *Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana*. *J Diabetes Complications*, 2013. **27**(2): p. 103-13.
59. Elnaga, N.I.E.A.M., M.I., Yousef, M.I.; Mohamed, H.H.A., *Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats*. *Annals of Agricultural Science*, 2016. **61**(1): p. 155-63.
60. Wahl, P., G.M. Ducasa, and A. Fornoni, *Systemic and renal lipids in kidney disease development and progression*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. **310**(6): p. F433-45.
61. Rebholz, C.M., et al., *Diet Soda Consumption and Risk of Incident End Stage Renal Disease*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017. **12**(1): p. 79-86.
62. Shoham, D.A., et al., *Sugary soda consumption and albuminuria: results from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2004*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3431.
63. Lin, J. and G.C. Curhan, *Associations of sugar and artificially sweetened soda with albuminuria and kidney function decline in women*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011. **6**(1): p. 160-6.
64. Reeves, P.G., F.H. Nielsen, and G.C. Fahey, Jr., *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. *J Nutr*, 1993. **123**(11): p. 1939-51.

65. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
66. Rosas-Villegas, A., et al., *Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress*. Nutrients, 2017. **9**(4).
67. Li, L., et al., *A Long-Term High-Fat/High-Sucrose Diet Promotes Kidney Lipid Deposition and Causes Apoptosis and Glomerular Hypertrophy in Bama Minipigs*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0142884.
68. Kizhner, T. and M.J. Werman, *Long-term fructose intake: biochemical consequences and altered renal histology in the male rat*. Metabolism, 2002. **51**(12): p. 1538-47.
69. Brymora, A., et al., *Low-fructose diet lowers blood pressure and inflammation in patients with chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(2): p. 608-12.
70. Schiffman, S.S. and K.I. Rother, *Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2013. **16**(7): p. 399-451.
71. van Eyk, A.D., *The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells*. Drug Chem Toxicol, 2015. **38**(3): p. 318-27.
72. Altunkaynak, M.E., et al., *The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats*. J Anat, 2008. **212**(6): p. 845-52.
73. Lim, A.I., et al., *Albumin and glycated albumin activate KIM-1 release in tubular epithelial cells through distinct kinetics and mechanisms*. Inflamm Res, 2014. **63**(10): p. 831-9.
74. Noordzij, M.J., J.D. Lefrandt, and A.J. Smit, *Advanced glycation end products in renal failure: an overview*. J Ren Care, 2008. **34**(4): p. 207-12.
75. Cortez, M., et al., *A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells*. Inflammation, 2013. **36**(2): p. 379-86.
76. Lee, H.B., et al., *Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8 Suppl 3): p. S241-5.
77. Mates, J.M., et al., *Antioxidant enzymatic activities in human blood cells after an allergic reaction to pollen or house dust mite*. Blood Cells Mol Dis, 1999. **25**(2): p. 103-9.
78. Mohd-Radzman, N.H., et al., *Potential Roles of Stevia rebaudiana Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 718049.
79. Gonzalez, C.T., M.: Perez, E.; Pallet, D.; Dornier, M., *Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review*. Fruits, 2014. **69**(2): p. 127-141.
80. *Svetia*.
81. Mandal, M.D. and S. Mandal, *Honey: its medicinal property and antibacterial activity*. Asian Pac J Trop Biomed, 2011. **1**(2): p. 154-60.
82. Guler, A.B., A; Nisbet, C.; Yavuz, O., *Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (Saccharum officinarum L.) syrup*. Food Chem, 2007. **105**(3): p. 1119-1125.
83. da Silva, P.M., et al., *Honey: Chemical composition, stability and authenticity*. Food Chem, 2016. **196**: p. 309-23.

84. Erejuwa, O.O., et al., *Comparison of antioxidant effects of honey, glibenclamide, metformin, and their combinations in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats*. Int J Mol Sci, 2011. **12**(1): p. 829-43.
85. Henning, S.M., et al., *Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity*. Nutr Cancer, 2003. **45**(2): p. 226-35.
86. Kim, M.S., et al., *ChREBP regulates fructose-induced glucose production independently of insulin signaling*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4372-4386.
87. Munday, M.R. and C.J. Hemingway, *The regulation of acetyl-CoA carboxylase--a potential target for the action of hypolipidemic agents*. Adv Enzyme Regul, 1999. **39**: p. 205-34.<3

XIII. ANEXOS

Durante la realización del presente trabajo, se realizó el análisis del estrés oxidativo en el riñón relacionándolo con la microbiota intestinal en un modelo murino que consumió una dieta alta en grasa con sacarosa o fructosa.

Se obtuvo la publicación del siguiente artículo en el Journal Nutrients (doi: 10.3390/nu9040393).



Article

Differential Effect of Sucrose and Fructose in Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress

Adriana Rosas-Villegas ¹, Mónica Sánchez-Tapia ¹, Azalia Avila-Nava ¹, Victoria Ramírez ², Armando R. Tovar ¹ and Nimbe Torres ^{1,*}

¹ Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F. 14080, México; kadriana.rosas@gmail.com (A.R.-V.); qfbmoniko@gmail.com (M.S.-T.); zorni33@gmail.com (A.A.-N.); tovarar@gmail.com (A.R.T.)

² Departamento de Nefrología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F. 14080, México; vikko60@hotmail.com

* Correspondence: nimbester@gmail.com; Tel./ Fax: +52-(55)-5655-3038

Received: 23 February 2017; Accepted: 13 April 2017; Published: 16 April 2017

Abstract: There is controversial information about the adverse effect of sucrose (S) or fructose (F) in the development of obesity. Thus, the purpose of the study was to evaluate the effect of S or F in a high fat diet (HF) on gut microbiota and renal oxidative stress. Rats were fed for four months with either high-fat + sucrose (HFS) or high-fat + fructose (HFF) or a control diet (C). Half of the HFS or HFF groups were maintained with the same diet and the other half were switched to the consumption of C. HFS and HFF groups increased 51% and 19% body weight, respectively, compared with the C group. Body fat mass, metabolic inflexibility, glucose intolerance, lipopolysaccharide (LPS), insulin, renal reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), *Naip3*, and *Srebp-1* were significantly higher and antioxidant enzymes and lean body mass were significantly lower in the HFS group with respect to the HF-F group. Change in the consumption of HFS or HFF to a C diet ameliorated the insulin and glucose intolerance. The type of carbohydrate differentially modified the microbiota composition, however, both groups significantly decreased *C. ratiahus* with respect to the C group. Thus, metabolic alterations with the HFS diet had a more detrimental effect than HFF.

Keywords: microbiota; renal oxidative stress; sucrose; fructose; obesity; LPS; inflammation

1. Introduction

Since 1980, overweight and obesity have more than doubled in the worldwide population [1]. In addition to the decrease of physical activity in a genetically-stable population, increased consumption of foods with a high content of energy, mainly attributed by sugar and fat, constitutes the main environmental factor, contributing to this dramatic increase in obesity that has reached epidemic levels [2]. Obesity is often accompanied by hyperinsulinemia and, consequently, dyslipidemia, which could impact the renal structures, like the glomerulus, contributing to vasodilation and hypertension, leading to kidney injury [3].

In recent years, the modification of gut microbiota and activation of inflammation pathways have been implicated in the development of insulin resistance and renal disease related to obesity [4]. Kidney disease is associated with low fiber consumption and increased intestinal permeability due to a modified intestinal microbiota [5]. During obesity there is an inflammatory state and imbalance in the gut microbiota composition (dysbiosis) involving the toll-like receptor (TLR) family. Obesity results in an increase of circulating lipopolysaccharide (LPS) because of the disruption of the enterocyte junctions resulting in increased gut permeability [4]. Another mechanism involved in the kidney

Nutrients 2017, 9, 393; doi:10.3390/nu9040393www.mdpi.com/journal/nutrients