



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Dra. Nimbe Torres y Torres
Depto. Fisiología de la Nutrición
Presente.

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

“Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta”

Este comité ha dictaminado **APROBARLO CON UNA OBSERVACIÓN:**

1. El proyecto no podrá iniciarse hasta que se entregue el FAEP debidamente firmado por el investigador responsable. Se autoriza el uso de 96 ratas Wistar macho más un 10% para cubrir pérdidas, a reserva del espacio y del equipo en el DIEB.

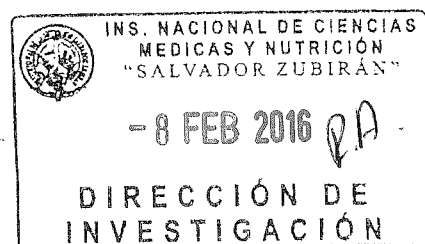
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

Avenida Vasco de
Quiroga No. 15 NAB/hom
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx



Recibí
Laura Zavala-R.
Feb. 8, 2016.

ACUSE

México, D. F., a 5 de febrero de 2016.

REF: CINVA-1735 FNU-1735-15/18-1

FEB 2016
P.N. 617
INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

México Cd.Mx., a 10 de abril del 2019

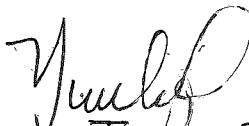
Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA
Presente

Estimada Dra. Bobadilla:

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo: "Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dolor en un modelo de ratas Wistar" con registro CINVA: CICUAL-FNU-1735-15/18-1 debido a que el protocolo ha concluido.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,


Dra Nimbe Torres y Torres

Nombre y Firma del (a) Investigador (a)



Ciudad de México a 10 de abril 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

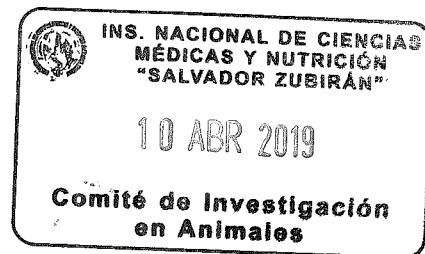
EFFECTO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

REF: CICUAL-FNU-1735-15/18-1

Dra Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

Por este conducto le informo que este protocolo ya se termino.

1. Anexo el formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de investigación



Informe final

I. Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar

A continuación se muestra la ganancia de peso de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa saturada y colesterol y 10% de cada edulcorante en el agua de bebida, exceptuando los glucósidos de steviol que solo se les dio a una concentración 2.5% y sucralosa que fue administrada al 1.5%. Para ver el efecto de la combinación de una dieta alta en grasa saturada y los edulcorantes se incluyó un grupo con esta dieta con agua simple y un grupo con una dieta control de caseína al 14% como lo recomienda el AIN 93. Estos tratamientos fueron administrados por un periodo de 4 meses. Como se puede observar en la figura 1, el grupo HFD+Sacarosa es el que más gano peso, siendo 87.5% mayor respecto al grupo que consumió una dieta control, mientras que cuando se consumen los monosacáridos glucosa y fructosa únicamente se obtuvo una ganancia del 34.9% y 23.7% respectivamente. Por otra parte aquellos grupos que consumieron edulcorantes calóricos con menor refinación, es decir mascabado y miel tuvieron ganancias del 30.8% y 25.6%. Aquellos grupos con edulcorantes no calóricos tuvieron menor ganancia de peso, a excepción de la svetia® que tuvo una ganancia 49.9% superior a la del grupo control, mientras que los glucosidos solo obtuvieron un incremento del 1.2% respecto al control y los que consumieron sucralosa incluso fue 1.4% menor a la del grupo control, aunque estadísticamente no fue significativo. Finalmente el grupo que consumió únicamente la HFD sin adición del edulcorante tuvo un incremento del 43.3%, de ganancia de peso respecto al grupo con la dieta AIN-93.

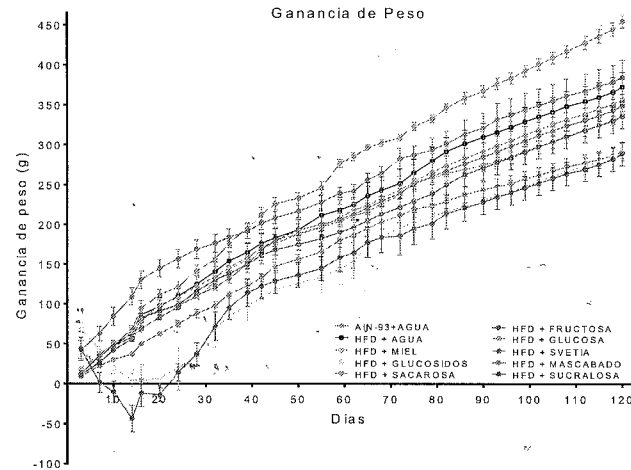


Figura 1. Curva de crecimiento de ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y edulcorantes en el agua de bebida

Respecto a la ingesta calórica, como se puede apreciar en la figura 2 se observa que el consumo calórico de alimentos en el grupo control y los grupos que consumieron una HFD fue el mismo, por lo que las variaciones en el peso no se deben a una diferencia en la ingesta calórica, sino que se debe a la fuente de energía, ya que los grupos con edulcorantes calóricos consumían menos gramos de alimento pero mayor volumen de agua.

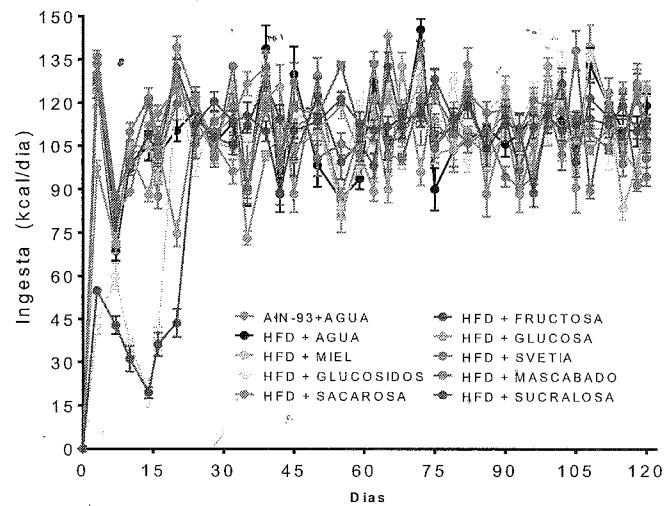


Figura 2. Determinación de la ingesta de alimento en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y edulcorantes en el agua

II. Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

Esta prueba se realizó después de 3.5 meses del consumo de dieta control o la HFD con o sin edulcorantes en el agua de bebida. Para ello se mantuvieron a los animales en ayuno durante 7 horas, se midió el nivel basal de glucosa sanguínea y se administró vía i.p. una solución de glucosa a una dosis de 2g/kg y se cuantificó la glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se obtuvo la gráfica de la CTG por grupo y se determinó el área bajo la curva.

En la figura 3 se muestran los resultados obtenidos. En el panel A se observa que el grupo control tiene una CTG normal, incrementando los niveles séricos de glucosa entre los 15 y 30 min después de la administración y disminuyendo de manera gradual hasta regresar a los niveles basales a los 120 min posteriores a la administración; por el contrario los grupos con HFD tienen mayor incremento en la glucosa sérica pero sin poder retornar a los niveles basales aun después de un periodo de 2 horas posteriores a la administración lo que sugiere una resistencia a la insulina, siendo más pronunciada con el consumo de sacarosa, sucralosa y svetia® y menor en los grupos con glucósidos, mascabado y miel

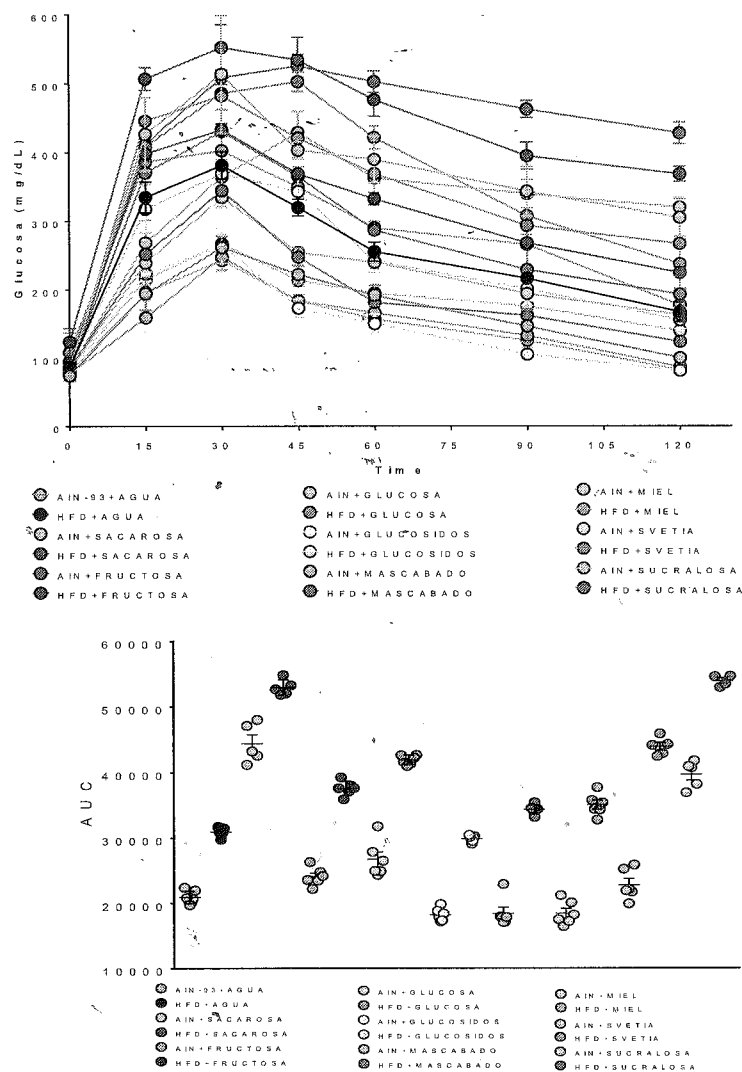


Figura 3. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

1735

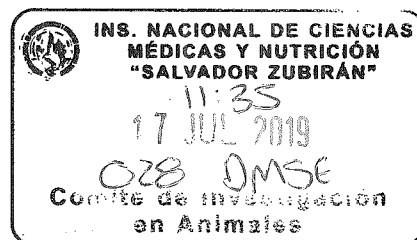
Ciudad de México a 17 de julio de 2019.

Dr Jorge Alberto Barrios Payán
Coordinador del CICUAL

Estimado Dr Barrios,
A continuación le envío copia del convenio de asignación de recursos por parte de CONACYT y la forma única actualizada del proyecto "Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de rata.

Atentamente,

Dra Nimbe Torres y Torres
Investigadora en Ciencias Médicas F
Departamento de Fisiología de la Nutrición



Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

III. Cuantificación de parámetros bioquímicos en suero en los diferentes grupos experimentales

Se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa (Figura 4), triglicéridos (Figura 5), colesterol total (Figura 6), colesterol LDL (Figura 7) después del tratamiento (dieta control o dieta alta en grasa) con o sin edulcorantes en el agua de bebida

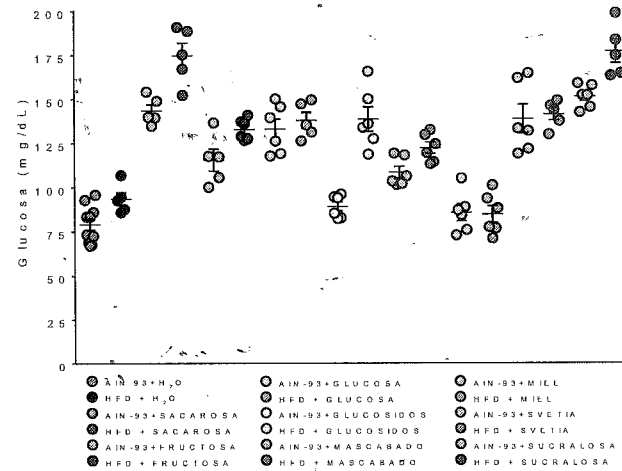


Figura 6. Determinación de la glucosa en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

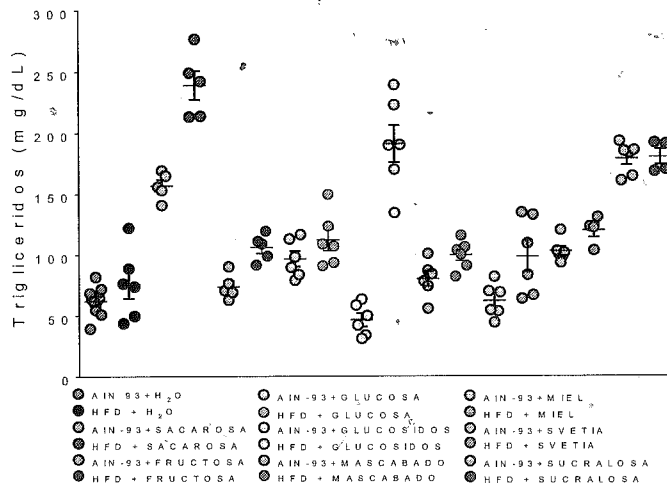


Figura 7. Determinación de triglicéridos séricos en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

Figura 8. Determinación del colesterol total en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

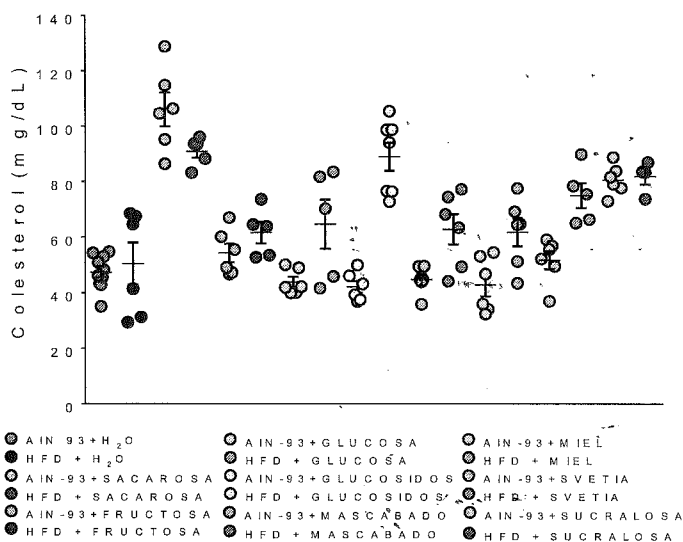
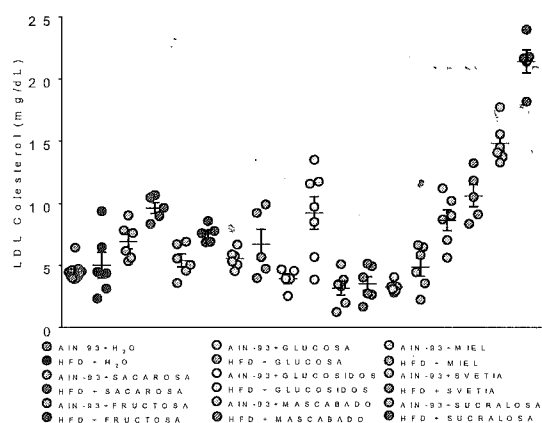


Figura 9. Determinación del colesterol LDL en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida



Determinación del coeficiente respiratorio y el gasto calórico

Se determinó coeficiente de intercambio respiratorio (RER) de los grupos después del tratamiento (4 mes) en la dieta por medio de calorimetría indirecta determinando el volumen de oxígeno. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos para el RER y el volumen de oxígeno. En la Figura 11A y B se muestra dicho coeficiente en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche es decir cuando la ingesta de alimento es mayor en los roedores mientras que en la gráfica 11c se presentan el consumo total de oxígeno de todos los puntos, tanto en periodo de ayuno (día) y postprandio (noche). Durante el periodo de ayuno todos los grupos tienen un RER de 0.7077 debido a que oxidan ácidos grasos, sin embargo, durante la noche (postprandial) el del grupo control sube el RER a 0.9799 mientras que el resto muestra un metabolismo mixto, en el caso del grupo con HFD y sacarosa, esta tiene una inflexibilidad metabólica es decir a no puede cambiar tan rápidamente de sustrato a oxidar para la obtención de energía, por lo que aunque este consumiendo carbohidratos sigue oxidando lípidos. Otro hallazgo interesante es que el consumo de sucralosa con una dieta control parece generar una cetosis durante el

período de ayuno. Finalmente cabe destacar que los grupos que consumieron glucósidos, mascabado y miel tienen una menor inflexibilidad metabólica y un mayor gasto calórico

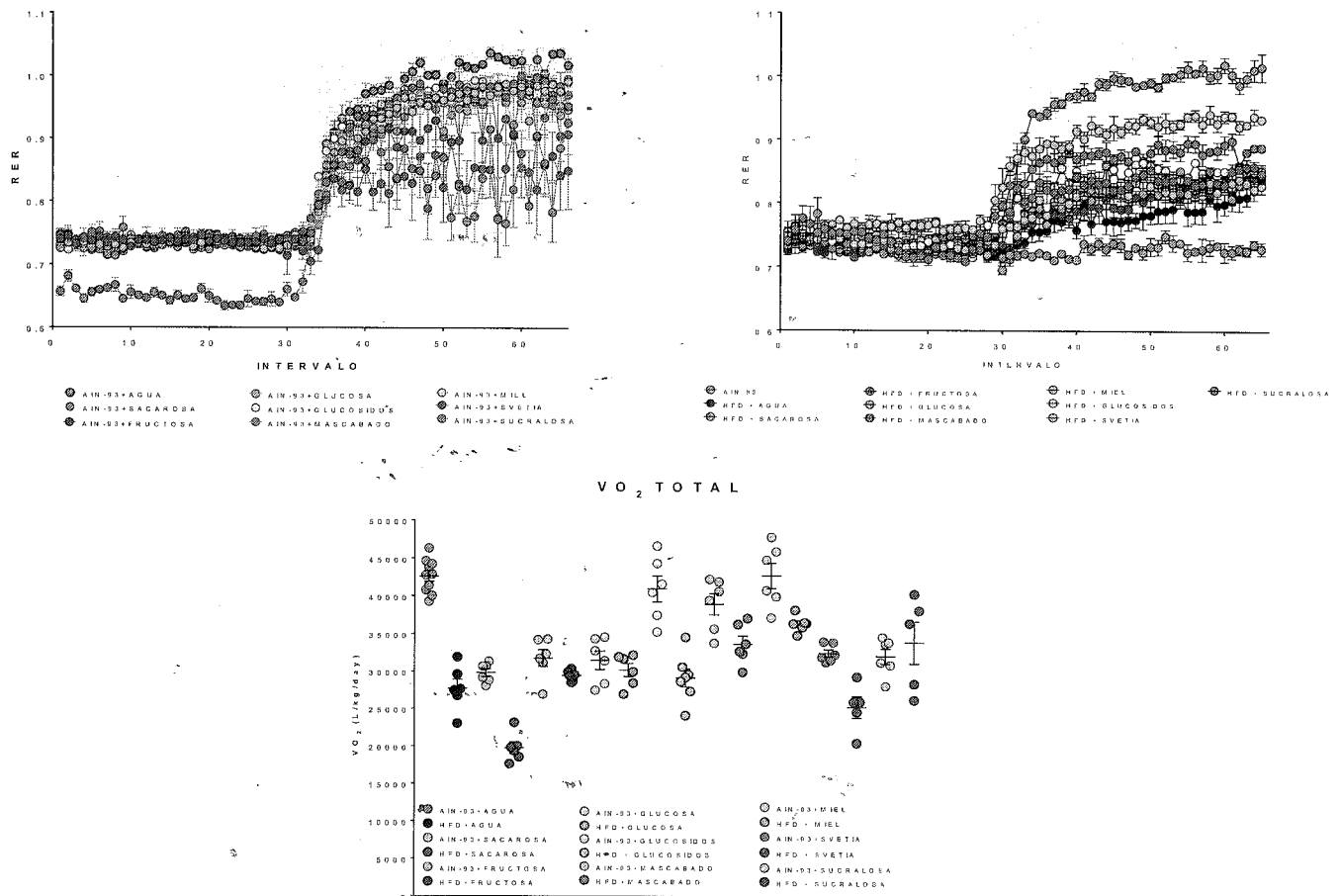


Figura 10. Determinación de coeficiente respiratorio.

Secuenciamiento por síntesis de la microbiota intestinal utilizando la plataforma MiSeq de Illumina

De la secuenciación por síntesis en la plataforma MiSeq Illumina se obtuvieron 5 906 496 secuencias (40756 ± 9541 por muestra) con una longitud media de 459 ± 1 pb. Las lecturas fueron asignadas a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de novo con la paquetería de QIIME V.1.9. De esta manera, usando la comparación de las OTUs con QIIME contra la base de datos Greengenes, el 99.7% de las lecturas fueron asignadas al nivel de *phylum*, 99.5% a orden, 99.4% a familia, el 75.2% a género y 24.4% a especie. Respecto a las abundancias de OTUs, que se calcularon, incluyen matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos. Para comparar las diferentes muestras, se hizo el corte en 18975 lecturas basándose en el mínimo de la suma de las abundancias de los taxones en RV.3.0.1. La diversidad alfa sirve para estimar la riqueza de especies y para ello se determinó el índice shannon, el cual sugiere que existe una mayor alfa diversidad en los grupos alimentados con miel, ya que el número de OTUs observado fue mayor, mientras que el grupo HFD+sucralosa tuvo menor alfa diversidad. También se realizó el análisis de la curva de rarefacción que indica mayor riqueza de especies en el grupo que consumió una dieta control con respecto a demás grupos. Para análisis de la composición de la microbiota, basado por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA, se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias

UniFrac unweighted, el cual mostro que el consumo de una dieta alta en grasa saturada impacta aproximadamente en un 30% en la composición de la microbiota intestinal, mientras que el consumo de diversos edulcorantes cambia la composición de la microbiota un 18% aproximadamente, respecto a los animales que fueron alimentados con una dieta control, representando en su conjunto el 50% de la variación de la misma

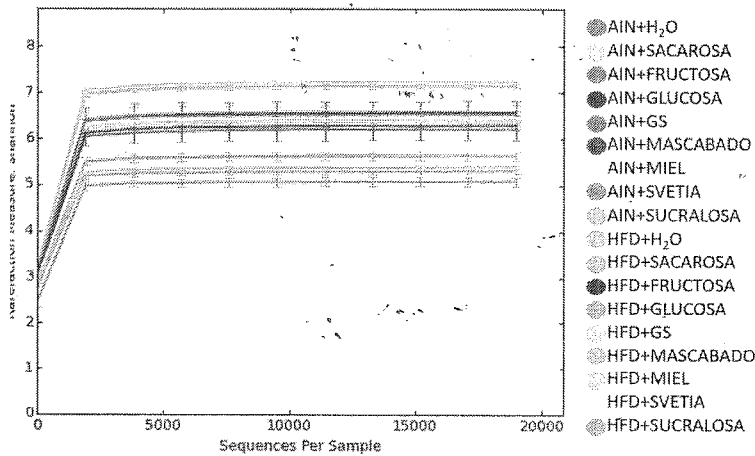


Figura 11. Determinación de la alfa diversidad mediante el índice shannon en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

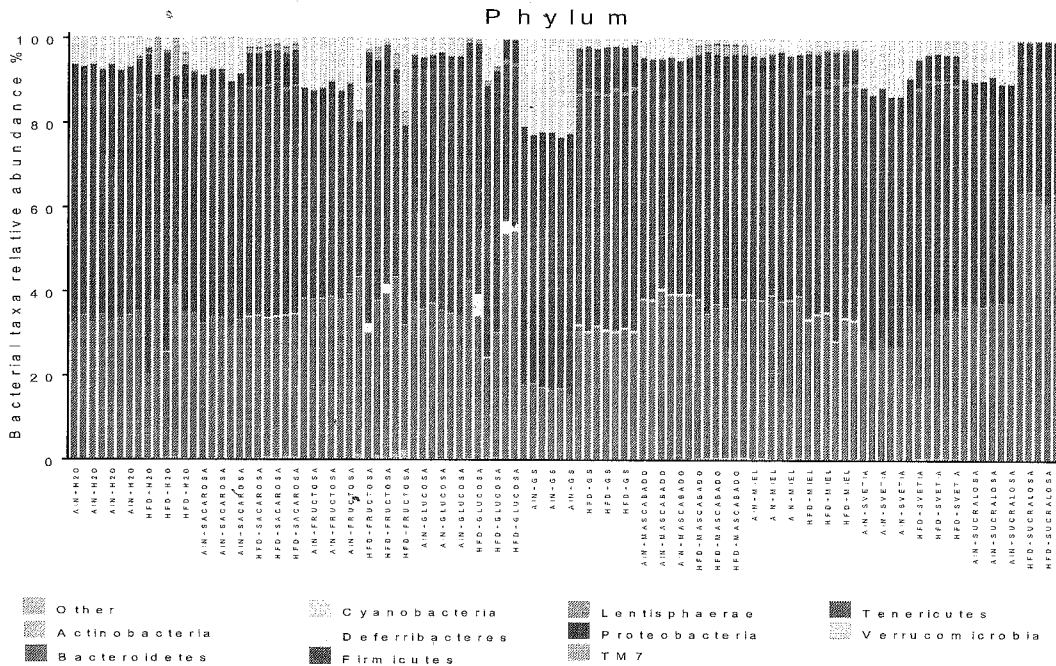


Figura 12. Determinación de los Phylum mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

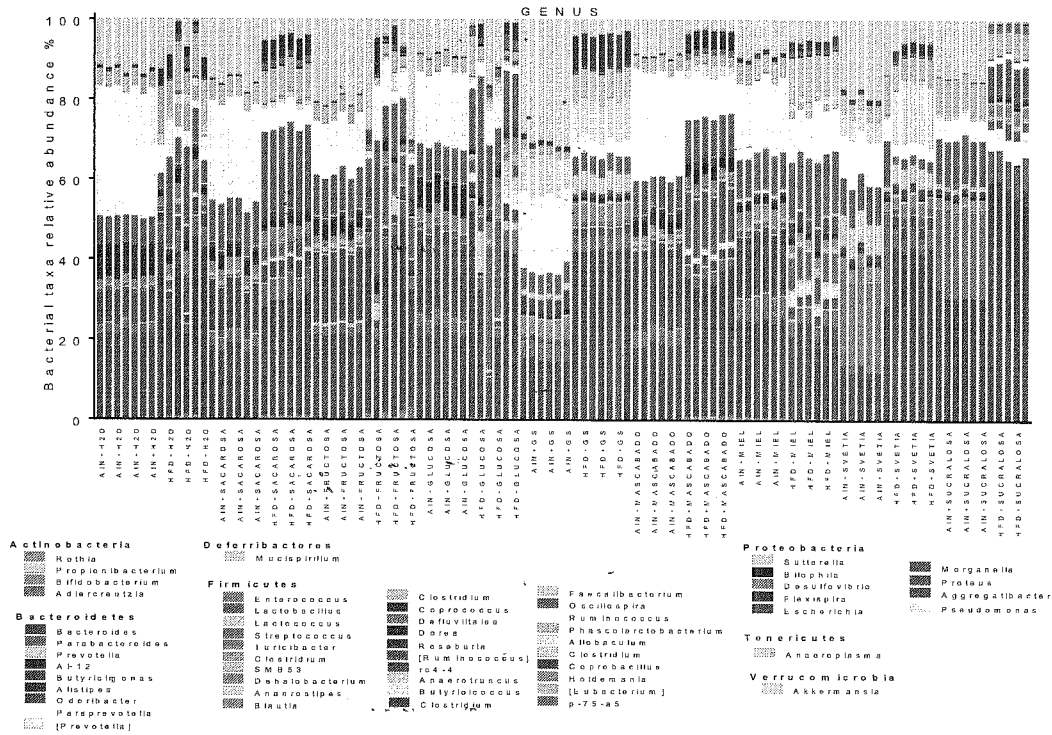


Figura 13. Determinación de los Generos mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

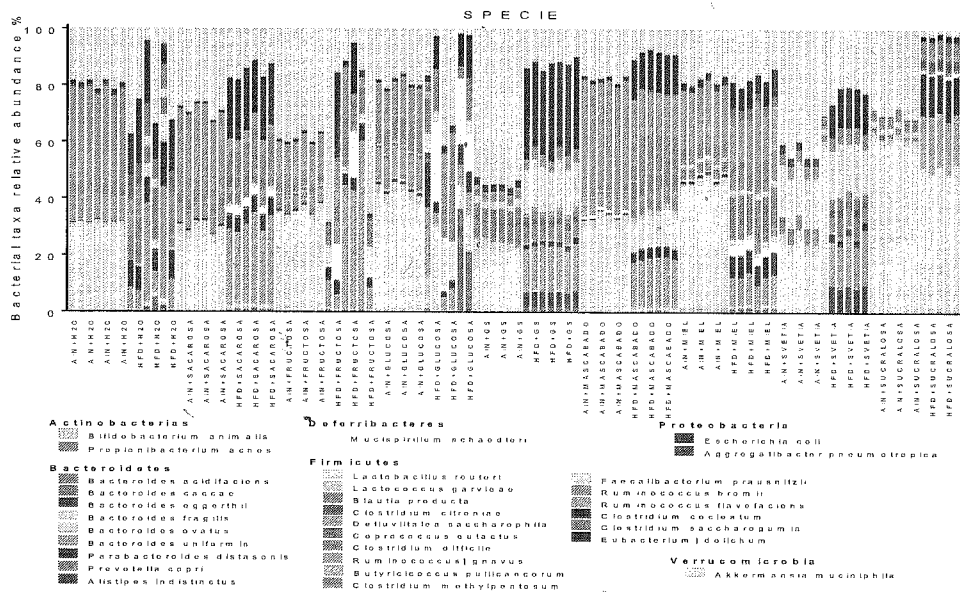


Figura 14. Determinación de las Species mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq.

Evaluación de los receptores de dulzor en lengua

En la actualidad existe una amplia variedad de edulcorantes, a percepción gustativa del sabor dulce de estos compuestos se lleva a cabo por un heterodímero de 2 subunidades proteicas, T1R2 (receptor gustativo tipo 1, miembro 2) y T1R3 (receptor gustativo tipo 1, miembro 3), los cuales son codificados por los genes TAS1R2 y TAS1R3, localizados en el cromosoma 1. T1R2 es el componente específico de la percepción del sabor dulce, ya que T1R3 a su vez está involucrado en la percepción del sabor umami. Éstos, T1R2 y T1R3 se expresan en el paladar y en las células gustativas de las papilas circunvaladas y foliadas de la lengua, sin embargo, T1R2 se ha detectado en otros tejidos clave para la regulación metabólica y la homeostasis energética, tales como el tracto gastrointestinal, el páncreas e hipotálamo, por lo cual se le ha considerado un receptor implicado en la ingesta de alimentos. En este estudio se evaluó la presencia de estos receptores tanto en lengua como en intestino ya que estudios han demostrado que tras la activación de estos receptores en células enteroendocrinas tiene 2 efectos: 1) Absorber mayor cantidad de glucosa vía SGLT-1 y 2) liberar una mayor cantidad de incretinas; por lo que la expresión de una mayor cantidad de estos puede explicar los cambios observados en los transportadores de glucosa, así como en las incretinas

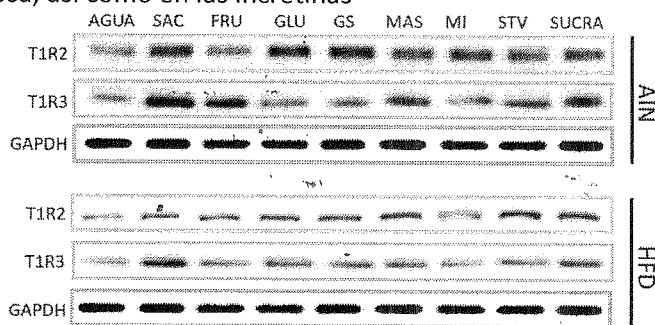


Fig 15. Determinación de los receptores de dulzor en lengua de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida

PRODUCTOS FINALES

Los productos finales son:

1. Primer artículo resultado de esta investigación (se anexa).
2. El estudiante de maestría empezará a escribir su tesis para titularse entre julio- agosto

Atentamente,


Dra Nimbe Torres y Torres
Departamento de Fisiología de la Nutrición

1
2 **Natural and artificial sweeteners and high fat diet**
3 **modify differentially taste receptors, insulin and**
4 **TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose**
5 **tissue of rats.**

6 **Mónica Sánchez-Tapia¹, Jonathan Martínez-Medina¹ Armando R Tovar¹ and Nimbe Torres^{1,*}**

7 ¹ Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador
8 Zubirán, México City, 14080, México; qfbmonikt@gmail.com (MST),
9 jonathan.martinez@comunidad.unam.mx (JMM), armando.tovar@incmnsz.mx (ART),
10 nimbe.torrest@incmnsz.mx (NT)

11 * Correspondence: nimbe.torrest@incmnsz.mx; Tel.: (+525556553038)

12 Received: date; Accepted: date; Published: date

13 **Abstract:** It is difficult to know if the responsible for obesity is the type of sweetener, the high fat
14 (HF) or the combination of sweetener and fat. The purpose of the present work was to study
15 different types of sweeteners in particular steviol glycosides (SG), glucose, fructose, sucrose,
16 brown sugar, honey, stevia and sucralose on the functionality of the adipocyte. Male Wistar rats
17 were fed for 4 months with the different sweeteners or sweetener with HF added. Taste receptors
18 T1R2 and T1R3 were differentially expressed in the tongue and intestine by sweeteners and HF.
19 The combination of fat and sweetener showed an additive effect on circulating levels of GIP and
20 GLP-1 with the exception of honey, SG and brown sugar. In adipose tissue, sucrose and sucralose
21 stimulated TLR4, and JNK. The combination of a HF with sweeteners increased NFκB with the
22 exception of SG and honey. Honey maintained active the insulin signaling pathway and the
23 smallest adipocytes in WAT and BAT and the highest expression of adiponectin, PPARγ and
24 UCP-1 in BAT. Addition of HF reduced BCAT and BCKDH and increased BCAA levels by sucrose
25 and sucralose. Our data suggest that consumption of particularly honey maintained functional
26 adipocytes despite the consumption of a HF diet.

27
28 **Keywords:** adipose tissue; sweeteners; taste receptors; TLR4; BCAA; insulin signaling; incretins
29

30 **1. Introduction**

31 In the last decades there has been an increase in the consumption of natural and artificial
32 sweeteners¹. The increase in the consumption of natural sweeteners, particularly sucrose (sugar) has
33 been associated with the epidemic of obesity worldwide². One of the strategies to reduce this health
34 problem has been the use of artificial sweeteners in order to reduce energy intake. However, in the
35 recent years, it has been reported controversial results about the consumption of artificial
36 sweeteners that have been associated with a greater risk for overweight and obesity³. Besides that,
37 other studies have been focused on other monosaccharides particularly fructose⁴ and few studies
38 have been focused on other natural complex sweeteners such as honey, brown sugar, steviol
39 glycosides or the artificial sweetener sucralose⁵. In conditions of persistent intake of sweeteners,
40 some taste receptors type 1 member 2 (T1R2) or member 3 (T1R3) are activated in tongue, intestine

41 and adipose tissue⁶⁻⁸. Sugar and artificial sweetener could bind specifically one or both receptors in
42 different proportion and this raises the possibility that sweeteners may influence the metabolism of
43 adipose tissue⁹. Adipose tissue is a dynamic endocrine organ that responds to energy intake by
44 increasing size and/or number of adipocytes to facilitate lipid storage. In the intestine, sweeteners
45 can activate taste receptors regulating the secretion of the incretins glucose-dependent
46 insulinotropic peptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1)¹⁰. The GIP receptor (GIPr) is
47 present in white and brown adipose tissue¹¹ and regulates insulin action¹² and pro-inflammatory
48 cytokine production¹³ leading in changes in adipocyte functionality. Many adipose
49 nutrient-sensing pathways are involved in the regulation of the adipose tissue metabolism. Among
50 those are hormonal, such as insulin signaling¹⁴ or by regulating the secretion of adiponectin, leptin
51 and other cytokines¹⁵. Another possible mechanism for which a sweetener could regulate the
52 functionality of the adipocyte is through toll like receptors (TLR) that in turn regulate several
53 inflammatory pathways in the adipocyte¹⁶. However, the effect of natural and artificial sweeteners
54 on the function of adipocytes has been not fully studied. In addition, the presence of high fat in
55 the diet in combination with the different sweeteners could modify the different metabolic
56 pathways involved in the functionality of the adipocyte. Thus, the purpose of the present work was
57 to study the effect of monosaccharides, disaccharides, natural complex sweeteners, particularly
58 brown sugar, honey, steviol glycosides and the artificial sweetener sucralose on tongue and
59 intestine taste receptors and its role in incretins, insulin signaling and potentially TLR 4 pathway
60 and branched chain amino acids in adipose tissue in the presence or absence of a high fat diet to
61 better understand potential molecular mechanism (s) through which sweeteners modulate adipose
62 metabolism.
63

64 2. Materials and Methods

65 2.1. Animals and diets

66 Male Wistar rats aged 5 weeks were obtained from the National Institute of Medical Sciences and
67 Nutrition. The animals were housed in individual cages and maintained at a controlled room
68 temperature with 12-h light-dark cycles and free access to water and food. Rats were randomized
69 into 18 groups; nine groups were fed a control diet (C) according with AIN-93¹⁷ and different
70 sweeteners in drinking water (W) (n=6 per group); the other 9 groups were fed high-fat diet (HF)
71 and different sweeteners in drinking water at the following concentration: sucrose (S), fructose (F),
72 glucose (G), brown sugar (BS), honey (H), stevia (SV; steviol glycosides plus sucrose) at 10%, steviol
73 glycosides (SG) at 2.5% and sucralose (SU) at 1.5%, for four months (n=6 per group). The high fat
74 diet (HF) consisted in 17% lard (45% kcal from fat). A group of six rats were fed with the control
75 diet or high fat diet to study the effect of antibiotics on branched chain amino acids (BCAA).
76 Antibiotics were provided in the drinking water for 3 weeks and the concentration of antibiotics
77 were 1 mg/ml ampicillin and 0.5 mg/ml neomycin. At the end of study, the rats were anesthetized
78 with sevoflurane before decapitation. The adipose tissue was rapidly removed and stored at -70°C
79 and serum was obtained by centrifugation of blood at 1500xg for 10 min and stored at -70°C. The
80 Animal Committee of the National Institute of Medical Sciences and Nutrition, Mexico City
81 approved the procedure (CINVA1735).

82



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

OCUSE



2019

AÑO DEL CAUDILLO DEL SUR
EMILIANO ZAPATA

CdMX., a 22 de marzo de de 2019.

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
DEPTO. DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN
Presente.

REF: CICUAL-FNU-1735-15/18-1

Estimada Dra. Torres:

Este comité ha dictaminado **NO APROBAR** la prórroga, a su proyecto intitulado **“EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECPTORES DSEL DULZOR EN UN MODELO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y CIN OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA”**, hasta que la carta sea dirigida al CICUAL.

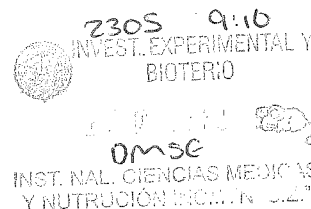
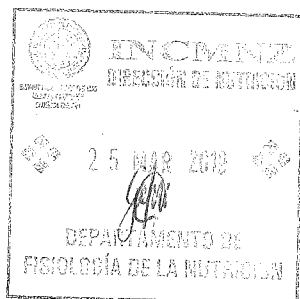
Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma Bobadilla Sandoval
Coordinadora del Comité Interno para el Cuidado y Uso de
los Animales de Laboratorio

c.c.p. M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom



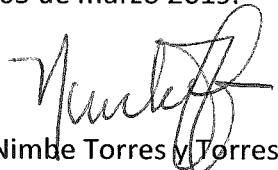
Avenida Vasco de
Quiroga No. 15
Colonia Belisario
Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

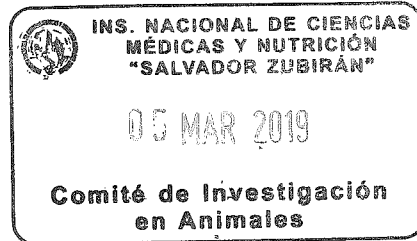
EFFECTO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y SIN OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA

Informe final de resultados 05 de marzo 2019.


Dra. Nimbe Torres y Torres

FNU-1735-15/18-1

Resultados



I. Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar

a) Crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar macho que consumieron una HFD

A continuación se muestra la ganancia de peso de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa saturada y colesterol y 10% de cada edulcorante en el agua de bebida, exceptuando los glucósidos de steviol que solo se les dio a una concentración 2.5% y sucralosa que fue administrada al 1.5%. Para ver el efecto de la combinación de una dieta alta en grasa saturada y los edulcorantes se incluyó un grupo con esta dieta con agua simple y un grupo con una dieta control de caseína al 14% como lo recomienda el AIN 93. Estos tratamientos fueron administrados por un periodo de 4 meses. Como se puede observar en la figura 1, el grupo HFD+Sacarosa es el que más gano peso, siendo 87.5% mayor respecto al grupo que consumió una

dieta control, mientras que cuando se consumen los monosacáridos glucosa y fructosa únicamente se obtuvo una ganancia del 34.9% y 23.7% respectivamente. Por otra parte aquellos grupos que consumieron edulcorantes calóricos con menor refinación, es decir mascabado y miel tuvieron ganancias del 30.8% y 25.6%. Aquellos grupos con edulcorantes no calóricos tuvieron mejor ganancia de peso, a excepción de la svetia® que tuvo una ganancia 49.9% superior a la del grupo control, mientras que los glucosidos solo obtuvieron un incremento del 1.2% respecto al control y los que consumieron sucralosa incluso fue 1.4% menor a la del grupo control, aunque estadísticamente no fue significativo. Finalmente el grupo que consumió únicamente la HFD sin adición del edulcorante tuvo un incremento del 43.3%, de ganancia de peso respecto al grupo con la dieta AIN-93.

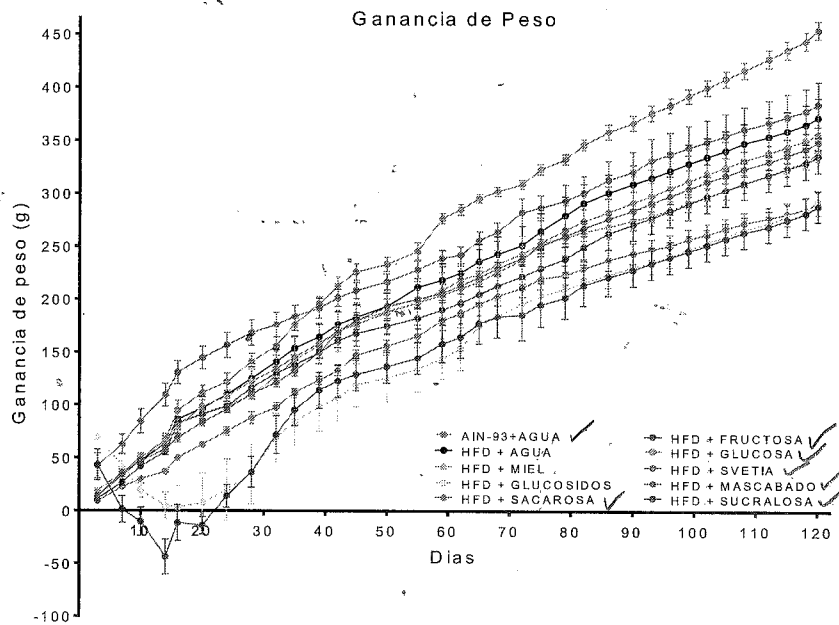


Figura 1. Curva de crecimiento de ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y edulcorantes en el agua de bebida

Respecto a la ingesta calórica, como se puede apreciar en la figura 2 se observa que el consumo calórico de alimentos en el grupo control y los grupos que consumieron una HFD fue el mismo, por lo que las variaciones en el peso no se deben a una diferencia en la ingesta calórica, sino que se debe a la fuente de energía, ya

que los grupos con edulcorantes calóricos consumían menos gramos de alimento (Figura 2B) pero mayor volumen de agua (Figura 2C).

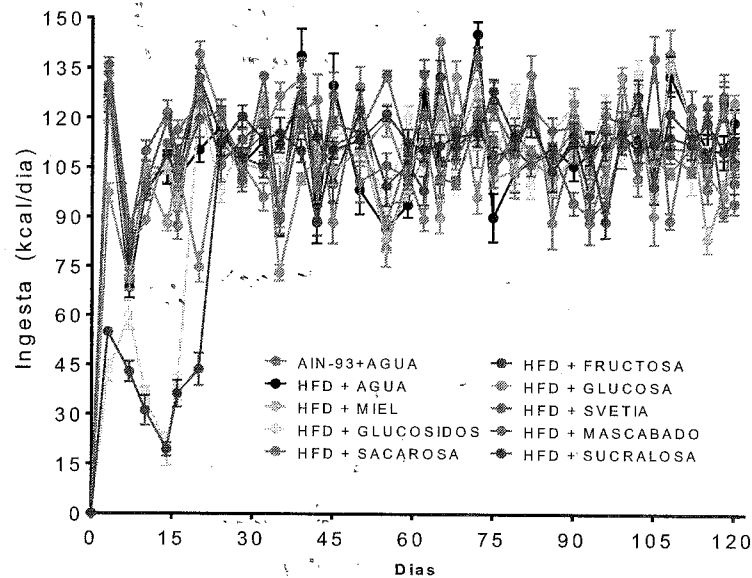


Figura A-C. Determinación de la ingesta de alimento en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y edulcorantes en el agua

b) Crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar macho que consumieron una dieta control (AIN-93)

A continuación, se muestra la ganancia de peso de los grupos alimentados con una dieta de caseína al 14% como lo recomienda el AIN 93 y 10% de cada edulcorante en el agua de bebida, exceptuando los glucósidos de steviol que solo se les dio a una concentración 2.5% y sucralosa que fue administrada al 1.5%. El grupo que consumió sacarosa es el que más gana peso, siendo 32% mayor respecto al grupo que consumió una dieta control, mientras que cuando se consumen los monosacáridos

glucosa y fructosa no hay una diferencia muy grande, obteniendo una ganancia del 4.3% con glucosa y una pequeña disminución de peso con la fructosa del 3% respectivamente. Por otra parte aquellos grupos que consumieron edulcorantes calóricos con menor refinación, es decir mascabado y miel tuvieron ganancias del 5.1% y 0.4%. Aquellos grupos con edulcorantes no calóricos tuvieron, al contrario que con la dieta alta engrasa una mayor ganancia de peso, siendo del 12.2% con el consumo de svetia®, mientras que los glucósidos obtuvieron una ganancia de peso menor en un 3.7% respecto al grupo control, es decir, el uso de un vehículo en el producto comercial impacta significativamente en una mayor ganancia de peso. Finalmente los animales de experimentación que consumieron sucralosa, presentaron un incremento del 12.2% en la ganancia de peso respecto al grupo control, resultado contrario al obtenido con el consumo de una dieta alta en grasa saturada. Sin embargo esto puede deberse a la ingesta calórica ya que como se puede apreciar en la figura 4 se observa que el consumo calórico de alimentos en el grupo control con y sin edulcorantes fue el mismo a excepción del grupo con sucralosa, por otro lado, los grupos con edulcorantes calóricos consumían menos gramos de alimento (Figura 4B) pero mayor volumen de agua (Figura 4C)

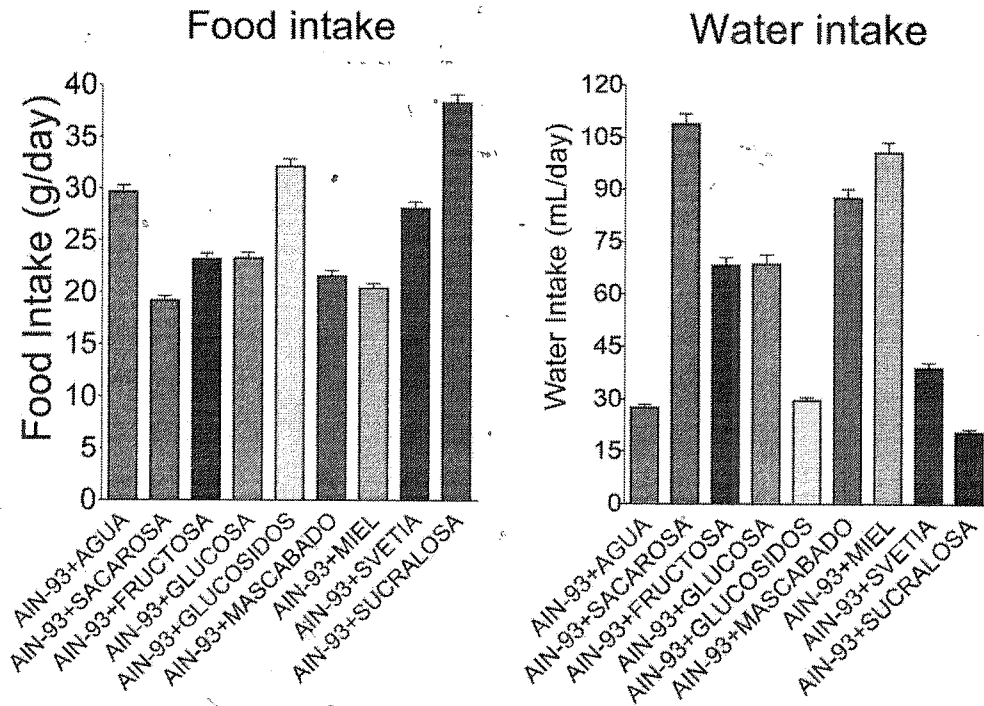
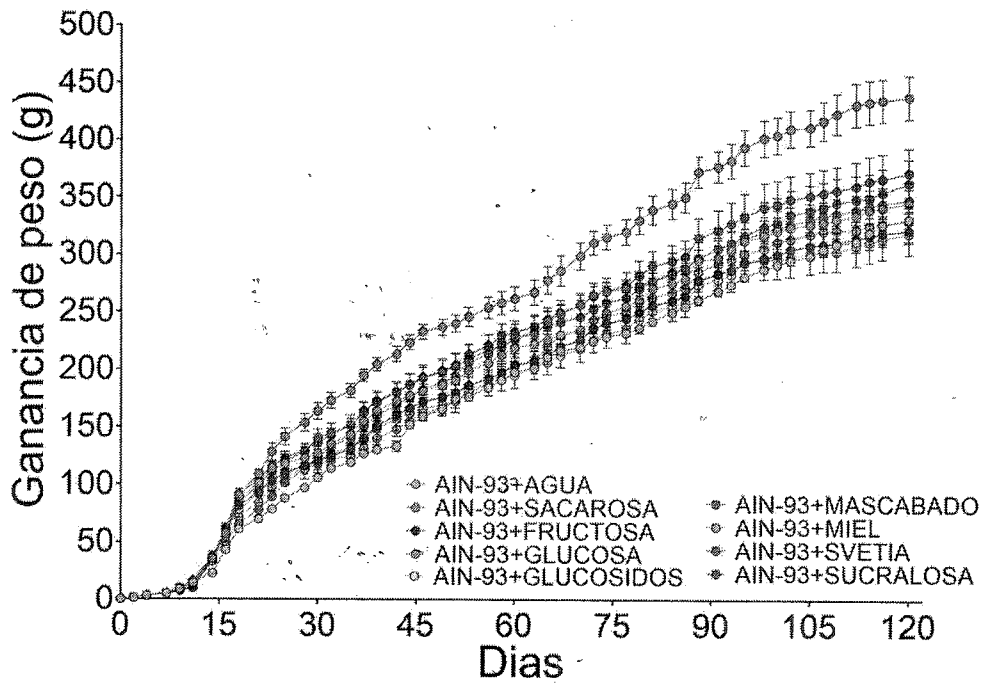
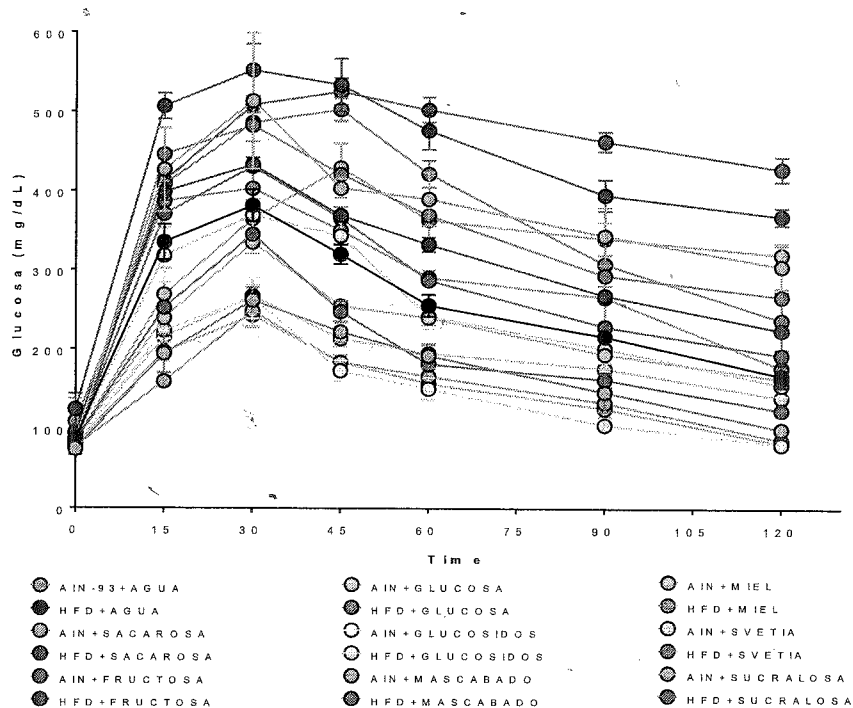


Figura 3. Curva de crecimiento de ratas Wistar alimentadas con una dieta al 14% de caseína (dieta control) y edulcorantes en el agua de bebida y Determinación de la ingesta de alimento en ratas Wistar alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y edulcorantes en el agua

II. Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

Esta prueba se realizó después de 3.5 meses del consumo de dieta control o la HFD con o sin edulcorantes en el agua de bebida. Para ello se mantuvieron a los animales en ayuno durante 7 horas, se midió el nivel basal de glucosa sanguínea y se administró vía i.p. una solución de glucosa a una dosis de 2g/kg y se cuantificó la glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se obtuvo la gráfica de la CTG por grupo y se determinó el área bajo la curva.

En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos. En el panel A se observa que el grupo control tiene una CTG normal, incrementando los niveles séricos de glucosa entre los 15 y 30 min después de la administración y disminuyendo de manera gradual hasta regresar a los niveles basales a los 120 min posteriores a la administración, por el contrario los grupos con HFD tienen mayor incremento en la glucosa sérica pero sin poder retornar a los niveles basales aun después de un periodo de 2 horas posteriores a la administración lo que sugiere una resistencia a la insulina, siendo más pronunciada con el consumo de sacarosa, sucralosa y svetia® y menor en los grupos con glucósidos, mascabado y miel



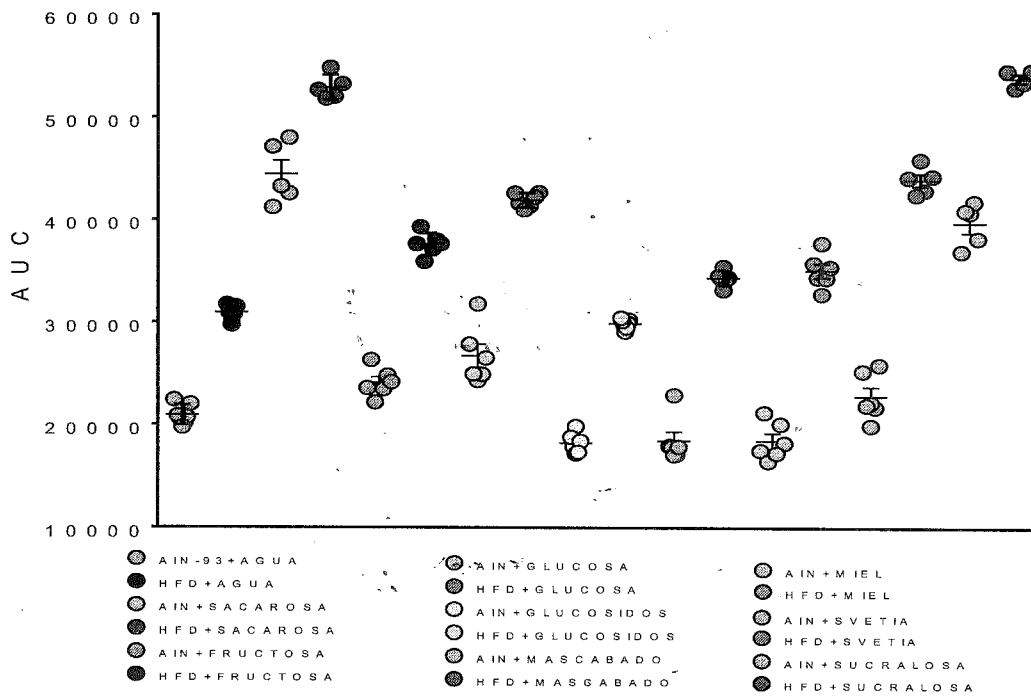


Figura 5. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

III. Cuantificación de parámetros bioquímicos en suero en los diferentes grupos experimentales

Se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa (Figura 6), triglicéridos (Figura 7), colesterol total (Figura 8), colesterol LDL (Figura 9) después del tratamiento (dieta control o dieta alta en grasa) con o sin edulcorantes en el agua de bebida

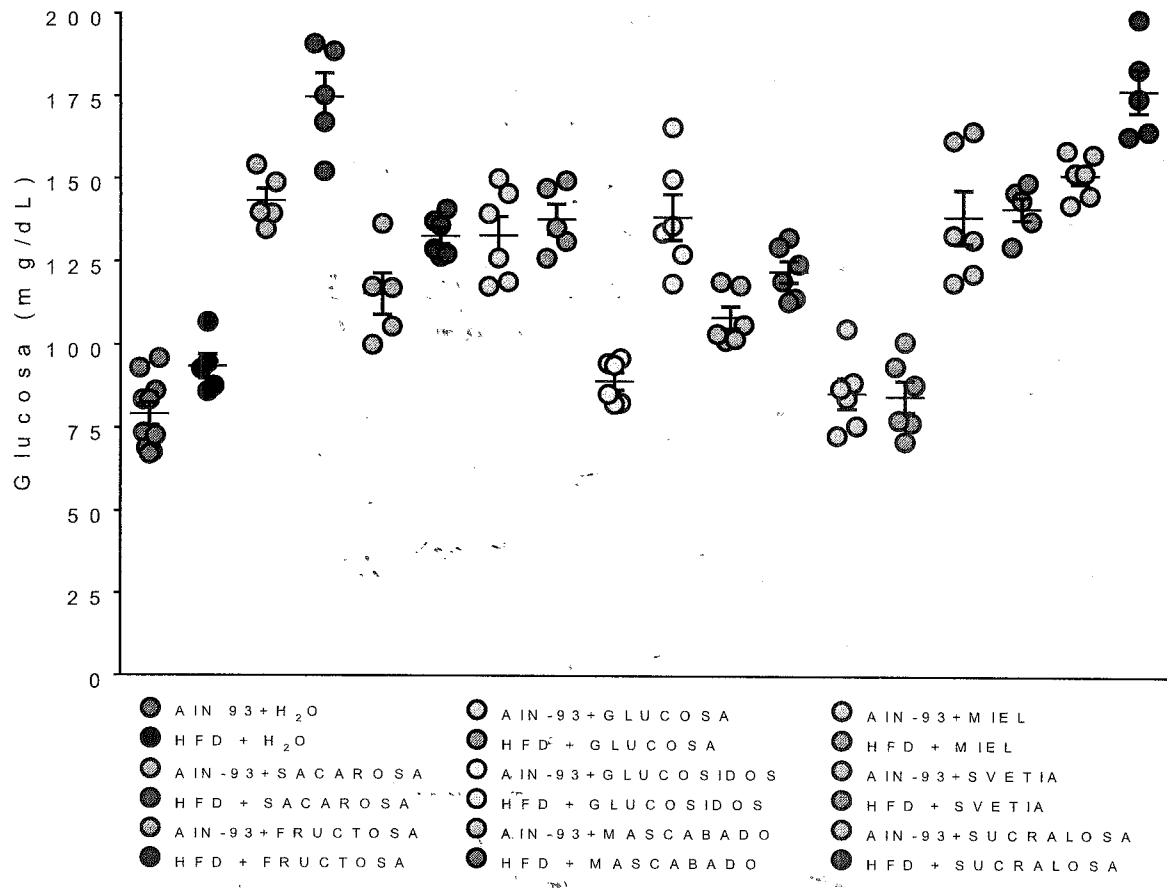


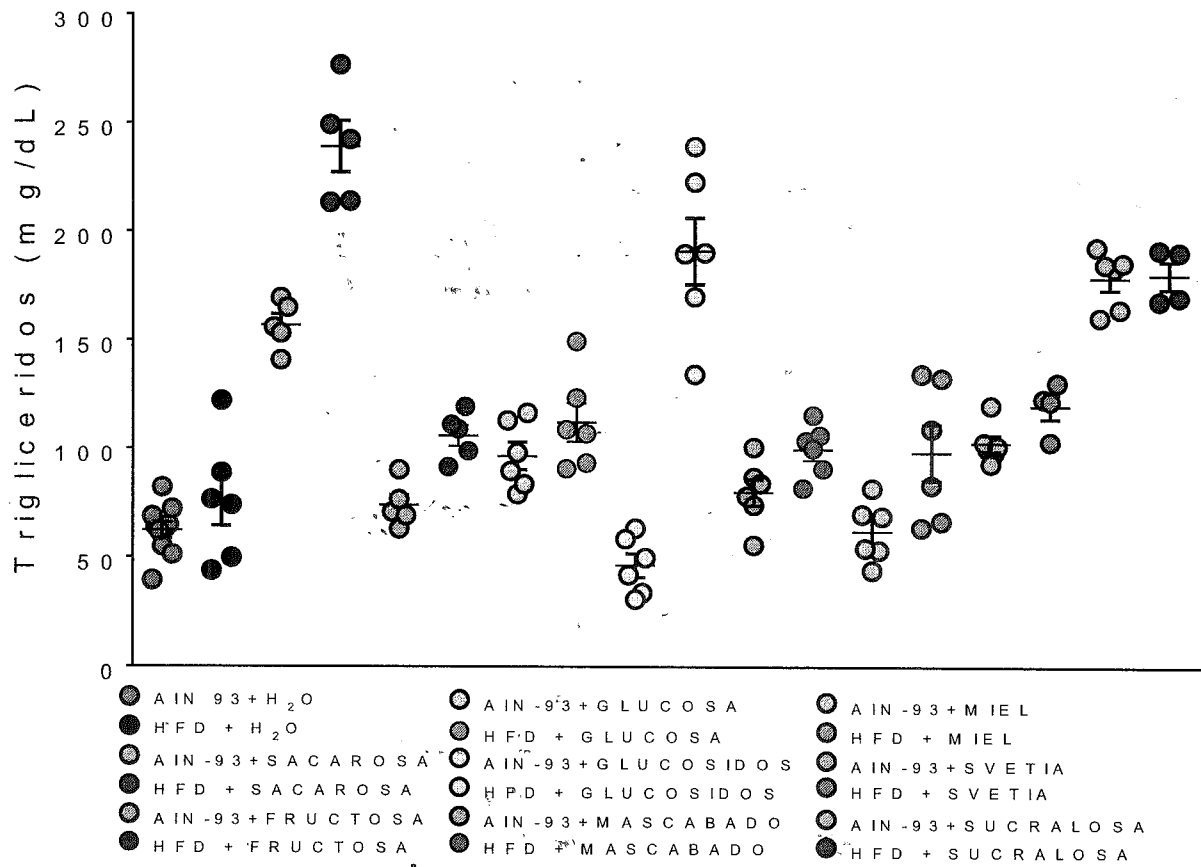
Figura 6. Determinación de la glucosa en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

Figura

7.

Determinación

de



triglicéridos séricos en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida

Figura 8. Determinación del colesterol total en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de

bebida

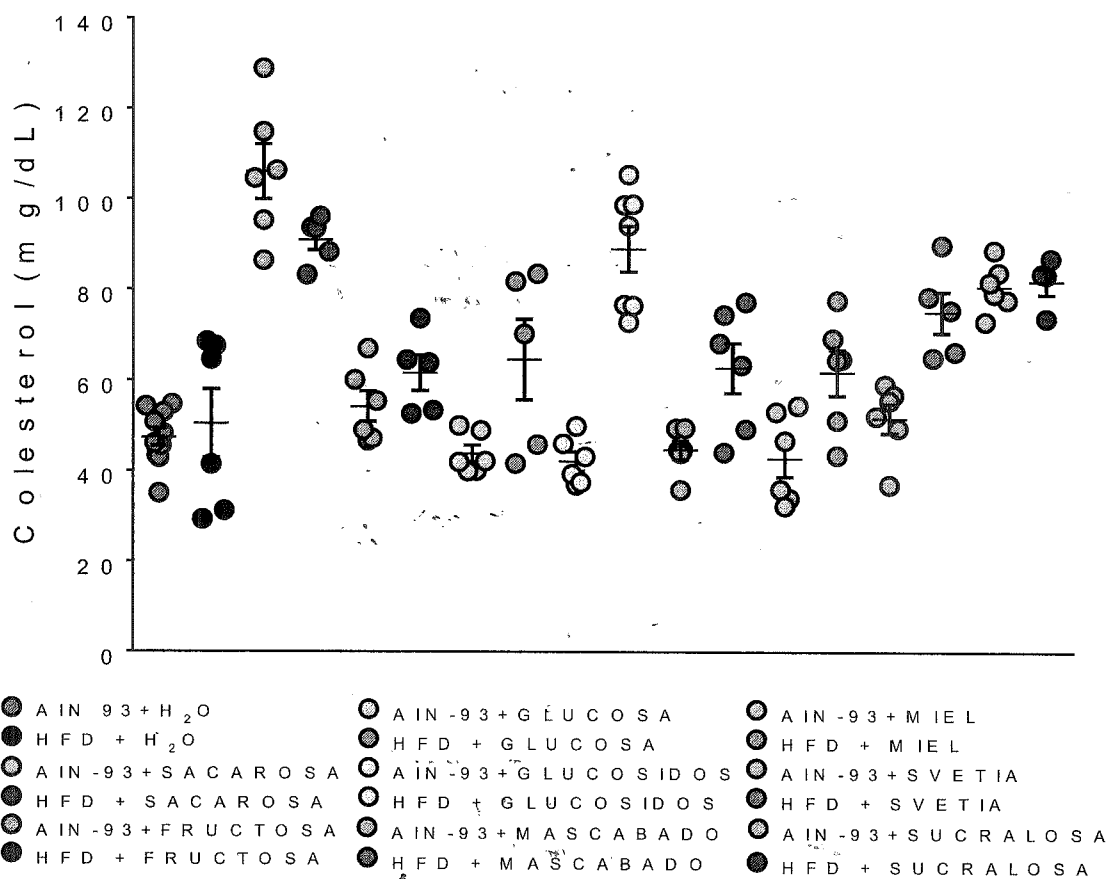
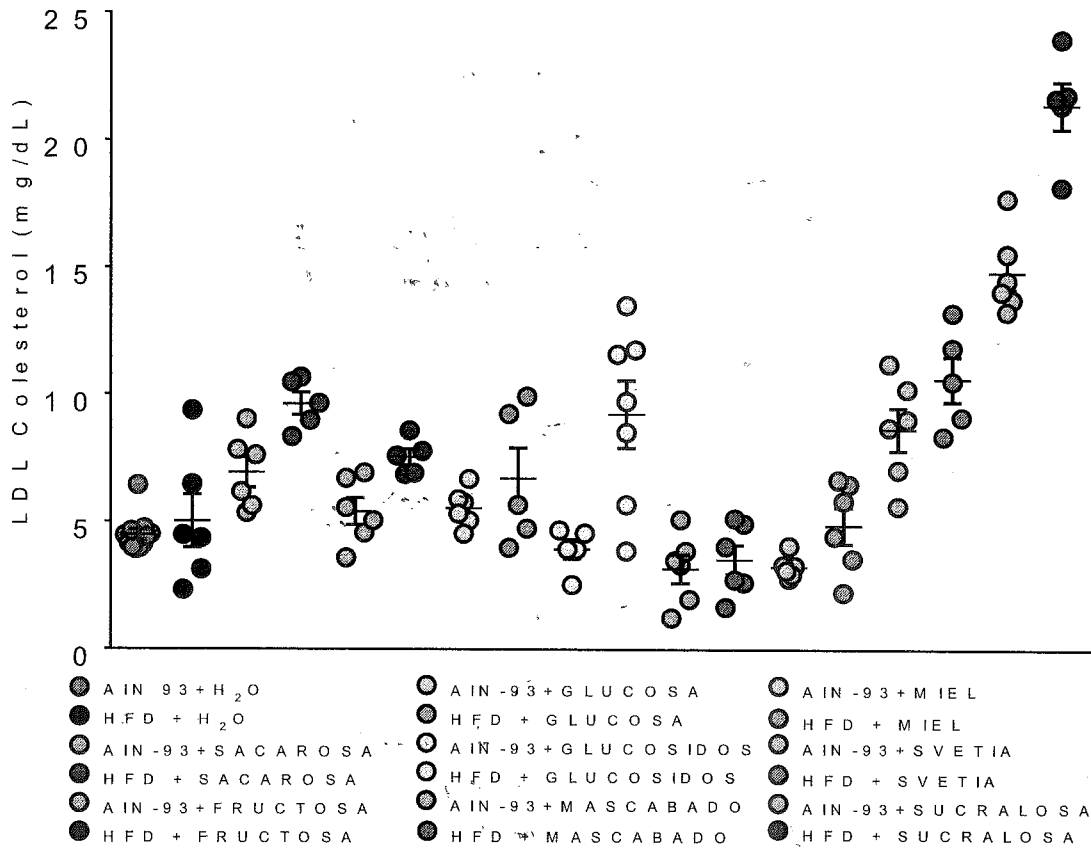


Figura 9. Determinación del colesterol LDL en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de

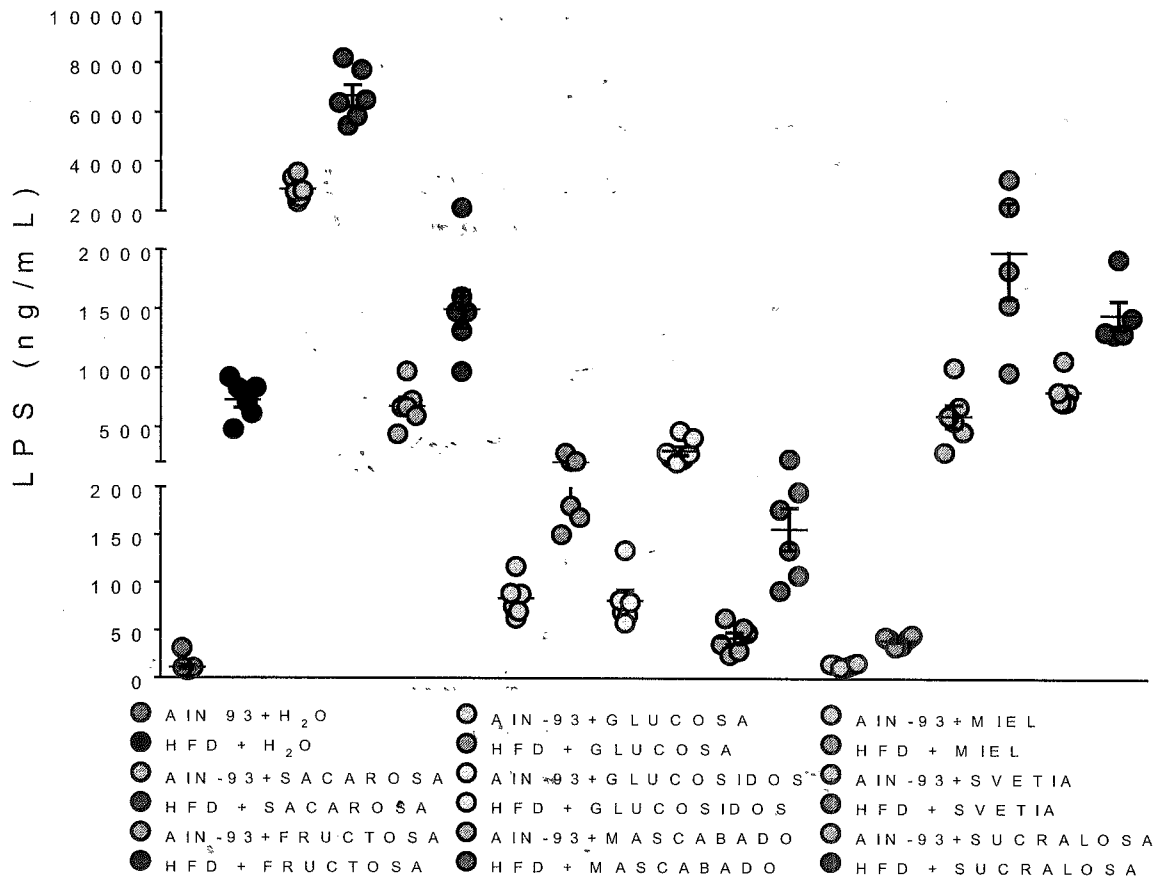
bebida



Determinación del lipopolisacárido (LPS)

Este factor que nos ayuda a establecer la condición de endotoxemia se determinó en suero, mediante el uso de ELISA. Los resultados obtenidos sugieren que el grupo con HFD muestra una endotoxemia metabólica ya que los niveles son superiores a los mostrados por el grupo control (Figura 10).

Figura 10. Determinación LPS serico en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida



IV. Determinación del coeficiente respiratorio y el gasto calórico

Se determinó coeficiente de intercambio respiratorio (RER) de los grupos después del tratamiento (4 mes) en la dieta por medio de calorimetría indirecta determinando el volumen de oxígeno. En la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos para el RER y el volumen de oxígeno. En la Figura 11A y B se muestra dicho coeficiente en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche es decir cuando la ingesta de alimento es mayor en los roedores mientras que en la gráfica 11c se presentan el consumo total de oxígeno de todos los puntos, tanto en periodo de ayuno (día) y postprandio (noche). Durante el periodo de ayuno todos los grupos tienen un RER de 0.7077 debido a que oxidan ácidos grasos, sin embargo, durante la noche (postprandial) el del grupo control sube el RER a 0.9799 mientras que el resto muestra un metabolismo

mixto, en el caso del grupo con HFD y sacarosa, esta tiene una inflexibilidad metabólica es decir a no puede cambiar tan rápidamente de sustrato a oxidar para la obtención de energía, por lo que aunque este consumiendo carbohidratos sigue oxidando lípidos. Otro hallazgo interesante es que el consumo de sucralosa con una dieta control parece generar una cetosis durante el período de ayuno. Finalmente cabe destacar que los grupos que consumieron glucósidos, mascabado y miel tienen una menor inflexibilidad metabólica y un mayor gasto calórico

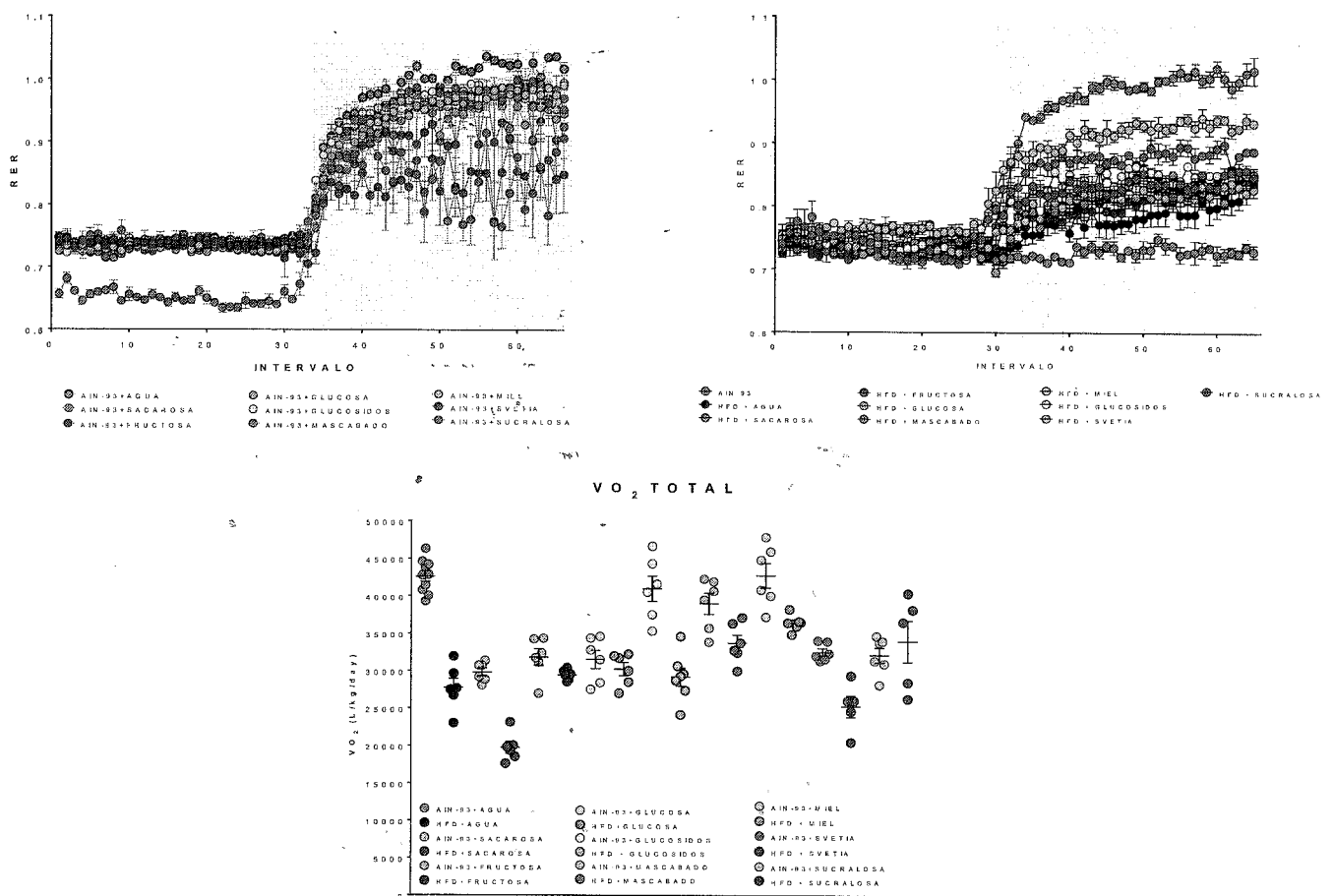


Figura 11. Determinación de coeficiente respiratorio

V. Secuenciamiento por síntesis de la microbiota intestinal utilizando la plataforma MiSeq de Illumina

De la secuenciación por síntesis en la plataforma MiSeq Illumina se obtuvieron 5 906 496 secuencias (40756 ± 9541 por muestra) con una longitud media de 459 ± 1 pb. Las lecturas fueron asignadas a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) de novo con la paquetería de QIIME V.1.9. De esta manera, usando la comparación de las OTUs con QIIME contra la base de datos Greengenes, el 99.7% de las lecturas fueron asignadas al nivel de *phylum*, 99.5% a orden, 99.4% a familia, el 75.2% a género y 24.4% a especie. Respecto a las abundancias de OTUs, que se calcularon, incluyen matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos. Para comparar las diferentes muestras, se hizo el corte en 18975 lecturas basándose en el mínimo de la suma de las abundancias de los taxones en RV.3.0.1. La diversidad alfa sirve para estimar la riqueza de especies y para ello se determinó el índice shannon, el cual sugiere que existe una mayor alfa diversidad en los grupos alimentados con miel, ya que el número de OTUs observado fue mayor, mientras que el grupo HFD+sucralosa tuvo menor alfa diversidad. También se realizó el análisis de la curva de rarefacción que indica mayor riqueza de especies en el grupo que consumió una dieta control con respecto a demás grupos. Para análisis de la composición de la microbiota, basado por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA, se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac unweighted, el cual mostro que el consumo de una dieta alta en grasa saturada impacta aproximadamente en un 30% en la composición de la microbiota intestinal, mientras que el consumo de diversos edulcorantes cambia la composición de la microbiota un 18% aproximadamente, respecto a los animales que fueron alimentados con una dieta control, representando en su conjunto el 50% de la variación de la misma

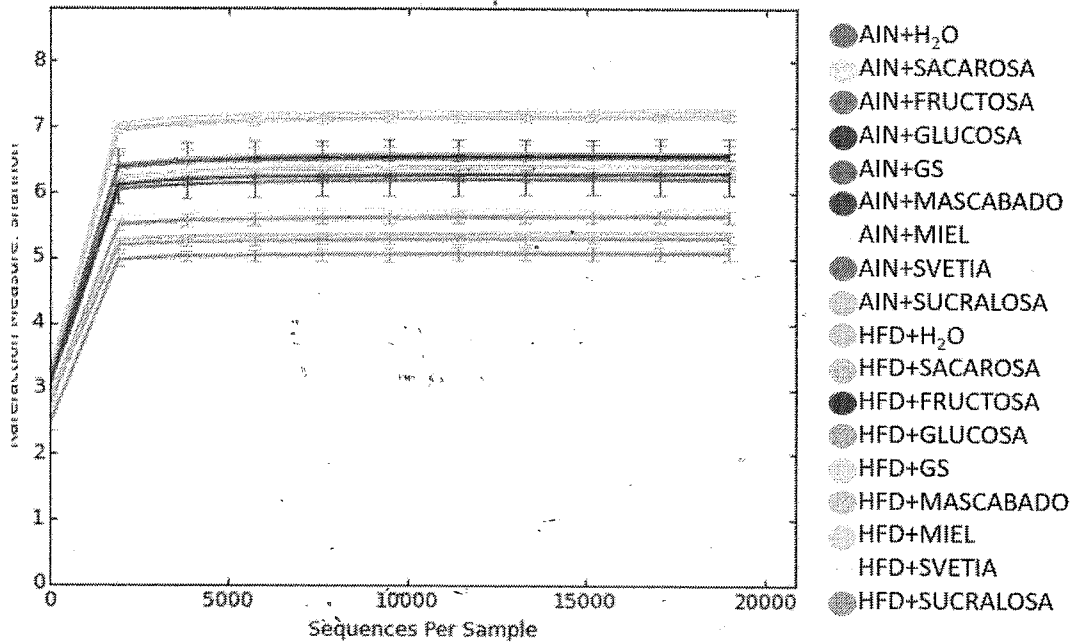


Figura 12. Determinación de la alfa diversidad mediante el índice shannon en atas Wistar, alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

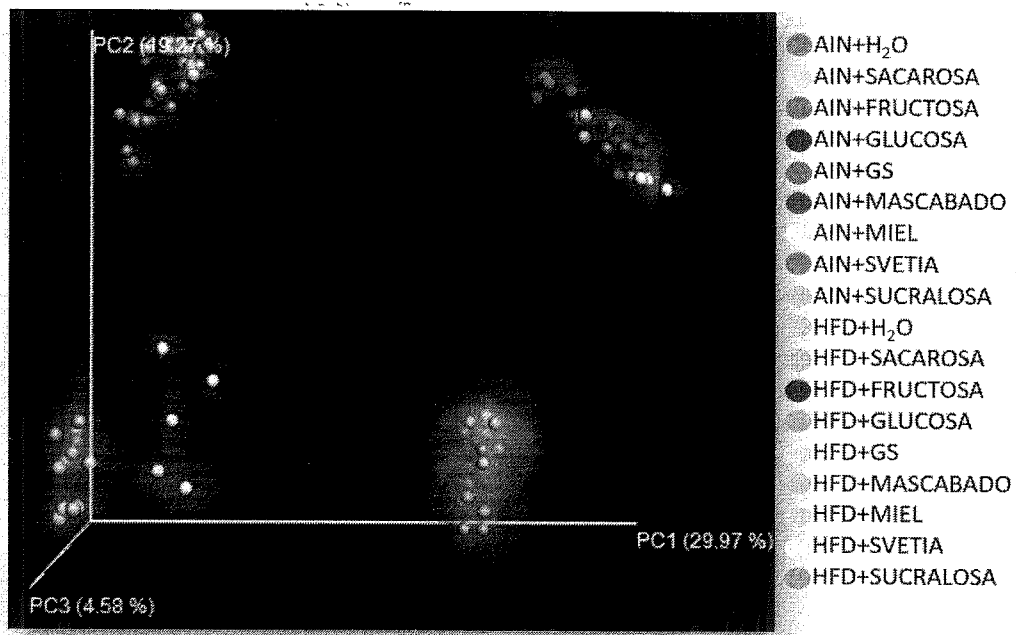


Figura 13. Determinación de la beta diversidad, mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSe

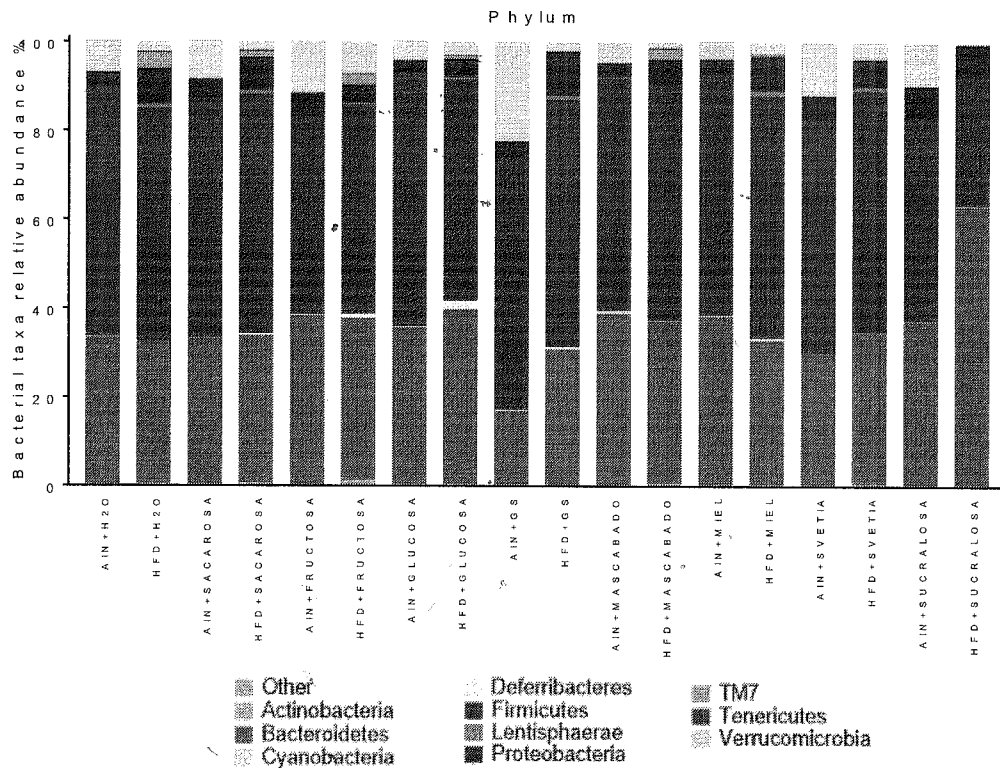
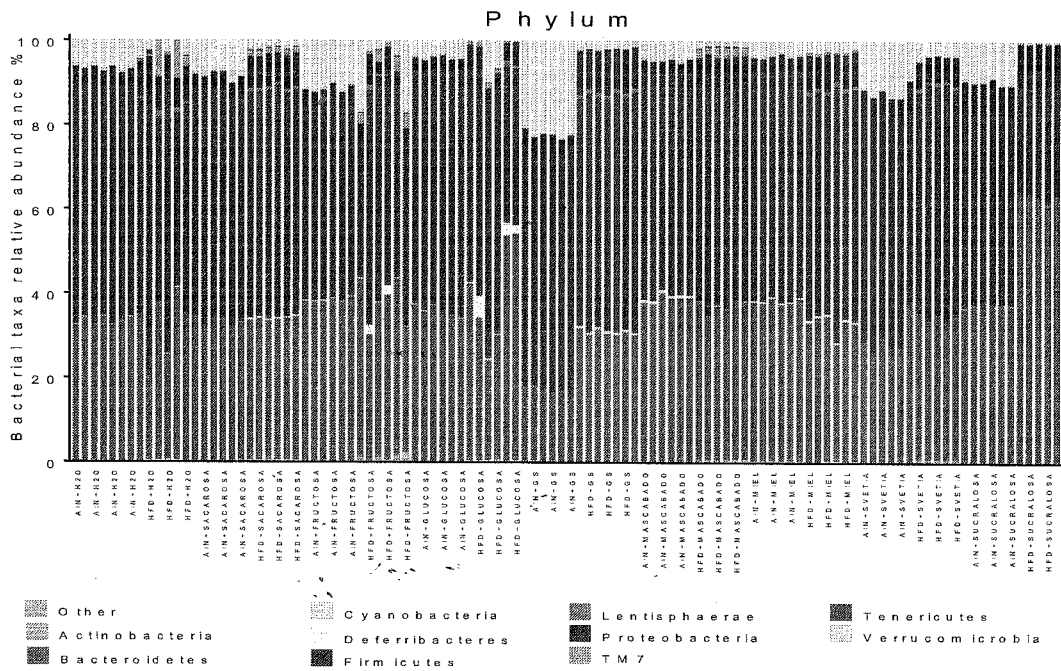


Figura 14. Determinación de los Phylum mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

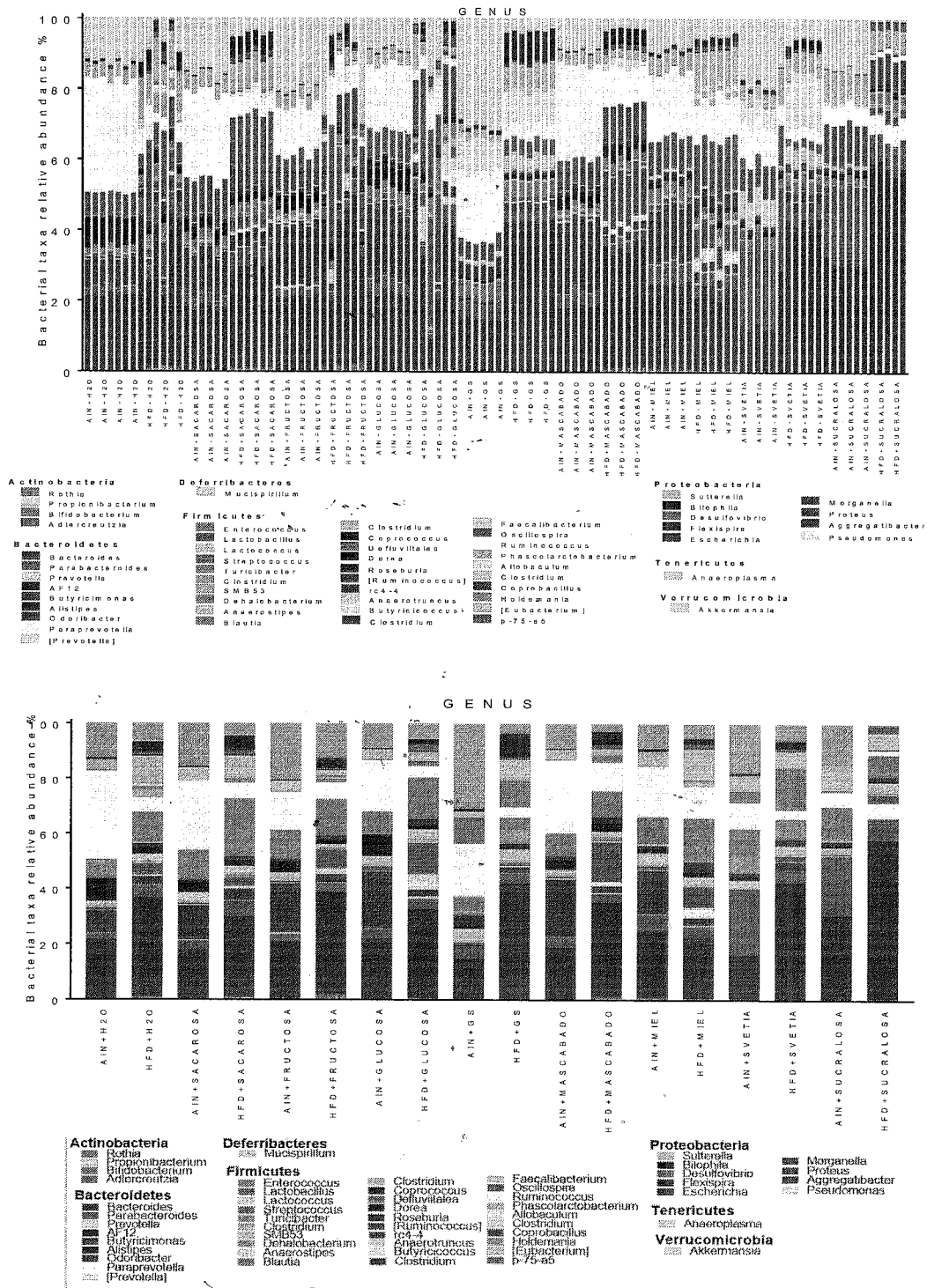


Figura 15. Determinación de los Generos mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

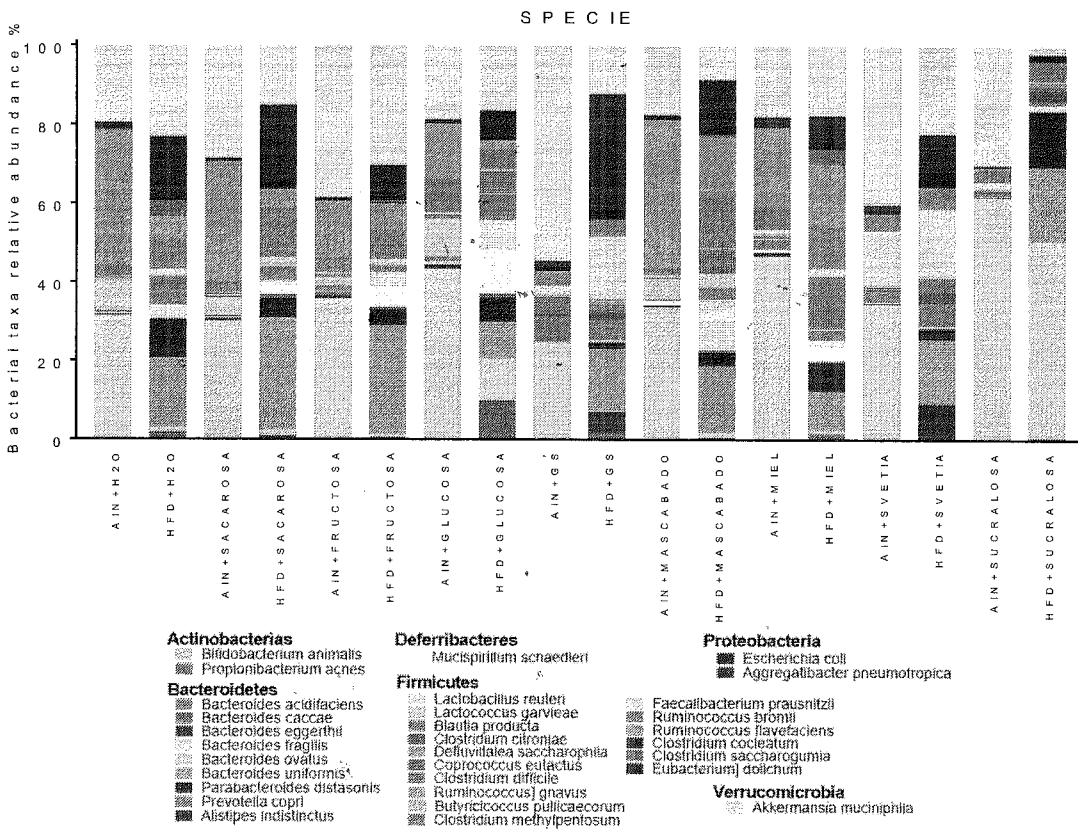
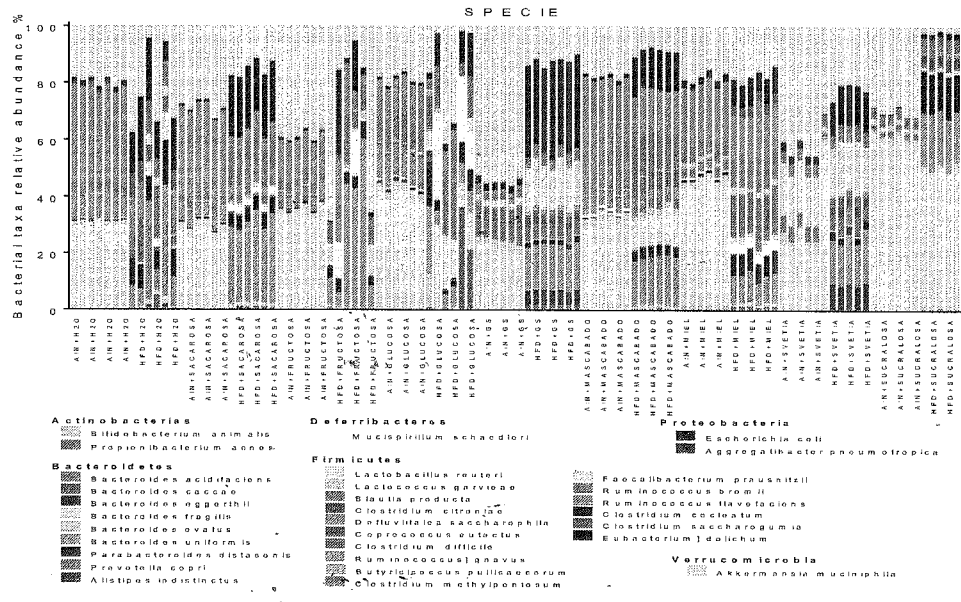


Figura 16. Determinación de los Specie mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal en ratas Wistar alimentadas con una dieta de caseína al 14% o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida, secuenciadas en la plataforma MiSeq

VI. Determinación de la expresión de genes y proteínas involucrados en la inflamación

Se evaluó la expresión relativa de TLR-4 (Figura 17) el cual es activado por PAMPs, principalmente el LPS, y este se encuentra en las placas de Peyer intestinales, interesantemente se observó un incremento en la expresión del mismo con la adición de grasa a la dieta, comportamiento similar al obtenido en la cuantificación de LPS sérico; sin embargo se profundizó en el estudio de la activación de esta vía mediante la medición del TLR 4 y TLR 2, cuyos ligandos principales son LPS y Peptidoglicano, respectivamente, mediante el uso de Western Blot, así como de una de las principales proteínas río abajo ($\text{NF}\kappa\beta$) en las diferentes secciones intestinales, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la figura 18.

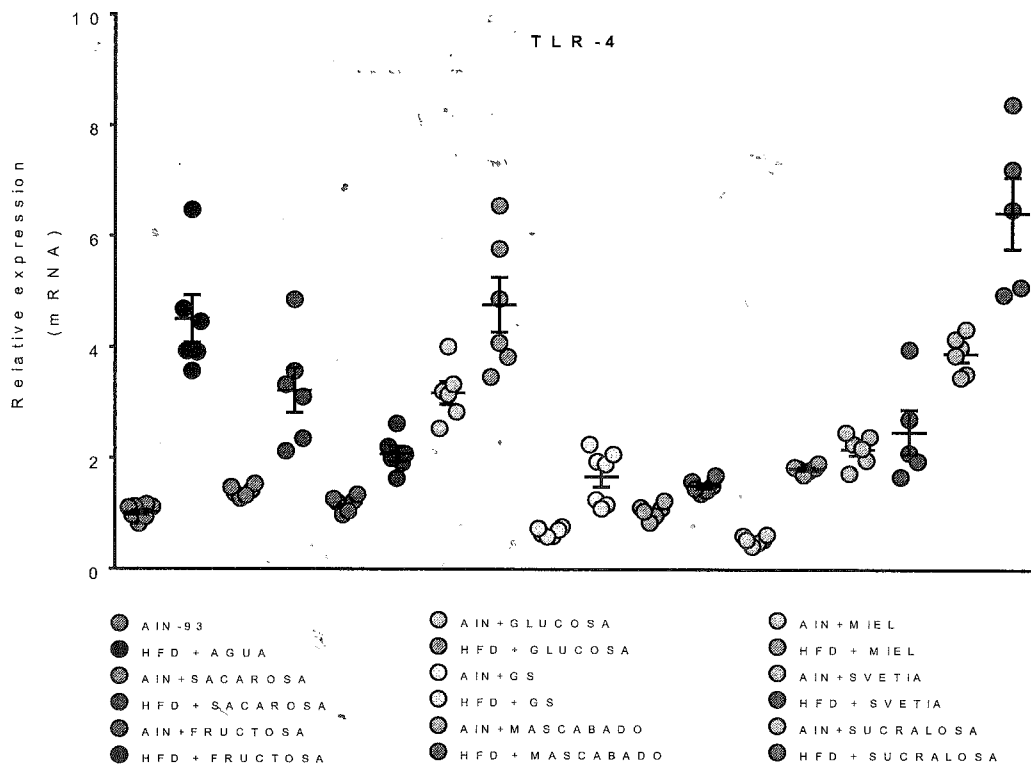
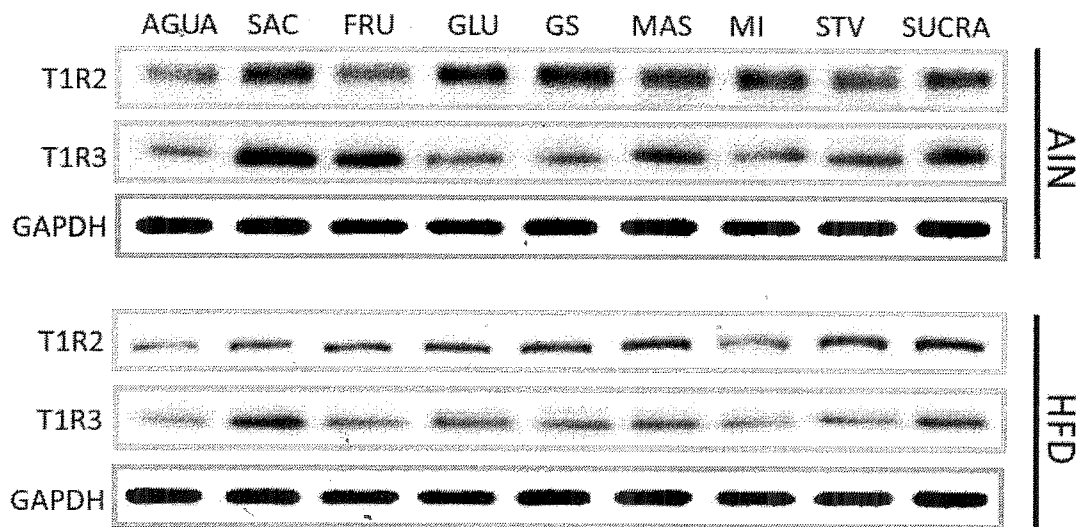


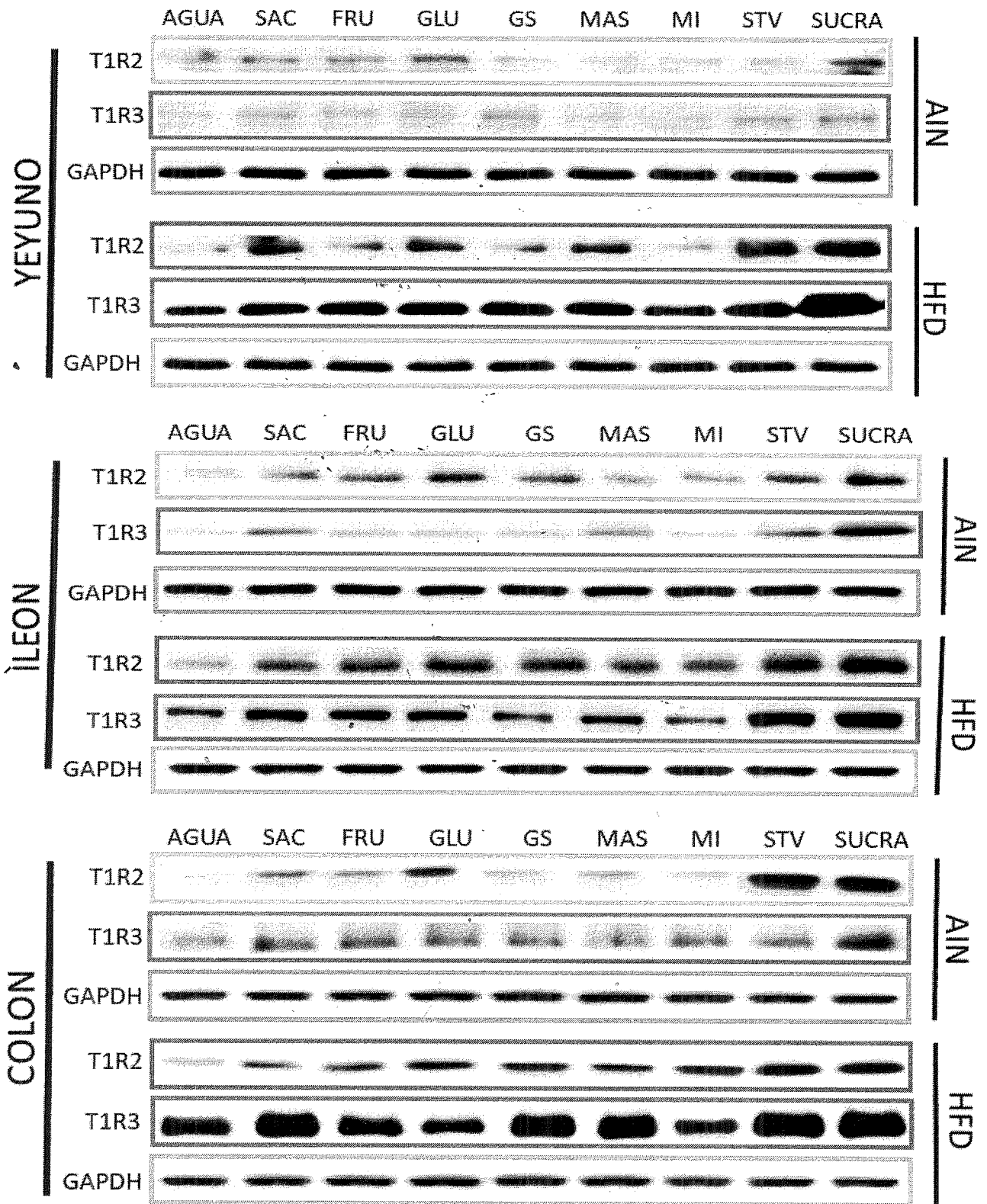
Figura 17. Determinación de la expresión génica de TLR4 en el intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes

Evaluación de los receptores de dulzor en lengua e intestino

En la actualidad existe una amplia variedad de edulcorantes, a percepción gustativa del sabor dulce de estos compuestos se lleva a cabo por un heterodímero de 2 subunidades proteicas, T1R2 (receptor gustativo tipo 1, miembro 2) y T1R3 (receptor gustativo tipo 1, miembro 3), los cuales son codificados por los genes TAS1R2 y TAS1R3, localizados en el cromosoma 1. T1R2 es el componente específico de la percepción del sabor dulce, ya que T1R3 a su vez está involucrado en la percepción del sabor umami. Éstos, T1R2 y T1R3 se expresan en el paladar y en las células gustativas de las papilas circunvaladas y foliadas de la lengua, sin embargo, T1R2 se ha detectado en otros tejidos clave para la regulación metabólica y la homeostasis energética, tales como el tracto gastrointestinal, el páncreas e hipotálamo, por lo cual se le ha considerado un receptor implicado en la ingesta de alimentos. En este estudio se evaluó la presencia de estos receptores tanto en lengua como en intestino ya que estudios han demostrado que tras la activación de estos receptores en células enteroendocrinas tiene 2 efectos: 1) Absorber mayor cantidad de glucosa vía SGLT-1 y 2) liberar una mayor cantidad de incretinas; por lo que la expresión de una mayor cantidad de estos puede explicar los cambios observados en los transportadores de glucosa, así como en las incretinas



Determinación de los receptores de dulzor en lengua de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida



Determinación de los receptores de dulzor en diferentes porciones de intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida

El protocolo ya se termino, estamos analizando los resultados, posteriormente escribiremos el articulo, por lo que pedimos una prorrogga de 6 meses con el objeto de que si nos piden algún experimento extra lo podamos llevar a cabo en tiempo.

Bibliografía

1. Flores M, Macias N, Rivera M, Lozada A, Barquera S, Rivera-Dommarco J, et al. Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight or obese. *J Nutr*. 2010;140(10):1869-73.
2. Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: *Neuroscience* 2010. *Yale J Biol Med*. 2010;83(2):101-8.
3. Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011;14(4):391-5.
4. Simon BR, Parlee SD, Learman BS, Mori H, Scheller EL, Cawthorn WP, et al. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *J Biol Chem*. 2013;288(45):32475-89.
5. Hofmann SM, Tschop MH. Dietary sugars: a fat difference. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1089-92.
6. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014;514(7521):181-6.
7. Gardana C, Simonetti P, Canzi E, Zanchi R, Pietta P. Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(22):6618-22.
8. Margolskee RF. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem*. 2002;277(1):1-4.
9. Fernstrom JD, Munger SD, Sclafani A, de Araujo IE, Roberts A, Molinary S. Mechanisms for sweetness. *J Nutr*. 2012;142(6):1134S-41S.
10. Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2014;17(4):379-85.

11. Moran AW, Al-Rammahi M, Zhang C, Bravo D, Calsamiglia S, Shirazi-Beechey SP. Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. *J Dairy Sci.* 2014;97(8):4955-72.

12. Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Hamano K, Medina J, Nagasawa M. Return of the glucoreceptor: Glucose activates the glucose-sensing receptor T1R3 and facilitates metabolism in pancreatic beta-cells. *J Diabetes Investig.* 2015;6(3):256-63.

Swartz TD, Duca FA, de Wouters T, Sakar Y, Covasa M. Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and sodium glucose luminal transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota. *Br J Nutr.* 2012;107(5):621-30.

PRODUCTOS FINALES

Estamos en el proceso de empezar a escribir el artículo, la estudiante de doctorado empezará a escribir su tesis alrededor de junio del 2019 ya que termina su doctorado hasta diciembre y tenemos una presentación en congreso en junio del 2018.

83 2.2. Biochemical Parameters

84 Serum glucose was analyzed with the autoanalyzer COBAS C11 (Roche, Basel, Switzerland). Insulin
85 by ELISA kit (Alpco Diagnostics, Salem, NH, USA), leptin was determined using commercial
86 ELISA kits (Abcam, USA).

87

88 2.3. Adipose Tissue Gene Expression

89 The gene expression was determined by real-time PCR. First, total RNA was extracted using
90 TRIzol, following the manufacturer's instructions. The mRNA abundance was measured by
91 real-time quantitative PCR using SYBR® Green assays (Roche), using 36B4 and cyclophilin as
92 housekeeping gene for normalization. All primer sequences for gene expression determination are
93 shown in Supplementary Table 1.

94

95 2.4. Western Blot Analysis

96 Total protein of pooled adipose tissue samples (n = 6) was extracted, quantified by Bradford assay
97 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and stored at -70 °C. The protein detection was performed by
98 electrophoresis in SDS-PAGE and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. All
99 blots were blocked with 3% BSA for 60 min at room temperature and incubated overnight at 4 °C
100 with the following antibodies: toll-like receptor 4 (TLR-4) (1:1000), nuclear factor-kappa B (NF-κB)
101 (1:1000), kinase c-Jun N-terminal (JNK) (1:1000), myeloid differentiation primary response 88 (MyD
102 88) (1:1000), total insulin receptor substrate (IRS) (1:750), phosphorylated IRS (p263y-IRS) (1:2000),
103 total protein kinase B (AKT)(1:2500) and phosphorylated AKT(1:5000). The blots were incubated
104 with anti-rabbit, anti-goat, or anti-mouse secondary antibodies conjugated with horseradish
105 peroxidase (1:15000). GAPDH (1:3500) was used to normalize the data. Images were analyzed with
106 a ChemiDoc™ XRS + System Image Lab™ Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The western
107 blot analysis was performed three times using independent blots.

108

109 2.5 Histological analysis.

110 Adipose tissue sections 4 μm thick were stained with hematoxylin and eosin. A morphological
111 analysis was performed using a Leica microscope (Leica DM750 Wetzlar, Germany). Adipocyte size
112 measurement was performed using AdipoSoft (ImageJ, 1.14 version, NIH, Bethesda, Maryland)

113

114 2.6. Statistical Analysis

115 The results were expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using
116 one-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test, using Prism 7.0 software (GraphPad, San
117 Diego, CA, USA); p < 0.005 was considered significant.

118 3. Results

119 3.1 Body weight and biochemical parameters

120 After 4 months of dietary treatment with sweeteners, rats fed with sucrose, sveltia or sucralose
121 gained significant more weight than those fed brown sugar, glucose or honey, whereas those fed
122 with SG, fructose or no sweetener in the water had the lowest weight gain (p=0.04). The presence of
123 HF in the diet significantly increased body weight in most of the groups with the exception of those
124 fed with sucralose or SG. Similar to body weight, rats fed with sucralose, sucrose or sveltia had the

125 highest serum glucose concentration than the rest of the groups. Those fed with glucose, fructose or
 126 brown sugar had higher serum glucose than those fed SG, honey or without sweetener. The
 127 addition of high fat in the diet increased serum glucose in rats fed sucralose, sucrose, SG, fructose
 128 or no sweetener. It is noteworthy, that rats fed with honey had the lowest serum glucose ($p < 0.001$).
 129 Interestingly, long term consumption of sucralose produced hyperinsulinemia followed by sucrose
 130 or svertia, whereas those fed brown sugar, honey, SG or no sweetener had the lowest serum insulin.
 131 Insulin concentration in rats fed sweeteners plus HF in the diet followed the same pattern than
 132 without HF. Unexpectedly, honey was the only sweetener that even in the presence of HF did not
 133 significantly increase insulin concentration. Although rats fed sucralose, sucrose or svertia had
 134 similar body weight, those fed with sucralose developed hyperleptinemia. Rats fed BS, honey or no
 135 sweetener showed the lowest serum leptin concentration. The presence of HF in the diet
 136 significantly increased serum leptin concentration in all groups, however, those fed sucralose,
 137 sucrose, svertia, glucose, fructose or no sweetener developed hyperleptinemia.

138

139 **Table 1.** Body weight and serum biochemical parameters of rats fed natural or artificial
 140 sweeteners with and without high fat

Group	Body Weight (g)	Glucose (mg/dL)	Insulin (ng/mL)	Leptin (ng/mL)
C+W	546.4 ± 12.6 ^c	79.19 ± 3.3 ^c	0.24 ± 0.05 ^h	3.92 ± 0.08 ^g
HF+W	628.2 ± 16 ^a	93.55 ± 3.7 ^{b,c}	2.40 ± 0.17 ^g	17.58 ± 0.24 ^d
C+10%S	680 ± 16.33 ^a	143.5 ± 3.5 ^{a,b}	5.00 ± 0.21 ^e	9.48 ± 0.43 ^e
HF+10%S	720.2 ± 3.5 ^a	174.8 ± 7.1 ^a	6.78 ± 0.24 ^b	35.62 ± 1.17 ^b
C+10%F	558.5 ± 1 ^b	115.4 ± 6.2 ^b	2.83 ± 5.4 ^g	6.92 ± 0.25 ^f
HF+10%F	587.2 ± 18.7 ^b	132.8 ± 2.4 ^{a,b}	5.39 ± 0.16 ^d	15.81 ± 0.3 ^d
C+10%G	589.7 ± 22.3 ^b	133 ± 5.7 ^{a,b}	1.72 ± 0.08 ^g	4.94 ± 0.15 ^g
HF+10%G	606.8 ± 27.3 ^{a,b}	137.9 ± 4.5 ^{a,b}	3.97 ± 0.05 ^f	22.78 ± 0.62 ^c
C+2.5%SG	562.2 ± 17.5 ^c	89.18 ± 2.6 ^{b,c}	0.28 ± 0.04 ^h	5.64 ± 0.26 ^e
HF+2.5%SG	540 ± 12.05 ^c	138.6 ± 6.9 ^{a,b}	1.72 ± 0.15 ^g	9.48 ± 0.37 ^e
C+10%BS	593.2 ± 6.5 ^b	108.4 ± 3.3 ^b	0.71 ± 0.09 ^h	3.63 ± 0.27 ^f
HF+10%BS	599.2 ± 10.73 ^{a,b}	122.2 ± 3.3 ^b	1.76 ± 0.12 ^g	7.75 ± 0.26 ^e
C+10%H	574.3 ± 18.11 ^b	85.7 ± 4.7 ^{b,c}	0.31 ± 0.03 ^h	3.62 ± 0.19 ^g
HF+10%H	591 ± 11.79 ^b	84.8 ± 4.7 ^{b,c}	0.61 ± 0.08 ^h	9.57 ± 0.29 ^e
C+10%SV	609 ± 19.26 ^{a,b}	138.7 ± 8.1 ^{a,b}	3.7 ± 0.11 ^f	8.41 ± 0.35 ^e
HF+10%SV	634.2 ± 19.29 ^a	141.4 ± 3.4 ^{a,b}	5.05 ± 0.20 ^e	27.21 ± 0.52 ^c
C+1.5%SU	603.3 ± 21.74 ^{a,b}	151.5 ± 2.7 ^a	6.44 ± 0.35 ^c	25.54 ± 1.32 ^c
HF+1.5%SU	540.8 ± 10.4 ^c	177 ± 6.5 ^a	10.6 ± 0.31 ^a	39.80 ± 0.74 ^a
Sweetener	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Fat	0.0349	<0.001	<0.001	<0.001
p	0.0036	<0.001	<0.001	<0.001

141 C, control diet; HF, high fat diet; W, water; S, sucrose; F, fructose; G, glucose; SG, steviol glycosides;
 142 BS. Brown sugar; H, honey; SV, svertia; SU, sucralose

143 3.2 Tongue and intestine TIR2, TIR3, SGLT-1, GLUT-2 and incretins after the consumption of
 144 natural and artificial sweeteners with and without a high fat diet.

145

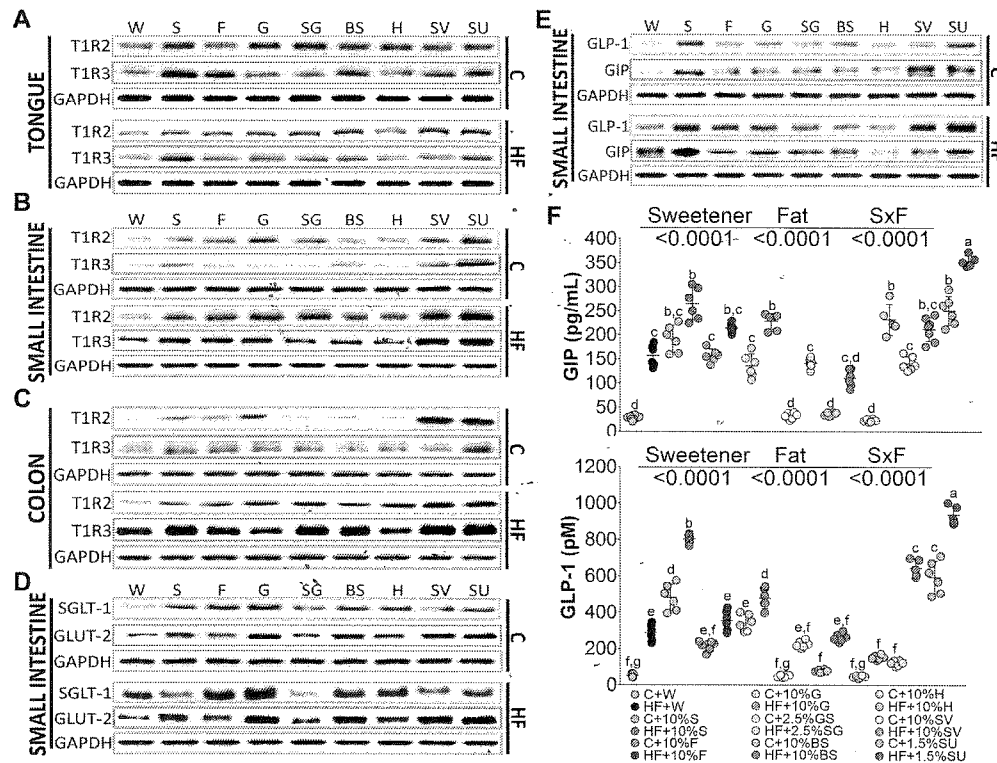
146 Tongue taste receptors T1R2 and T1R3 serve as sensors of different types of sweeteners. T1R2
147 was induced by SG followed by glucose, sucrose, honey, brown sugar, svertia and finally sucralose
148 by 153%, 120%, 102%, 94%, 83%, 66% and 57% respectively compared to the control group (C+W).
149 Interestingly, the presence of high fat in the diet reduced in a higher extent the abundance of T1R2,
150 Figure 1A. T1R3 was significantly more stimulated by sucrose than T1R2. In addition to sucrose,
151 T1R3 was stimulated by fructose, brown sugar and sucralose by 2.5-, 1.5-, 1.3- and 1.2-fold
152 respectively compared to the C+W group. Also, T1R3 was reduced by the presence of HF in the diet
153 with the exception of glucose and SG, Figure 1A.

154

155 T1R2 and T1R3 in the intestine may play a role in the post-oral absorption and metabolism of
156 sweeteners and could stimulate the secretion of incretins, that in turn regulate the glucose
157 transporters and insulin secretion¹⁸. The abundance of T1R2 in small intestine and colon followed a
158 similar pattern. Sucralose and SG stimulated the abundance of T1R2 in a higher extent than the rest
159 of the sweeteners followed by glucose, fructose and sucrose and in a lower extent by BS and H,
160 Figure 1B. Sucralose, svertia and sucrose significantly induced the abundance of T1R3. On the
161 contrary to the tongue, T1R2 and T1R3 abundance was stimulated by the presence of HF in the diet
162 in small intestine and mainly in the colon, Figure 1C. Interestingly, sodium-dependent glucose
163 cotransporter (SGLT) abundance, which is found in the enterocytes of the small intestine, was
164 stimulated by glucose, fructose, BS, sucrose followed by H, sucralose, SG and SV by 4.6-, 3.3-, 2.5-,
165 2.0-, 1.6-, 1.5-, 1.2- and 0.9-fold respectively. The presence of high fat in the diet significantly
166 increased the abundance of SGLT-1 mainly by glucose, fructose followed by BS, sucralose and H by
167 5.7-, 4.1-, 3.2-, 2.7- and 2.2-fold respectively compared to the control group C+W. The glucose
168 transporter 2 (GLUT2), which facilitates movement of glucose across cell membrane, was induced
169 by all sweeteners with the lowest abundance by SG, however the presence of a high fat diet
increased its abundance by all the sweeteners with the lowest induction by SG, Figure 1D.

170

171 Sweeteners specifically stimulate taste receptors that in turn can regulate the release of the
172 incretins glucose insulinotropic peptide (GIP) and glucagon like peptide (GLP-1)¹⁹. GLP-1 in the
173 small intestine was induced mainly by sucrose and sucralose by approximately 4.1- and 3.5-fold
174 respectively. Addition of high fat to the diet increased the abundance of GLP-1 by 2.2-fold in
175 comparison with the C+W group. Consumption of a high fat with sucralose, svertia, sucrose,
176 glucose, fructose and SG increased significantly GLP-1 protein abundance by 8.7-, 6.1-, 5.9-, 4.1-, 3.9-
177 and 3.2-fold respectively. Interestingly, H showed no increase in GLP-1 abundance even in the
178 presence of a high fat diet. GIP was induced by SV, sucralose and sucrose by 15.4-, 11.4- and
179 10.3-fold, and the presence of high fat in the diet induced in a larger extent GIP abundance by
180 sucrose, sucralose, and glucose by 21.1-, 14.9-, 12.5-fold respectively compared to the control group
181 C+W, Figure 1E. These results were confirmed when these incretins were measured in serum.
182 Sucralose and sucrose were the main stimulators of GIP and GLP-1 followed by fructose, glucose,
183 SV, and finally by SG, BS or H. The presence of high fat in the diet showed an additive effect on GIP
184 mainly by sucralose and sucrose indicating that not only the type of sweetener but the presence of
saturated fat play an important role in the circulating levels of incretins, Figure 1E, F.



185

186

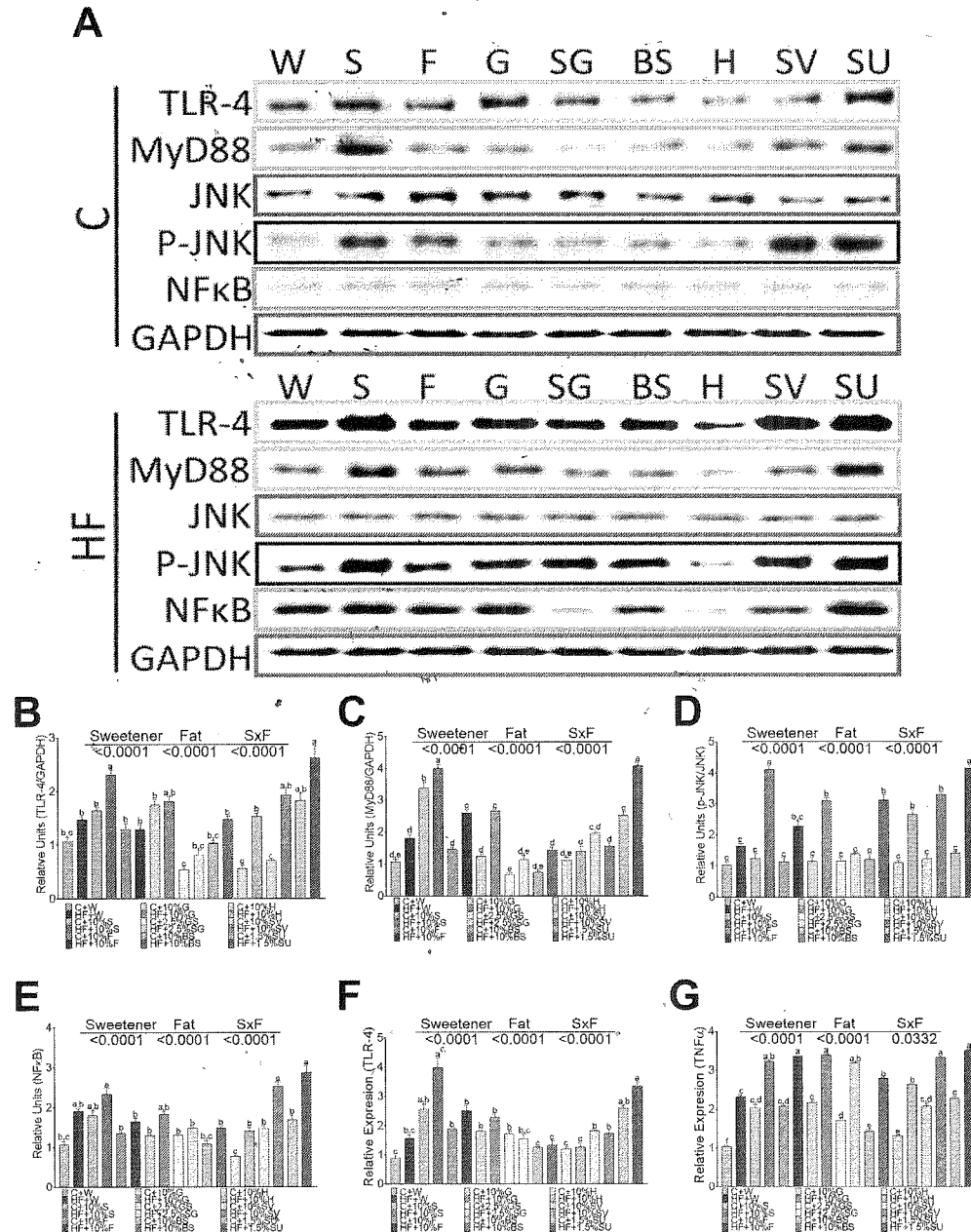
187 **Figure 1.** Taste receptors TIR2 and TIR3 in tongue (A), small intestine (B) and colon (C); glucose
 188 transporters (D) and incretins (E) in small intestine. Serum levels of glucose insulinotropic peptide
 189 (GIP) (F) and glucagon like peptide (GLP-1) (G) of rats fed with different sweeteners with or
 190 without high fat diet. The data are expressed as the mean \pm SEM (n = 6). Results were considered
 191 statistically significant at $p < 0.05$. The differences between groups are indicated by letters, where a
 192 $> b > c > d > e > f > g$.

193

194 **3.3 Inflammatory pathways are differentially regulated by the type of sweeteners and high fat.**

195 Adipocytes may play an important role in inflammation and insulin resistance via TLR
 196 signaling after the consumption of sweeteners. Rats fed with sucrose, sucralose and glucose showed
 197 the highest expression of RNA and protein abundance of TLR4 followed by fructose, Figure 2A, B,
 198 F. The lowest expression of TLR4 was observed with BS and honey. It has been demonstrated that
 199 the interaction of TLR4 with MyD88 triggers a downstream signaling cascade, leading to activation
 200 of the transcription factor NF- κ B pathway and reciprocally induces activation of the c-Jun
 201 N-terminal kinase (JNK) inducing a proinflammatory state²⁰. In the present study, MyD88 followed
 202 a similar pattern than TLR4, Figure 2A, C. The highest protein abundance of MyD88 was observed
 203 with sucrose followed by sucralose. JNK was highly phosphorylated by SV, sucralose, sucrose and
 204 fructose and the addition of a high fat diet significantly increase p-JNK with the exception of H,
 205 Figure 2 A, D. Interestingly, there was no differential induction of NF κ B protein abundance by any
 206 sweetener, however the presence of high fat in the diet induced in a higher extent the protein
 207 abundance of NF κ B by sucralose followed by sucrose and there was no stimulation of NF κ B by the
 208 groups fed SG and H, Figure 2 A, E. These results indicated that both pathways regulated by MyD
 209 88 are differentially activated by sweeteners, and in a greater extent by saturated fat. Finally, NF κ B

210 and JNK play an important role in the production of proinflammatory cytokines. In fact, cytokine
 211 TNF α was stimulated mainly by sucralose, SV, sucrose, glucose and fructose and in a lesser extent
 212 by SG, BS and H, and the addition of high fat significantly increased the gene expression of this
 213 cytokine.
 214



215

216

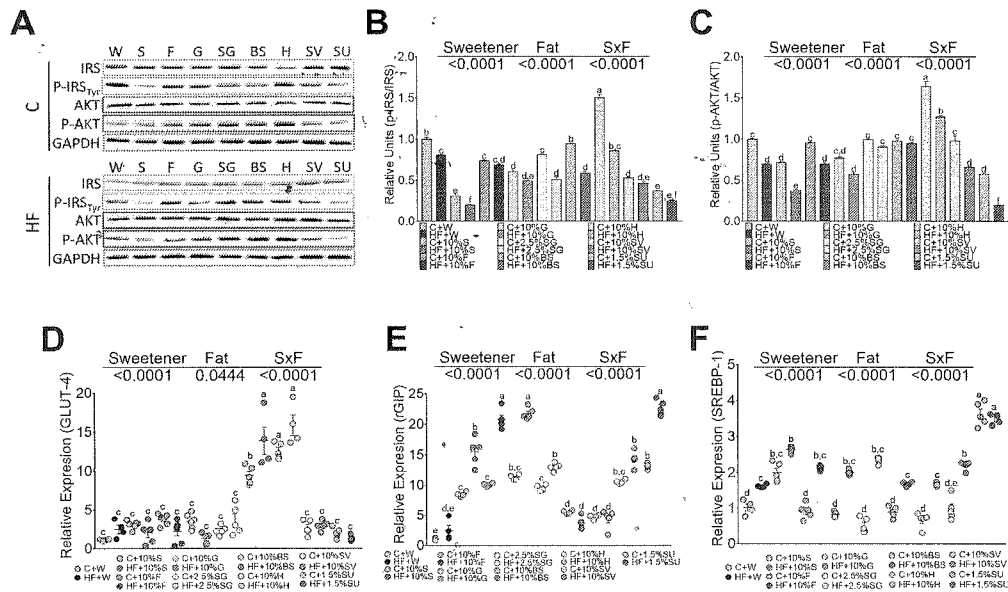
217 **Figure 2.** Relative protein abundance and gene expression of inflammation markers in white
 218 adipose tissue of rats fed different sweeteners with and without high fat diet (A); Protein

219 abundance of toll like receptor 4 (TLR-4) (B), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) (C); c-Jun
 220 N-terminal kinase (JNK)(D); Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB)
 221 (E); Relative expression of TLR4 (F) and tumor necrosis factor alpha (TNF α)(G). The data are
 222 expressed as the mean ± SEM (n = 6). Results were considered statistically significant at p < 0.05. The
 223 differences between groups are indicated by letters, where a > b > c > d > e.

224
 225

226 3.4 Insulin signaling after the consumption of sweeteners.

227 Incretins secreted from enteroendocrine cells may play a critical role in the development of obesity
 228 by regulating insulin signaling in adipocytes depending on the type of sweetener consumed. To
 229 further investigate the insulin-mimetic effects of GIP via activation of AKT and its effect on GLUT4,
 230 we studied the effect of the different sweeteners. Honey, BS and SG showed an adequate insulin
 231 signaling by maintaining the phosphorylation of IRS and AKT, Figure 3A-C, however, sucralose
 232 and sucrose showed a significant decrease in the phosphorylation of pT263^{IRS1} and pS473^{AKT}, Figure
 233 3A- C. The addition of high fat in the diet decreased the phosphorylation of IRS and AKT with the
 234 exception of H and BS, Figure 3A-C. As a result, the expression of GLUT 4 was induced only by BS
 235 and H, Figure 3D. These results indicate that sweeteners specifically regulate insulin signaling and
 236 the presence of high fat in the diet significantly decreased the insulin signaling. On the other hand,
 237 consumption of sucralose and in a lesser extent sucrose, produced hyperinsulinemia and
 238 significantly increased lipogenesis mediated by SREBP-1, Figure 3E.



239
 240

241 Figure 3. Relative protein abundance of insulin signaling pathway in white adipose tissue.
 242 IRS, pT263^{IRS1}, AKT, and pS473^{AKT} in rats fed different sweeteners with or without high fat diet
 243 (A); phosphorylated IRS/total IRS ratio (B); phosphorylated AKT/total AKT ratio (C); relative
 244 expression of glucose transporter type 4 (GLUT 4) (D), GIP receptor (E) and sterol regulatory
 245 element-binding protein 1 (F). The data are expressed as the mean ± SEM (n = 6). Results were
 246 considered statistically significant at p < 0.05. The differences between groups are indicated by
 247 letters, where a > b > c > d > e.

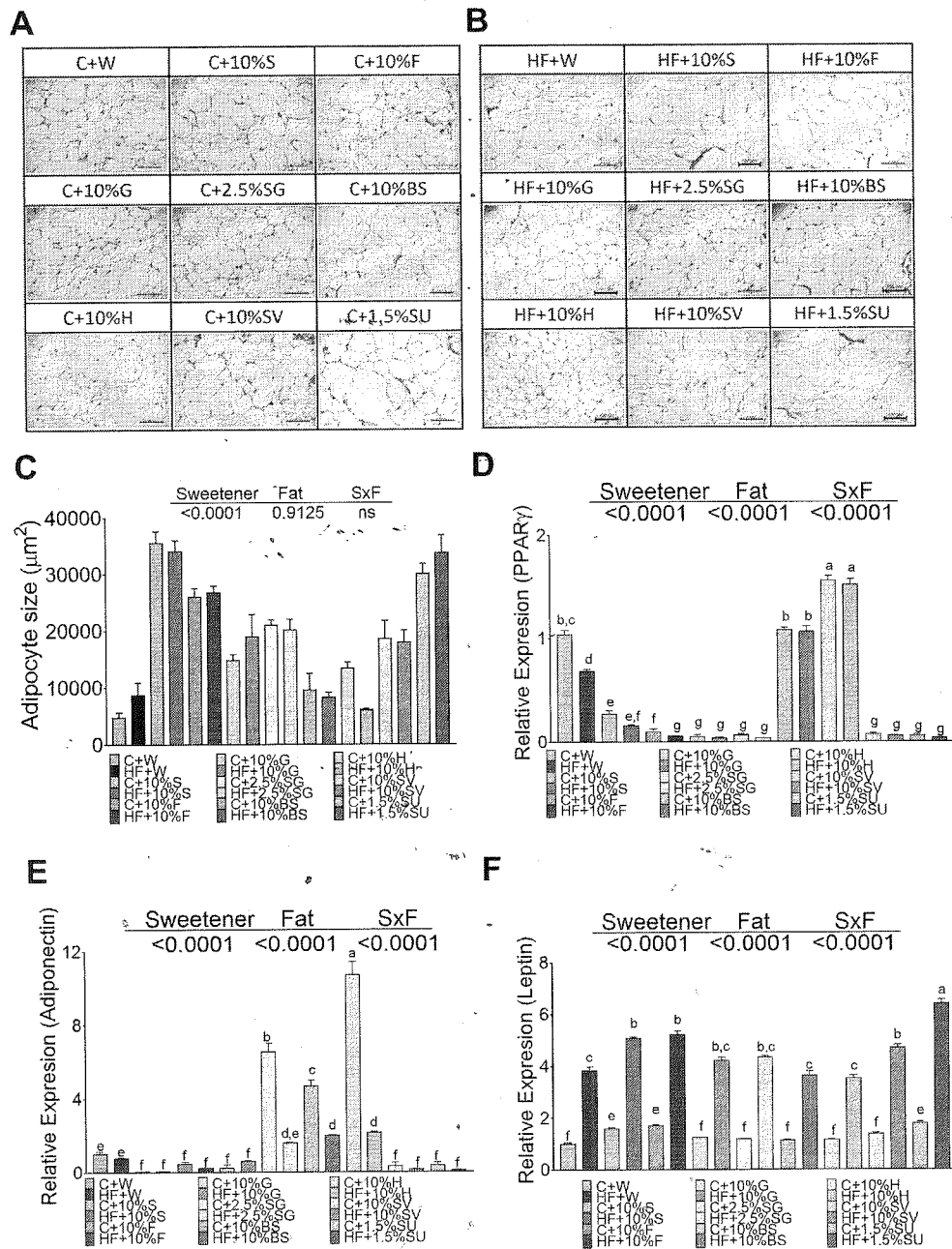
248

249

250 3.5 The type of sweetener and high fat diet differentially modify the functionality of the adipocyte
251 in white adipose tissue.

252 The adipocyte size of rats fed control diet without sweetener had a size of approximately 4743 μm^2 ,
253 and the consumption of a high fat doubled the size of the adipocytes. Interestingly, the
254 consumption of specific sweeteners had a significant impact in the size of the adipocytes. Rats fed
255 sucrose and sucralose showed the highest size of adipocytes, approximately 7.5- and 6.3-fold higher
256 compared to those fed the control diet, whereas the lowest size was seen in rats fed H and BS,
257 Figure 4A, C. The addition of high fat in the diet had no significant effect on the size of the
258 adipocyte, Figure 4 B, C. Almost all sweeteners decreased the expression of PPAR γ , a gene involved
259 in adipogenesis, and with some sweeteners, the addition of a high fat diet further decreased the
260 expression of this gene. Surprisingly, this effect was not observed with BS, but particularly with
261 honey, Figure 4D. Interestingly, the gene expression of adiponectin was significantly low in rats fed
262 all the sweeteners with the exception of SG, H and BS that increased adiponectin mRNA abundance
263 by 6.4-, 10.5- and 4.3-fold respectively, however the addition of a high fat diet significantly reduced
264 the expression of adiponectin. Leptin is an adipokine that has been shown to increase with fat mass,
265 and our results showed that all sweeteners had a low impact on the leptin concentration, however
266 the presence of a high fat diet significantly increased leptin mRNA abundance with all sweeteners
267 mainly with sucralose that had a 2-6 -fold increase with respect to the sweetener alone followed by
268 sucrose, fructose, SV, glucose, SG and honey.

269



270

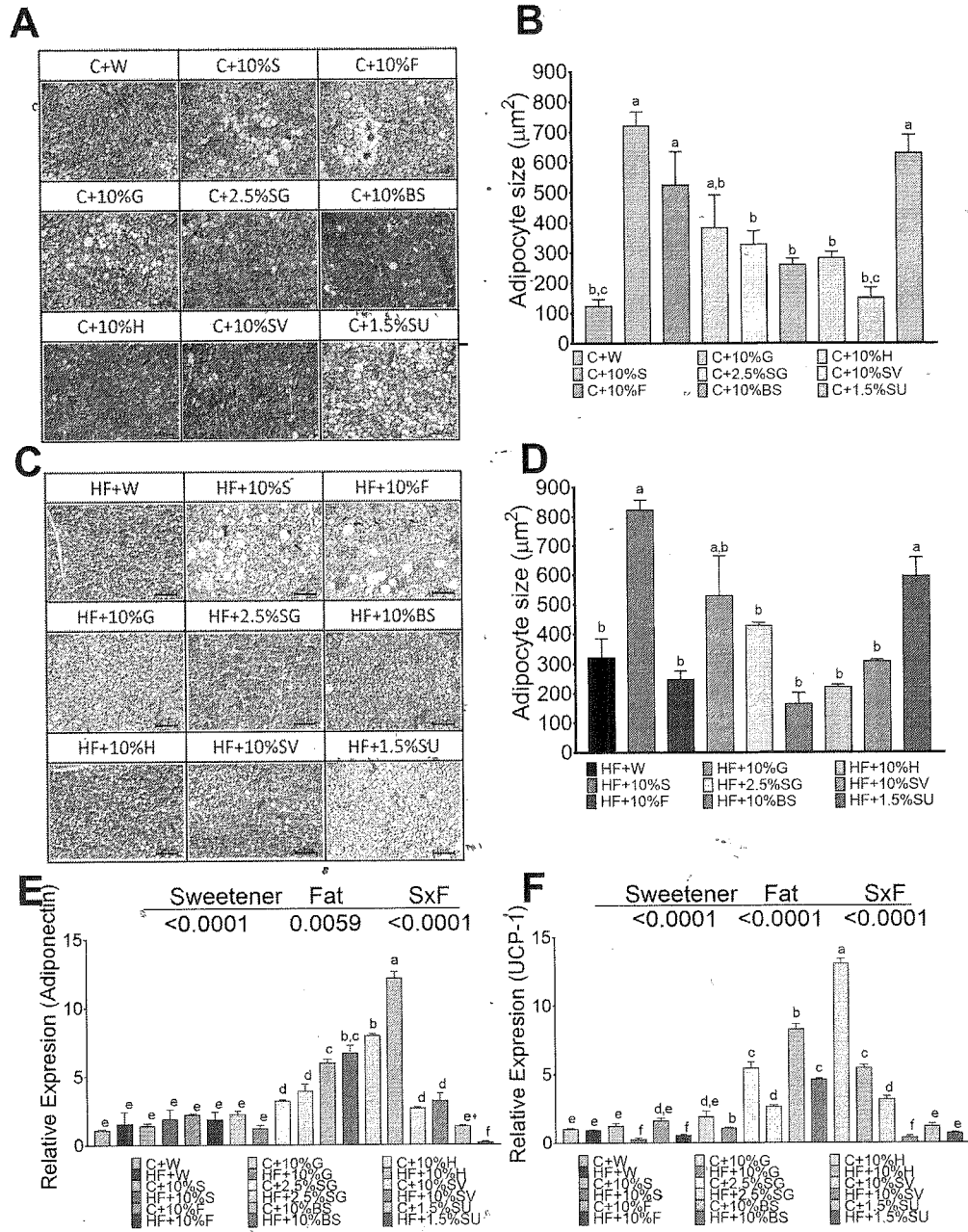
271 **Figure 4.** The type of sweetener and high fat diet differentially modify the functionality of the
 272 adipocyte in white adipose tissue. Hematoxylin-Eosin staining (HE) of white adipose tissue of rats
 273 fed different sweeteners with control (A) or high fat diet (B); adipocyte size (C); mRNA relative
 274 expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) (D), adiponectin (E) and
 275 leptin (F). The data are expressed as the mean \pm SEM (n = 6). Results were considered statistically
 276 significant at p < 0.05. The differences between groups are indicated by letters, where a > b > c > d >
 277 e.

278

279

280 3.6 Sweeteners differentially regulate gene expression of adiponectin and UCP-1 in BAT.

281 The size of the brown adipocytes in control rats without sweetener was around $124 \mu\text{m}^2$. Animals
282 fed with sucrose ($720 \mu\text{m}^2$), sucralose ($630 \mu\text{m}^2$) or fructose ($630 \mu\text{m}^2$) showed the biggest brown
283 adipocyte size followed by glucose and SG, and the lowest size was observed for svetia ($150 \mu\text{m}^2$),
284 brown sugar ($261 \mu\text{m}^2$) and honey ($283 \mu\text{m}^2$), (Figure 5A, B). Interestingly, the histological analysis
285 revealed the presence of large lipid droplets in the groups of rats fed with sucralose, sucrose,
286 fructose and glucose indicating a possible whitening of the adipocytes (Figure 5A). The addition of
287 high fat content in the diet significantly increased the adipocyte size mainly in rats fed sucrose,
288 glucose, SG and svetia (Figure 5 C, D). Similar to the WAT, only the groups fed with H, BS and SG
289 showed the smallest size of adipocyte (Figure 5D). Also, as observed in WAT, the highest levels of
290 adiponectin (10-fold) were observed in H, BS and SG (Figure 5E). Interestingly, rats fed with SG, BS
291 or honey significantly increased uncoupled protein- (UCP-1), a thermogenesis marker, however the
292 presence of high fat in the diet significantly decreased UCP-1 mRNA abundance (Figure 5F).



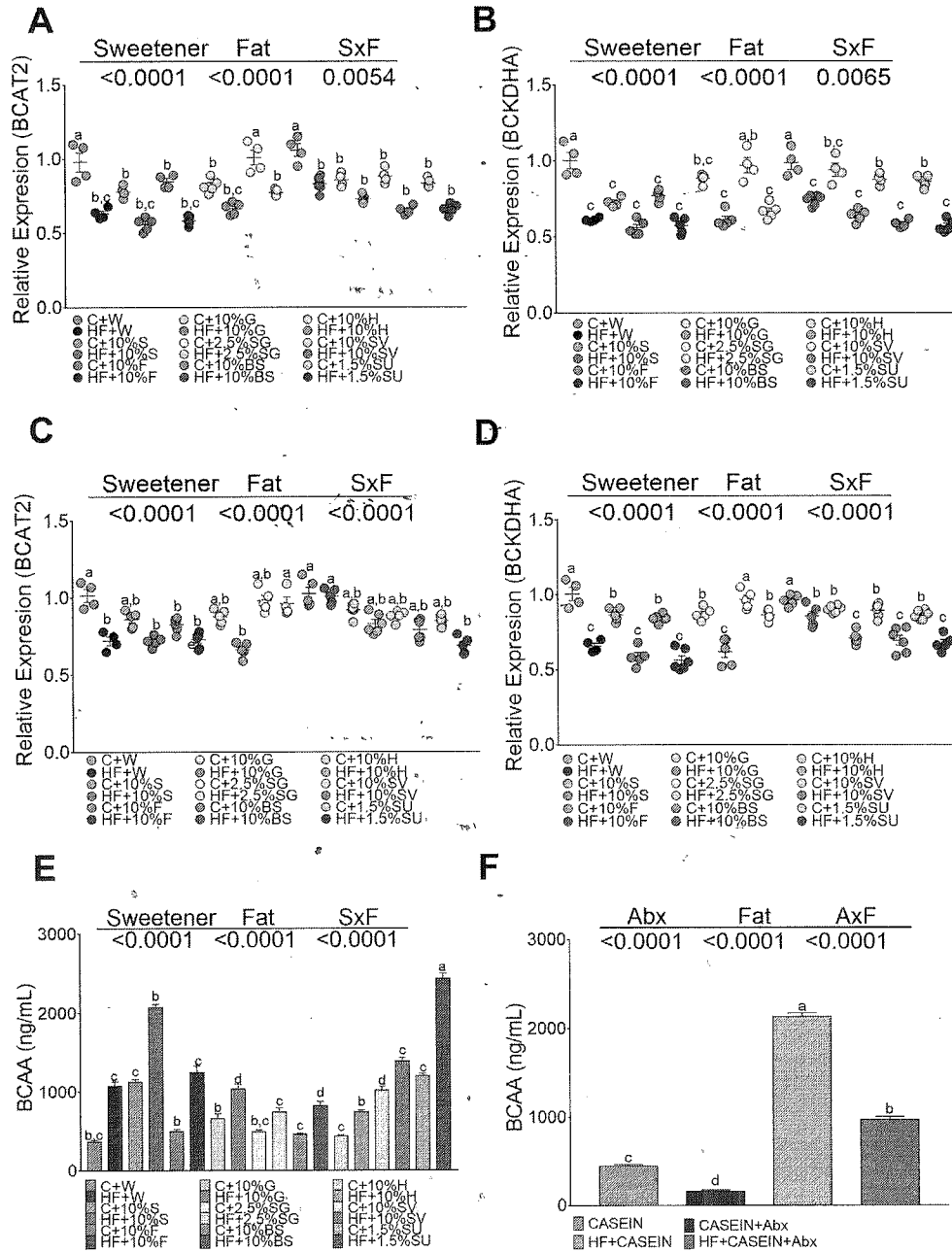
293

294

295 **Figure 5.** Effect of type of sweeteners on histological morphology and expression of adiponectin
 296 and UCP-1 in brown adipose tissue. Hematoxylin-Eosin staining (HE) of BAT of rats fed different
 297 sweetener with control (A) or high fat diet (C). Brown adipocyte size (B, D); Relative expression of
 298 adiponectin (E) and uncoupling protein 1 (UCP-1) (F). The data are expressed as the mean \pm SEM (n
 299 = 6). Results were considered statistically significant at $p < 0.05$. The differences between groups are
 300 indicated by letters, where $a > b > c > d > e$.
 301

302 3.7 High fat diet and specific sweeteners increased the concentrations of branched chain amino acids.
303 Adipose tissue can metabolize substantial amounts of branched chain amino acids (BCAA), and it
304 has been reported an increase of these amino acids during obesity. For this reason we measured
305 serum branched chain amino acid (BCAA) concentration in rats fed the different sweeteners with
306 and without the presence of a high fat diet. Animals fed control diet had serum BCAA levels in the
307 range of 400 ng/mL, whereas the consumption of sucrose or sucralose increased by approximately
308 3-fold BCAA concentration, and rats fed with SG, honey and brown sugar presented the similar
309 levels than the control group. The addition of only fat in the diet significantly increased by 1.9-fold
310 the BCAA concentration and the combination of sucrose or sucralose with HF increased by 5.6- and
311 5.5-fold the concentration of these amino acids respectively. In the rest of the groups, the presence
312 of fat in the diet had an additive effect on serum BCAA concentration, Figure 6E. In order to explain
313 the increase of these amino acids, we measured the gene expression of the enzymes involved in the
314 catabolism of BCAA, BCAT and BCKD, in adipose tissue. The results showed similar expression of
315 both enzymes in WAT (Figure 6A,B) and BAT(Figure 6C,D) with all sweeteners, but significantly
316 decreased their expression in the presence of a high fat diet independently of the type of sweetener.
317 However, the decrease in the expression of BCAT and BCKDH did not explain the elevation of
318 BCAA concentration in serum. Thus, a group of rats was fed a control diet and other group was fed
319 a high fat diet, and after 5 weeks of dietary treatment, rats were given antibiotics in the drinking
320 water for one month. This treatment produced a significant decrease in the levels of BCAA by 64%
321 in the control group and by 55% in the high fat group (Figure 6F) indicating that the gut microbiota
322 produced a significant amount BCAA.

323



324

325

326 Figure 6. mRNA abundance of amino acid catabolizing enzymes in white adipose tissue (WAT)
 327 and brown adipose tissue (BAT), and circulating branched chain amino acids (BCAA) in rats fed
 328 different sweeteners with and without high fat diet. mRNA abundance of branched chain
 329 aminotransferase-2 (BCAT2) (A) and branched chain alpha keto acid dehydrogenase (BCKDH) (B)
 330 in WAT and BAT (C,D). Serum BCAA (valine, isoleucine, leucine) (E). Effect of antibiotics on serum
 331 BCAA, (F). The data are expressed as the mean ± SEM (n = 6). Results were considered statistically

332 significant at $p < 0.05$. The differences between groups are indicated by letters, where $a > b > c > d$
333 $> e$.

334

335 4. Discussion

336 With the current problems of obesity, new sweeteners with low calories have been
337 incorporated; this situation has created confusion for the consumer about what type of sweetener is
338 the best option. In addition to this, the high consumption of saturated fat has been associated with
339 an increased risk of coronary heart disease. Thus, it is difficult to know if the responsible for obesity
340 is the type of sweetener, the high saturated fat or the combination of sweetener and fat²¹.

341 Our results showed that persistent consumption of sweeteners, particularly sucrose or
342 sucralose, stimulated T1R2 and T1R3 taste receptors in a greater extent, whereas honey stimulated
343 these receptors similar to the control group. Interestingly, the addition of a high fat diet reduced the
344 abundance of these receptors in tongue independently of the type of sweetener. Contrary to the
345 tongue, in small intestine T1R2 was more activated by sucralose, svertia and glucose, whereas T1R3
346 was activated mainly by sucralose and svertia, a similar pattern was observed in colon. Interestingly,
347 the addition of high fat in the diet stimulated in a greater extent the protein abundance of T1R2 and
348 T1R3 in the small intestine and colon, mainly by sucralose, svertia, and glucose and in a lesser extent
349 by honey. The activation of these taste receptors in the intestine promotes the glucose absorption
350 from the lumen into the epithelial cells by the sodium glucose luminal transporter-1 (SGLT1)
351 located in the apical cell membrane. SGLT1 was stimulated by glucose, fructose, BS and sucrose and
352 in a lesser extent by SG and svertia. Interestingly, the abundance of GLUT2 was also increased with
353 all sweeteners with the exception of SG, resulting in lower serum glucose and insulin concentration
354 in this group. Interestingly the presence of fat in the diet increased the intestinal abundance of
355 GLUT2 in the small intestine. These transporters play a role as glucose sensors in enteroendocrine
356 cells contributing to glucose-induced secretion of the incretins GIP and GLP-1²². Consumption of
357 sucrose or sucralose significantly increased the abundance of GLP-1 and GIP in the intestine, and
358 the addition of fat in the diet had an additive effect on GIP and GLP-1 that was reflected in serum
359 GIP and GLP-1 concentrations with the exception of honey, SG and BS. In addition to its role as the
360 primary mediator of the enteroinsular axis, GIP may play a critical role in the metabolism of the
361 adipocyte²³. The adipocyte GIP receptor was significantly induced by sucralose, svertia, glucose and
362 sucrose, and in a lesser extent by BS and honey. Like insulin, GIP induces the activation of the
363 serine/threonine kinase protein kinase B (Akt/PKB) pathway, however, hyperinsulinemia and
364 hypersecretion of GIP as seen after the consumption of sucralose or sucrose with a high fat diet
365 reduced the insulin signaling by reducing the phosphorylation of IRS_{tyr} and Akt, indicative of
366 insulin resistance, and interestingly honey was the only sweetener that increased the
367 phosphorylation of IRS and Akt, indicative of a better insulin signaling. The inactivation of Akt, in
368 turn, decreased the membrane translocation of glucose transporter (GLUT4), leading to a reduced
369 adipocyte glucose uptake producing hyperglycemia, mainly observed in the groups fed with
370 sucralose and sucrose. GIP is known to increase fat accumulation and aggravate obesity²⁴, in fact,
371 we observed that the area of the adipocytes was significantly larger in rats fed with sucrose and
372 sucralose with and without high fat in the diet that was associated with higher circulating levels of
373 GIP. The increase in adipocyte size in the group fed with sucralose and sucrose was aggravated by
374 stimulation of lipogenesis induced by hyperinsulinemia via SREBP-1, mainly by sucralose.
375 Remarkably, the group fed with honey showed the smallest adipocytes and reduced lipogenesis
376 even in the presence of high fat in the diet that was associated with the highest expression of
377 PPAR γ and adiponectin, indicative of an adequate adipocyte differentiation. Enlarged adipocytes
378 recruit macrophages and promote inflammation and the release of factors that produce insulin
379 resistance. The TLR4 signaling pathways are the main triggers of the obesity-induced inflammatory
380 response²⁵. Studies indicate that saturated fatty acid can induce inflammation by activating the
381 TLR4 signaling pathway^{25, 26}. Sucralose, sucrose and glucose and the addition of high fat diet

382 increased the abundance of this receptor by 144.6%, 115.5% and 68.1%, respectively compared with
383 the control group, indicative of a stimulation of inflammatory pathways. Honey and SG showed the
384 lowest abundance of TLR4. MyD 88 was increased by sucrose and sucralose independently of the
385 presence of fat in the diet. The cJun-N-terminal-kinase (JNK) has been associated with insulin
386 resistance and the activation of the transcription factor NFκB. Rats fed with sucrose, sucralose and
387 svetia increased phosphorylation of JNK with and without fat in the diet with the exception of
388 honey. It is noteworthy that only rats fed high fat diet increased the protein abundance of NFκB
389 with the exception of honey or SG. NFκB in turn stimulated proinflammatory cytokine production,
390 in particular TNFα. Interestingly, only the high fat diet stimulated the gene expression of TNFα by
391 125.3% with respect to the control group, and the combination of high fat plus any sweetener
392 increased by approximately 70% even more the expression of TNFα. An increase in NFκB inhibits
393 PPARγ function, this in turn inhibits adipogenesis promoting hypertrophy of adipocytes as
394 observed in rats fed sucrose or sucralose. BS and particularly honey showed the opposite effect
395 maintaining insulin sensitivity, even in rats fed high fat diet. Insulin resistance has been associated
396 with high levels of BCAA in humans ²⁷, in this study, the groups fed sucrose or sucralose showed
397 the highest concentration of serum BCAA with the exception of honey, SG and BS. Finally, honey
398 and BS maintained the phenotypic characteristics of brown adipose tissue with a significant
399 increase in UCP1.

400 Although additional studies will be necessary in humans to fully characterize the complex
401 nature and the biological significance of each sweetener, the present work demonstrated that honey
402 has a protective effect in the development of obesity, maintains insulin sensitivity and low levels of
403 serum glucose and insulin. In addition, the consumption of honey increased the functionality of the
404 adipocyte by increasing adiponectin and PPARγ in WAT, UCP-1 in BAT an indicator of
405 thermogenesis, and reducing the inflammatory state mediated by TLR4. These findings found in
406 honey may be due in part to the particular composition of the honey. Honey only contains 1%
407 sucrose and other monosaccharides such as glucose and fructose, around 150 polyphenolic
408 compounds with antioxidant capacity^{28, 29} that could be able to maintain the adipocyte functionality.
409

410 Supplementary materials: Table S1: Primers used in real time PCR.

411 **Author Contributions:** N.T. and A.T. designed the research; M.S.-T., J.M.-M. conducted the research;
412 N.T., A.R.T., M.S.-T. and J.M.-M., analyzed the data; and N.T., A.R.T., wrote the manuscript. N.T.
413 had primary responsibility for the final content of the manuscript. All of the authors read and
414 approved the final manuscript.

415 **Funding:** This research was funded by CONACYT, grant number CB-257339 (to NT)

416 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest

417

418

419 **References**

- 420 1. USDA Sugar and sweeteners yearbook tables.
421 <https://www.ers.usda.gov/data-products/sugar-and-sweeteners-yearbook-tables.aspx> (accessed January 29,
422 2019).
- 423 2. Pereira, M. A., Sugar-sweetened and artificially-sweetened beverages in relation to obesity risk. *Adv Nutr*
424 **2014**, *5* (6), 797-808.
- 425 3. Fernstrom, J. D., Non-nutritive sweeteners and obesity. *Annu Rev Food Sci Technol* **2015**, *6*, 119-36.
- 426 4. Tappy, L., Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. *J Exp Biol*
427 **2018**, *221* (Pt Suppl 1).
- 428 5. Bornemann, V.; Werness, S. C.; Buslinger, L.; Schiffman, S. S., Intestinal Metabolism and
429 Bioaccumulation of Sucralose In Adipose Tissue In The Rat. *J Toxicol Environ Health A* **2018**, *81* (18), 913-923.
- 430 6. Simon, B. R.; Parlee, S. D.; Leanman, B. S.; Mōri, H.; Scheller, E. L.; Cawthorn, W. P.; Ning, X.;
431 Gallagher, K.; Tyrberg, B.; Assadi-Porter, F. M.; Evans, C. R.; MacDougald, O. A., Artificial sweeteners
432 stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *J Biol Chem* **2013**, *288*
433 (45), 32475-89.
- 434 7. Masubuchi, Y.; Nakagawa, Y.; Ma, J.; Sasaki, T.; Kitamura, T.; Yamamoto, Y.; Kurose, H.;
435 Kojima, I.; Shibata, H., A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic
436 differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e54500.
- 437 8. Masubuchi, Y.; Nakagawa, Y.; Medina, J.; Nagasawa, M.; Kojima, I.; Rasenick, M. M.; Inagaki,
438 T.; Shibata, H., T1R3 homomeric sweet taste receptor regulates adipogenesis through Galphas-mediated
439 microtubules disassembly and Rho activation in 3T3-L1 cells. *PLoS One* **2017**, *12* (5), e0176841.
- 440 9. Avau, B.; Bauters, D.; Steensels, S.; Vancleef, L.; Laermans, J.; Lesuisse, J.; Buyse, J.; Lijnen, H.
441 R.; Tack, J.; Depoortere, I., The Gustatory Signaling Pathway and Bitter Taste Receptors Affect the
442 Development of Obesity and Adipocyte Metabolism in Mice. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0145538.
- 443 10. Duca, F. A.; Bauer, P. V.; Hamr, S. C.; Lam, T. K., Glucoregulatory Relevance of Small Intestinal
444 Nutrient Sensing in Physiology, Bariatric Surgery, and Pharmacology. *Cell Metab* **2015**, *22* (3), 367-80.
- 445 11. McIntosh, C. H.; Widenmaier, S.; Kim, S. J., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide signaling in
446 pancreatic beta-cells and adipocytes. *J Diabetes Investig* **2012**, *3* (2), 96-106.
- 447 12. Ceperuelo-Mallafre, V.; Duran, X.; Pachon, G.; Roche, K.; Garrido-Sanchez, L.; Vilarrasa, N.;
448 Tinahones, F. J.; Vicente, V.; Pujol, J.; Vendrell, J.; Fernandez-Veledo, S., Disruption of GIP/GIPR axis in
449 human adipose tissue is linked to obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* **2014**, *99* (5), E908-19.
- 450 13. Chen, S.; Okahara, F.; Osaki, N.; Shimotoyodome, A., Increased GIP signaling induces adipose
451 inflammation via a HIF-1alpha-dependent pathway and impairs insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol*
452 *Endocrinol Metab* **2015**, *308* (5), E414-25.
- 453 14. Schenk, S.; Saberi, M.; Olefsky, J. M., Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J*
454 *Clin Invest* **2008**, *118* (9), 2992-3002.
- 455 15. Stern, J. H.; Rutkowski, J. M.; Scherer, P. E., Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of
456 Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. *Cell Metab* **2016**, *23* (5), 770-84.
- 457 16. Palsson-McDermott, E. M.; O'Neill, L. A., Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor,
458 Toll-like receptor-4. *Immunology* **2004**, *113* (2), 153-62.

- 459 17. Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C., Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report
460 of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent
461 diet. *J Nutr* **1993**, *123* (11), 1939-51.
- 462 18. Mace, O. J.; Affleck, J.; Patel, N.; Kellett, G. L., Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate
463 glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol* **2007**, *582* (Pt 1), 379-92.
- 464 19. Jang, H. J.; Kokrashvili, Z.; Theodorakis, M. J.; Carlson, O. D.; Kim, B. J.; Zhou, J.; Kim, H. H.;
465 Xu, X.; Chan, S. L.; Juhaszova, M.; Bernier, M.; Mosinger, B.; Margolskee, R. F.; Egan, J. M.,
466 Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U*
467 *S A* **2007**, *104* (38), 15069-74.
- 468 20. Konner, A. C.; Bruning, J. C., Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends Endocrinol*
469 *Metab* **2011**, *22* (1), 16-23.
- 470 21. Siri-Tarino, P. W.; Sun, Q.; Hu, F. B.; Krauss, R. M., Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular
471 disease. *Am J Clin Nutr* **2010**, *91* (3), 502-9.
- 472 22. Roder, P. V.; Geillinger, K. E.; Zietek, T. S.; Thorens, B.; Koepsell, H.; Daniel, H., The role of SGLT1
473 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS One* **2014**, *9* (2), e89977.
- 474 23. Song, D. H.; Getty-Kaushik, L.; Tseng, E.; Simon, J.; Corkey, B. E.; Wolfe, M. M.,
475 Glucose-dependent insulinotropic polypeptide enhances adipocyte development and glucose uptake in part
476 through Akt activation. *Gastroenterology* **2007**, *133* (6), 1796-805.
- 477 24. Thondam, S. K.; Daousi, C.; Wilding, J. P.; Holst, J. J.; Ameen, G. I.; Yang, C.; Whitmore, C.;
478 Mora, S.; Cuthbertson, D. J., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide promotes lipid deposition in
479 subcutaneous adipocytes in obese type 2 diabetes patients: a maladaptive response. *Am J Physiol Endocrinol*
480 *Metab* **2017**, *312* (3), E224-E233.
- 481 25. Rogero, M. M.; Calder, P. C., Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. *Nutrients* **2018**,
482 *10* (4).
- 483 26. Cani, P. D.; Amar, J.; Iglesias, M. A.; Poggi, M.; Knauf, C.; Bastelica, D.; Neyrinck, A. M.;
484 Fava, F.; Tuohy, K. M.; Chabo, C.; Waget, A.; Delmee, E.; Cousin, B.; Sulpice, T.; Chamontin, B.;
485 Ferrieres, J.; Tanti, J. F.; Gibson, G. R.; Casteilla, L.; Delzenne, N. M.; Alessi, M. C.; Burcelin, R.,
486 Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* **2007**, *56* (7), 1761-72.
- 487 27. Serralde-Zuniga, A. E.; Guevara-Cruz, M.; Tovar, A. R.; Herrera-Hernandez, M. F.; Noriega, L. G.;
488 Granados, O.; Torres, N., Omental adipose tissue gene expression, gene variants, branched-chain amino acids,
489 and their relationship with metabolic syndrome and insulin resistance in humans. *Genes Nutr* **2014**, *9* (6), 431.
- 490 28. Buratti, S.; Benedetti, S.; Cosio, M. S., Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal
491 jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* **2007**, *71* (3), 1387-92.
- 492 29. Nguyen, H. T. L.; Panyoyai, N.; Kasapis, S.; Pang, E.; Mantri, N., Honey and Its Role in Relieving
493 Multiple Facets of Atherosclerosis. *Nutrients* **2019**, *11* (1).
- 494



"2019. Año del Caudillo de Sur, Emiliano Zapata"

INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN



ACUSE

México Cd., Mx a 21 de febrero de 2019.

No. Oficio CICUAL-104-19

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
Depto. Fisiología de la Nutrición
Presente.

Estimada Dra. Torres.:

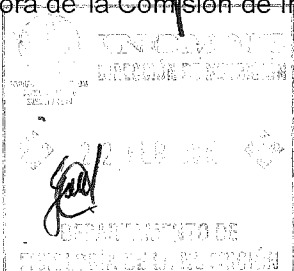
Por este conducto le informo que su proyecto intitulado: "EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECPTORES DSEL DULZOR EN UN MODELO DE RATAS WISTAR MACHO CON Y CIN OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA", con registro FNU-1735-15/18-1 finalizará en febrero 2019. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar al CICUAL el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del proyecto que se anexa a la presente (en hoja membretada e impresa) y adjunte los siguientes documentos indispensables para la conclusión del proyecto:

1. En caso de no requerir prórroga se necesita que entregue el: Formato de cierre
2. Informe final
3. Productos de Investigación derivados del proyecto (artículos, tesis, libros, capítulos de libro, patentes, presentaciones en congreso, entre otros).

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales



2220 12:35
INVEST. EXPERIMENTAL Y
BIOTERIO
21 FEB 2019
DMSE
INST. NAL. CIENCIAS MEDICAS
Y NUTRUCIÓN INCMYN "C.Z."

c.c.p.-M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NABS/nom

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
Ciudad de México
Tel. (52-55)54870900
www.incmnsz.mx

México, D.F., a 17 de Noviembre del 2015

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

Presente.

REF: CINVA 1735, Clave: FNU-1735-15/18-1

Estimada Dra. Bobadilla

Por medio de la presente aclaro las observaciones realizadas por el comité al Protocolo de Investigación Experimental Titulado

“Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta”.

1. El objetivo general queda de la siguiente manera

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo con y sin obesidad inducida por dieta

2. Las imágenes se incluyeron como documentos anexos en latis, sin embargo en este sistema no se logran ver. Las figuras ya se incluyeron en el FAEP. Se anexa a continuación

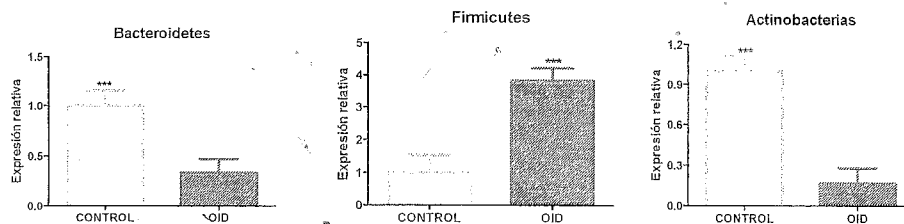
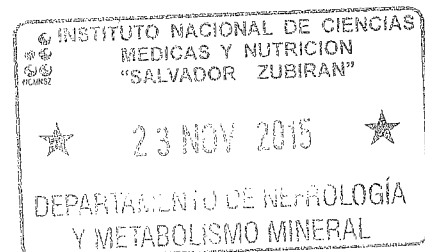


Figura 1. Relación de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias en ratas alimentadas con una dieta control (AIN 93) y en un grupo alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua (DIO)



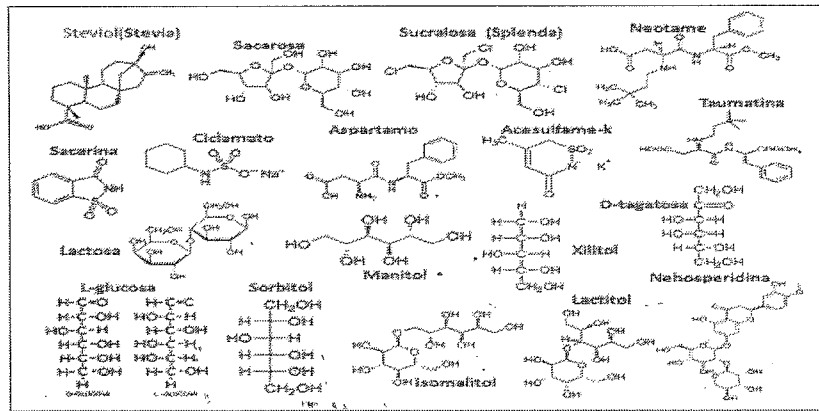


Figura 2. Estructura química de los edulcorantes.

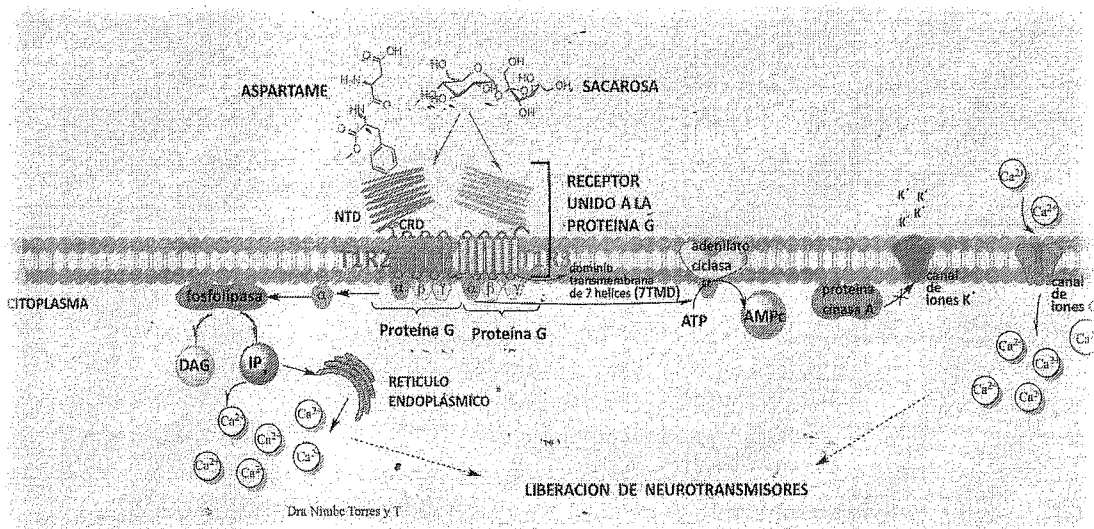


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores del dulzor T1R2 y T1R3

3. Se incluyó en el FAEP la referencia faltante
4. Fue sustituida la leyenda del punto 19: "Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior" por la leyenda: "Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior"

5. Las ratas se defasaran manejando grupos de 48 en 48 animales siendo factible la entrega y espacio para el manejo de animales

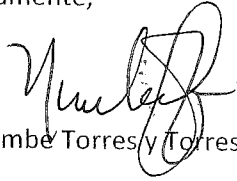
Inicio de periodo	Termino de periodo	Grupos en tratamiento
1-02-16	31-09-16	1-8 n=48
15-10-16	15-05-17	9-16 n=48

6. Los objetivos específicos quedan de la siguiente manera

- Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo animal con y sin obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
- Evaluar el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales sobre parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol LDL, leptina, adiponectina y LPS en suero en un modelo animal con y sin OID
- Determinar el efecto del consumo de edulcorantes, sobre la tolerancia a la glucosa, mediante una Curva de Tolerancia a la Glucosa
- Analizar el efecto a nivel tisular del consumo de edulcorantes artificiales, sobre el Hígado, intestino y tejido adiposo en ratas con y sin OID
- Determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de bacterias de la microbiota intestinal al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales en un modelo con y sin OID, mediante la identificación del gen 16Sr por medio de secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina
- Evaluar el efecto de los edulcorantes sobre la expresión génica y de proteínas involucradas en la lipogénesis (SREBP-1, FAS), oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas involucradas en el gasto energético como AMPK.
- Analizar el efecto del consumo de edulcorantes sobre los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intestino, vejiga, cerebro y tejido adiposo.
- Determinar la composición corporal por resonancia magnética (% de grasa, % masa grasa, % de masa libre de grasa, % de agua corporal), de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.

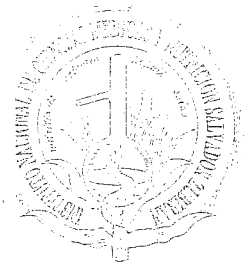
- Estudiar mediante calorimetría indirecta, el gasto energético y el coeficiente respiratorio de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.

Agradezco la atención brindada a la presente,
Atentamente,



Dra Nimbe Torres y Torres

Acuse



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZÚBIRÁN

13 NOV 2015

Laura Zúbirán

2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

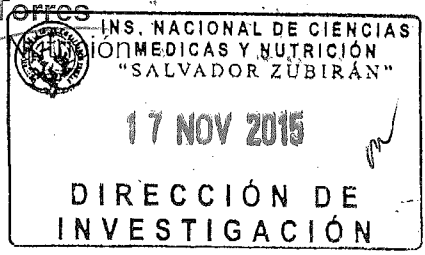
563

1 NOV 2015

DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

México, D. F., a 13 de noviembre de 2015

Dra. Nimbe Torres y Torres
Depto. Fisiología de la
Presente.



REF: CINVA-1735 FNU-1735-15/18-1

Estimada Dra. Torres:

Habiendo analizado detalladamente el Protocolo de Investigación Experimental titulado:


“Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta”

Este comité ha dictaminado dejar **Pendiente** la aprobación hasta que se aclaren las siguientes **Observaciones**:

1. En todo el protocolo incluyendo el título se maneja el efecto en ratas con y sin obesidad, sin embargo el objetivo general y los específicos se refieren exclusivamente al modelo con obesidad.
2. Las figuras en el formato Latis no se pueden ver y no se incluyeron en el FAEP.
3. En el FAEP faltan referencias y en el Latis hay referencias que no se citan en el texto.
4. En el punto 19, dice “Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos”. Se solicita ser más específico y corregir la leyenda **por Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI)**.
5. Es necesario incluir un calendario de cómo se pretende llevar a cabo el experimento que incluye un gran número de animales, además se requiere ponerse en contacto con el DIEB para la planeación del estudio y su factibilidad desde el punto de vista de entrega de animales y del espacio para el mantenimiento de los mismos.
6. Se sugiere corregir los objetivos específicos, ya que, mas que ser objetivos parecen una descripción abreviada de los métodos.

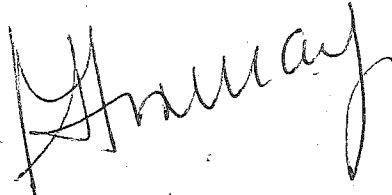
Revisar la ortografía de los documentos.

Enida Vasco de Iroga No. 7
Lonia Belisario
Minguez Sección XVI
Legación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52)54870900
www.incmnsz.mx

Es importante que las correcciones las hagan en el Sistema de Latis y envíe una carta especificando la respuesta a cada punto solicitado. La respuesta al comité y el protocolo modificado en el sistema Latis deberá entregarse en forma impresa y el pdf por vía electrónica a los correos: norma.bobadillas@incmnsz.mx y 

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,



Dra. Norma-A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
M.V.Z. Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio

NAB/nom



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:

CLAVE: FNU-1735-15/18-1

Fecha de registro del Protocolo: 05-oct-15

Título del Protocolo: "Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta "

Propuesta: a) Nueva b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ø

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ø

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	Doctora	56553038	Ø
	Maestro	57473800 ext 5442	

Vigencia del Proyecto.			
Fecha de inicio del proyecto		noviembre	2015
Fecha tentativa de finalización.		Octubre	2018



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

General

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo con y sin obesidad inducida por dieta

Específicos

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo animal con y sin obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
2. Evaluar el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales sobre parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol LDL, leptina, adiponectina y LPS en suero en un modelo animal con y sin OID
3. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes, sobre la tolerancia a la glucosa, mediante una Curva de Tolerancia a la Glucosa
4. Analizar el efecto a nivel tisular del consumo de edulcorantes artificiales, sobre el hígado, intestino y tejido adiposo en ratas con y sin OID
5. Determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de bacterias de la microbiota intestinal al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales en un modelo con y sin OID, mediante la identificación del gen 16Sr por medio de secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina
6. Evaluar el efecto de los edulcorantes sobre la expresión génica y de proteínas involucradas en la lipogénesis (SREBP-1, FAS), oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas involucradas en el gasto energético como AMPK.
7. Analizar el efecto del consumo de edulcorantes sobre los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intestino, vejiga, cerebro y tejido adiposo.
8. Determinar la composición corporal por resonancia magnética (% de grasa, % masa grasa, % de masa libre de grasa, % de agua corporal), de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.
9. Estudiar mediante calorimetría indirecta, el gasto energético y el coeficiente respiratorio de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los diferentes edulcorantes artificiales tienen un impacto benéfico o adverso sobre la salud. También existe confusión si todos los edulcorantes artificiales generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además no existe mucha información si cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de los receptores del dulce.

El consumo de edulcorantes artificiales (aspartame, sucralosa, sacarina) así como el consumo de azúcares (sacarosa, fructosa) o edulcorantes naturales (*Stevia rebaudiana*, xilitol) han causado una gran controversia en los últimos años. Basado en diversos estudios epidemiológicos se han observado cambios importantes en los patrones de alimentación en los hogares de México mostrando una disminución en el consumo de alimentos tradicionales, vegetales y frutas; con un incremento en azúcares refinados, grasas y refrescos (1). Durante la última década se observó un incremento sustancial en el número de productos que contienen edulcorantes y en el consiguiente consumo de los mismos. En Estados Unidos salieron al mercado más de 6000 productos con edulcorantes entre 1999 a 2004. Por otro lado el azúcar proporciona hidratos de carbono que se absorben rápidamente y al encontrarse en una gran cantidad de alimentos, da lugar a una ingesta de energía excesiva, ganancia de peso y síndrome metabólico. Por ello las personas escogen los edulcorantes no calóricos sobre el azúcar, con la intención de perder o mantener el peso corporal (2).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inclusión de 5% de sacarosa en el agua más una dieta alta en grasa saturada significativamente incrementan las anomalías de parámetros bioquímicos de ratas que consumieron esta dieta por 7 meses, como son: triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, insulina, leptina, intolerancia a la glucosa y un desequilibrio significativo en la proporción de bacterias en el intestino (disbiosis) incrementando significativamente los *Firmicutes* y disminuyendo significativamente los *Bacteroidetes*.

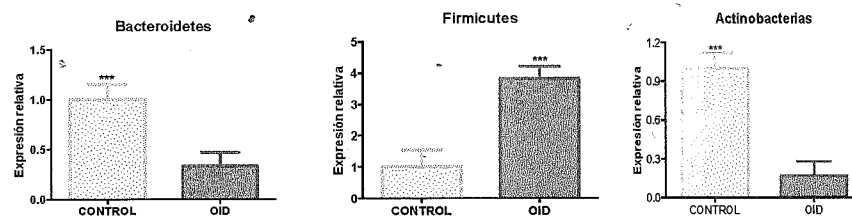


Figura 1. Relación de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias en ratas alimentadas con una dieta control (AIN 93) y en un grupo alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua (DIO)

Interesantemente, los estudios epidemiológicos sugieren que los edulcorantes artificiales no ayudan a la pérdida de peso. Estudios de cohorte prospectivos correlacionan de manera positiva el uso de edulcorantes artificiales y la ganancia de peso. Las bebidas dietéticas, de amplio consumo en la población, se han relacionado con un incremento de 0.16 Kcal/m² en el índice de masa corporal por cada porción de bebida consumida. Esto resulta relevante dado que los edulcorantes no aportan, o aportan una cantidad mínima de energía (2).

El mecanismo por el cual el sabor dulce es útil para predecir la ingesta energética (calórica) se ve alterado al utilizar edulcorantes, ya que el organismo prepara una respuesta en el tracto gastrointestinal para el procesamiento de los hidratos de carbono asociados al sabor dulce, que no se lleva a cabo con la ingestión de los edulcorantes; la consecuencia es la disociación de la dulzura de la ingesta energética (13). Experimentos en roedores sugieren que el dar un edulcorante natural genera una respuesta que mantiene el consumo de energía constante, mientras que esto no ocurre con el consumo de edulcorantes artificiales que pueden ocasionar una ingesta energética compensatoria mayor asociada al bajo contenido calórico del edulcorante artificial (2). Otros estudios con edulcorantes artificiales demostraron que estos influyen en la diferenciación de los adipocitos estimulando la adipogénesis y que este mecanismo es dependiente de la dosis utilizada (3). Los diferentes hidratos de carbono



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

impactan de maneras diferentes el metabolismo de los lípidos. La fructosa incrementa la lipogénesis *de novo*, provoca dislipidemia, disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la adiposidad visceral; interesantemente el consumo de glucosa provoca un incremento en la adiposidad subcutánea en roedores (4).

Estas alteraciones fisiológicas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas, cuyas causas aún tienen múltiples incógnitas, que impactan a millones de personas a nivel mundial. La obesidad y *Diabetes mellitus* han alcanzado proporciones epidémicas que representan un costo sustancial para los sistemas de salud alrededor del mundo. Los tratamientos desarrollados a través de la investigación representan una esperanza para los afectados, ya que aún no se encuentra una cura. Estas patologías se encuentran asociadas a diversos factores de riesgo como inactividad física, exceso de grasa corporal, hábitos alimenticios inadecuados, disbiosis de la microbiota intestinal, señalización hormonal (leptina), y otros factores que contribuyen a estados sistémicos patológicos. Por lo anterior, es fundamental realizar mayores estudios para comprender los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes edulcorantes sobre las alteraciones metabólicas generadas por una disbiosis en la microbiota. Actualmente se sabe que la microbiota es considerada como un nuevo órgano por su impacto sobre la salud.

La microbiota intestinal se define como la comunidad microbiana que habita un medio ambiente específico, en nuestro caso, la microbiota de interés es la intestinal. Las principales phylas bacterianas que conforman la microbiota intestinal son los *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Actinobacterias* (3%), *Proteobacterias* (8%) y *Verrucomicrobia* (2%). Se ha demostrado en varios estudios que durante el desarrollo de la obesidad se presenta un desequilibrio de estas bacterias favoreciendo la presencia de *Firmicutes* y disminuyendo la de *Bacteroidetes*. El tipo y la concentración de polisacáridos no digeribles pero fermentables, así como la presencia de algunos compuestos bioactivos modulan la proporción de bacterias, sin embargo la presencia de azúcares o edulcorantes puede afectar la fermentación de los polisacáridos modificando los productos de fermentación que son los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato).

Recientemente se publicó en la revista Nature (5) que el consumo de edulcorantes artificiales, particularmente la sacarina, producen disbiosis en la microbiota intestinal resultando en intolerancia a la glucosa. Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un incremento en *B. vulgatus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas vías metabólicas están asociadas a obesidad y diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes artificiales, y que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo no toman en cuenta la estructura química de cada edulcorante (Figura 2) y además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante.

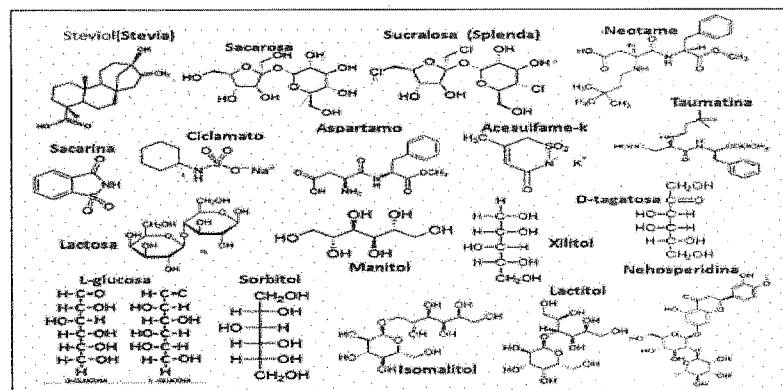


Figura 2. Estructura química de los edulcorantes.

Cabe mencionar que algunos edulcorantes naturales, como *Stevia rebaudiana*, se han asociado



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

a algunos efectos benéficos como la actividad antioxidante y esto ha incrementado su uso en productos comerciales. Sin embargo, al analizar su efecto *in vitro* sobre la microbiota intestinal se demostró que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y se observa un pH más elevado que en los controles, indicando una posible modificación en el microambiente (6). Por lo que es necesario conocer el efecto *in vivo* de este edulcorante a largo plazo sobre la microbiota. Los mamíferos se inclinan por la preferencia del sabor dulce debido a que está relacionado a la presencia de hidratos de carbono que indican la disponibilidad de energía y nutrientes. El sabor se percibe por los receptores de la familia T1R, de los cuáles T1R1, T1R2 y T1R3 se ubican principalmente en las papilas gustativas (7). Las células en las papilas gustativas envían la información al sistema nervioso central que da la percepción del sabor. El sabor dulce es detectado por la combinación de T1R2+T1R3 (Figura 3) que tienen diversos sitios de unión para diferentes compuestos. Principalmente se distinguen 3 dominios en cada receptor, la unión de los edulcorantes a estos receptores permiten la percepción del dulzor (8).

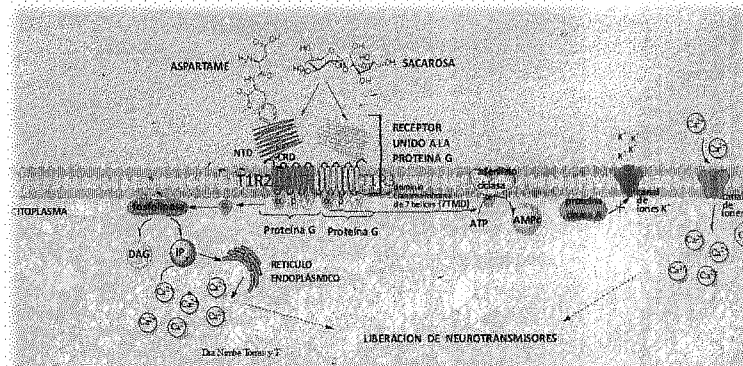


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores del dulzor T1R2 y T1R3

Los receptores del dulzor están asociados a proteínas G, mediante la interacción con GPCRs de las células receptoras del gusto. Los T1R también se han encontrado en intestino, cerebro, tejido adiposo, vejiga y otros órganos. Su localización en estos órganos sugiere muchas teorías, entre ellas la posibilidad de detectar diferentes nutrientes y mantener la homeostasis de los mismos (9). En el caso de los roedores, T1R2 y T1R3 expresados en el intestino, se proponen como los sensores de glucosa a nivel del tracto gastrointestinal (14).

Asociaciones entre el metabolismo energético y los receptores del dulzor en tejidos extraorales, sugieren que son una parte importante de la homeostasis energética. La glucosa es metabolizada por la insulina que es sintetizada en las células pancreáticas, que también expresan receptores asociados a proteínas G para detectar aminoácidos y lípidos; este mismo mecanismo es el usado para la detección del sabor dulce a través de T1R2 y T1R3. Se reporta que el receptor que detecta la glucosa facilita el metabolismo de succinato mitocondrial, pero se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre y cómo se regula el metabolismo de glucosa (15). Existe evidencia reciente donde se ha demostrado que ratones libres de germen presentan una sobre-expresión del receptor T1R3, sin embargo se desconoce si los edulcorantes naturales o artificiales modifican la microbiota y de ahí la expresión de los receptores del dulzor (17).

En conjunto los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes artificiales debido a su estructura diversa pueden modificar de manera diferencial a la microbiota y de ahí generar diferentes alteraciones en el metabolismo de lípidos, así como en la expresión de los receptores del dulzor que modulan el metabolismo energético de la célula.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para mas información consultar: www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=6, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	96	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		16		
No. de animales por grupo:		6		
No. TOTAL DE ANIMALES:		96		

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 7 y 8 meses.

Las ratas se defasaron manejando grupos de 48 en 48 animales siendo factible la entrega y espacio para el manejo de animales

Inicio de periodo	Termino de periodo	Grupos en tratamiento
1-02-16	31-09-16	1-8 n=48
15-10-16	15-05-17	9-16 n=48

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una caja metabólica durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

A) Se utilizarán 16 grupos con una n=6 por grupo, en total 96 ratas Wistar. Las dietas se preparan en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Coliña	0.25
TBHQ	0.0014

⇒ Tratamiento 2 (Control+5% Sacarosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarosa al 5%

⇒ Tratamiento 3 (Control+5% Fructosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con fructosa al 5%

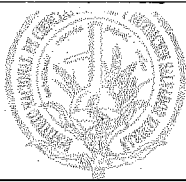


FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- ⇒ Tratamiento 4 (Control+5%Glucosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 5 (Control+5%Stevia): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con stevia al 5%
- ⇒ Tratamiento 6 (Control+5%Sucralosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 7 (Control+5%mascabado): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 8 (Control+5%Sacarina): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarina al 5%
- ⇒ Tratamiento 9 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

- ⇒ Tratamiento 10 (DAGS+5%Sacarosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 11 (DAGS+5%Fructosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con fructosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 12 (DAGS+5%Glucosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 13 (DAGS+5%Stevia): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

stevia al 5%

- ⇒ Tratamiento 14 (DAGS+5% Sucralosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 15 (DAGS+5% mascabado): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 16 (DAGS+5% Sacarina): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarina al 5%

B) Para estudiar el efecto del consumo de los diferentes endulcorantes en un modelo animal con y sin OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en los 16 grupos antes mencionados y se alimentarán con esas dietas durante el periodo de 7 meses, durante el mismo, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica. Durante el tratamiento se medirá cada mes la composición corporal por medio de resonancia magnética. Al final de los tratamientos se medirá el gasto energético y el coeficiente respiratorio por calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (18). Una semana antes de finalizar el tratamiento se realizará una curva de tolerancia a la glucosa, después de un ayuno durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará glucosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la solución glucosada y al final del tratamiento se obtendrán muestras de sangre para la determinación de parámetros bioquímicos y heces para la determinación de la composición de la microbiota

Para la determinación de la microbiota se tomara una muestra de heces posterior al consumo de los diferentes endulcorantes y se aislara el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de phylas específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla y con la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina

Transcurridos los 7 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO_2 previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, riñon, musculo, lengua, cerebro, colon, y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos así como tejido adiposo pardo y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes lipogénicos (SREBP-1, FAS, ACC), genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (PPAR α , CPT-1), sensores de energía (AMPK), transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) en tejido adiposo y músculo). Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado, lengua y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamación y acumulación de grasa. Respecto al cerebro se realizaran análisis histológico e inmunohistoquímico, para determinar marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y estrés oxidativo

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimático-colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 16 grupos experimentales de tratamiento

11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consentes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevofluorano		Inhalada	1 vez

13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección.

No habrá procedimientos quirúrgicos

15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad,



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 - 1. Aceptable una disminución del 5-10%
 - 2. Moderada del 10-20%
 - 3. Substancial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 - 1. 0 si es normal.
 - 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 - 3. 2 si está afectado
 - 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO₂)

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) No b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5_sect_V.pdf

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

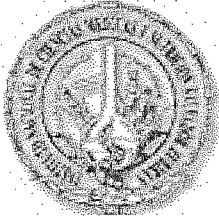
Nombre y firma del Investigador Responsable

Dra. Nimbe Torres Torres



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ
INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE
EVALUACIÓN
DE PROYECTO
DE
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIBH: FNU-1735-15/18-1

1. Título del proyecto

Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratón sin obesidad inducida por dieta

2. Investigadores

2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
RAMIREZ MIRAFUENTES ALEJANDRO		Investigador invitado		O
RODRIGUEZ HERNÁNDEZ PAMELA		Investigador invitado		
OE		Investigador invitado		
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

- INCMNSZ
- INCMNSZ
- INCMNSZ
- INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
- INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
- Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
- Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación en la investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

ANTECEDENTES:

El consumo de edulcorantes artificiales (aspartame, sucralosa, sacarina) así como el consumo de azúcares (sacarosa, fructosa) o edulcorantes naturales (*Stevia rebaudiana*, xilitol) han causado controversia en los últimos años. Basado en diversos estudios epidemiológicos se han observado cambios importantes en los patrones de alimentación en los hogares de México mostrando un mayor consumo de alimentos tradicionales, vegetales y frutas; con un incremento en azúcares refinados y refrescos (1). Durante la última década se observó un incremento sustancial en el consumo de productos que contienen edulcorantes y en el consiguiente consumo de los mismos. En México se salieron al mercado más de 6000 productos con edulcorantes entre 1999 a 2004. Por lo tanto, se proporciona hidratos de carbono que se absorben rápidamente y al encontrarse en una gran variedad de alimentos, da lugar a una ingesta de energía excesiva, ganancia de peso y síndrome metabólico. Las personas escogen los edulcorantes no calóricos sobre el azúcar, con la intención de reducir el peso corporal (2).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inclusión de 5% de sacarosa en una dieta alta en grasa saturada significativamente incrementan las anomalías bioquímicas de ratas que consumieron esta dieta por 7 meses, como son: triglicérido, colesterol LDL, insulina, leptina, intolerancia a la glucosa y un desequilibrio significativo en la flora bacteriana en el intestino (disbiosis) incrementando significativamente los *Firmicutes* y disminuyendo significativamente los *Bacteroidetes*.

Figura 1. Relación de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias en ratas alimentadas con una dieta normal (AIN 93) y en un grupo alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar.

EDULCORANTES Y GANANCIA DE PESO

Interesantemente, los estudios epidemiológicos sugieren que los edulcorantes artificiales están asociados con la pérdida de peso. Estudios de cohorte prospectivos correlacionan de manera positiva el uso de edulcorantes artificiales y la ganancia de peso. Las bebidas dietéticas, de amplio consumo en la población, contienen edulcorantes artificiales.

relacionado con un incremento de 0.16 Kcal/m² en el índice de masa corporal por cada gramo consumida. Esto resulta relevante dado que los edulcorantes no aportan, o aportan una cantidad mínima de energía (2).

El mecanismo por el cual el sabor dulce es útil para predecir la ingesta energética (calórica) al utilizar edulcorantes, ya que el organismo prepara una respuesta en el tracto gastrointestinal al procesamiento de los hidratos de carbono asociados al sabor dulce, que no se lleva a cabo con los edulcorantes; la consecuencia es la disociación de la dulzura de la ingesta energética. Experimentos en roedores sugieren que el dar un edulcorante natural genera una respuesta que mantiene el consumo de energía constante, mientras que esto no ocurre con el consumo de edulcorantes que pueden ocasionar una ingesta energética compensatoria mayor asociada al bajo consumo de edulcorante artificial (2). Otros estudios con edulcorantes artificiales demostraron que estimulan la diferenciación de los adipocitos estimulando la adipogénesis y que este mecanismo es dependiente de la dosis utilizada (3). Los diferentes hidratos de carbono impactan de maneras diferentes en el metabolismo de los lípidos. La fructosa incrementa la lipogénesis *de novo*, provoca dislipidemia, disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la adiposidad visceral; interesantemente el consumo de glucosa no genera un incremento en la adiposidad subcutánea en roedores (4).

Estas alteraciones fisiológicas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, que tienen múltiples incógnitas, que impactan a millones de personas a nivel mundial. La obesidad y la diabetes mellitus han alcanzado proporciones epidémicas que representan un costo sustancial para la salud alrededor del mundo. Los tratamientos desarrollados a través de la investigación ofrecen poca esperanza para los afectados, ya que aún no se encuentra una cura. Estas patologías están asociadas a diversos factores de riesgo como inactividad física, exceso de grasas en la dieta, alimentos inadecuados, disbiosis de la microbiota intestinal, señalización hormonal alterada y otros factores que contribuyen a estados sistémicos patológicos. Por lo anterior, es fundamental realizar estudios para comprender los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes edulcorantes y las alteraciones metabólicas generadas por una disbiosis en la microbiota. Actualmente la microbiota es considerada como un nuevo órgano por su impacto sobre la salud.

La microbiota intestinal se define como la comunidad microbiana que habita un medio ambiente específico. En nuestro caso la microbiota de interés es la intestinal. Las principales phylas bacterianas en la microbiota intestinal son los *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Actinobacterias* (3%), *Proteobacterias* (8%) y *Verrucomicrobia* (2%). Se ha demostrado en varios estudios que durante la obesidad se presenta un desequilibrio de estas bacterias favoreciendo la presencia de *Firmicutes* y disminuyendo la de *Bacteroidetes*. El tipo y la concentración de polisacáridos no fermentables, así como la presencia de algunos compuestos bioactivos modulan la proporción de bacterias. Sin embargo la presencia de azúcares o edulcorantes puede afectar la fermentación de los polisacáridos modificando los productos de fermentación que son los ácidos grasos de cadena corta (ácido acetico y butirato).

Recientemente se publicó en la revista Nature (5) que el consumo de edulcorantes, particularmente la sacarina, producen disbiosis en la microbiota intestinal resultando en un aumento de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes*.

glucosa. Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un aumento de *Lactobacillus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas vías metabólicas están asociadas con la diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo no toman en cuenta la estructura química del edulcorante (Figura 2) y además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante.

Figura 2. Estructura química de los edulcorantes.

Cabe mencionar que algunos edulcorantes naturales, como *Stevia rebaudiana*, se han asociado con efectos benéficos como la actividad antioxidante y esto ha incrementado su uso en productos dietéticos. Sin embargo, al analizar su efecto *in vitro* sobre la microbiota intestinal se demostró el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y se observa un pH más elevado que en los controles, lo que sugiere una posible modificación en el microambiente (6). Por lo que es necesario conocer el efecto de cada edulcorante a largo plazo sobre la microbiota.

Los mamíferos se inclinan por la preferencia del sabor dulce debido a que está relacionada con la disponibilidad de hidratos de carbono que indican la disponibilidad de energía y nutrientes. El sabor dulce es detectado por los receptores de la familia T1R, de los cuales T1R1, T1R2 y T1R3 se ubican principalmente en las papilas gustativas. Las células en las papilas gustativas envían la información al sistema nervioso central para la percepción del sabor. El sabor dulce es detectado por la combinación de T1R2+T1R3 (Figura 2). Los diversos sitios de unión para diferentes compuestos. Principalmente se distinguen tres tipos de receptores, la unión de los edulcorantes a estos receptores permite la percepción del sabor dulce.

Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores del dulzor T1R2 y T1R3

Los receptores del dulzor están asociados a proteínas G, mediante la interacción con GPCRs (receptoras del gusto). Los T1R también se han encontrado en intestino, cerebro, tejido y otros órganos. Su localización en estos órganos sugiere muchas teorías, entre ellas detectar diferentes nutrimentos y mantener la homeostasis de los mismos (9). En el caso de T1R2 y T1R3 expresados en el intestino, se proponen como los sensores de glucosa gastrointestinal (14).

Asociaciones entre el metabolismo energético y los receptores del dulzor en tejidos extra-intestinales que son una parte importante de la homeostasis energética. La glucosa es metabolizada y también es sintetizada en las células pancreáticas, que también expresan receptores asociados a GPCR para detectar aminoácidos y lípidos; este mismo mecanismo es el usado para la detección de ácidos grasos a través de T1R2 y T1R3. Se reporta que el receptor que detecta la glucosa facilita el metabolismo mitocondrial de succinato, pero se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre y el metabolismo de glucosa (15). Existe evidencia reciente donde se ha demostrado que los gérmenes presentan una sobre-expresión del receptor T1R3, sin embargo se desconoce si los gérmenes naturales o artificiales modifican la microbiota y de ahí la expresión de los receptores del dulzor.

En conjunto los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes artificiales de diversa naturaleza pueden modificar de manera diferencial a la microbiota y de ahí generar diferentes efectos en el metabolismo de lípidos, así como en la expresión de los receptores del dulzor y el metabolismo energético de la célula.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Actualmente existe un consumo excesivo de edulcorantes artificiales, pero no el impacto en el metabolismo así como en la salud gastrointestinal del consumidor.

JUSTIFICACION :

Existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los edulcorantes artificiales tienen un impacto beneficioso o adverso sobre la salud. También existe confusión si los edulcorantes artificiales generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además, se necesita información si cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de genes relacionados con el dulzor.

6a. Hipótesis

El consumo de edulcorantes naturales o artificiales modularán de diferente manera la microbiota intestinal, los receptores del dulzor y el metabolismo de lípidos.

6b. Objetivos

General:

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal, el dulzor en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Específicos:

1. **Estudiar el consumo de edulcorantes** naturales y artificiales sobre la ingesta de alimentos y el peso en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
2. **Determinar la concentración de parámetros bioquímicos** (glucosa, insulina, triglicéridos, LDL, leptina, adiponectina y LPS) en suero en un modelo animal con OID y el efecto de edulcorantes naturales y/o artificiales.
3. **Determinar la curva de tolerancia a la glucosa** en el modelo de OID al final de la ingesta de edulcorantes naturales y artificiales.

4. **Análisis histológico** del hígado, intestino y tejido adiposo.
5. **Identificación del gen 16Sr por medio de secuenciación utilizando la plataforma I** para determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de **microbiota intestinal** al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales.
6. **Determinación de la expresión génica y de proteínas involucradas** en la lipogénesis oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas gasto energético como AMPK.
7. **Analizar mediante inmunohistoquímica los receptores T1R2 y T1R3** en lengua cerebro y tejido adiposo.
8. **Determinación de la composición corporal por resonancia magnetica** (% de grasa, de masa libre de grasa, % de agua corporal)
9. **Determinación del gasto energético y el coeficiente respiratorio** utilizando calorimet Oxymax.

7. Metodología: Diseño general.

A) Se utilizarán 16 grupos con una n=6 por grupo, en total 96 ratas Wistar. Las dietas planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20

Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (Control+5% Sacarosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarosa al 5%

Tratamiento 3 (Control+5% Fructosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con fructosa al 5%

Tratamiento 4 (Control+5% Glucosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con glucosa al 5%

Tratamiento 5 (Control+5% Stevia): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con stevia al 5%

Tratamiento 6 (Control+5% Sucralosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sucralosa al 5%

Tratamiento 7 (Control+5% mascabado): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con mascabado al 5%

Tratamiento 8 (Control+5% Sacarina): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarina al 5%

tratamiento 9 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

Tratamiento 10 (DAGS+5%Sacarosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con s

tratamiento 11 (DAGS+5%Fructosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con fru

tratamiento 12 (DAGS+5%Glucosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con glu

tratamiento 13 (DAGS+5%Stevia Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con stevia

tratamiento 14 (DAGS+5%Sucralosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con s

Tratamiento 15 (DAGS+5%mascabado): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con 5%

Tratamiento 16 (DAGS+5%Sacarina): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarina

B) Para estudiar el efecto del consumo de los diferentes endulcorantes en un modelo animal se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada (22°C) de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en los 16 grupos antes mencionados y se alimentarán con esas dietas durante un periodo de 7 meses, durante el mismo, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana y la ingesta calórica. Durante el tratamiento se medirá cada mes la composición corporal por resonancia magnética. Al final de los tratamientos se medirá el gasto energético y el coeficiente de eficiencia por calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (Chavez Santoscoy, 2018). Antes de finalizar el tratamiento se realizará una curva de tolerancia a la glucosa, durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará glucosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomará muestras de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa y al final del tratamiento se obtendrán muestras de sangre para la determinación de bioquímicos y heces para la determinación de la composición de la microbiota.

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior al tratamiento con diferentes endulcorantes y se aislara el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de secuencias específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla y con posterior secueñciación masiva MiSeq de Illumina.

Transcurridos los 7 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia por una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, riñón, cerebro, colon, y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo local (inguinal e intercostal) de todos los grupos así como tejido adiposo pardo y las muestras de heces.

nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se e estudiar la expresión de los

genes lipogénicos (SREBP-1, FAS, ACC), genes involucrados en la oxidación de ácido CPT-1), sensores de energía (AMPK), transportadores de glucosa dependientes de in: tejido adiposo y músculo). Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado, lengua y t destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamac de grasa. Respecto al cerebro se realizarán análisis histológico e inmunohistoquímico marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y e

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuar bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pr colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la mic

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos e genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 16 grupos experimentales de tratamiento

8. Metodología: Criterios de selección

A) Ratitas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se excluirán ratas hembras

C) Se eliminarán del estudio las ratas que no aumenten de peso o que presenten comparación con las ratas que reciban esta dieta.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl

Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ACC	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
CPT-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- α	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
NOX	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
TNF- α	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- γ	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
XBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
BIP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ATF-6	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Adiponectina	Medición de la	Tejido	Cuantitativa	Unidades

	expresión génica por RT-PCR	adiposo	continua	arbitrarias
APP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- α	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- γ	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS1-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-2	Medición de la	Hígado y	Cuantitativa	Unidades

	expresión proteica por medio de Western blot	tejido adiposo	continua	arbitrarias
IRS2-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AMPK	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GLUT-4	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado Musculo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
T1R2	Técnicas inmunohistoquímicas	Lengua	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
T1R3	Técnicas inmunohistoquímicas	Lengua	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Insulina	Cuantificación por RIA	Suero	Cuantitativa continua	ng/mL
Densidad total de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Morfología de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

Análisis estadístico.

Las variables continuas serán expresadas en promedios con error estándar y se evaluará con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar su tipo de distribución. En caso de que los datos no sigan una distribución normal, se realizará la transformación logarítmica antes del análisis. Los datos bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL se analizarán con la prueba de ANOVA de una vía, comparando los grupos tratados con el grupo control. Posteriormente se realizará la prueba *post hoc* de Bonferroni. De igual manera, se analizará la expresión génica y de proteínas como valor significativo de *p* cuando sea menor a 0.05.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Conocer el efecto metabólico y sobre la composición de la microbiota intestinal de los endulcorantes naturales y artificiales control como en un modelo de obesidad inducida por dieta

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguna

EFFECTOS ADVERSOS : Ninguno

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración control del peso y consumo de alimento.

PROCEDIMIENTOS : consulta con el veterinario

OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas

1) Flores M, Macías N, Rivera M, et al. Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight nutrition. 2010; 140(10):1869-73.

2) Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. Yale Journal of 2010; 83:101-8.

3) Simon BR, Parlee SD, Learman BS, et al. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independent of sweet taste receptors. The Journal of biological chemistry. 2013; 288(45):32475-89.

4) Hofmann SM, Tschöp MH. Dietary sugars: a fat difference. The Journal of clinical investigation. 2009; 119(5):1089-94.

5) Suez J, Korem T, Zeevi D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. Nature. 2014; 514(7521):181-6.

6) Denina I, Semjonovs A, Fomina R, et al. The influence of Stevia glycosides on the growth of Lactobacillus reuteri ssp. reuteri. Microbiology. 2013; 58:278-84.

7) Margolskee RF. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. The Journal of biological chemistry. 2001; 276(12):3173-8.

8) Fernstrom JD, Munger SD, Sclafani A, et al. Mechanisms for sweetness. The journal of nutrition. 2012; 142(6):1134S-1139S.

9) Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2014; 17:379-85.

10) Li D, Kirsop J, Tang WH. Listening to Our Gut: Contribution of Gut Microbiota and Cardiovascular Risk in Diabetes Mellitus. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2014; 17:386-92.

Diab Rep. 2015 Sep;15(9):634.

11) Hur KY, Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*. 2015 Jun; 39(3): 198–203.

12) Mandal RS, Saha S, Das S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Jun; 14(4):391-5.

13) Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab*. 2015 Jul; 14(4):391-5.

14) Moran AW, Al-Rammahi M, Zhang C, Bravo D, Calsamiglia S, Shirazi-Beechey SP. Sweet taste receptor expression and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. *J Dairy Sci*. 2014 Aug; 97(8):4955-72.

15) Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Hamano K, Medina J, Nagasawa M. Return of the glucoreceptor: Glucose activation of T1R3 and facilitates metabolism in pancreatic β -cells. *J Diabetes Investig*. 2015 May; 6(3):256-63.

16) Allison MB, Myers MG Jr. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 2014 Oct; 193(1):1530-1544.

17) Swartz T D, Duca FA, Wouters T, Sakar Y, Covasa M. Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota

CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS

1000/321/2016

MOD.ORD./41/2016

SUBPROGRAMA DE CIENCIA BÁSICA

GENERAL

000000000257339

CB-2015-01

CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS QUE CELEBRAN POR UNA PARTE NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., I.B.D., FIDUCIARIA DEL FIDEICOMISO DENOMINADO "FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN", EN LO SUCESIVO EL "FONDO", REPRESENTADO EN ESTE ACTO POR EL C.P. ARIEL GÓMEZ AGUILAR, EN SU CARÁCTER DE SECRETARIO ADMINISTRATIVO SUPLENTE DEL COMITÉ TÉCNICO Y DE ADMINISTRACIÓN DEL "FONDO", ASISTIDO EN ESTE ACTO POR EL DR. LUIS HUMBERTO FABIOLA CASTILLO, EN SU CARÁCTER DE SECRETARIO TÉCNICO DEL COMITÉ TÉCNICO Y DE ADMINISTRACIÓN DEL "FONDO"; Y POR OTRA PARTE, EL/LA INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, EN LO SUCESIVO EL "SUJETO DE APOYO", REPRESENTADO EN ESTE ACTO POR EL/LA DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ, EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL INSTRUMENTO QUE SUJETAN AL TENOR DE LOS ANTECEDENTES, DECLARACIONES Y CLÁUSULAS SIGUIENTES:

ANTECEDENTES

1. Uno de los objetos primordiales de la Ley de Ciencia y Tecnología (LCyT), contenido en su artículo 1, consiste en regular los apoyos que el Gobierno Federal se encuentra obligado a otorgar, para impulsar, fortalecer y desarrollar la investigación científica y tecnológica en el país, así como para determinar los instrumentos jurídicos, financieros y administrativos, mediante los cuales cumplirá con esta obligación de apoyo.
2. La Ley Orgánica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dispone, en su artículo 13 que la canalización de recursos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en adelante el "CONACYT", a programas, proyectos, estudios, investigaciones específicas, otorgamiento de becas en sus diferentes modalidades y cualquier otro apoyo o ayuda de carácter económico que convenga o proporcione, estará siempre sujeta a la celebración de un contrato o convenio, según sea el caso.
3. Con fecha 4 de diciembre de 2002, la Secretaría de Educación Pública y el "CONACYT", con fundamento en los artículos 15, fracción II, 17 y 18 de la Ley para el Fomento de la Investigación Científica y Tecnológica, actualmente 23, fracción II, 25 y 26 de la LCyT, celebraron un Convenio para establecer el "FONDO", mismo que fue modificado con fecha 21 de septiembre de 2009, con el objeto de ampliar la vigencia de dicho instrumento y actualizarlo para continuar la operación del "FONDO".
4. Con fecha 27 de diciembre de 2002, el "CONACYT" en su calidad de Fideicomitente, celebró con Nacional Financiera, S.N.C., en su calidad de Institución Fiduciaria, el Contrato de Fideicomiso del "FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN", en lo sucesivo el "CONTRATO", siendo modificado con fechas 21 de septiembre de 2009, 15 de junio de 2012 y 22 de marzo de 2012, a través del Primer y Segundo Convenio Modificatorio al Contrato de Fideicomiso, respectivamente.
5. El "FONDO" en términos del artículo 25, fracción II de la LCyT, considera como sujetos de apoyo a las Universidades e Instituciones de Educación Superior, públicas y particulares, centros, laboratorios, empresas públicas y privadas y demás personas que se inscriban en el Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas (RENIECYT), los cuales son elegidos mediante concurso y bajo las modalidades que expresamente determine el Comité Técnico y de Administración con apego a las Reglas de Operación del Fideicomiso y según la Convocatoria de Investigación Científica Básica 2015.
6. Con el fin de ajustar la operación y administración del "FONDO", el Comité Técnico y de Administración en su Décimo Octava Sesión Ordinaria, de fecha 15 de diciembre de 2011, mediante acuerdo número 06-SORD18-II aprobó modificaciones a las Reglas de Operación del "FONDO", lo que hace necesario ajustar el "CONTRATO".
7. El Plan Nacional de Desarrollo (PND) 2013-2018, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 20 de mayo de 2013, establece en su Objetivo 3.5. Hacer del desarrollo científico, tecnológico y la innovación pilares para el progreso económico y

social sostenible.

8. El Programa Especial de Ciencia, Tecnología e Innovación (PECITI), publicado en el Diario Oficial de la Federación el 30 de julio de 2014, cuyos objetivos, estrategias y líneas de acción deberán alinearse con la Meta III y el Objetivo 3.5 del PND, que establecen la obligación de Contribuir a que la inversión nacional en investigación científica y desarrollo tecnológico crezca anualmente y alcance un nivel de 1% del PIB; Contribuir a la formación y fortalecimiento del capital humano de alto nivel; Impulsar el desarrollo de las vocaciones y capacidades científicas, tecnológicas y de innovación locales, para fortalecer el desarrollo regional sustentable e incluyente; Contribuir a la transferencia y aprovechamiento del conocimiento, vinculando a las instituciones de educación superior y los centros de investigación con los sectores público, social y privado; y Contribuir al fortalecimiento de la infraestructura científica y tecnológica del país.
9. El subprograma de Ciencia Básica aprobado por la Junta de Gobierno del "CONACYT" en su Décima Tercera Sesión Ordinaria, celebrada en el mes de julio de 2005, el cual contempla dentro de sus objetivos el brindar apoyo al desarrollo de proyectos de investigación básica que contribuyan a incrementar el conocimiento científico en general, ampliar las fronteras del conocimiento, mejorar la calidad de la educación en ciencia y tecnología, fortalecer los postgrados y ampliar la infraestructura científica y tecnológica nacional.
10. El Comité Técnico y de Administración, previo proceso de evaluación a que se refieren las Reglas de Operación del "FONDO", en su Sesión Ordinaria número 25, de fecha 14 de junio de 2016, mediante Acuerdo número 04-SORD25-16, autorizó la canalización de recursos a favor del "SUJETO DE APOYO", por un monto de \$1,292,727.00 (UN MILLON DOSCIENTOS NOVENTA Y DOS MIL SETECIENTOS VEINTISIETE PESOS 00/100 MN), para el desarrollo del proyecto denominado EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES, ARTIFICIALES Y AZUCAR SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS WISTAR, en lo sucesivo el "PROYECTO".

DECLARACIONES

I. El "FONDO" a través de su Secretario Administrativo declara que:

- A. La Secretaría de Educación Pública, con fecha 20 de mayo de 2013, designó al Lic. Rodolfo Demetrio Alor Muñoz como Secretario Administrativo del "FONDO" y al C.P. Ariel Gómez Aguilar como Secretario Administrativo Suplente con los derechos y obligaciones contenidos en el "CONTRATO" y en sus Reglas de Operación.
- B. El Comité Técnico y de Administración del "FONDO", en su Quinta Sesión Extraordinaria, de fecha 6 de junio de 2013, mediante acuerdo 07-SEXT05-13, se dio por enterado y ratificó la designación del Lic. Rodolfo Demetrio Alor Muñoz como Secretario Administrativo del "FONDO". Asimismo, mediante acuerdo 09-SEXT05-13 tomó conocimiento de la designación del C.P. Ariel Gómez Aguilar como Secretario Administrativo Suplente del "FONDO".
- C. Con fecha 23 de julio de 2015, el C.P. Ariel Gómez Aguilar, en su carácter de Director General Adjunto, adscrito a la Secretaría de Educación Pública, solicitó a Nacional Financiera, S.N.C., I.B.D., se otorgue poderes generales para pleitos y cobranzas, actos de administración y para cubrir y manejar cuentas bancarias al Secretario Administrativo Suplente del "FONDO", por ausencia definitiva del Secretario Administrativo, con fundamento en el Capítulo III, numeral 3.3 de las Reglas de Operación del "FONDO".
- D. Mediante Carta de Instrucción GCR-123/2015, de fecha 27 de julio de 2015, Nacional Financiera, S.N.C., I.B.D., en su calidad de Institución Fiduciaria del "FONDO", otorgó un poder general para pleitos y cobranzas, actos de administración y para cubrir y manejar cuentas bancarias, al C.P. Ariel Gómez Aguilar, en su carácter de Secretario Administrativo Suplente, mismo que se hace constar a través del testimonio de la escritura pública número 143.501, de fecha 31 de julio de 2015, otorgada ante la fe del Lic. Ignacio Soto Borja y Anda, Notario Público número 129 del Distrito Federal, por virtud del cual comparece a la celebración del presente Convenio.
- E. Tiene establecido su domicilio en Avenida Insurgentes Sur número 1971, Torre IV, piso 6, Colonia Guadalupe Inn, Delegación Álvaro Obregón, Código Postal 01020, Ciudad de México, mismo que señala para los fines y efectos legales de este Convenio.
- F. Para efectos de notificaciones relacionadas con la administración, ejecución y seguimiento de este Convenio señala la calle República de Argentina número 28, Delegación Cuauhtémoc, Centro Histórico, Código Postal 06020 Ciudad de México.

II. El "SUJETO DE APOYO" a través de su Representante declara que:

- A. El (La) INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN ES UN ORGANISMO PÚBLICO DESCENTRALIZADO, CON PERSONALIDAD JURÍDICA Y PATRIMONIO PROPIOS, DE CONFORMIDAD CON LO DISPUESTO EN LOS ARTÍCULOS 3, 9 Y 45 DE LA LEY ORGÁNICA DE LA ADMINISTRACIÓN PÚBLICA FEDERAL; 2, 14 Y 15 DE LA LEY FEDERAL DE LAS ENTIDADES PARAESTATALES; 1, 5 FRACCIÓN III; 9 FRACCIÓN III DE LA LEY DE LOS INSTITUTOS NACIONALES DE SALUD, PUBLICADA EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 26 DE MAYO DE 2000; 3 FRACCIONES I, II, XIV; 34 FRACCIÓN I DEL ESTATUTO

ORGÁNICO DEL INSTITUTO, PUBLICADO EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN EL 20 DE OCTUBRE DE 2009 . .

- B. El (la) **DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ**, cuenta con las facultades para suscribir el presente Convenio, tal y como se desprende de la escritura pública número 137232, de fecha 21 DE JUNIO DE 2012, pasada ante la fe del C. LIC. IGNACIO SOTO BORJA, Notario Público número 129 del DISTRITO FEDERAL, MEXICO, D.F; manifestando que a la fecha de firma del presente instrumento, sus facultades no le han sido revocadas ni modificadas en forma alguna.
- C. El Registro Federal de Contribuyentes inscrito en la Secretaría de Hacienda y Crédito Público es INC710101RH7.
- D. En atención a la Convocatoria 2015, presentó a concurso la propuesta denominada: "EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES, ARTIFICIALES Y AZUCAR SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS WISTAR", con clave número 00000000257339, de la que se derivó el "PROYECTO", mismo que se relaciona en el Antecedente 10, que forma parte del objeto del presente Convenio.
- E. Tiene establecido su domicilio en VASCO DE QUIROGA EXT/INT 15, BELISARIO DOMINGUEZ SECCION XVI, TLALPAN, C.P.14080, MEXICO, DISTRITO FEDERAL, mismo que señala para los fines y efectos legales de este Convenio.
- F. En cumplimiento a lo dispuesto por los artículos 16, 17 y 25, fracción II de la LCyT, se encuentra inscrito en el Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas (RENIECYT) a cargo del "CONACYT", tal y como se acredita con la constancia de inscripción número 006.

III. Declaración Conjunta:

ÚNICA. Las partes expresamente manifiestan su conocimiento al contenido de lo dispuesto por el artículo 12, fracción II de la LCyT que a la letra dice: "Los resultados de las actividades de investigación, desarrollo tecnológico e innovación que sean objeto de apoyos en términos de esta Ley serán invariablemente evaluados y se tomarán en cuenta para el otorgamiento de apoyos posteriores".

Expuesto lo anterior, las partes se obligan de acuerdo con las siguientes:

CLÁUSULAS

PRIMERA. OBJETO

El objeto del presente Convenio consiste en canalizar los recursos asignados por el "FONDO" en favor del "SUJETO DE APOYO", para la realización del "PROYECTO" aprobado, denominado EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES, ARTIFICIALES Y AZUCAR SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS WISTAR, cuya responsabilidad de ejecución y correcta aplicación de los recursos, queda, desde este momento, plenamente asumida por el "SUJETO DE APOYO".

El objetivo del "PROYECTO" es

Objetivo general

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales y sacarosa sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo animal de obesidad inducida por dieta.

Objetivos específicos

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales (glucosa, sacarosa y fructosa) y artificiales (sucralosa y estevia) sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo animal de obesidad inducida por dieta (OID).
2. Determinar la concentración de glucosa, insulina, leptina y adiponectina en ratas con OID y el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales.
3. Determinar la curva de tolerancia a la glucosa en ratas con OID al final del tratamiento con edulcorantes naturales, artificiales y sacarosa.

4. Analisis histológico del hígado y tejido adiposo.
5. Identificación de la microbiota (phyla, clase y especie) por secuenciamiento masivo (MiSeq, Illumina), al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales.
6. Determinar la expresión génica de factores de transcripción y enzimas involucradas en la lipogénesis, oxidación de ácidos grasos, receptores del dulzor así como proteínas involucradas en el gasto energético como AMPK.
7. Analizar mediante inmunohistoquímica los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intestino, vejiga, cerebro y tejido adiposo.
8. Determinación de la composición corporal (% de grasa, % masa grasa, % de masa libre de grasa) y el gasto energético (utilización de diferentes sustratos metabólicos).

SEGUNDA. CANALIZACIÓN DE RECURSOS

El "FONDO" con cargo a su patrimonio, y en cumplimiento al acuerdo tomado por el Comité Técnico y de Administración, y con sujeción a lo establecido en el presente Convenio, canaliza al "SUJETO DE APOYO" la cantidad total de \$1,292,727.00 (UN MILLON DOSCIENTOS NOVENTA Y DOS MIL SETECIENTOS VEINTISIETE PESOS 00/100 MN).

El "SUJETO DE APOYO" deberá presentar el comprobante fiscal digital según corresponda para cada una de las ministraciones. Las partes acuerdan que las ministraciones se comprobarán por medio del estado de cuenta de Nacional Financiera, S.N.C., I.B.D., como Institución Fiduciaria del "FONDO".

El "FONDO", canalizará los recursos al "SUJETO DE APOYO" en los términos establecidos en el Anexo Uno.

Una vez liberada la primera ministración y a la conclusión de la primera etapa del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" presentará el Informe Técnico y el Informe Financiero, a efecto de que se realice la ministración correspondiente al período siguiente y así sucesivamente, hasta la conclusión del "PROYECTO".

El "FONDO" podrá evaluar los informes financieros y técnicos y en caso de que las evaluaciones no resulten favorables, detendrá la ministración de recursos hasta que, en su caso, se resuelvan las observaciones a los reportes a satisfacción del Secretario Técnico o del Secretario Administrativo, según corresponda.

TERCERA. ANEXOS

Los Anexos que forman parte integral del presente Convenio se componen por lo siguiente:

1. El Anexo Uno contiene el Desglose Financiero del "PROYECTO".
2. El Anexo Dos contiene los objetivos, metas, actividades, entregables y plazos con los que se aprobó el "PROYECTO".

Los Anexos sólo podrán ser modificados por voluntad de las partes, a través de comunicaciones escritas en las que se hagan constar sus acuerdos, que deberán integrarse al presente instrumento, sin necesidad de celebrar un Convenio Modificatorio para tal efecto.

CUARTA. OBLIGACIONES DEL "FONDO"

a) Canalizar al "SUJETO DE APOYO" los recursos económicos a que se refiere la Cláusula Primera de este instrumento, en un término no mayor a 30 (treinta) días naturales, contados a partir de que el "SUJETO DE APOYO" haya entregado la documentación que para tales efectos le requiera el "FONDO", mismos que serán entregados en términos de lo presentado en la propuesta contenida en el Anexo Uno, a través de las ministraciones correspondientes a cada una de las etapas que conforman en su conjunto el "PROYECTO".

b) Vigilar por conducto del Secretario Administrativo y el Secretario Técnico la debida aplicación y adecuado aprovechamiento de los recursos económicos, efectivamente canalizados al "SUJETO DE APOYO", conforme al contenido de los Anexos Uno y Dos.

c) El "FONDO", a través de los medios que considere pertinentes, podrá en cualquier momento realizar auditorías y/o practicar visitas de supervisión, con el propósito de constatar el grado de avance en el desarrollo de los trabajos y la correcta aplicación de los recursos canalizados al "SUJETO DE APOYO".

QUINTA. OBLIGACIONES DEL "SUJETO DE APOYO"

a) Se obliga a entregar en un término no mayor a 30 (treinta) días naturales, contados a partir de la suscripción del presente instrumento jurídico, la documentación que le requiera el Secretario Administrativo del "FONDO" para poder llevar a cabo la

canalización de los recursos.

b) Se obliga a destinar bajo su más estricta responsabilidad los recursos económicos ministrados por el "FONDO", exclusivamente a la realización del "PROYECTO", de conformidad con lo dispuesto en el presente Convenio y los Anexos que forman parte integral del mismo.

c) Se obliga a desarrollar el "PROYECTO" conforme a lo contenido en los Anexos Uno y Dos, mismos que forman parte integral del presente Convenio.

d) Se obliga a proporcionar las facilidades necesarias para permitir el acceso a sus instalaciones a un representante del "FONDO", así como para mostrar la información técnica y financiera que le sea solicitada por el mismo.

e) Deberá guardar toda aquella información técnica-financiera que se genere para realizar futuras evaluaciones sobre el "PROYECTO", durante un periodo de 5 (cinco) años posteriores a la conclusión del mismo.

f) Deberá abrir un sistema de registro contable de los movimientos financieros relativos al "PROYECTO", así como contar con un expediente específico para la documentación del mismo, el cual deberá contener al menos la siguiente documentación:

- o Impresión del Convenio de Asignación de Recursos con los códigos de firma electrónica.
- o En su caso, solicitud para la apertura de la cuenta bancaria para el "PROYECTO".
- o En su caso, estados de cuenta bancarios que reflejen los movimientos de la cuenta.
- o En caso de que por la normatividad institucional no se pueda abrir una cuenta bancaria específica para el "PROYECTO", respaldo documental de los movimientos financieros relacionados con el "PROYECTO".
- o Copia del recibo institucional o comprobante fiscal digital para solicitar la ministración de recursos.
- o Comprobantes de las erogaciones de gastos.
- o Documentos relacionados con movimientos técnicos y/o financieros.

g) Se obliga a informar de manera inmediata al Área de Quejas y Responsabilidades del Órgano Interno de Control en el "CONACYT" así como al Área de Quejas y Responsabilidades del Órgano Interno de Control en la Secretaría de Educación Pública, en el caso de que algún servidor público del "CONACYT" o de la Secretaría, por sí, o por interposición persona solicite o reciba indebidamente para sí o para otro, dinero o cualquier otra dádiva, o acepte una promesa, para hacer o dejar de hacer actos o acciones relacionadas con el cumplimiento del presente instrumento jurídico.

h) Se obliga a rendir los informes a que hace referencia la Cláusula Sexta de este Convenio.

SEXTA. INFORMES

El "SUJETO DE APOYO" deberá presentar los informes respecto del avance del "PROYECTO", de conformidad con lo siguiente:

1. Informe Financiero acorde al Desglose establecido en el Anexo Uno del "PROYECTO".
2. Informe Técnico al cierre de cada etapa conforme a las actividades establecidas en el Anexo Dos del "PROYECTO".

Los Informes mencionados deberán contener los entregables comprometidos para esa etapa, la información de la aplicación de los recursos canalizados, y una valoración razonable sobre la viabilidad de alcanzar el objetivo del "PROYECTO" por parte del "SUJETO DE APOYO".

La recepción de los Informes como soporte, no implica la aceptación definitiva de los resultados, ya que podrán ser evaluados tanto por el Secretario Técnico (Informe Técnico), como por el Secretario Administrativo (Informe Financiero) respectivamente, para proceder a la entrega de la ministración correspondiente.

Al término del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" deberá presentar al Secretario correspondiente un Informe Final Técnico y uno Financiero dentro de los 30 (treinta) días naturales contados a partir de la fecha de conclusión del "PROYECTO". El Informe Financiero deberá estar auditado preferentemente por un Despacho de Auditoría acreditado ante la Secretaría de la Función Pública.

El Informe Financiero deberá considerar la rendición de cuentas del monto total del apoyo otorgado, incluyendo los reembolsos realizados de los recursos no ejercidos.

Para la expedición de la Constancia de Conclusión Técnica y Financiera, será indispensable que al término del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" reembolse al "FONDO" la totalidad de los recursos económicos que no haya aplicado al desarrollo del "PROYECTO", en la cuenta que se determine para tal efecto, en un plazo no mayor a 15 (quince) días hábiles posteriores a la conclusión del "PROYECTO".

De proceder los Informes Finales Técnico y Financiero, el "FONDO" por conducto del Secretario Técnico y del Secretario Administrativo emitirán la Constancia de Conclusión Técnica y Financiera, en el que se contendrá la resolución de cierre del "PROYECTO", conforme a los criterios y procedimientos establecidos por el "FONDO".

La recepción de los Informes Técnicos y Financieros como soporte, no implican la aceptación definitiva de los resultados. En caso de que el "SUJETO DE APOYO" incumpla con las obligaciones establecidas en el Convenio, el "FONDO" se reserva el derecho de ejecución de las acciones correspondientes en términos de las leyes que resulten aplicables:

SEPTIMA. ÁREAS DE COORDINACIÓN

El Secretario Administrativo realizará el seguimiento financiero y administrativo del uso de los recursos del "FONDO" por el "SUJETO DE APOYO" en el "PROYECTO" aprobado.

El Secretario Técnico coordinará el seguimiento técnico del "PROYECTO" apoyado con los recursos del "FONDO" así como la evaluación de resultados del mismo.

El "SUJETO DE APOYO" designa a DRA. NIMBE TORRES Y TORRES, como Responsable Técnico del "PROYECTO", quien será el enlace con el Secretario Técnico del "FONDO", para los asuntos técnicos, teniendo como obligación principal la de coordinar el desarrollo del "PROYECTO", presentar el informe de cierre, y en general supervisar el fiel cumplimiento del presente Convenio.

En caso de ausencia temporal mayor a 30 (treinta) días naturales o definitiva del Responsable Técnico, el "SUJETO DE APOYO" deberá designar al sustituto, con el acuerdo por escrito del Secretario Técnico del "FONDO", en un plazo que no excederá de 15 (quince) días naturales posteriores a que éste se ausente.

El "SUJETO DE APOYO" designa a C. MARÍA TERESA RAMÍREZ CÁZARES, como Responsable Administrativo del "PROYECTO", quien auxiliará al Responsable Técnico en su función de enlace con el Secretario Administrativo y tendrá como obligación directa el manejo de los recursos del apoyo económico canalizado al "SUJETO DE APOYO", así como los asuntos contables y administrativos del "PROYECTO".

En caso de ausencia temporal mayor a 30 (treinta) días naturales o definitiva del Responsable Administrativo, el "SUJETO DE APOYO" deberá designar al sustituto, notificando de ello al Secretario Administrativo del "FONDO", en un plazo que no excederá de 15 (quince) días naturales posteriores a que éste se ausente.

OCTAVA. CUENTA BANCARIA

El "SUJETO DE APOYO" deberá disponer de una cuenta de cheques, a través de la cual se le canalizarán las ministraciones correspondientes a cada etapa, debiendo estar a nombre del "SUJETO DE APOYO", la cual será operada mancomunadamente por el Responsable Técnico y el Responsable Administrativo a que se refiere la Cláusula anterior, únicamente para administrar los recursos canalizados al "PROYECTO", por lo que será necesario que la misma se encuentre acreditada ante el "FONDO", previamente a la entrega de la primera ministración.

En caso de que el "SUJETO DE APOYO" maneje cuentas concentradoras, deberá asignar una cuenta específica para el "PROYECTO" notificando de ello al Secretario Administrativo, a fin de que se acredite la misma.

En caso de que las cuentas de cheques o concentradoras generen rendimientos, éstos deberán ser reintegrados al "FONDO" al término del "PROYECTO", a través de la cuenta que se determine para tal efecto.

Los recursos asignados al "PROYECTO" deberán permanecer en la cuenta específica del mismo, hasta en tanto no sean ejercidos en términos de lo aprobado por el Comité Técnico y de Administración. Los recursos depositados en la cuenta no podrán transferirse a otras cuentas que no estén relacionadas con el objeto del "PROYECTO".

Las ministraciones que se otorguen para la realización de los proyectos no formarán parte del patrimonio del "SUJETO DE APOYO", ni de su presupuesto y su ejercicio se registrará por lo estipulado en las Reglas de Operación del Fideicomiso y lo que determine el Comité Técnico y de Administración del "FONDO".

Es obligación del Responsable Administrativo del "PROYECTO" cumplir con todos los requisitos administrativos y contables derivados del presente Convenio.

Asimismo, las aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias se deberán depositar en la misma cuenta bancaria, para aplicarse en los rubros comprometidos de conformidad con las cantidades y conceptos aprobados que se detallan en el Anexo Uno, el cual forma

parte integral del presente Convenio.

Las aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias realizadas para el desarrollo del "PROYECTO" por el "SUJETO DE APOYO", previas a la formalización del presente instrumento, no se contabilizarán como aportaciones líquidas, concurrentes y/o complementarias del "SUJETO DE APOYO" para el desarrollo del mismo.

NOVENA. DERECHOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y/O AUTOR

La titularidad de los derechos de autor de naturaleza patrimonial y los derechos de propiedad industrial de las obras, procesos, patentes, marcas, modelos de utilidad, diseños industriales, innovaciones o cualquier otro producto de investigación que realice o produzca durante el desarrollo del "PROYECTO" por el "SUJETO DE APOYO" en forma individual o con la colaboración con otros, en virtud del "PROYECTO", serán propiedad única y exclusiva de quien conforme a derecho corresponda, respetando en todo momento los derechos morales de quienes intervengan en su realización.

En lo no previsto en la presente Cláusula, se estará a lo regulado en la Ley Federal del Derecho de Autor, en la Ley de la Propiedad Industrial y en los demás ordenamientos aplicables.

El "SUJETO DE APOYO" estará obligado a informar por escrito al "FONDO" sobre el estado que guarden los citados derechos y sobre las posibles implicaciones que ello represente para la viabilidad del "PROYECTO".

En las publicaciones o presentaciones en eventos que se realicen, derivadas o relacionadas con el resultado del "PROYECTO", el "SUJETO DE APOYO" deberá dar, invariablemente, el crédito correspondiente al "FONDO", agregando la leyenda: "Proyecto Apoyado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación".

El "FONDO" pactará con el "SUJETO DE APOYO" el uso de los derechos de propiedad industrial derivados del "PROYECTO", en aquellos casos en que exista un interés de Estado debidamente justificado, sujetándose a los términos y condiciones que se estipulen en los Convenios correspondientes.

DÉCIMA. INFORMACIÓN CONFIDENCIAL Y PÚBLICA

Las partes se comprometen a tratar como confidencial toda la información relacionada con los datos personales del "SUJETO DE APOYO", así como aquella que con tal carácter proporcionen.

El "SUJETO DE APOYO", se compromete a proporcionar la información del "PROYECTO" a través de una Ficha que contenga la información básica de los objetivos del "PROYECTO" y sus resultados, misma que se considerará información pública en términos de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental, su Reglamento, la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública y demás disposiciones jurídicas aplicables.

DÉCIMA PRIMERA. ACCESO A LA INFORMACIÓN

El "SUJETO DE APOYO" se compromete a proporcionar la información del "PROYECTO" requerida por el Sistema Integrado de Información sobre Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación (SIICYT) que opera el "CONACYT". Dicha información será publicada en su página de Internet, dando con ello cumplimiento a las disposiciones de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental y la Ley General de Transparencia y Acceso a la Información Pública.

El "SUJETO DE APOYO" cuyas actividades de investigación sean financiadas total o parcialmente con recursos públicos o que hayan utilizado infraestructura pública para la realización del "PROYECTO" y de sus resultados, así como de la información derivada de las actividades académicas, científicas, tecnológicas y de innovación nacional e internacional, deberán acatar las disposiciones contenidas en los Lineamientos Generales para el Repositorio Nacional y los Repositorios Institucionales, así como por los Lineamientos Técnicos para el Repositorio Nacional y los Repositorios Institucionales.

DÉCIMA SEGUNDA. COMUNICACIÓN PÚBLICA DE LA CIENCIA

El conocimiento generado por la investigación, científica, tecnológica y la innovación puede ser aprovechado por la sociedad mexicana en su proceso permanente de transformación, desarrollo social y económico, particularmente dicho conocimiento debe convertirse en motor de desarrollo y en factor dinamizador del cambio social. En su caso, el conocimiento debe socializarse para tener un impacto real.

De conformidad con el artículo 12, fracción XV de la Ley de Ciencia y Tecnología, los beneficiarios de los apoyos que otorga el Gobierno Federal en materia científica, tecnológica y de innovación, difundirán a la sociedad sus actividades y los resultados de sus investigaciones y desarrollos, sin perjuicio de los derechos de propiedad intelectual correspondientes, y de la información que, por razón de su naturaleza, deba reservarse.

DÉCIMA TERCERA. RESCISIÓN

El "FONDO" podrá rescindir el presente Convenio al "SUJETO DE APOYO", sin necesidad de declaración judicial previa ni de dar aviso por escrito, cuando éste incurra en alguno de los supuestos de incumplimiento que de manera enunciativa más no limitativa, a continuación se señalan:

- a) Aplique los recursos canalizados por el "FONDO" con finalidades distintas a la realización directa del "PROYECTO".
- b) No presente los Informes Técnicos y Financieros al cierre de cada etapa o no atienda las observaciones emitidas por las instancias de evaluación y seguimiento.
- c) No presente los Informes Técnico y Financiero finales o no lo haga satisfactoriamente.
- d) No brinde las facilidades de acceso a la información, o a las instalaciones donde se administra y desarrolla el "PROYECTO".
- e) El estado del "PROYECTO" no guarde congruencia con los informes hasta ese momento presentados.
- f) Por identificación de desviaciones no reportadas en la etapa de desarrollo correspondiente, por parte de los Responsables Técnico y/o Administrativo.
- g) No compruebe la debida aplicación de los recursos canalizados para el "PROYECTO" cuando le sea expresamente requerido por el "FONDO".
- h) Proporcione información o documentación falsa.
- i) Retire los recursos de la cuenta específica del "PROYECTO" para transferirlos a otras cuentas no relacionadas con el objeto del mismo.
- j) Incurra en algún otro incumplimiento a este Convenio y sus Anexos.

Cuando el "FONDO", ejercite el derecho contenido en la presente Cláusula, el "SUJETO DE APOYO" reembolsará el remanente de los recursos que le fueron canalizados en un plazo no mayor de 30 (treinta) días naturales, contados a partir del requerimiento escrito que se le formule para tales efectos, con independencia de que se haga acreedor a la sanción a que se refiere la Cláusula siguiente.

DÉCIMA CUARTA. CANCELACIÓN DEL RENIECYT

En los casos en que el incumplimiento por parte del "SUJETO DE APOYO" a las obligaciones que asume por virtud del presente instrumento legal, que impida continuar con el desarrollo del "PROYECTO", y que haya sido omiso a los requerimientos del Secretario Técnico, el "FONDO" previo acuerdo del Comité Técnico y de Administración, solicitará a la Unidad de Asuntos Jurídicos a través de Dirección de Procesos Jurídicos, se convoque a la Comisión Interna de Evaluación a efecto de conocer y resolver lo conducente respecto a la procedencia de cancelación del RENIECYT, conforme a lo dispuesto en el artículo 52 de las Bases de Organización y Funcionamiento del Registro Nacional de Instituciones y Empresas Científicas y Tecnológicas.

DÉCIMA QUINTA. CASO FORTUITO Y/O FUERZA MAYOR

En aquellos casos en que el incumplimiento por parte del "SUJETO DE APOYO", sea por consecuencia de caso fortuito o causas de fuerza mayor, deberá notificar al "FONDO" dichas circunstancia(s), debiendo reembolsar en la cuenta que para tal efecto se determine, el remanente de los recursos económicos que no hayan sido aplicados al desarrollo del "PROYECTO", que no sean elegibles y que no estén debidamente comprobados ni justificados por el sujeto de apoyo, en la cuenta que el "FONDO" determine para tal efecto, en un plazo no mayor a 30 (treinta) días naturales contados a partir de la notificación correspondiente.

Para efectos de este Convenio se entenderá por caso fortuito y fuerza mayor, a los sucesos de la naturaleza o de hechos del hombre que, siendo extraños al "SUJETO DE APOYO", lo afectan impidiéndole temporal o definitivamente el cumplimiento parcial o total de sus obligaciones.

DÉCIMA SEXTA. PROHIBICIÓN PARA UTILIZAR LA INFORMACIÓN PARA FINES POLÍTICOS

Los compromisos asumidos en este Convenio derivan de programas de carácter público, los cuales no son patrocinados ni promovidos por partido político alguno y sus recursos provienen de los impuestos que pagan todos los contribuyentes. Está prohibido el uso del contenido de este Convenio y del "PROYECTO" con fines políticos, electorales, de lucro y otros distintos a los establecidos. Quien haga uso indebido de los recursos de este Convenio y del "PROYECTO" deberá ser denunciado y sancionado de acuerdo con la Ley aplicable y ante la autoridad competente.

DÉCIMA SÉPTIMA. TERMINACIÓN ANTICIPADA

El "FONDO" podrá dar por terminado de manera anticipada el presente Convenio, cuando a su juicio existan circunstancias que impidan continuar con el desarrollo del "PROYECTO", previa notificación por escrito que se haga al "SUJETO DE APOYO" con una anticipación mínima de 5 (cinco) días naturales.

En el supuesto de terminación anticipada del presente Convenio, el "SUJETO DE APOYO" reembolsará en depósito al "FONDO", a la cuenta que se determine para tal efecto, la totalidad de los recursos de apoyo económico que, en su caso, no haya aplicado al "PROYECTO", en un plazo no mayor a 15 (quince) días naturales contados a partir de la fecha de conclusión del mismo.

DÉCIMA OCTAVA. DEVOLUCIÓN DE LOS RECURSOS

En cualquier caso de devolución de recursos económicos del "PROYECTO", el Responsable Administrativo del "PROYECTO" tiene la obligación de dar aviso de inmediato al Secretario Técnico y Administrativo del "FONDO" de la devolución de los recursos al "FONDO", y comprobar dicha devolución mediante la entrega de la copia de la ficha de depósito o de la transferencia bancaria, para que el recurso devuelto sea identificado inmediatamente.

DÉCIMA NOVENA. RELACIÓN LABORAL

El "FONDO" no establecerá ninguna relación de carácter laboral con el personal que el "SUJETO DE APOYO" llegase a ocupar para la realización del "PROYECTO", en consecuencia, las partes acuerdan que el personal designado, contratado o comisionado para la realización del "PROYECTO", estará bajo la dependencia directa del "SUJETO DE APOYO"; y por lo tanto, en ningún momento se considerará al "FONDO" como patrón solidario o sustituto, ni tampoco al "SUJETO DE APOYO" como intermediario, por lo que el "FONDO" no asume ninguna responsabilidad que pudiera presentarse en materia de trabajo y seguridad social, por virtud del presente Convenio.

VIGÉSIMA. RESPONSABILIDAD CIVIL

Queda expresamente pactado que las partes no tendrán responsabilidad civil por los daños y perjuicios que pudieran causarse como consecuencia de caso fortuito o fuerza mayor, particularmente por el paro de labores académicas o administrativas, en la inteligencia de que una vez superados estos eventos, se reanudarán las actividades en la forma y términos que dictaminen las partes.

VIGÉSIMA PRIMERA. PREVISIONES ÉTICAS, ECOLÓGICAS Y DE SEGURIDAD

El "SUJETO DE APOYO" se obliga a cumplir y hacer cumplir durante el desarrollo del "PROYECTO" y hasta su conclusión la legislación aplicable especialmente en materia ecológica, de protección a la bioseguridad y la biodiversidad, así como a respetar las convenciones y protocolos en materia ética aplicada a la investigación.

Asimismo, el "SUJETO DE APOYO" se obliga a considerar la equidad de género, la no discriminación por causas de nacionalidad, origen étnico, preferencia sexual, religión y/o cualquier otro atributo inherente a la persona, que pudieran interpretarse o resultar como un acto discriminatorio, así como la legislación aplicable y la normatividad institucional en materia de seguridad.

VIGÉSIMA SEGUNDA. ACTUALIZACIÓN DE DATOS EN EL RENIECYT

El "SUJETO DE APOYO" tendrá la obligación de informar a la Dirección de Procesos Jurídicos adscrita a la Unidad de Asuntos Jurídicos, entre otros cambios los de su situación económica, cambio de domicilio legal, razón o denominación social o representante legal. Asimismo, el "SUJETO DE APOYO" se obliga a mantener actualizada su inscripción e información en el RENIECYT.

VIGÉSIMA TERCERA. VIGENCIA

El presente Convenio tendrá una vigencia de 36 meses, contados a partir de la fecha de la primera ministración, entendiéndose como formalizado al momento en que se cuente con la firma de todas y cada una de las partes que intervienen en el mismo.

No obstante, la vigencia al Convenio podrá prorrogarse siempre que se cuente con el consentimiento de las partes por escrito y el Acuerdo que al respecto emita el Comité Técnico y de Administración del "FONDO".

Las obligaciones a cargo del "SUJETO DE APOYO" concluyen hasta que el "FONDO" expida la Constancia de Conclusión Técnica y Financiera.

VIGÉSIMA CUARTA. ASUNTOS NO PREVISTOS

Los asuntos relacionados con el objeto de este Convenio y que no queden expresamente previstos en sus Cláusulas, ni en sus Anexos, serán interpretados y resueltos de común acuerdo por las partes, apelando a su buena fe y consecución de mismos propósitos, haciendo constar sus decisiones por escrito.

VIGÉSIMA QUINTA. CONSENTIMIENTO ELECTRÓNICO

En términos del artículo 1803, fracción I del Código Civil Federal, las partes acuerdan que es su voluntad aceptar íntegramente el contenido obligacional de este Convenio a través de su suscripción mediante el Sistema de People Soft, por lo que reconocen que dicho medio, constituye el consentimiento expreso del presente acuerdo de voluntades.

VIGÉSIMA SEXTA. AUSENCIA DE VICIOS DE VOLUNTAD

Las partes manifiestan que en la celebración del presente convenio no ha mediado circunstancia alguna que induzca a error, dolo, mala fe u otra circunstancia que afecte o vicie la plena voluntad con que celebran el presente instrumento, por lo que el mismo es válido para todos los efectos legales conducentes.

VIGÉSIMA SÉPTIMA. JURISDICCIÓN

Para la solución a toda controversia que se pudiera suscitar con motivo de la interpretación, ejecución y cumplimiento del presente Convenio y sus Anexos, y que no se resuelva de común acuerdo por las partes, éstas se someterán a las Leyes Federales vigentes y Tribunales Federales competentes de la Ciudad de México, renunciando desde ahora a cualquier otro fuero que les pudiera corresponder en razón de sus respectivos domicilios presentes o futuros.

PREVIA LECTURA Y CON PLENO CONOCIMIENTO DE SU CONTENIDO, LAS PARTES EXPRESAN SU CONSENTIMIENTO ELECTRÓNICO AL PRESENTE INSTRUMENTO QUE A CONTINUACIÓN SE INSERTA PARA CADA UNA DE ELLAS.

POR EL "FONDO"

POR EL "SUJETO DE APOYO"

C.P. ARIEL GÓMEZ AGUILAR
SECRETARIO ADMINISTRATIVO SUPLENTE

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ
REPRESENTANTE LEGAL

ASISTIDO POR:

DR. LUIS HUMBERTO FABILA CASTILLO
SECRETARIO TÉCNICO

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES
RESPONSABLE TÉCNICO

C. MARÍA TERESA RAMÍREZ CÁZARES
RESPONSABLE ADMINISTRATIVO

LAS FIRMAS QUE ANTECEDEN, CORRESPONDEN AL CONVENIO DE ASIGNACIÓN DE RECURSOS QUE CELEBRAN NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., EN SU CARÁCTER DE FIDUCIARIA DEL FIDEICOMISO PÚBLICO DE ADMINISTRACIÓN E INVERSIÓN DENOMINADO "FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN", EL "FONDO" Y INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, EL "SUJETO DE APOYO", MEDIANTE EL CUAL ESTABLECEN LAS CONDICIONES PARA OTORGAR EL APOYO PARA LLEVAR A CABO EL "PROYECTO" DENOMINADO EFECTO DE EDULCORANTES NATURALES, ARTIFICIALES Y AZUCAR SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y RECEPTORES DEL DULZOR EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA EN RATAS WISTAR.

Anexo I: Dèsglose Financiero

Total de etapas: \$1292727

Etapas: 001

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	512110
FONDO	GINVE	402	Equipo de laboratorio	130000

Total de etapa: \$642110

Etapas: 002

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	492817
FONDO	GCORR	321	Honorarios por serv. profesion	20000

Total de etapa: \$512817

Etapas: 003

Tipo de Recurso	Categoría del recurso	Subcategoría del recurso	Descripción de Subcategoría	Importe del recurso
FONDO	GCORR	326	Materiales de uso directo	15000
FONDO	GCORR	328	Pasajes	4000
FONDO	GCORR	336	Viáticos	15000
FONDO	GCORR	310	Cuotas de inscripción	6800
FONDO	GCORR	336	Viáticos	29750
FONDO	GCORR	328	Pasajes	22150
FONDO	GCORR	329	Public ediciones e impresiones	45100

Total de etapa: \$137800

Anexo 2: Cronograma de actividades por etapa

Etapa #	Descripción De La Etapa	Descripción De La Meta	Actividades	Productos	Fecha inicial DD-MM-AAAA	Fecha de termino DD-MM-AAAA	Fecha informe avance y final DD-MM-AAAA
---------	-------------------------	------------------------	-------------	-----------	--------------------------	-----------------------------	---

001	<p>Con el objeto de estudiar si el consumo de edulcorantes naturales y/ o artificiales tiene un efecto sobre la ganancia de peso y modificación de la microbiota, se alimentaran ratas cepa Wistar con diferentes azuceres naturales y artificiales por un periodo de 5 meses. Durante este periodo se evaluarán los siguientes parámetros: peso corporal, consumo de alimento, composición corporal, gasto energético, concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, triglicéridos, insulina, leptina, adiponectina y LPS (lipopolisacárido) para estudiar si el efecto de estos edulcorantes pudiera ocasionar algún tipo de inflamación mediada por LPS</p>	<p>Conocer el efecto de edulcorantes naturales y artificiales a largo plazo sobre la microbiota intestinal, composición corporal, gasto energético y parámetros bioquímicos</p>	<p>Se llevarán a cabo las siguientes actividades Medición del consumo de alimento diario y el peso corporal cada tercer día durante toda la duración del estudio. Esto se realizará con el fin de conocer el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre la ganancia de peso. Determinación de la composición corporal mediante resonancia magnética y el gasto energético mediante calorimetría indirecta durante 24 horas. Esto se llevará a cabo con el fin de conocer el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales en la regulación de la respuesta metabólica y la composición corporal. Determinación de las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total, triglicéridos, insulina, leptina, adiponectina mediante ensayos enzimáticos, colorimétricos y ensayos de Elisa. Esto se llevará a cabo con el fin de</p>	<p>Cumplimiento de los objetivos específicos descritos en el presente proyecto referentes al efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales en una dieta control. 1. Resultados del efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ganancia de peso, la composición corporal y el gasto energético. 2. Resultados del efecto de los edulcorantes artificiales y naturales sobre las concentraciones séricas de glucosa, colesterol total (CT) y triglicéridos (TG), leptina, insulina, adiponectina. 3. Resultados de la curva de tolerancia a la glucosa y ver si los edulcorantes naturales o artificiales tienen un efecto en la intolerancia a la glucosa</p>	05/09/2016	04/09/2017	04/09/2017
-----	--	---	---	--	------------	------------	------------

			<p>conocer el efecto del consumo de los edulcorantes naturales y artificiales en la modulación de parámetros bioquímicos.</p> <p>Determinación de la prueba de tolerancia a la glucosa con el fin de ver si el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales producen intolerancia a la glucosa.</p> <p>Recolección de heces para la extracción de ADN. Se congelaran hasta el momento de la recolección del segundo grupo de OID.</p> <p>Realización de cortes histológicos para estudiar el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre el depósito de grasa en el hígado</p>				
002	<p>En esta segunda etapa se estudiará el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales en el desarrollo de la obesidad. Para lo cual se alimentarán ratas con una dieta alta en grasa saturada junto con el edulcorante natural y/o artificial por un periodo de 5 meses. En esta etapa también se evaluará ganancia de peso, consumo de alimento, tolerancia a la glucosa, composición corporal, gasto</p>	<p>Conocer el efecto de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo de obesidad inducido por dieta y ver su efecto en el desarrollo o control de la obesidad</p>	<p>Se llevarán a cabo las siguientes actividades</p> <p>Medición del consumo de alimento diario y el peso corporal cada tercer día durante toda la duración del estudio. Esto se realizará con el fin de conocer el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales en la ganancia o control de peso.</p> <p>Determinación de la</p>	<p>Cumplimiento de los objetivos específicos descritos en el presente proyecto referentes al efecto del consumo de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo de obesidad inducido por dieta.</p> <p>Resultados del efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ganancia de peso, la</p>	05/09/2017	04/09/2018	04/09/2018

energético
 concentraciones
 séricas de glucosa,
 colesterol total,
 triglicéridos,
 insulina, leptina,
 adiponectina y LPS
 (lipopolisacárido)
 para estudiar el
 efecto de estos
 edulcorantes en un
 modelo de obesidad
 inducido por dieta y
 si pudiera ocasionar
 algún tipo de
 inflamación
 mediada por LPS y
 se comparará con
 los grupos de la
 primera etapa.

composición
 corporal
 mediante
 resonancia
 magnética y el
 gasto
 energético
 mediante
 calorimetría
 indirecta
 durante 24
 horas. Esto se
 llevará a cabo
 con el fin de
 conocer el
 efecto de los
 edulcorantes
 naturales y
 artificiales en la
 regulación de la
 respuesta
 metabólica y la
 composición
 corporal.
 Determinación
 de las
 concentraciones
 séricas de
 glucosa,
 colesterol total,
 triglicéridos,
 insulina,
 leptina,
 adiponectina
 mediante
 ensayos
 enzimáticos,
 colorimétricos
 y ensayos de
 Elisa. Esto se
 llevará a cabo
 con el fin de
 conocer el
 efecto del
 consumo de los
 edulcorantes
 naturales y
 artificiales en la
 modulación de
 parámetros
 bioquímicos.
 Determinación
 de la prueba de
 tolerancia a la
 glucosa con el
 fin de ver si el
 efecto de los
 edulcorantes
 naturales y
 artificiales
 producen
 intolerancia a la
 glucosa en el
 modelo de
 OID.
 Recolección de

composición
 corporal y el
 gasto
 energético.
 Resultados del
 efecto de los
 edulcorantes
 artificiales y
 naturales sobre
 las
 concentraciones
 séricas de
 glucosa,
 colesterol total
 (CT) y
 triglicéridos
 (TG), leptina,
 insulina,
 adiponectina.
 Resultados de la
 curva de
 tolerancia a la
 glucosa y ver si
 los edulcorantes
 naturales o
 artificiales
 tienen un efecto
 en la
 intolerancia a la
 glucosa en el
 modelo de OID.
 Comparar todos
 los parámetros
 antes
 mencionados
 con los grupos
 controles
 obtenidos en la
 etapa 1.
 Obtención de
 los datos de
 secuenciamiento
 para su posterior
 análisis
 bioinformático.
 Se podrá
 comparar el
 efecto de los
 edulcorantes
 naturales en una
 dieta control y
 en un modelo de
 obesidad
 inducida por
 dieta y su efecto
 sobre la
 expresión de
 genes
 lipogénicos y de
 oxidación de
 ácidos grasos

			<p>heces para la extracción de ADN. Se congelaran hasta el momento de la extracción de ADN. Realización de cortes histológicos para estudiar el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre el deposito de grasa en el hígado. Se empezará con la extracción del ADN de heces para llevar a cabo la determinación del gen 16S ribosomal por secuenciación masiva utilizando la plataforma MiSeq de Illumina. Se empezará con la extracción de RNA de los diferentes tejidos y se cuantificará la expresión de genes lipogénicos (SREBP-1, FAS) y de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (PPARα y CPT-1)</p>				
003	<p>En esta etapa se estudiará el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales en cortes sobre los receptores T1R2 y T1R3 por medio de análisis inmunohistoquímico en lengua, intestino, cerebro y tejido adiposo para los receptores del dulzor T1R2, T1R3, el análisis</p>	<p>En esta etapa se estudiará el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales en cortes sobre los receptores T1R2 y T1R3 por medio de análisis inmunohistoquímico en lengua, intestino, cerebro y tejido adiposo para los receptores del dulzor T1R2, T1R3, el análisis</p>	<p>En esta etapa se estudiará el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre la expresión de receptores T1R2 y T1R3 en los diferentes tejidos con el objeto de ver si existe una</p>	<p>En este periodo se podrán conocer la diversidad de las bacterias presentes en la microbiota con los diferentes edulcorantes naturales y artificiales, su relación con los receptores del dulzor y la expresión de</p>	05/09/2018	04/09/2019	04/09/2019

	<p>bioinformático y la escritura del manuscrito.</p>	<p>bioinformático y la escritura del manuscrito.</p>	<p>asociación entre la expresión de los receptores del dulzor y la diversidad de la microbiota También en este periodo se llevará acabo el análisis bioinformático de la base de datos guardada en BaseSpace y podrá ser analizada por programas como el QIME para poder determinar el efecto de los edulcorantes naturales y artificiales sobre las diferentes phylas, clases y especies de bacterias contenidas en la microbiota intestinal. Presentación de los resultados en un congreso internacional. Se empezará con la escritura de un manuscrito para una revista de alto impacto y uno de divulgación científico</p>	<p>genes. Publicación de un artículo de investigación y graduación de los estuianes de maestria y doctorado.</p>			
--	--	--	--	--	--	--	--

Nombre	Códigos de firma electrónica	Fecha y hora de firma
Este contrato tiene como última Fecha de Firma		



No. CINVA:
 CLAVE: FNU-1735-15/18-1
 Fecha de registro del Protocolo: 05-oct-15

Título del Protocolo: "Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta"

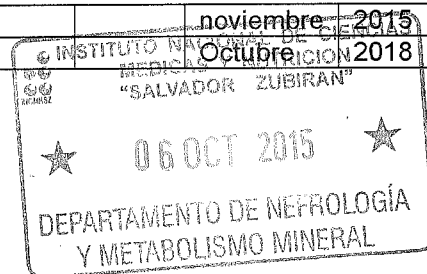
Propuesta: a) Nueva b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ø

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ø

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	Doctora	56553038	Ø
	Maestro	57473800 ext 5442	

Vigencia del Proyecto.	
Fecha de inicio del proyecto	noviembre 2015
Fecha tentativa de finalización.	Octubre 2018





PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

General

1. Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de obesidad inducida por dieta.

Específicos

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo de obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
2. Determinar la concentración de parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol LDL, leptina, adiponectina y LPS en suero en un modelo animal con OID y el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales.
3. Determinar la curva de tolerancia a la glucosa en el modelo de OID al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales.
4. Análisis histológico del hígado, intestino y tejido adiposo.
5. Identificación del gen 16Sr por medio de secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina para determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de bacterias de la microbiota intestinal al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales.
6. Determinación de la expresión génica y de proteínas involucradas en la lipogénesis (SREBP-1, FAS), oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas involucradas en el gasto energético como AMPK.
7. Analizar mediante inmunohistoquímica los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intestino, vejiga, cerebro y tejido adiposo.
8. Determinación de la composición corporal por resonancia magnética (% de grasa, % masa grasa, % de masa libre de grasa, % de agua corporal)
9. Determinación del gasto energético y el coeficiente respiratorio utilizando calorimetría indirecta OxyMax.

- 3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Actualmente hay un consumo excesivo de diversos edulcorantes tanto naturales como artificiales, sin embargo, existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los diferentes edulcorantes artificiales tienen un impacto benéfico o adverso



sobre la salud. También existe confusión si todos los edulcorantes artificiales generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además no existe mucha información si cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de los receptores del dulzor.

Recientemente se publicó que el consumo de edulcorantes artificiales, particularmente la sacarina, producen disbiosis en la microbiota intestinal resultando en intolerancia a la glucosa. Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un incremento en *B. vulgatus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas vías metabólicas están asociadas a obesidad y diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes artificiales, y que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo no toman en cuenta la estructura química de cada edulcorante (Fy además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inclusión de 5% de sacarosa en el agua más una dieta alta en grasa saturada significativamente incrementan las anomalías de parámetros bioquímicos de ratas que consumieron esta dieta por 7 meses, como son: triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, insulina, leptina, intolerancia a la glucosa y un desequilibrio significativo en la proporción de bacterias en el intestino (disbiosis) incrementando significativamente los *Firmicutes* y disminuyendo significativamente los *Bacteroidetes*, por lo que es necesario el estudio del consumo de edulcorantes en modelos animales con y sin obesidad en ratas Wistar

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para mas información consultar: www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf



Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

- 5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=6, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

- 6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

- 7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	96	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:		16		
No. de animales por grupo:		6		
No. TOTAL DE ANIMALES:		96		

- 8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 7 y 8 meses.

- 9) Procedimientos que se realizarán con los animales.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Única vez Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		
Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una caja metabólica durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

A) Se utilizarán 16 grupos con una n=6 por grupo, en total 96 ratas Wistar. Las dietas se preparan en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5



Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

- ⇒ Tratamiento 2 (Control+5% Sacarosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 3 (Control+5% Fructosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con fructosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 4 (Control+5% Glucosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 5 (Control+5% Stevia): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con stevia al 5%
- ⇒ Tratamiento 6 (Control+5% Sucralosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 7 (Control+5% mascabado): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 8 (Control+5% Sacarina): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarina al 5%
- ⇒ Tratamiento 9 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5



Manteca

17

- ⇒ Tratamiento 10 (DAGS+5% Sacarosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 11 (DAGS+5% Fructosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con fructosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 12 (DAGS+5% Glucosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 13 (DAGS+5% Stevia): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con stevia al 5%
- ⇒ Tratamiento 14 (DAGS+5% Sucralosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 15 (DAGS+5% mascabado): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 16 (DAGS+5% Sacarina): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarina al 5%

B) Para estudiar el efecto del consumo de los diferentes endulcorantes en un modelo animal con y sin OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en los 16 grupos antes mencionados y se alimentarán con esas dietas durante el periodo de 7 meses, durante el mismo, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica. Durante el tratamiento se medirá cada mes la composición corporal por medio de resonancia magnética. Al final de los tratamientos se medirá el gasto energético y el coeficiente respiratorio por calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (18). Una semana antes de finalizar el tratamiento se realizará una curva de tolerancia a la glucosa, después de un ayuno durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará glucosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la solución glucosada y al final del tratamiento se obtendrán muestras de sangre para la determinación de parámetros bioquímicos y heces para la determinación de la composición de la microbiota

Para la determinación de la microbiota se tomara una muestra de heces posterior al consumo de los diferentes endulcorantes y se aislara el DNA de la muestra y se llevara a cabo la ampliificación de phylas específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla y con la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina

Transcurridos los 7 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO_2 previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, riñon, musculo, lengua, cerebro, colon, y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos así como tejido adiposo pardo y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes lipogénicos (SREBP-1, FAS, ACC), genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (PPAR α , CPT-1), sensores de energía (AMPK), transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) en tejido adiposo y músculo). Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado, lengua y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la

presencia de inflamación y acumulación de grasa. Respecto al cerebro se realizarán análisis histológico e inmunohistoquímico, para determinar marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y estrés oxidativo

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimático-colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 16 grupos experimentales de tratamiento

11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales conscientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevoflurano		Inhalada	1 vez

13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardíaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.



14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No habrá procedimientos quirúrgicos

15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad, cambios en comportamiento social...
- Respuesta a estímulos externos
- Signos clínicos:
 - i. Respiración: normal, laboriosa...
 - ii. Temperatura
 - iii. Temblores
 - iv. Convulsiones
 - v. Descarga nasal, salivación

Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.

Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse" asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 - 1. Aceptable una disminución del 5-10%
 - 2. Moderada del 10-20%
 - 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 - 1. 0 si es normal.
 - 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 - 3. 2 si está afectado
 - 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe



confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO_2)

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Sobredosis con anestesia inhalado (sevofluorano)

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Via
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO_2	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO_2	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO_2	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO_2	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) ~~No~~ b) Si

Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
<http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMML5 sect V.pdf>

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.



FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACION DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable

Dra. Nimbe Torres Torres

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

No. CINVA:

CLAVE: FNU-1735-15/18-1

Fecha de registro del Protocolo: 05-oct-15

Título del Protocolo: "Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta "

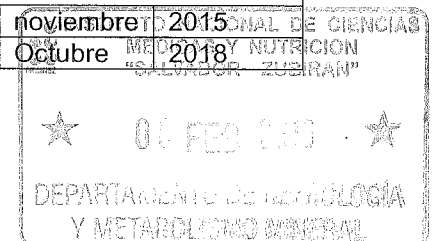
Propuesta: a) Nueva b) Renovación

Investigador Responsable del Proyecto.	
Nombre del Investigador Titular	Dra. Nimbe Torres y Torres
Institución de Adscripción	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"
Departamento de Adscripción	Fisiología de la Nutrición
Teléfono	56553038
Correo electrónico	Ø

Investigadores que Participaran en el Protocolo			
Nombre	Grado	Teléfono	e-mail
Armando Roberto Tovar Palacio	Doctor	56553038	Ø

Estudiantes			
Nombre	Grado a obtener	Teléfono	e-mail
Ø	Doctora	56553038	Ø
	Maestro	57473800 ext 5442	

Vigencia del Proyecto.	
Fecha de inicio del proyecto	
Fecha tentativa de finalización.	



**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR
LA CINVA DEL INCMNSZ.**

PROTOCOLO PARA EL USO DE ANIMALES EN INVESTIGACIÓN.

- 1) Institución en donde se realizará el proyecto.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

- 2) Objetivos generales y específicos del protocolo:

General

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo con y sin obesidad inducida por dieta

Específicos

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo animal con y sin obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
2. Evaluar el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales sobre parámetros bioquímicos (glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol LDL, leptina, adiponectina y LPS en suero en un modelo animal con y sin OID
3. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes, sobre la tolerancia a la glucosa, mediante una Curva de Tolerancia a la Glucosa
4. Analizar el efecto a nivel tisular del consumo de edulcorantes artificiales, sobre el hígado, intestino y tejido adiposo en ratas con y sin OID
5. Determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de bacterias de la microbiota intestinal al final del tratamiento con edulcorantes naturales y artificiales en un modelo con y sin OID, mediante la identificación del gen 16Sr por medio de secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina
6. Evaluar el efecto de los edulcorantes sobre la expresión génica y de proteínas involucradas en la lipogénesis (SREBP-1, FAS), oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas involucradas en el gasto energético como AMPK.
7. Analizar el efecto del consumo de edulcorantes sobre los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intestino, vejiga, cerebro y tejido adiposo.
8. Determinar la composición corporal por resonancia magnética (% de grasa, % masa grasa, % de masa libre de grasa, % de agua corporal), de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.
9. Estudiar mediante calorimetría indirecta, el gasto energético y el coeficiente respiratorio de animales con y sin OID que consumen diferentes edulcorantes naturales y artificiales.

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

3) Justificación del experimento y los procedimientos en el uso de animales:

Existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los diferentes edulcorantes artificiales tienen un impacto benéfico o adverso sobre la salud. También existe confusión si todos los edulcorantes artificiales generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además no existe mucha información si cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de los receptores del dulzor.

El consumo de edulcorantes artificiales (aspartame, sucralosa, sacarina) así como el consumo de azúcares (sacarosa, fructosa) o edulcorantes naturales (*Stevia rebaudiana*, xilitol) han causado una gran controversia en los últimos años. Basado en diversos estudios epidemiológicos se han observado cambios importantes en los patrones de alimentación en los hogares de México mostrando una disminución en el consumo de alimentos tradicionales, vegetales y frutas; con un incremento en azúcares refinados, grasas y refrescos (1). Durante la última década se observó un incremento sustancial en el número de productos que contienen edulcorantes y en el consiguiente consumo de los mismos. En Estados Unidos salieron al mercado más de 6000 productos con edulcorantes entre 1999 a 2004. Por otro lado el azúcar proporciona hidratos de carbono que se absorben rápidamente y al encontrarse en una gran cantidad de alimentos, da lugar a una ingesta de energía excesiva, ganancia de peso y síndrome metabólico. Por ello las personas escogen los edulcorantes no calóricos sobre el azúcar, con la intención de perder o mantener el peso corporal (2).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inclusión de 5% de sacarosa en el agua más una dieta alta en grasa saturada significativamente incrementan las anomalías de parámetros bioquímicos de ratas que consumieron esta dieta por 7 meses, como son: triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL, insulina, leptina, intolerancia a la glucosa y un desequilibrio significativo en la proporción de bacterias en el intestino (disbiosis) incrementando significativamente los *Firmicutes* y disminuyendo significativamente los *Bacteroidetes*.

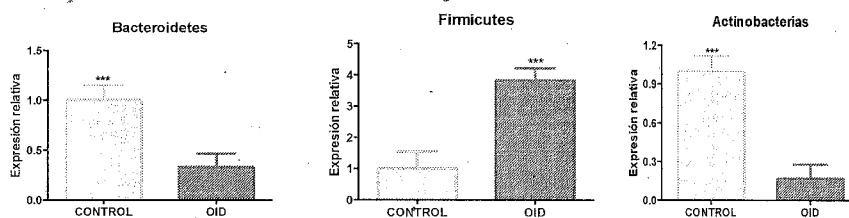


Figura 1. Relación de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias en ratas alimentadas con una dieta control (AIN 93) y en un grupo alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcar en el agua (DIO)

Interesantemente, los estudios epidemiológicos sugieren que los edulcorantes artificiales no ayudan a la pérdida de peso. Estudios de cohorte prospectivos correlacionan de manera positiva el uso de edulcorantes artificiales y la ganancia de peso. Las bebidas dietéticas, de amplio consumo en la población, se han relacionado con un incremento de 0.16 Kcal/m² en el índice de masa corporal por cada porción de bebida consumida. Esto resulta relevante dado que los edulcorantes no aportan, o aportan una cantidad mínima de energía (2).

El mecanismo por el cual el sabor dulce es útil para predecir la ingesta energética (calórica) se ve alterado al utilizar edulcorantes, ya que el organismo prepara una respuesta en el tracto gastrointestinal para el procesamiento de los hidratos de carbono asociados al sabor dulce, que no se lleva a cabo con la ingestión de los edulcorantes; la consecuencia es la disociación de la dulzura de la ingesta energética (13). Experimentos en roedores sugieren que el dar un edulcorante natural genera una respuesta que mantiene el consumo de energía constante, mientras que esto no ocurre con el consumo de edulcorantes artificiales que pueden ocasionar una ingesta energética compensatoria mayor asociada al bajo contenido calórico del edulcorante artificial (2). Otros estudios con edulcorantes artificiales demostraron que estos influyen en la diferenciación de los adipocitos estimulando la adipogénesis y que este mecanismo es dependiente de la dosis utilizada (3). Los diferentes hidratos de carbono

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

impactan de maneras diferentes el metabolismo de los lípidos. La fructosa incrementa la lipogénesis *de novo*, provoca dislipidemia, disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la adiposidad visceral; interesantemente el consumo de glucosa provoca un incremento en la adiposidad subcutánea en roedores (4).

Estas alteraciones fisiológicas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas, cuyas causas aún tienen múltiples incógnitas, que impactan a millones de personas a nivel mundial. La obesidad y *Diabetes mellitus* han alcanzado proporciones epidémicas que representan un costo sustancial para los sistemas de salud alrededor del mundo. Los tratamientos desarrollados a través de la investigación representan una esperanza para los afectados, ya que aún no se encuentra una cura. Estas patologías se encuentran asociadas a diversos factores de riesgo como inactividad física, exceso de grasa corporal, hábitos alimenticios inadecuados, disbiosis de la microbiota intestinal, señalización hormonal (leptina), y otros factores que contribuyen a estados sistémicos patológicos. Por lo anterior, es fundamental realizar mayores estudios para comprender los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes edulcorantes sobre las alteraciones metabólicas generadas por una disbiosis en la microbiota. Actualmente se sabe que la microbiota es considerada como un nuevo órgano por su impacto sobre la salud.

La microbiota intestinal se define como la comunidad microbiana que habita un medio ambiente específico, en nuestro caso la microbiota de interés es la intestinal. Las principales phylas bacterianas que conforman la microbiota intestinal son los *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%) *Actinobacterias* (3%), *Proteobacterias* (8%) y *Verrucomicrobia* (2%). Se ha demostrado en varios estudios que durante el desarrollo de la obesidad se presenta un desequilibrio de estas bacterias favoreciendo la presencia de *Firmicutes* y disminuyendo la de *Bacteroidetes*. El tipo y la concentración de polisacáridos no digeribles pero fermentables, así como la presencia de algunos compuestos bioactivos modulan la proporción de bacterias, sin embargo la presencia de azúcares o edulcorantes puede afectar la fermentación de los polisacáridos modificando los productos de fermentación que son los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato).

Recientemente se publicó en la revista Nature (5) que el consumo de edulcorantes artificiales, particularmente la sacarina, producen disbiosis en la microbiota intestinal resultando en intolerancia a la glucosa. Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un incremento en *B. vulgatus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas vías metabólicas están asociadas a obesidad y diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes artificiales, y que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo no toman en cuenta la estructura química de cada edulcorante (Figura 2) y además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante.

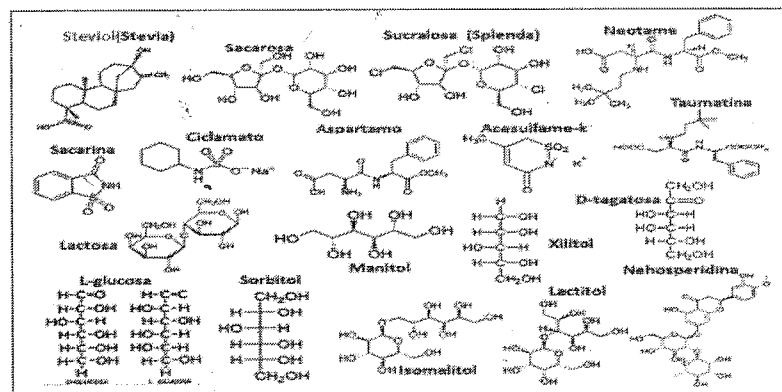


Figura 2. Estructura química de los edulcorantes.

Cabe mencionar que algunos edulcorantes naturales, como *Stevia rebaudiana*, se han asociado

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

a algunos efectos benéficos como la actividad antioxidante y esto ha incrementado su uso en productos comerciales. Sin embargo, al analizar su efecto *in vitro* sobre la microbiota intestinal se demostró que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y se observa un pH más elevado que en los controles, indicando una posible modificación en el microambiente (6). Por lo que es necesario conocer el efecto *in vivo* de este edulcorante a largo plazo sobre la microbiota. Los mamíferos se inclinan por la preferencia del sabor dulce debido a que está relacionado a la presencia de hidratos de carbono que indican la disponibilidad de energía y nutrientes. El sabor se percibe por los receptores de la familia T1R, de los cuáles T1R1, T1R2 y T1R3 se ubican principalmente en las papilas gustativas (7). Las células en las papilas gustativas envían la información al sistema nervioso central que da la percepción del sabor. El sabor dulce es detectado por la combinación de T1R2+T1R3 (Figura 3) que tienen diversos sitios de unión para diferentes compuestos. Principalmente se distinguen 3 dominios en cada receptor, la unión de los edulcorantes a estos receptores permiten la percepción del dulzor (8).

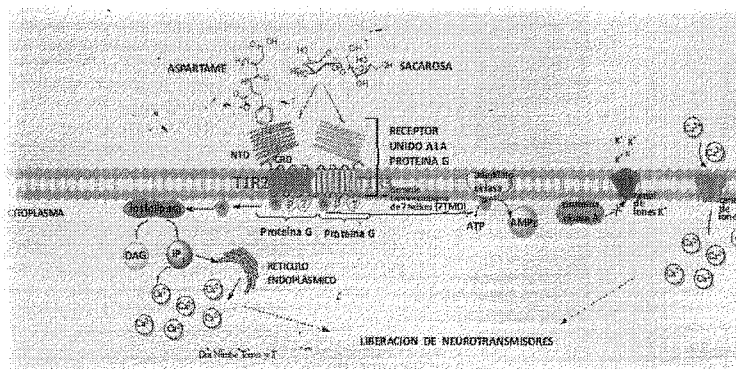


Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores del dulce T1R2 y T1R3

Los receptores del dulce están asociados a proteínas G, mediante la interacción con GPCRs de las células receptoras del gusto. Los T1R también se han encontrado en intestino, cerebro, tejido adiposo, vejiga y otros órganos. Su localización en estos órganos sugiere muchas teorías, entre ellas la posibilidad de detectar diferentes nutrientes y mantener la homeostasis de los mismos (9). En el caso de los roedores, T1R2 y T1R3 expresados en el intestino, se proponen como los sensores de glucosa a nivel del tracto gastrointestinal (14).

Asociaciones entre el metabolismo energético y los receptores del dulce en tejidos extraorales, sugieren que son una parte importante de la homeostasis energética. La glucosa es metabolizada por la insulina que es sintetizada en las células pancreáticas, que también expresan receptores asociados a proteínas G para detectar aminoácidos y lípidos; este mismo mecanismo es el usado para la detección del sabor dulce a través de T1R2 y T1R3. Se reporta que el receptor que detecta la glucosa facilita el metabolismo de succinato mitocondrial, pero se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre y cómo se regula el metabolismo de glucosa (15). Existe evidencia reciente donde se ha demostrado que ratones libres de germen presentan una sobre-expresión del receptor T1R3, sin embargo se desconoce si los edulcorantes naturales o artificiales modifiquen la microbiota y de ahí la expresión de los receptores del dulce (17).

En conjunto los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes artificiales debido a su estructura diversa pueden modificar de manera diferencial a la microbiota y de ahí generar diferentes alteraciones en el metabolismo de lípidos, así como en la expresión de los receptores del dulce que modulan el metabolismo energético de la célula

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

4) Clasificación del proyecto de acuerdo al nivel de invasividad en los animales.

Categoría A

Experimentos o ejercicios de enseñanza que involucran animales invertebrados, embriones de vertebrados, huevos embrionados de aves o de reptiles hasta antes del 90% de su total desarrollo, órganos aislados, tejidos y células vivas.

Categoría B.

Experimentos o ejercicios de enseñanza que se espera produzcan poca o ninguna angustia, incomodidad o dolor en especies animales vertebradas.

Categoría C

Experimentos o ejercicios de enseñanza que provocan angustia leve, molestia o dolor leve de corta duración en animales vertebrados. Los procedimientos dentro de esta categoría representan una atención adicional en proporción del nivel y la duración de las molestias, la angustia o el dolor inevitables. Los ejercicios de enseñanza que involucran procedimientos dentro de esta categoría requieren de una fuerte justificación de sus objetivos académicos.

Categoría D

Experimentos que provocan angustia, molestia o dolor significativo e inevitable en especies vertebradas. Los experimentos en esta categoría exigen la responsabilidad explícita del investigador para buscar diseños experimentales que aseguren que las molestias, la angustia o el dolor del animal se minimicen o se eliminen.

Categoría E

Procedimientos que involucran infligir angustia severa o dolor, por encima del umbral de tolerancia, en animales vertebrados conscientes, no anestesiados. Los experimentos en esta categoría no se aprobarán sin la justificación completa, profunda y detallada por parte del investigador responsable del proyecto.

Para mas información consultar: www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15B.pdf

Categoría:	A:	B: X	C:	D:	E:
------------	----	------	----	----	----

5) Justificación de la cantidad de animales participantes en el estudio tomando en cuenta los principios básicos de las tres "R's", remplazo, reducción y refinamiento.

Para mayor información consultar:

<http://ec.europa.eu/health/opinions/en/non-human-primates/glossary/tuv/three-rs-principle.htm>

Se decidió trabajar con ratas Wistar ya que por experiencias previas en el laboratorio se he desarrollado de manera exitosa un modelo de obesidad inducida por dieta, el cual se acerca más a la realidad en la actualidad sobre los pacientes obesos, con riesgo de desarrollo de otras enfermedades crónico-degenerativas, por lo que el estudio en modelo *in vivo* nos da una mejor perspectiva de la realidad

Cada uno de los grupos experimentales tendrá una n=6, ya que esta es la mínima cantidad necesaria para obtener resultados relevantes, de acuerdo a otros estudios en modelos animales de rata.

Finalmente, los animales serán sometidos a procedimientos refinados, en los que la angustia o el dolor generado sea mínimo o nulo

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

6) Describir como se realizará la transportación o movilización de los animales experimentales, en caso de ser necesario.

No se requerirá el transporte o movilización de animales.

7) Mencione el número y las especies animales, así como el género que serán usados en las actividades de este protocolo.

Género – Especie.	Cantidad	Rango de peso	Rango de edad	Sexo
Ratas- Wistar	96	180-220	3-4 semanas	machos
No. de Grupos experimentales:	16			
No. de animales por grupo:	6			
No. TOTAL DE ANIMALES:	96			

8) Especificar el tiempo que permanecerán los animales en el bioterio.

Los animales permanecerán en el bioterio entre 7 y 8 meses.

Las ratas se defasaran manejando grupos de 48 en 48 animales siendo factible la entrega y espacio para el manejo de animales

Inicio de periodo	Termino de periodo	Grupos en tratamiento
1-02-16	31-09-16	1-8 n=48
15-10-16	15-05-17	9-16 n=48

9) Procedimientos que se realizarán con los animales.

Procedimiento	NO	SI	Frecuencia, cantidad y vía.
Restricción de agua y/o alimento por más de 8 horas.	X		
Toma de muestra sanguínea.		X	Inmediatamente después del sacrificio mediante punción cardíaca para cuantificar parámetros bioquímicos
Colocación de cánula.	X		
Técnica para modificar conducta.	X		
Inoculaciones de agentes.		X	En la dieta de ingesta diaria
Procedimientos quirúrgicos con recuperación.	X		
Procedimientos quirúrgicos sin recuperación.	X		
Uso de adyuvantes (indicar cuál)	X		

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Estudios LD50 o ID50	X		
Restricción física (máximo 6 horas)	X		
Restricción física (menos de 6 horas)	X		
Confinamiento o aislamiento		X	Únicamente durante la prueba de calorimetría, se mantendrán solos en una caja metabólica durante un día.
Producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.	X		
Inducción de lesiones	X		
Agentes teratogénicos o carcinogénicos	X		
Sustancias químicas tóxicas	X		
Implantes	X		
Estudios estereotáxicos.	X		
Otros:			

- 10) Describir detalladamente los procedimientos a realizar incluyendo material, sujeción, vías de administración o toma de muestra, frecuencia, número de veces de muestreo, volumen de aplicación y volumen de toma de muestra, etc.

A) Se utilizarán 16 grupos con una n=6 por grupo, en total 96 ratas Wistar. Las dietas se preparan en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

- ⇒ Tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10
Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

- ⇒ Tratamiento 2 (Control+5%Sacarosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarosa al 5%

- ⇒ Tratamiento 3 (Control+5%Fructosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con fructosa al 5%

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

- ⇒ Tratamiento 4 (Control+5%Glucosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 5 (Control+5%Stevia): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con stevia al 5%
- ⇒ Tratamiento 6 (Control+5%Sucralosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 7 (Control+5%mascabado): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 8 (Control+5%Sacarina): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarina al 5%
- ⇒ Tratamiento 9 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Casefna	24
Maltodextrina	10.267
Sacaroša	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

- ⇒ Tratamiento 10 (DAGS+5%Sacarosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 11 (DAGS+5%Fructosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con fructosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 12 (DAGS+5%Glucosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con glucosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 13 (DAGS+5%Stevia Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

stevia al 5%

- ⇒ Tratamiento 14 (DAGS+5%Sucralosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sucralosa al 5%
- ⇒ Tratamiento 15 (DAGS+5%mascabado): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con mascabado al 5%
- ⇒ Tratamiento 16 (DAGS+5%Sacarina): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sacarina al 5%

B) Para estudiar el efecto del consumo de los diferentes endulcorantes en un modelo animal con y sin OID, se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), bajo ciclos de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en los 16 grupos antes mencionados y se alimentarán con esas dietas durante el periodo de 7 meses, durante el mismo, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces por semana, de la ingesta calórica. Durante el tratamiento se medirá cada mes la composición corporal por medio de resonancia magnética. Al final de los tratamientos se medirá el gasto energético y el coeficiente respiratorio por calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (18). Una semana antes de finalizar el tratamiento se realizará una curva de tolerancia a la glucosa, después de un ayuno durante la noche (de 6 a 8 h), se administrara glucosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomar muestra sanguínea de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la solución glucosada y al final del tratamiento se obtendrán muestras de sangre para la determinación de parámetros bioquímicos y heces para la determinación de la composición de la microbiota

Para la determinación de la microbiota se tomara una muestra de heces posterior al consumo de los diferentes endulcorantes y se aislara el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de phylas específicas por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla y con la plataforma de secuenciación masiva MiSeq de Illumina

Transcurridos los 7 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia con CO_2 previo a una punción cardiaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, riñon, musculo, lengua, cerebro, colon, y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo localizado en la zona inguinal e intercostal de todos los grupos así como tejido adiposo pardo y las muestras se congelarán en nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se extraerá ARN para estudiar la expresión de los genes lipogénicos (SREBP-1, FAS, ACC), genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos (PPAR α , CPT-1), sensores de energía (AMPK), transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) en tejido adiposo y músculo). Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado, lengua y tejido adiposo) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamación y acumulación de grasa. Respecto al cerebro se realizaran análisis histológico e inmunohistoquímico, para determinar marcadores de inflamación, así como número, y morfología de las espinas dendríticas y estrés oxidativo

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar parámetros bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante pruebas enzimático-colorimétricas y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha demostrado que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 16 grupos experimentales de tratamiento

11) Si el protocolo incluye la restricción de movimiento de los animales consientes, indique el grado y tiempo de inmovilización y los dispositivos para lograrlo.

Los animales no se privarán de movimiento, ni se les inmovilizará.

12) Agentes analgésicos, anestésicos y/o tranquilizantes que se utilizarán.

Especie	Agente	Dosis	Vía de admón.	Frecuencia.
Rata	Sevofluorano		Inhalada	1 vez

13) ¿Qué parámetros empleará para conocer el grado de Anestesia o analgesia del agente a utilizar?

Se considerará que el animal está anestesiado cuando no haya una reacción (reflejo) ante un pellizco de cola (gentilmente se genera presión en la porción proximal de la cola, puede ser con los dedos o con una pinza). Otra técnica consiste en pellizcar las garras, ya sea con los dedos o con pinza, un animal anestesiado no debe tener una respuesta de retiro de la pata.

Además, puede considerarse que permanezca en posición decúbito dorsal sin moverse y que las vibrisas no estén en movimiento.

También se monitorean los signos vitales, dado que la frecuencia cardiaca y respiratoria se incrementan si no está anestesiado.

14) Cuando el protocolo incluya procedimientos invasivos (cirugías) especificar los cuidados pre y post-operatorios (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección).

No habrá procedimientos quirúrgicos

15) Evaluación de signos de dolor de su proyecto piloto.

Los parámetros generales a observar son:

- Cambios en peso corporal
- Apariencia física: pilo-erección, posturas indicativas de dolor, etc.
- Comportamiento: aparición de comportamientos estereotipados, agresividad,

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

cambios en comportamiento social... - Respuesta a estímulos externos - Signos clínicos: i. Respiración: normal, laboriosa... ii. Temperatura iii. Temblores iv. Convulsiones v. Descarga nasal, salivación				
Escala: 0 si es normal, 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado, 2 si está afectado y 3 si está muy afectado.				
Parámetro	0	1	2	3
a) Peso corporal			X	
b) Apariencia	X			
c) Signos clínicos (Temp., FC., FR., etc.)	X			
d) Conducta espontánea.	X			
e) Conducta provocada.	X			

16) ¿Cuáles serán los criterios para establecer el "punto final humanitario"?

Criterios de punto final

Basándose en los parámetros seleccionados para evaluar la condición del animal hay que determinar en que momento se procederá a la eutanasia humanitaria del mismo. Los parámetros observados pueden "cuantificarse", asignando valores arbitrarios según la gravedad que presenten.

- a. Variación de peso corporal:
 - 1. Aceptable una disminución del 5-10%
 - 2. Moderada del 10-20%
 - 3. Substantial > al 20% (criterio de punto final).
- b. Los valores como la postura, piloerección, comportamiento social etc., pueden valorarse según la escala:
 - 1. 0 si es normal.
 - 2. 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
 - 3. 2 si está afectado
 - 4. 3 si está muy afectado.

Hay que tener en cuenta que no existe un criterio de punto final adaptable a todos los procedimientos y es el **Investigador Responsable** del experimento el que, basándose en observaciones de ensayos piloto o por datos de experimentos similares ya publicados, debe confeccionar su propio protocolo de determinación de punto final de manera que cumpla la normativa vigente en cuanto a protección de los animales utilizados en experimentación y por otra se evite la pérdida de datos del estudio.

Se tomará en cuenta que los tratamientos a evaluar tienen un efecto modesto en la reducción del peso corporal, por lo que es de esperar que éste, cambie.

Sin embargo, como criterios de punto final, se pueden considerar ciertas variables, por ejemplo: el peso corporal, cambios en la conducta motora, el consumo de alimento, el consumo de agua, la temperatura, que presente convulsiones o hemorragias, entre otras. La escala será la siguiente y se asignará un score final al cuantificar los valores asignados a cada variable.

- 0 si es normal.
- 1 si el parámetro en cuestión se ve ligeramente alterado
- 2 si está afectado
- 3 si está muy afectado.

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO₂)

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) ~~No~~ b) Si

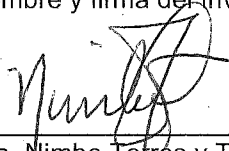
Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbi5/BMBL5_sect_V.pdf

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable


 Dra. Nimbe Torres y Torres

FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR LA CINVA DEL INCMNSZ.

Cuando un score sea de 3 en alguna variable o que en total sumen >5 como score final, se considerará que al animal habrá que hacerle la eutanasia (asfixia con CO₂)

17) ¿Cuál será el método de eutanasia que utilizará?

Sobredosis con anestesia inhalado (sevoflurano)

Recomendaciones para el Sacrificio Humanitario de los Animales de Experimentación.			
Especie	Método	Dosis	Vía
Ratón	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	210 mg/kg	IV, IP
Rata	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Jerbo	Pentobarbital Asfixia con CO ₂	270 mg/kg	IV, IP
Conejo	Pentobarbital Pistola de perno cautivo Asfixia con CO ₂	120 mg/kg	IV, IP
Cerdo	Pentobarbital	90 mg/kg	IV
Rana	Pentobarbital	100 mg/kg	IP

* Método aceptado únicamente bajo ciertas condiciones establecidas por el comité. Su aplicación requiere una justificación científica por parte del Investigador Responsable

18) El protocolo representa riesgo biológico?

a) ~~No~~ b) Si

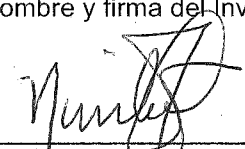
Si la respuesta es afirmativa, defina el Nivel de Bioseguridad para Animales (ABSL) requerido. Se recomienda consultar la clasificación del Center for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbi5/BMBL5_sect_V.pdf

19) ¿Cuál será el destino final de los animales utilizados en el proyecto experimental?

Los cadáveres de los animales se almacenarán en bolsas amarillas para residuos sólidos patológicos y se llevarán a un congelador destinado para el desecho de dichos residuos, para posteriormente ser entregados a la empresa contratada para su manejo posterior.

Me comprometo a conducir mi proyecto de Investigación de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-062-ZOO-1999.

Nombre y firma del Investigador Responsable


 Dra. Nimbe Torres y Torres

**FORMATO DE APOYO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTOCOLOS POR
LA CINVA DEL INCMNSZ.**

Integrantes de la CINVA	Cargo	Firma
Dra. Norma Bobadilla Sandoval	Coordinadora	
Dr. Jorge Alberto Barrios Payán	Secretario	
M. en C. Octavio Villanueva Sánchez	Vocal	
Dra. Elena Zambrano González	Vocal	
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Vocal	
Dra. Nimbe Torres y Torres	Vocal	
Dr. Gonzalo Torres Villalobos	Vocal	
Dra. María Elena Flores Carrasco	Vocal Externo	

Not empleado: 7160

(3762)

CTA: 4059537068 (131)



Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

SALVADOR ZUBIRAN

Dirección de Investigación

FORMA ÚNICA PARA REGISTRO DE PROYECTOS

FECHA DE RECEPCIÓN: 05/10/2015

CLAVE: FNU-1735-16/19-1

TÍTULO: Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratas Wistar macho con y sin obesidad inducida por dieta

INVESTIGADOR RESPONSABLE: TORRES Y TORRES NIMBE

DEPARTAMENTO O SERVICIO: DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA DE LA NUTRICIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL

PATROCINADORES:

Patrocinador	Cantidad
Fondo Sectorial de Investigación para La educación (Conacyt)	\$ 1,292,727.00

VIGENCIA DEL PROYECTO: Del 13/12/2016 al 12/12/2019

Trimestre 1

Trimestre 2

Trimestre 3

Trimestre 4

COSTO TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN		INSTITUCIONES PARTICIPANTES	
Personal	\$ 20,000.00		
(sueldos y sobresueldos al personal)			
Equipos	\$ 130,000.00		
(de laboratorio, cómputo, transporte, etc.)			
Materiales	\$ 1,019,927.00	FIRMAS	
(reactivos, consumibles, desechables, etc.)			
Animales	\$ 0.00	Investigador responsable	Jefe de Departamento
(adquisición, cuidado, procedimientos, etc.)			
Estudios	\$ 0.00	Comité de Investigación en Humanos	Comité de Investigación en Animales
(de laboratorio, gabinete, especiales, etc.)			
Viaticos	\$ 77,700.00	Director de Investigación	Director General
(reuniones científicas y trabajo de campo)			
Publicaciones	\$ 45,000.00	Fecha de resolución	
(costo directos de publicación, sobregiro)		23-ENERO-2017	



Instituto Nacional de Ciencias
Médicas y Nutrición

Salvador Zubirán

COMITÉ
INSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN
HUMANOS

FORMATO DE
EVALUACIÓN
DE PROYECTO
DE
INVESTIGACIÓN

No. de registro CIIBH: FNU-1735-15/18-1

1. Título del proyecto

Efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal y receptores del dulzor en un modelo de ratón sin obesidad inducida por dieta.

2. Investigadores

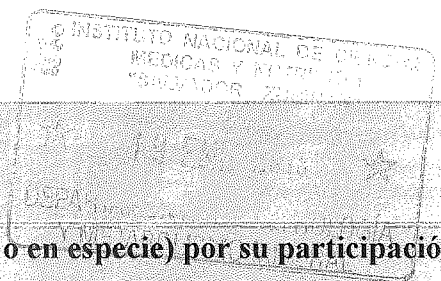
2a. Identificación

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
RAMIREZ MIRAFUENTES ALEJANDRO		Investigador invitado		[Redacted]
RODRIGUEZ HERNÁNDEZ PAMELA		Investigador invitado		
[Redacted] CE		Investigador invitado		
TORRES Y TORRES NIMBE	INVESTIGADOR EN CIENCIAS MED F	Investigador responsable		
TOVAR PALACIO ARMANDO ROBERTO	JEFE DE DEPARTAMENTO	Investigador asociado		

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

3. Instituciones participantes

- INCMNSZ
- INCMNSZ
- INCMNSZ
- INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
- INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
- Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa
- Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación investigación.

5. Marco teórico

ANTECEDENTES:

ANTECEDENTES:

El consumo de edulcorantes artificiales (aspartame, sucralosa, sacarina) así como el consumo de edulcorantes naturales (*Stevia rebaudiana*, xilitol) han causado controversia en los últimos años. Basado en diversos estudios epidemiológicos se han observado cambios importantes en los patrones de alimentación en los hogares de México mostrando un menor consumo de alimentos tradicionales, vegetales y frutas; con un incremento en azúcares refinados y refrescos (1). Durante la última década se observó un incremento sustancial en el consumo de productos que contienen edulcorantes y en el consiguiente consumo de los mismos. En consecuencia se salieron al mercado más de 6000 productos con edulcorantes entre 1999 a 2004. Por lo tanto se proporciona hidratos de carbono que se absorben rápidamente y al encontrarse en una gran variedad de alimentos, da lugar a una ingesta de energía excesiva, ganancia de peso y síndrome metabólico. Por lo tanto las personas escogen los edulcorantes no calóricos sobre el azúcar, con la intención de reducir el peso corporal (2).

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que la inclusión de 5% de sacarosa en una dieta alta en grasa saturada significativamente incrementan las anomalías bioquímicas de ratas que consumieron esta dieta por 7 meses, como son: triglicérido, colesterol LDL, insulina, leptina, intolerancia a la glucosa y un desequilibrio significativo en la flora bacteriana en el intestino (disbiosis) incrementando significativamente los *Firmicutes* y disminuyendo significativamente los *Bacteroidetes*.

Figura 1. Relación de Bacteroidetes, Firmicutes y Actinobacterias en ratas alimentadas con una dieta estándar (AIN 93) y en un grupo alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y 5% de azúcares.

EDULCORANTES Y GANANCIA DE PESO

Interesantemente, los estudios epidemiológicos sugieren que los edulcorantes artificiales pueden contribuir a la pérdida de peso. Estudios de cohorte prospectivos correlacionan de manera positiva el uso de edulcorantes artificiales y la ganancia de peso. Las bebidas dietéticas, de amplio consumo en la población, contienen edulcorantes artificiales.

relacionado con un incremento de 0.16 Kcal/m^2 en el índice de masa corporal por cada consumida. Esto resulta relevante dado que los edulcorantes no aportan, o aportan una energía (2).

El mecanismo por el cual el sabor dulce es útil para predecir la ingesta energética (calórica) al utilizar edulcorantes, ya que el organismo prepara una respuesta en el tracto gastrointestinal al procesamiento de los hidratos de carbono asociados al sabor dulce, que no se lleva a cabo con los edulcorantes; la consecuencia es la disociación de la dulzura de la ingesta energética. Experimentos en roedores sugieren que el dar un edulcorante natural genera una respuesta que mantiene el consumo de energía constante, mientras que esto no ocurre con el consumo de edulcorantes artificiales que pueden ocasionar una ingesta energética compensatoria mayor asociada al bajo consumo de edulcorante artificial (2). Otros estudios con edulcorantes artificiales demostraron que estimulan la diferenciación de los adipocitos estimulando la adipogénesis y que este mecanismo es dependiente de la dosis utilizada (3). Los diferentes hidratos de carbono impactan de maneras diferentes en el metabolismo de los lípidos. La fructosa incrementa la lipogénesis *de novo*, provoca dislipidemia, disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la adiposidad visceral; interesantemente el consumo de glucosa no genera un incremento en la adiposidad subcutánea en roedores (4).

Estas alteraciones fisiológicas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas, como la diabetes mellitus, que tienen múltiples incógnitas, que impactan a millones de personas a nivel mundial. La obesidad y la diabetes mellitus han alcanzado proporciones epidémicas que representan un costo sustancial para la salud alrededor del mundo. Los tratamientos desarrollados a través de la investigación ofrecen poca esperanza para los afectados, ya que aún no se encuentra una cura. Estas patologías están asociadas a diversos factores de riesgo como inactividad física, exceso de grasa corporal, dietas alimenticias inadecuadas, disbiosis de la microbiota intestinal, señalización hormonal alterada y otros factores que contribuyen a estados sistémicos patológicos. Por lo anterior, es fundamental realizar estudios para comprender los mecanismos de acción a nivel molecular de los diferentes nutrientes y las alteraciones metabólicas generadas por una disbiosis en la microbiota. Actualmente la microbiota es considerada como un nuevo órgano por su impacto sobre la salud.

La microbiota intestinal se define como la comunidad microbiana que habita un medio ambiente específico. En nuestro caso la microbiota de interés es la intestinal. Las principales phylas bacterianas en la microbiota intestinal son los *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Actinobacterias* (3%), *Proteobacterias* (8%) y *Verrucomicrobia* (2%). Se ha demostrado en varios estudios que durante la obesidad se presenta un desequilibrio de estas bacterias favoreciendo la presencia de *Firmicutes* y disminuyendo la de *Bacteroidetes*. El tipo y la concentración de polisacáridos no fermentables, así como la presencia de algunos compuestos bioactivos modulan la proporción de bacterias. Sin embargo la presencia de azúcares o edulcorantes puede afectar la fermentación de los polisacáridos modificando los productos de fermentación que son los ácidos grasos de cadena corta (ácido acetico y butirato).

Recientemente se publicó en la revista Nature (5) que el consumo de edulcorantes, particularmente la sacarina, producen disbiosis en la microbiota intestinal resultando en un aumento de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes*.

glucosa. Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un aumento de *Lactobacillus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas vías metabólicas están asociadas con la diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo no toman en cuenta la estructura química del edulcorante (Figura 2) y además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante.

Figura 2. Estructura química de los edulcorantes.

Cabe mencionar que algunos edulcorantes naturales, como *Stevia rebaudiana*, se han asociado con efectos benéficos como la actividad antioxidante y esto ha incrementado su uso en productos alimentarios. Sin embargo, al analizar su efecto *in vitro* sobre la microbiota intestinal se demostró un menor crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y se observa un pH más elevado que en los controles, lo que sugiere una posible modificación en el microambiente (6). Por lo que es necesario conocer el efecto de los edulcorantes a largo plazo sobre la microbiota.

Los mamíferos se inclinan por la preferencia del sabor dulce debido a que está relacionada con la disponibilidad de hidratos de carbono que indican la disponibilidad de energía y nutrientes. El sabor dulce es detectado por la combinación de receptores de la familia T1R, de los cuales T1R1, T1R2 y T1R3 se ubican principalmente en las papilas gustativas. Las células en las papilas gustativas envían la información al sistema nervioso central para la percepción del sabor. El sabor dulce es detectado por la combinación de T1R2+T1R3 (Figura 2). Existen diversos sitios de unión para diferentes compuestos. Principalmente se distinguen tres tipos de receptores, la unión de los edulcorantes a estos receptores permiten la percepción del sabor dulce.

Figura 3. Mecanismo de acción de los receptores del dulzor T1R2 y T1R3

Los receptores del dulzor están asociados a proteínas G, mediante la interacción con GPCRs (receptoras del gusto). Los T1R también se han encontrado en intestino, cerebro, tejido y otros órganos. Su localización en estos órganos sugiere muchas teorías, entre ellas detectar diferentes nutrimentos y mantener la homeostasis de los mismos (9). En el caso de T1R2 y T1R3 expresados en el intestino, se proponen como los sensores de glucosa gastrointestinal (14).

Asociaciones entre el metabolismo energético y los receptores del dulzor en tejidos extra que son una parte importante de la homeostasis energética. La glucosa es metabolizada y también es sintetizada en las células pancreáticas, que también expresan receptores asociados a detectar aminoácidos y lípidos; este mismo mecanismo es el usado para la detección de la glucosa a través de T1R2 y T1R3. Se reporta que el receptor que detecta la glucosa facilita el metabolismo de succinato mitocondrial, pero se desconoce el mecanismo por el que esto ocurre y el metabolismo de glucosa (15). Existe evidencia reciente donde se ha demostrado que los gérmenes presentan una sobre-expresión del receptor T1R3, sin embargo se desconoce si los gérmenes naturales o artificiales modifican la microbiota y de ahí la expresión de los receptores del

En conjunto los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes artificiales de diversa naturaleza pueden modificar de manera diferencial a la microbiota y de ahí generar diferentes efectos en el metabolismo de lípidos, así como en la expresión de los receptores del dulzor y el metabolismo energético de la célula.

DEFINICION DE PROBLEMAS :

Actualmente existe un consumo excesivo de edulcorantes artificiales, pero no se conoce el impacto en el metabolismo así como en la salud gastrointestinal del consumo de estas sustancias

JUSTIFICACION :

Existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los edulcorantes artificiales tienen un impacto beneficioso o adverso sobre la salud. También existe confusión si los edulcorantes artificiales generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además, se necesita información si cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de los receptores del dulzor.

6a. Hipótesis

El consumo de edulcorantes naturales o artificiales modularán de diferente manera la microbiota intestinal, los receptores del dulzor y el metabolismo de lípidos.

6b. Objetivos

General:

Determinar el efecto de edulcorantes naturales y artificiales sobre la microbiota intestinal, los receptores del dulzor en un modelo con y sin obesidad inducida por dieta

Específicos:

1. Estudiar el consumo de edulcorantes naturales y artificiales sobre la ingesta de alimento y la ganancia de peso en un modelo animal con y sin obesidad inducida por dieta (OID) en ratas cepa Wistar.
2. Evaluar el efecto de los edulcorantes naturales y/o artificiales sobre parámetros bioquímicos: triglicéridos, colesterol LDL, leptina, adiponectina y LPS en suero en un modelo animal con y sin OID.
3. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes, sobre la tolerancia a la glucosa, mediante una prueba de tolerancia a la Glucosa

4. Analizar el efecto a nivel tisular del consumo de endulcorantes artificiales, sobre el hígado, intesti ratas con y sin OID
5. Determinar la proporción de principales phylas, clases y especies de bacterias de la microbiot: tratamiento con endulcorantes naturales y artificiales en un modelo con y sin OID, mediante la identi por medio de secuenciación utilizando la plataforma MiSeq de Illumina
6. Evaluar el efecto de los endulcorantes sobre la expresión génica y de proteínas involucradas en la l FAS), oxidación de ácidos grasos (PPAR α y CPT-1), receptores del dulzor así como proteínas inv energético como AMPK.
7. Analizar el efecto del consumo de endulcorantes sobre los receptores T1R2 y T1R3 en lengua, intes tejido adiposo.
8. Determinar la composición corporal por resonancia magnética (% de grasa, % masa grasa, % de n de agua corporal), de animales con y sin OID que consumen diferentes endulcorantes naturales y arti
9. Estudiar mediante calorimetría indirecta, el gasto energético y el coeficiente respiratorio de anima consumen diferentes endulcorantes naturales y artificiales.

7. Metodología: Diseño general.

A) Se utilizarán 16 grupos con una n=6 por grupo, en total 96 ratas Wistar. Las dietas planta piloto del departamento de tecnología de alimentos

tratamiento 1 (Control): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones del Institute of Nutrition).

Dieta AIN-93 (CONTROL)	
Ingrediente	%
Almidón	39.749
Caseína	20
Maltodextrina	13.2
Sacarosa	10

Aceite de soya	7
Celulosa	5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014

Tratamiento 2 (Control+5% Sacarosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarosa al 5%

Tratamiento 3 (Control+5% Fructosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con fructosa al 5%

Tratamiento 4 (Control+5% Glucosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con glucosa al 5%

Tratamiento 5 (Control+5% Stevia): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con stevia al 5%

Tratamiento 6 (Control+5% Sucralosa): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sucralosa al 5%

Tratamiento 7 (Control+5% Mascabado): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con mascabado al 5%

Tratamiento 8 (Control+5% Sacarina): Dieta con caseína al 20% de acuerdo a las recomendaciones AIN-93 (American Institute of Nutrition) y agua de bebida con sacarina al 5%

tratamiento 9 (DAGS): Dieta alta en grasa saturada

DAGS	
Ingrediente	%
Almidón	23.903
Caseína	24
Maltodextrina	10.267
Sacarosa	7.778
Aceite de soya	7
Celulosa	2.5
Mineral mix	3.5
Vitaminas mix	1
L-Cistina	0.3
Colina	0.25
TBHQ	0.0014
Inulina	2.5
Manteca	17

Tratamiento 10 (DAGS+5%Sacarosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con s

tratamiento 11 (DAGS+5%Fructosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con fru

tratamiento 12 (DAGS+5%Glucosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con glu

tratamiento 13 (DAGS+5%Stevia Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con stevia

tratamiento 14 (DAGS+5%Sucralosa): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con s

tratamiento 15 (DAGS+5%mascabado): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida

5%

tratamiento 16 (DAGS+5% Sacarina): Dieta alta en grasa saturada y agua de bebida con sa

B) Para estudiar el efecto del consumo de los diferentes endulcorantes en un modelo ani se pretende utilizar ratas Wistar macho que se mantendrán a temperatura controlada (22 de luz/oscuridad de 12h/12h y 50-55% de humedad.

Las ratas se dividirán en los 16 grupos antes mencionados y se alimentarán con esas periodo de 7 meses, durante el mismo, se tendrá un registro del peso corporal de 2 veces la ingesta calórica. Durante el tratamiento se medirá cada mes la composición corporal por resonancia magnética. Al final de los tratamientos se medirá el gasto energético y el coeficiente por calorimetría indirecta, de acuerdo a lo previamente reportado (Chavez Santoscoy, 2012). Antes de finalizar el tratamiento se realizará una curva de tolerancia a la glucosa, durante la noche (de 6 a 8 h), se administrará glucosa vía intraperitoneal 2g/kg y tomará de la cola del animal a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración de la glucosada y al final del tratamiento se obtendrán muestras de sangre para la determinación de biomarcadores bioquímicos y heces para la determinación de la composición de la microbiota.

Para la determinación de la microbiota se tomará una muestra de heces posterior a los 7 meses de diferentes endulcorantes y se aislara el DNA de la muestra y se llevara a cabo la amplificación de genes específicos por medio de qPCR utilizando primers específicos para cada phyla y con posterior secueñciación masiva MiSeq de Illumina.

Transcurridos los 7 meses, las ratas se irán sacrificando escalonadamente mediante asfixia a una punción cardíaca, bajo anestesia (sevoflurano) y se obtendrá el hígado, riñón, cerebro, colon, y el tejido adiposo visceral (gonadal y retroperitoneal) y subcutáneo local inguinal e intercostal de todos los grupos así como tejido adiposo pardo y las muestras de heces y nitrógeno líquido y se almacenarán a -70°C hasta el día de las determinaciones. Se pretende estudiar la expresión de los

genes lipogénicos (SREBP-1, FAS, ACC), genes involucrados en la oxidación de ácido

CPT-1), sensores de energía (AMPK), transportadores de glucosa dependientes de insulina (GLUT4) en el tejido adiposo y músculo). Adicionalmente, parte de los tejidos (hígado, lengua y intestino) se destinará a estudios histológicos para observar la morfología y la presencia de inflamación y depósito de grasa. Respecto al cerebro se realizarán análisis histológico e inmunohistoquímico para detectar marcadores de inflamación, así como número y morfología de las espinas dendríticas y e

Se tomarán muestras de sangre para posteriormente separar el plasma y cuantificar biomarcadores bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, leptina, colesterol HDL y LDL, mediante métodos colorimétricos y por último se tomarán muestras de heces para la determinación de la microbiota.

C) El tamaño de la muestra será de 6 ratas Wistar por grupo, ya que en estudios previos se ha establecido que es el número mínimo de animales para poder observar cambios representativos en la expresión de genes.

D) Las ratas son machos de peso inicial de 200g aproximadamente.

E) La asignación del tratamiento será de forma aleatorizada.

F) Se tendrán 16 grupos experimentales de tratamiento.

Las ratas se defasaron manejando grupos de 48 en 48 animales siendo factible la entrega y espacio para 48 animales.

Inicio de periodo	Termino de periodo	Grupos en tratamiento	
1-02-16	31-09-16	1-8	n=48
15-10-16	15-05-17	9-16	n=48

8. Metodología: Criterios de selección

A) Ratitas machos de la cepa Wistar, de peso entre 180-220 g.

B) Se excluirán ratitas hembras.

C) Se eliminarán del estudio las ratitas que no aumenten de peso o que presenten una ganancia de peso menor a la comparación con las ratitas que reciban esta dieta.

9. Metodología: Desenlaces y variables

Variable	Definición	Muestra	Tipo de variable	Escala de medición
Glucosa	Concentración plasmática de glucosa por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Triglicéridos	Concentración plasmática de triglicéridos por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol HDL	Concentración plasmática de colesterol HDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
Colesterol LDL	Concentración plasmática de colesterol LDL por ensayo enzimático	Suero	Cuantitativa continua	mg/dl
SREBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
ACC	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
CPT-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- α	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
NOX	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
TNF- α	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- γ	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
XBP-1	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
BIP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

ATF-6	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Leptina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Adiponectina	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
APP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión génica por RT-PCR	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
SREBP-1	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
FAS	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- α	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
PPAR- γ	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AKT-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-1	Medición de la expresión proteica por medio de	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

	Western blot			
IRS1-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS-2	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
IRS2-P	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado y tejido adiposo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
AMPK	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GLUT-4	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Hígado Musculo	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
T1R2	Técnicas inmunohistoquímicas	Lengua	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
T1R3	Técnicas inmunohistoquímicas	Lengua	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
GFAP	Medición de la expresión proteica por medio de Western blot	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Insulina	Cuantificación por RIA	Suero	Cuantitativa continua	ng/mL
Densidad total de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias
Morfología de espinas dendríticas	Técnicas inmunohistoquímicas	Cerebro	Cuantitativa continua	Unidades arbitrarias

Análisis estadístico.

Las variables continuas serán expresadas en promedios con error estándar y se evaluará con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para analizar su tipo de distribución. En caso de que los datos no sigan una distribución normal, se realizará la transformación logarítmica antes del análisis.

bioquímicos como la glucosa, triglicéridos, colesterol HDL y colesterol LDL se analizarán r de ANOVA de una vía, comparando los grupos tratados con el grupo control. Posteriormente prueba *post hoc* de Bonferroni. De igual manera, se analizará la expresión génica y de pr como valor significativo de p cuando sea menor a 0.05.

10. Riesgos y beneficios del estudio

BENEFICIO DIRECTO:

Conocer el efecto metabólico y sobre la composición de la microbiota intestinal de los endulcorantes naturales y artific control como en un modelo de obesidad inducida por dieta

BENEFICIOS INDIRECTOS:

RIESGOS:

MOLESTIAS GENERADAS : Ninguna

COMPLICACIONES DE PROCEDIMIENTO : Ninguna

EFFECTOS ADVERSOS : Ninguno

EFFECTOS PSICOLOGICOS : Ninguno

METODOS DE SEGURIDAD : Observación diaria de los modelos animales para determinar si existe alguna alteración control del peso y consumo de alimento.

PROCEDIMIENTOS : consulta con el veterinario

OTRO TIPO DE RIESGO : Ninguno

11. Costos

COSTOS TOTALES DE LA INVESTIGACIÓN	
Admon. Gastos pacientes	\$ 0.00
Animales	\$ 0.00
Equipos	\$ 0.00
Estudios	\$ 0.00
Materiales	\$ 0.00
Personal	\$ 0.00
Publicaciones	\$ 0.00
Suscripciones	\$ 0.00
Varios	\$ 0.00
Viaticos	\$ 0.00

12. Citas bibliográficas.

- 1) Flores M, Macías N, Rivera M, et al. Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight nutrition. 2010; 140(10):1869-73.
- 2) Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. Yale Journal o 2010; 83:101-8.
- 3) Simon BR, Parlee SD, Learman BS, et al. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis inde receptors. The Journal of biological chemistry. 2013; 288(45):32475-89.
- 4) Hofmann SM, Tschop MH. Dietary sugars: a fat difference. The Journal of clinical investigation. 2009; 119(5):1089-94.
- 5) Suez J, Korem T, Zeevi D, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut mi 514(7521):181-6.
- 6) Denina I, Semjonovs A, Fomina R, et al. The influence of Stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* s

microbiology. 2013; 58:278-84.

7) Margolskee RF. Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *The Journal of biological chemistry*. 2012; 287(12):3933-3941.

8) Fernstrom JD, Munger SD, Sclafani A, et al. Mechanisms for sweetness. *The journal of nutrition*. 2012; 142(6):1134S-1138S.

9) Laffitte A, Neiers F, Briand L. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2014; 17:379-85.

10) Li D, Kirsop J, Tang WH. Listening to Our Gut: Contribution of Gut Microbiota and Cardiovascular Risk in Diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Sep; 38(9):1634-41.

11) Hur KY, Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*. 2015 Jun; 39(3): 198-203.

12) Mandal RS, Saha S, Das S. Metagenomic Surveys of Gut Microbiota. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2015 Jun; 13(2):101-11.

13) Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab*. 2014 Jul; 14(4):391-5.

14) Moran AW, Al-Rammahi M, Zhang C, Bravo D, Calsamiglia S, Shirazi-Beechey SP. Sweet taste receptor expression and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. *J Dairy Sci*. 2014 Aug; 97(8):4955-72.

15) Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Hamano K, Medina J, Nagasawa M. Return of the glucoreceptor: Glucose activates the sweet taste receptor T1R3 and facilitates metabolism in pancreatic β -cells. *J Diabetes Investig*. 2015 May; 6(3):256-63.

16) Allison MB, Myers MG Jr. 20 years of leptin: connecting leptin signaling to biological function. *J Endocrinol*. 2014 Oct; 183(1):1530-1540.

17) Swartz T D, Duca FA, Wouters T, Sakar Y, Covasa M. Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and transporter-1 expression and increased-sucrose intake in mice lacking gut microbiota.

- A) SE TESTA NOMBRE DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- B) SE TESTA FIRMA DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**
- C) SE TESTA CORREO ELECTRÓNICO DE PERSONAS FÍSICAS QUE NO SE TIENE LA CERTEZA DE SER SERVIDORES PÚBLICOS TODA VEZ QUE SE TRATA DE DATOS PERSONALES DE ACUERDO AL ARTÍCULO 113 FRACCIÓN I DE LA L.F.T.I.P.**