

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN NUTRICIÓN HUMANA

TESIS

**“EFECTO DE EDULCORANTES ARTIFICIALES EN LA FORMACIÓN DEL
TUBO NEURAL DE EMBRIONES DE POLLO”**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN NUTRICIÓN HUMANA

PRESENTA

FRANCISCO RAFAEL PÉREZ MUÑOZ

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2011

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Noviembre, 2011
México



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Ciencias Naturales
 Maestría en Nutrición Humana

“EFECTO DE EDULCORANTES ARTIFICIALES EN LA FORMACIÓN DEL TUBO NEURAL DE EMBRIONES DE POLLO”
TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
 Maestra en Nutrición Humana

Presenta:

Francisco Rafael Pérez Muñoz

Dirigido por:

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer

Dra. Ma. Guadalupe García Alcocer

Presidente

Dra. Teresa García Gasca

Secretario

Dra. Miriam Aracely Anaya Loyola

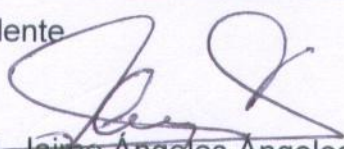
Vocal

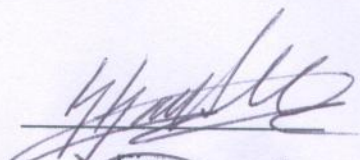
Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Suplente

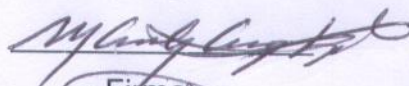
MC Jesica Esther Escobar Cabrera

Suplente

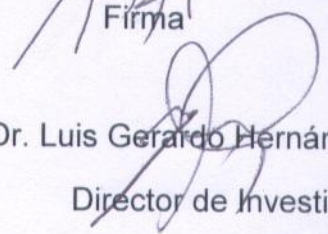

 Biol. Jaime Angeles Angeles
 Director de la Facultad de
 Ciencias Naturales


 Firma


 Firma


 Firma


 Firma


 Dr. Luis Gerardo Hernández Sa
 Director de Investigación y
 Posgrado

RESUMEN

El azúcar fue el edulcorante más consumido en el mundo hasta a mediados del siglo XX. En México el azúcar continúa siendo usado en la elaboración de dulces típicos y en refrescos sin embargo con los problemas de obesidad, sobrepeso y la diabetes, se han propuesto alternativas con los edulcorantes artificiales. Éstos tienen bajo aporte energético y se les considera benéficos para el control del sobrepeso y de la obesidad y también se les han atribuido un efecto protector contra caries dental. Por estas razones son usados por la población de diversas edades en distintos alimentos. Cada uno de los edulcorantes cuenta con una dosis diaria recomendada y su consumo no se restringe a ninguno de los sectores de la población, con excepción del aspartame a los fenilcetonúricos. Los estudios toxicológicos de los edulcorantes artificiales son controversiales y es poco conocida su toxicidad durante el desarrollo temprano del sistema nervioso, así como su posible interacción con la serotonina que actúa como morfógeno durante la neurulación. En el presente trabajo se estudió el efecto de tres de los edulcorantes de mayor utilización y consumo (sucralosa, acesulfame K y neotame) en la formación del tubo neural en embriones de pollo, así como las modificaciones en la distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} durante la neurulación de embriones de pollo por efecto de los edulcorantes. Los resultados indicaron una mayor toxicidad del neotame que la sucralosa y acesulfame k. Al comparar la distribución de los receptores a serotonina entre los grupos control y tratados se encontró que, en los embriones que recibieron tratamiento con los diferentes edulcorantes, la expresión de los receptores a serotonina disminuyó.

Palabras clave: (Edulcorates artificiales, toxicidad, neurulación, serotonina.)

ABSTRACT

Sugar was the most largely consumed sweetener in the world till mid twentieth century. In Mexico it is still used for manufacturing regional sweets and soft drinks, nevertheless due the obesity and overweight problems, and diabetes, alternative sweeteners have been proposed as a solution for these problems. Artificial sweeteners are widely used as they provide little energy and also because they are considered as useful for overweight control and obesity. They have also been attributed a protective effect against dental caries; these are the reasons why they are consumed by different age populations in different kinds of foods. Each sweetener has a recommended daily dose and its consumption is not restricted to any population sector, except aspartame by phenylketonuric population. Toxicological studies on artificial sweeteners are controversial and their toxicity during early development of the nervous system is not very well known, as well as their possible interaction with the serotonin acting as morphogenic during neurulation. The effect of the three most commonly used and consumed sweeteners (sucralose, acesulfame K and neotame) in the formation of the neural tube of chicken embryos was studied, as well as the modifications in the distribution of serotonin receptors 5-HT_{2C} during neurulation of chicken embryos as a consequence of ingesting artificial sweeteners. Results indicated that neotame had more toxicity than sucralose and acesulfame K. when comparing the distribution of serotonin receptors among control groups and treatment group showed that in those embryos which were treated with the different sweeteners, the expression of serotonin receptors diminishes.

Key words: (Artificial sweeteners, toxicity, chicken embryos, neurulation, serotonin.)

ÍNDICE

Contenido	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
III.1 Edulcorantes artificiales	4
II.1.1 Sucralosa	4
II.1.2 Acesulfame K	6
II.1.3 Neotame	7
II.2 Desarrollo del Tubo Neural	8
II.3 Receptores de 5 Hidroxitriptamina o Serotonina	14
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
V.1 General	21
V.2 Específicos	
VI. METODOLOGÍA	22
VI.2 Métodos	22
VI.2.1 Método Biológico	22
VI.2.2 Método inmunohistoquímico	23
VI.2.3 Métodos estadísticos	24
VII RESULTADOS	25
VIII DISCUSIÓN	40
IX CONCLUSIONES	43
X REFERENCIAS	

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Comparación de la estructura química de la sucralosa y la sacarosa	4
2	Molécula del Acesulfame K	6
3	Estructura química del edulcorante neotame	8
4	Fecundación del óvulo	9
5	Proceso de división celular, mitosis consecutivas	9
6	La mórula es un conjunto de 16 a 64 células	9
7	La blástula tiene más de 64 células	9
8	La gastrulación	10
9	Etapas de la neurulación	11
10	Engrosamiento del neuroectodermo y formación de la placa neural	12
11	Cierre del tubo neural y formación de la cresta neural	13
12	Corte transversal de las vesículas encefálicas	13
13	Biosíntesis de serotonina a partir de triptófano en el sistema nervioso central	14
14	Interacción de la serotonina y sus receptores	18
15	Grupo control	25
16	Embrión normal	26
17	Grupo blanco	27
18	Tratamiento 1 con neotame	28
19	Resorción	28
20	Tratamiento 2 con neotame	29
21	Tratamiento 3 con neotame	30
22	Tratamiento 4 con sucralosa 1	31
23	Tratamiento 5 con sucralosa 2	32
24	Tratamiento 6 con sucralosa 3	33
25	Tratamiento 7 con acesulfame k 1.	34
26	Tratamiento 8 con acesulfame k 2.	35
27	Deficiencia en la formación de vesículas	35
28	Tratamiento 9 con acesulfame k 3	36
29	Marca IHQ para receptores a serotonina 5HT _{2C} en embrión normal contro	37
30	Distribución de los receptores a serotonina 5-HT _{2C} en embriones normales tratados con neotame	38
31	Marca inmunorreactiva para el receptor a serotonina 5-HT _{2C} en embriones tratados con sucralosa	38
32	Distribución de los receptores a serotonina en embriones normales tratados con acesulfame k	39

ÍNDICE DE CUADROS

1	Clasificación de los receptores a serotonina, distribución y su mecanismo de acción	16
2	Diseño del experimento	22

I. INTRODUCCIÓN:

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por el incremento de tejido adiposo en el organismo, acompañada de alteraciones metabólicas que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud, asociada en la mayoría de los casos a patología endocrina y cardiovascular. Con la idea de evitar dichos trastornos, se desarrollaron los edulcorantes artificiales que resuelven el gusto por lo dulce y por otro no aportan calorías. Entre los edulcorantes artificiales se encuentran el neotame, la sucralosa y el acesulfame k que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Los estudios toxicológicos de dichos edulcorantes son controversiales y son poco conocidos aquellos que se realizan durante el desarrollo temprano del sistema nervioso central. En este trabajo se estudiaron los efectos en la embriotoxicidad y embrioletalidad con los edulcorantes antes mencionados y con inmunohistoquímica se llevó a cabo la comparación de la densidad de receptores entre los grupos control y los tratados.

II. ANTECEDENTES:

El azúcar fue el edulcorante más consumido en el mundo hasta a mediados del siglo XX. En México el azúcar continúa siendo usado en la elaboración de dulces típicos y en refrescos sin embargo con los problemas de obesidad, sobrepeso y la diabetes, se han propuesto alternativas en los edulcorantes artificiales.

La obesidad, es una enfermedad crónica, caracterizada por el incremento de tejido adiposo en el organismo, acompañada de alteraciones metabólicas que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud y asociada en la mayoría de los casos a patología endocrina y cardiovascular. La obesidad está relacionada con factores biológicos, socioculturales y psicológicos. La etiología de la obesidad es multifactorial y su tratamiento debe ser apoyado en un grupo multidisciplinario. Dada su magnitud y trascendencia es considerada en México como un problema de salud pública y se han desarrollado lineamientos para su atención integral, para incidir de manera positiva en un adecuado manejo del importante número de pacientes que la padecen (Nom-174-SSA1-1998). Por esta razón es importante tomar medidas incluso en mujeres en periodo de gestación, ya que las mujeres obesas son más susceptibles a presentar complicaciones obstétricas durante la cesárea (Roman y col., 2007). Una de las alternativas que toman las pacientes obesas es el consumo de alimentos “light”, los cuales no son restringidos y son preparados con edulcorantes artificiales (FDA Consumer Magazine, 2006). Los productos preparados con edulcorantes artificiales son refrescos, yogures, dulces, aguas de sabor, cereales, gomas de mascar, edulcorantes de mesa e incluso suplementos nutricionales y laxantes (Aguilar, 2004).

Los edulcorantes sintéticos son compuestos químicos de bajo aporte calórico que proporcionan la misma sensación que el azúcar; son sustancias con un sabor dulce muy intenso, mayor que el de la sacarosa, por lo que se requiere menores cantidades para igualar el umbral de dulzor del azúcar (Kroger y col., 2006). Los edulcorantes bajos en calorías o no nutritivos se han regulado cuidadosamente en

la formulación de alimentos, por ello es necesario conocer las normatividades de cada país, las cuales difieren entre ellas (Institute of Food Technologists, 2007).

Los edulcorantes artificiales aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) de E.U.A. para consumo seguro y para ayudar a los consumidores a bajar la ingesta calórica y control de peso, son cinco: Aspartame, Acesulfame K, Sacarina, Neotame y Sucralosa (FDA Consumer Magazine, 2006) y por parte de la Secretaría de Salud (SSA) de nuestro país, en adición a los anteriores se permite el uso de sorbitol, xilitol, manitol y ciclamato (Proyecto NOM-086-SSA1-1994).

Los consumidores que desean disminuir el consumo de calorías recurren a refrescos conocidos como bajos en calorías, *light* o *diet*, que sustituyen el contenido de los azúcares naturales. Los más utilizados son acesulfame K, aspartame o sucralosa (Procuraduría Federal del Consumidor, 2003).

En el caso de la goma de mascar y en muchos productos dentales se utiliza el xilitol como edulcorante ya que tiene beneficios porque induce retroceso en las caries, para lo cual está bien establecido que a) el fluoruro inhibe la desmineralización y fortalece la remineralización, b) la Clorhexidina reduce el desarrollo cariogénico bacteriano y c) el xilitol es un edulcorante no cariogénico y tiene propiedades antibacteriales. El xilitol que se encuentra en las gomas de mascar, se aprecia efectivo clínicamente en la reducción de las bacterias cariogénicas y de los niveles de caries (Featherstone, 2006).

En múltiples alimentos y bebidas, particularmente en combinación con otros edulcorantes bajos en calorías, se utiliza el ciclamato en edulcorantes de mesa, bebidas y cereales entre otros (International Sweeteners Association, 2008).

Los edulcorantes más utilizados en México son:

II.1.1 Sucralosa: La sucralosa fue descubierta por investigadores británicos en 1976, se forma a partir de la sacarosa en un proceso de halogenación, donde tres grupos cloruro substituye a tres grupos hidroxilo. Aunque la sucralosa es sintetizada a partir del azúcar, el cuerpo humano no la reconoce como azúcar y no

la metaboliza; por lo que no provee de calorías. La sucralosa es 600 veces más intensa que el azúcar y es estable al calor por lo que puede utilizarse para cocinar y hornear. No fomenta el deterioro dental y comercialmente se encuentra con la marca de Splenda, que ha tenido que repensar su eslogan “Hecho de azúcar, por lo tanto sabe como azúcar” debido a que las Autoridades de Nueva Zelanda dijeron que confunde y engaña a los consumidores. Lo cual es cierto, ya que la estructura química de la sacarosa es significativamente diferente a la de la sucralosa como cita la Figura 1.

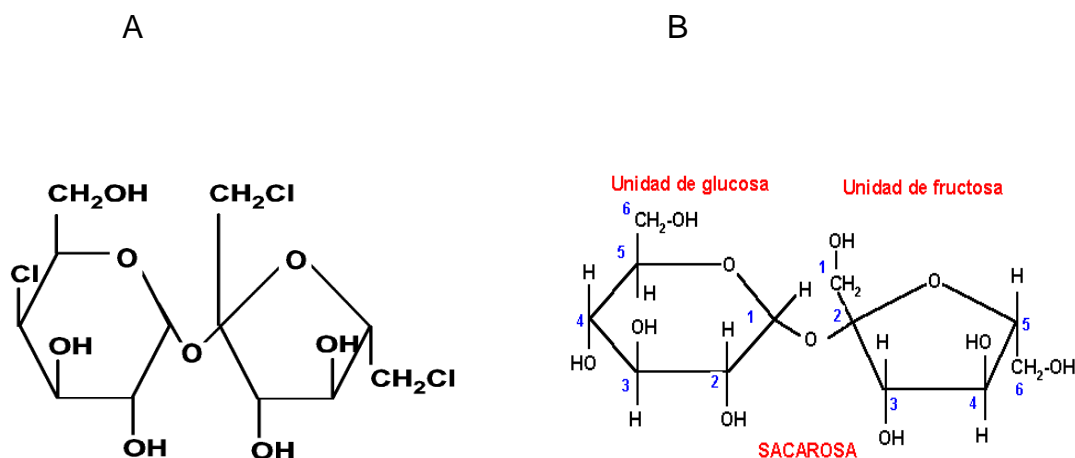


Figura 1. Comparación de la estructura química de la sucralosa y la sacarosa. A) Molécula de sucralosa que contiene un átomo de cloro. B) La sacarosa formada por una hexosa y una pentosa sin halógenos (adaptado de Thomas, 2005).

La FDA aprobó la sucralosa para utilizarse en 15 tipos de alimentos y bebidas en 1998 y en 1999 fue aprobada para uso general como edulcorante. La Ingestión Diaria Máxima Aceptable (IDA) en los Estados Unidos es de 5 mg/kg de peso/día, como calculó de la Food and Drug Administration (FDA) es de 15 mg/kg de peso. Son necesarios estudios acerca de su seguridad, ya que no es clara la disminución de la ingesta y la ganancia de peso que ocurre en ratas alimentadas con altas dosis de sucralosa, pudiendo deberse a la toxicidad o a una reducción de la palatabilidad de la dieta (Brusick y col., 2009)

La sucralosa es un compuesto clorado como los pesticidas, por lo que podría pensarse en una relación en su toxicidad, aunque se sabe que el proceso de cloración es aceptado en el tratamiento del agua ante los microorganismos (Kroger y col., 2006), ahora se ha reportado que el cloro induce mutaciones y aberraciones cromosómicas (Dogliotti, 2006).

El efecto tóxico de la sucralosa fue explorado por Sasaki y col. en 2002 con ratones en donde se evaluó el daño al DNA en 8 órganos diferentes con 39 aditivos, utilizados comúnmente en alimentos. En dicho estudio se encontró que la sucralosa, junto con ciclamato y sacarina, induce daño al DNA en órganos gastrointestinales, estos resultados fueron consistentes con los observados por Brusick y col. (2009). Otros trabajos proponen la inocuidad tanto genotóxica como clastogénica de la sucralosa y también en el sistema nervioso (Brusick y col. 2010; Durney y col. 1995; Finn y col. 2000). Adicionalmente, el estudio realizado en ratas hembra Sprague-Dawley, exploró el efecto neoplásico del incremento en las dosis de sucralosa de 3 000 ppm a 30 000 ppm, los resultados indicaron que no hubo neoplasia, solo cambios del tipo hiperplasia epitelial pélvica renal, así como mineralización renal pélvica, degeneración adrenocorticohemorrágica y cataratas (Mann y col., 2000).

El efecto embriotóxico de la sucralosa fue estudiado por Kille y col. 2000 en ratas y conejos, a los que les aplicaron dosis desde 175 hasta 700 mg/kg/día, durante los días 6 al 15 de gestación y posteriormente sacrificados el día 21. Los resultados indicaron que la sucralosa no indujo efecto teratógeno en los órganos observados. La relación entre el efecto de la sucralosa y la comunicación neuronal fue explorado en células entéricas (EC) humanas a las cuales se les adicionó una solución de sucralosa de 0.38 nM, los resultados indicaron la liberación considerable de serotonina (Kidd y col., 2008).

II.1.2 Acesulfame K: La molécula de acesulfame K fue descrita en 1967, cuya fórmula se puede observar en la Figura 2. Se le ha llamado K por el ion de potasio que puede unirse a ella, su poder edulcorante es aproximadamente 200 veces mayor que el azúcar (FDA Consumer Magazine, 2006).

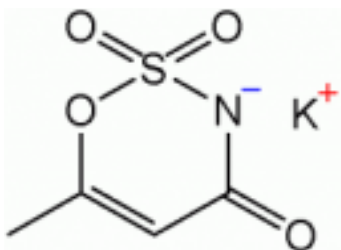


Figura 2. Molécula del Acesulfame K. La molécula de acesulfame cuenta con un átomo de potasio en su estructura cíclica (www.Chemistry.about.com/Acesulfame-Potassium.htm, 2009.)

..... El acesulfame K presenta estabilidad al calor, por lo cual puede ser utilizado para cocinar o para hornear. Es absorbido, pero no es metabolizado por el cuerpo humano y es fácilmente excretado por la orina, por lo que además del bajo aporte calórico, se ha observado que no promueve daño dental ni pierde el ión potasio. Frecuentemente es utilizado en combinación con otros edulcorantes, ya sea con sacarina, cuya estructura es muy similar, tiene sabor limpio que desaparece sin dejar resabio; al ser mezclado con otros edulcorantes de alta intensidad, provoca un perfil cercano al de la sacarosa (FDA Consumer Magazine, 2006).

Los estudios de seguridad del acesulfame K, se realizaron antes de ser aprobado por la FDA sin embargo, son poco conocidos los estudios asociados al desarrollo del sistema nervioso. En 1988 fue aprobado su uso para todo tipo de alimentos y bebidas alcohólicas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (USFDA), en 1998 fue aceptó su aplicación en bebidas no alcohólicas (carbonatadas y no carbonatadas) y en el año 2003 se aprobó su uso como edulcorante general. La Ingestión Diaria Máxima Aceptable (IDA) es de 15 mg/Kg de peso/día. Los estudios toxicológicos lo han asociado con tumores en pulmón y enfermedades respiratorias. Sin embargo, en estudios con ratas hembra, realizados por el Instituto de Tecnólogos en Alimentos, indican que no hay indicios de mutagenicidad. Más tarde se realizaron trabajos con el ensayo cometa y reportan que hay daño en el DNA inducido por acesulfame K

(Bandyopadhyay, y col. 2008). Los resultados de las investigaciones en relación a la toxicidad del acesulfame K son inconsistentes por lo que se propone realizar nuevos estudios biológicos (Karstadt, 2010).

II.1.3 Neotame: El neotame es otro de los edulcorantes artificiales con un poder endulzante de 7,000 a 13,000 veces el azúcar, dependiendo de cómo es usado en alimentos. El neotame no tiene calorías, fue aprobado en el 2002 como edulcorante para propósitos generales en una amplia variedad de productos alimenticios, entre los que se encuentran pasteles, bebidas, chicles, postres congelados, mermeladas, jaleas, gelatinas, pudines, así como frutas y jugos de frutas. La dosis diaria aceptable es de 2 mg/kg (FDA, 2006).

Le estructura química del neotame, es muy similar a la del aspartame, la diferencia radica en que el grupo amino del ácido aspártico, se cambia por un grupo 3,3 dimetil butilo. Es más estable que el aspartame (Figura 3). Los estudios sobre daños embriotóxicos son poco conocidos por lo que es importante comparar sus efectos teratógenos con los de otros edulcorantes artificiales.

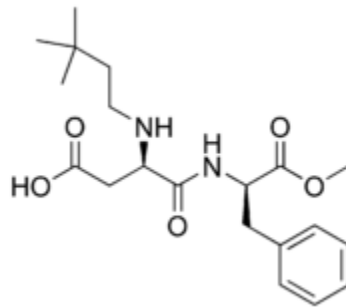


Figura 3. Estructura química del edulcorante neotame. El neotame cuenta con una anillo cíclico y el resto de la estructura lineal (www.seniblebite.com, 2009)

II.2 Desarrollo del tubo neural.

Los edulcorantes artificiales pueden afectar el desarrollo del tubo neural y más tarde inducir aborto. Entre las causas de aborto se encuentran las alteraciones genéticas y los asociados a la ingesta de sustancias químicas.

El desarrollo embrionario inicia una vez que los pronúcleos de óvulo y espermatozoide se unen (Figura 4), lo cual induce los procesos consecutivos de división celular por mitosis (Figura 5) y en donde se origina una masa de células embrionarias denominada mórula (Figura 6).

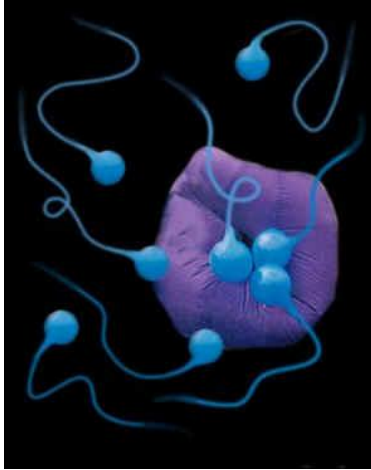


Figura 4. Fecundación del Óvulo



Figura 5. Proceso de división celular. En este proceso se llevan cabo mitosis consecutivas.

Al continuar el desarrollo, se le forma un hueco a la mórula dejando una cavidad interna, para originar lo que se conoce como gástrula, durante la cual se forman las capas germinales fundamentales para el embrión (Figuras 7 Y 8) (Evers y Starr, 2006).



Figura 6, La mórula es un conjunto de 16 a 64 células

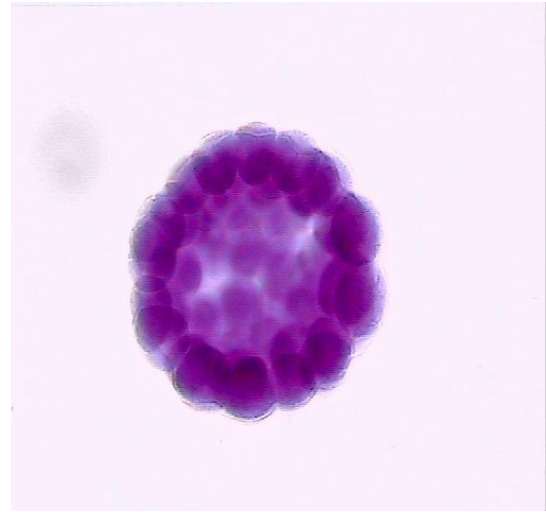


Figura 7, La blástula tiene más de 64 células, con una cavidad llamada blastocele.

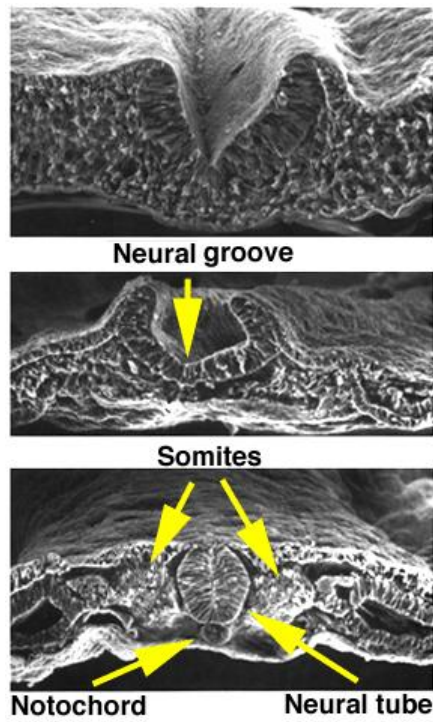
Las tres capas germinales se muestran en la Figura 8 y son (Evers y col. 2006):

- Ectodermo: Es la primera hoja blastodérmica del embrión, después surgirán el endodermo y el mesodermo en la gastrulación, a partir de esta capa se formará la piel y tejidos externos, así como el sistema nervioso.
- Endodermo: Es la capa de tejido más interna en las que se dividen los tejidos del embrión triblástico, a partir del endodermo se forma el aparato digestivo a excepción de la boca, faringe y la porción terminal del recto, de esta capa también se derivan el aparato respiratorio y las glándulas que drenan al tubo digestivo como hígado y páncreas y los folículos de la glándula tiroides y el timo.
- Mesodermo: Del ectodermo se origina la tercera capa de células situada entre el ectodermo y el endodermo denominada mesodermo. En los vertebrados a lo largo del desarrollo del mesodermo se diferencian cinco tipos diferentes



Figura 8. La gastrulación: La gastrulación es la etapa donde se forman las tres capas fundamentales del embrión, ectodermo, mesodermo y endodermo

El sistema nervioso de los vertebrados se forma de una manera común, para los embriones de pollo inicia en el estadio 3 de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951), entre la membrana bucofaringea y el nodo primitivo. El concepto de neurulación agrupa los procesos de formación de la placa neural, pliegues neurales y desarrollo del tubo neural. Este período abarca desde el proceso de inducción notocordal hasta el cierre del neuroporo caudal (Figura 9).



© Dr. K. Tosney, University of Michigan.

Figura 9. Etapas de la neurulación. Durante la neurulación se forma la placa neural, posteriormente por invaginación se tiene el surco neural, el cual se cierra para dar origen al neural

Al formarse la notocorda y el mesodermo estimulan al ectodermo adyacente, provocando que el tejido neuroectodérmico se engruese, formando así la placa neural (Figura 10). La inducción neural trae como consecuencia una sobreproducción inicial de células nerviosas, por otra parte se ha demostrado que a tal período le sigue otro de muerte celular programada (apoptosis) que determina el número de células formadas (Bravo, 2007).

Una vez completado el proceso inductivo, la placa neural se alarga desde su origen craneal al nodo primitivo hasta la membrana bucofaríngea. Durante este período los embriones son susceptibles al efecto de sustancias químicas.

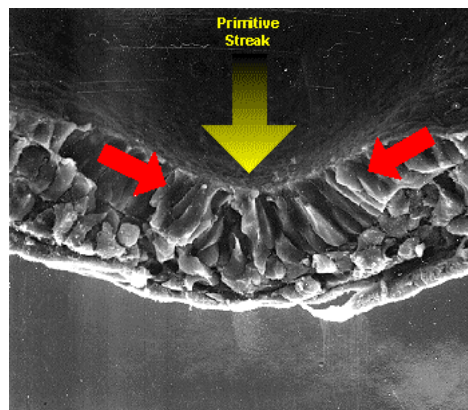


Figura 10. Engrosamiento del neuroectodermo y formación de la placa neural.

Una vez formada la placa neural, los bordes laterales se elevan para formar los pliegues neurales y la porción media forma el surco neural. La fusión empieza en la región cervical y sigue hacia la cefálica y caudal. La fusión de los pliegues neurales no ocurre simultáneamente a lo largo de ellos y la luz del tubo neural, comunica con la cavidad amniótica en sus extremos cefálico y caudal a través de los neuroporos craneal (anterior) y caudal (posterior)

El cierre del neuroporo craneal se realiza en los embriones de pollo en el estadio 13 de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951) (18 a 20 somitas) y el neuroporo caudal se cierra en el estadio 13+ a 14-, período de 21 somitas, lo que coincide con el establecimiento de la circulación sanguínea hacia el tubo neural. Mientras los pliegues neurales se acercan a la línea media para fusionar a un grupo de células neuroectodérmicas ubicadas en la cresta de cada pliegue (cresta neural), pierden su afinidad epitelial con las células vecinas, por lo que la migración activa de las células de la cresta neural (Figura 11), desde las crestas hasta el mesodermo adyacente transforma el neuroectodermo en una masa aplanada irregular que rodea el tubo neural y que dará origen a un conjunto de tejidos de gran importancia como son ganglios autónomos, ganglios craneales, leptomeninges (aracnoides y piamadre), entre otros que formarán parte del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso autónomo (Bravo, 2007).

Luego del cierre completo del tubo neural, comienza el desarrollo de la región caudal del tubo, mediante procesos de canalización y diferenciación regresiva. En esta etapa, un conjunto de células indiferenciadas al final del tubo neural desarrolla una serie de pequeñas vacuolas que posteriormente tendrán contacto con el canal central. En el periodo siguiente, ocurre la regresión de células de la masa caudal, originando el ventrículo terminal y el *filum terminale*. El extremo cefálico del tubo neural se dilata y origina 3 vesículas encefálicas primarias que son Prosencéfalo (cerebro anterior), Mesencéfalo (cerebro medio) y Rombencéfalo (cerebro posterior) que se muestran en la Figura 12. Posteriormente del alargamiento del tercio caudal se forma la médula espinal, en donde el neurocele se estrecha para formar el canal central, continuando con la cavidad de las vesículas encefálicas (Colas y Shoenwolf, 2001).

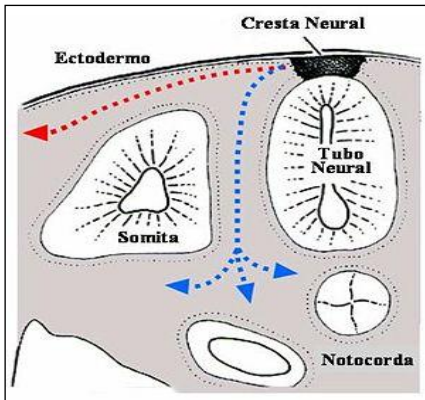


Figura 11. Cierre del tubo neural y formación de la cresta neural.



Figura 12. Corte transversal de las vesículas encefálicas, Prosencéfalo... Mesencéfalo y Rombencéfalo.

II.3 Receptores a 5-hidroxitriptamina o serotonina.

Las sustancias químicas externas como los edulcorantes artificiales, pueden modificar la síntesis de los morfógenos que participan en el desarrollo del sistema nervioso, uno de ellos es la serotonina. La 5 Hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) la cual se forma a partir del metabolismo del triptofano (Figura 13) y una vez unida a sus receptores participa en un amplio rango de sistemas fisiológicos en los organismos adultos, entre los que se incluyen el control de la movilidad y secreción gastrointestinal, la regulación cardiovascular, percepción de dolor y apetito, entre otros.

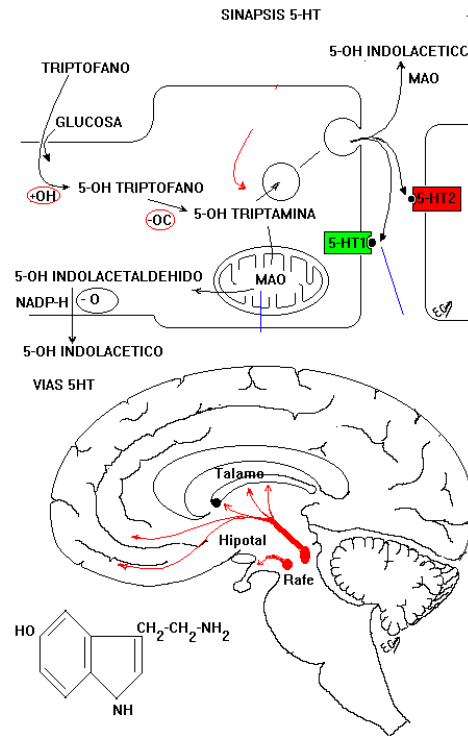


Figura 13. Biosíntesis de serotonina a partir de triptófano en el sistema nervioso central. En la figura se observan que el triptófano más oxígeno pasa a 5-Hidroxi L triptamina que por acción de la hidroxitriptofano descarboxilasa se forma serotonina.

El efecto de la serotonina durante el desarrollo fue propuesta por K. S. Koshtoyants a principios de los años 60, en donde se le considera morfógeno en el desarrollo prenervioso (Gennady y col., 2001).

La 5-HT presenta un doble papel en el organismo de los mamíferos. En primero se presenta en el desarrollo embrionario como mediador de la neurogénesis y el segundo en la maduración del cerebro como neurotransmisor. Durante la neurogénesis regula el desarrollo de las neuronas serotoninérgicas y la formación de tejidos, la neurotransmisión serotoninérgica se lleva a cabo cuando las neuronas se han diferenciado (Hranilovic y col., 2005). En mamíferos e invertebrados la 5-HT induce la neurogénesis, la diferenciación neuronal, inhibe el crecimiento de la movilidad del cono y la sinaptogénesis. Las acciones

morfogénicas de la 5-HT son reguladas por sus transportadores y la notocorda de embriones de pollo. En embriones de ratón se han reportado malformaciones craneales y cardíacas cuando recibieron tratamientos con inhibidores de 5-HT (Hansson y col.,1999).

Los receptores a serotonina se dividen en siete familias distintas que han sido identificadas como (5-HT₁ – 5-HT₇), las cuales, a su vez, se han clasificado en subpoblaciones de acuerdo al sitio de distribución, así como a su actividad agonista o antagonista ante sustancia químicas en el mecanismo postreceptor, la gran mayoría de las familias son metabotrópicas excepto la 5-HT₃, el cuál es un canal iónico como se muestra en el Cuadro 1.

La aparición temprana de la 5-HT y sus receptores (Figura 14) durante el desarrollo del embrión, aunado con los múltiples efectos originados por la 5-HT durante la morfogénesis del sistema nervioso central, sugieren que la 5-HT influye en el desarrollo y maduración del cerebro de los mamíferos antes de que llegua a actuar como neuromodulador/neurotransmisor. La 5-HT afecta la morfogénesis craneofacial, gastrointestinal y cardiovascular en embriones de pollo, rata y ratón. En el caso de los mamíferos la serotonina proviene de la madre y se sintetiza en sitios de biosíntesis temprana de 5-HT (Coté y col., 2006).

Cuadro 1, Clasificación de los receptores a serotonina, distribución y su mecanismo de acción (Glennon y col., 2008).

RECEPTORES SEROTONINERGICOS		
Tipo o Subtipo de Receptor	Distribución	Mecanismo Postreceptor
5-HT _{1A}	Núcleos del raquí Hipocampo	↓ AMPc, Canales de K ⁺
5-HT _{1B}	Sustancia Nigra, Globo Pálido, y Ganglios Basales	↓ AMPc
5-HT _{1Da,b}	Cerebro	↓ AMPc
5-HT _{1E}	Corteza cerebral Putamen	↓ AMPc
5-HT _{1F}	Corteza cerebral Hipocampo	↓ AMPc
5-HT _{2A}	Plaquetas, Músculo liso y Corteza cerebral	↑ IP3
5-HT _{2B}	Estómago (fondo)	↑ IP3
5-HT _{2C}	Coroides, Hipocampo y Sustancia Nigra	↑ IP3
5-HT ₃	Area postrema, nervios sensitivos y enérgicos	El Receptor es un canal iónico de Na ⁺ - K ⁺
5-HT ₄	SNC, neuronas mien- téricas y músculo liso	↑ AMPc
5-HT _{5A,B}	Cerebro	Desconocido
5-HT _{6,7}	Cerebro	↑ AMPc

La aparición temprana de la 5-HT y sus receptores (Figura 14) durante el desarrollo del embrión, aunado con los múltiples efectos originados por la 5HT durante la morfogénesis del Sistema Nervioso Central, sugieren que la 5HT influye en el desarrollo y maduración del cerebro de los mamíferos antes de que llegue a actuar como neuromodulador/neurotransmisor. La 5-HT afecta la morfogénesis craneofacial, gastrointestinal y cardiovascular en embriones de pollo, rata y ratón. En el caso de los mamíferos la serotonina proviene de la madre y se sintetiza en sitios de biosíntesis temprana de 5-HT (Coté y col., 2006).

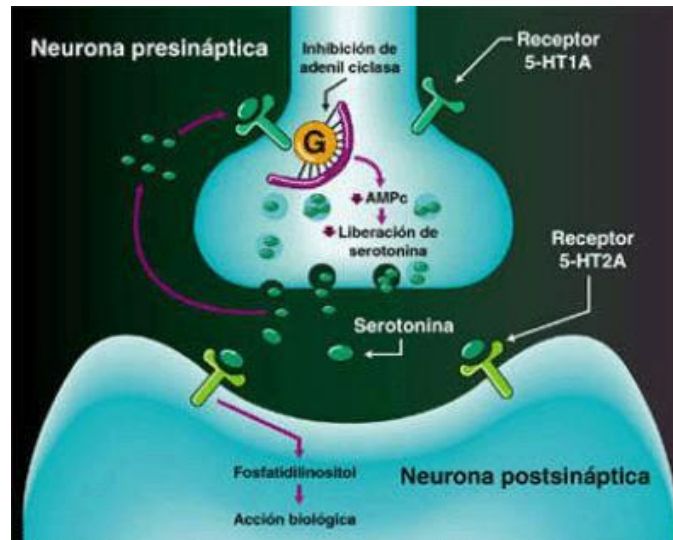


Figura 14. Interacción de la serotonina y sus receptores. La neurona presináptica despolarizada induce la apertura de canales de calcio. El calcio participa en la liberación de la serotonina al canal sináptico. La serotonina liberada activa a los receptores de la neurona postsináptica

Los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5HT_{2C} presentan inmunorreactividad durante las fases activas de la morfogénesis de los diferentes tejidos embrionarios y se ven afectadas ante sustancias antagónicas, por lo que la ingestión de estas como psicotrópicos durante el embarazo pueden interferir en el desarrollo prenatal y en tejidos neurales y no neurales (Lauder y col, 2000).

En la investigación realizada para determinar como la disminución de 5-HT inclusive regula la expresión del fenotipo GABAérgico del cordón espinal en embriones de ratón de la cepa OF1 por inmunofluorescencia, se encontró que dicha disminución frena la maduración de la transmisión inhibitoria temprana en cordón espinal de los embriones, e incluso regula los cambios en la población GABAérgica neuronal (Allain y col, 2005).

En embriones de orca se encontró que la serotonina está involucrada en eventos morfogénicos tempranos como la gastrulación y la neurulación. Durante la gastrulación es particularmente interesante su función en la migración de las células de la cresta neural. Los agentes serotoninérgicos causan malformaciones

craniofaciales en embriones de ratón, lo que indica que la 5-HT y sus receptores regulan la migración de la cresta neural del cráneo en ratones, en donde se utilizaron para evaluar el nivel de activación de los receptores a 5-HT, dentro de la regulación de la migración celular, distintas concentraciones de 5-HT, en un intervalo de 0.01 μM a 100 μM , siendo la de mayor efecto la de 0.01 μM de 5-HT. Lo anterior indica que la migración de las células de la cresta neural es estimulada por la activación apropiada de los receptores a serotonina y que puede promover su incremento o disminución dependiendo de la concentración de 5-HT (Moiseiwitsch y Lauder, 1995).

La 5-HT tiene un papel importante durante la gastrulación, subsecuentemente es observado en la placa del piso durante el desarrollo del tubo neural. Durante la formación de la cresta neural se ha demostrado que facilita la migración y estimula la diferenciación celular (Moiseiwitsch, 2000).

Durante el desarrollo embrionario del sistema nervioso, las redes neuronales son activadas de manera sincronizada; en estudios realizados con ratones CD-1 macho, se observó que al administrarles diferentes dosis de aspartame 13, 133 y 650 mg/Kg durante 30 días, sufrieron una disminución severa en las concentraciones de serotonina y su receptor 5-HT en diversas regiones del cerebro (Sharma y Columbe, 1987).

No hay más estudios en este sentido? Siento que falta fundamentar para fortalecer la hipótesis

III. JUSTIFICACIÓN

El uso de edulcorantes artificiales para el control de peso no es restringido, ni existe alguna advertencia en su consumo para mujeres embarazadas, por lo cual es importante ampliar los estudios del efecto de dichos edulcorantes sobre el desarrollo del sistema nervioso.

IV. HIPÓTESIS

Los edulcorantes artificiales son tóxicos en la formación temprana del sistema nervioso central en embriones de pollo y modifican la distribución de los receptores a serotonina 5HT_{2C}.

V. OBJETIVOS

V.1 General

Estudiar los efectos embriotóxicos de neotame, sucralosa y acesulfame K en la formación del tubo neural de embriones de pollo y los cambios inducidos por dichos edulcorantes en la distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C}.

V.2. Específicos

Para cada uno de los edulcorantes:

- a) Neotame,
 - b) Sucralosa
 - c) Acesulfame K
- Conocer los cambios fenotípicos inducidos por los 3 edulcorantes artificiales en tres concentraciones.
 - Explorar los cambios en la distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} durante la formación del tubo neural.
 - Comparar los cambios en la distribución de receptores en los embriones de pollo E13 tratados con los diferentes edulcorantes.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Métodos

VI.1.1 Método Biológico.

Los embriones de pollo libres de patógenos se incubaron a una temperatura de 37 °C y una humedad relativa de 60-70% durante 14 horas; después de este tiempo se realizó la inoculación de los edulcorantes en tres concentraciones basadas en su ingesta diaria aceptada (IDA) (Sucralosa, Acesulfame K y Neotame) Cuadro 2.

Cuadro 2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

EDULCORANTE	IDA	IDAX10	IDAX30
SUCRALOSA	0.3 mg	3 mg	9 mg
ACESULFAME K	0.9 mg	9 mg	27 mg
NEOTAME	0.26 mg	2.6 mg	7.8 mg

..... Una vez terminado dicho procedimiento se selló con cinta adhesiva y se volvió a incubar 45 horas para permitir su desarrollo embrionario hasta el estadio 13 de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951). En el grupo control se sometió a los mismos cambios de condiciones, pero sin la aplicación de los químicos.

Transcurridas las 45 horas de incubación se procedió a la extracción de los embriones del cascarón, con la ayuda de tijeras de disección rectas se cortó el cascarón aproximadamente a la mitad, cuidando de no perder la yema, la cual quedó expuesta para facilitar la extracción del embrión del saco vitelino.

Se extrajeron los embriones cortando alrededor del saco vitelino que los protege y se colocaron en cajas petri con una solución isotónica de cloruro de sodio al 1%.

Una vez realizada la extracción de los embriones, se observaron con la ayuda de estereomicroscopio y se reportaron las características fenotípicas de todos los grupos tratados. Los embriones fueron reportados como normales cuando tenían las características propuestas por Hamburger y Hamilton (1951). Entre las anomalías se encontraron la aplasia generalizada cuando los embriones disminuían su tamaño un 40% o más; las anomalías de la formación de vesículas, cuando al cerrar el tubo se veían cambios en la estructura normal, entre ellas se ubicaron las microcefalias que consistían en la reducción de un 40% o más de la dimensión de la vesícula. Las resorciones se observaron cuando el embrión era destruido, estas serían el equivalente a un aborto (García, 1995).

VI.1.2 Método inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica se realizó en los embriones en el estadio 13 de acuerdo a Hamburger y Hamilton (1951), para explorar la distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} por inmunohistoquímica. Los embriones fueron fijados en paraformaldehído y se crioprotegieron para realizar cortes de 30 µm de grosor, los cuales se montaron en portaobjetos para realizar la inmunohistoquímica.

Las laminillas con los cortes de embrión se lavaron 3 veces con solución buffer de fosfatos (PBS), 10 minutos cada lavado, después se incubaron durante 1 hora en una solución de peróxido de hidrógeno al 1%; posteriormente se incubaron durante 1 hora con una solución bloqueadora de leche descremada al 5% y se realizaron 3 lavados con solución de fosfatos con tritón (PBT) durante 10 minutos cada lavado. Se incubaron las preparaciones con el anticuerpo primario contra receptor 5-HT_{2C} (generado en conejo) durante toda la noche a 4°C (adaptado de García Alcocer y col. 2006).

Al otro día, se les realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBT y se colocó el anticuerpo secundario durante 1 hora (Anticuerpo contra conejo conjugado con peroxidasa de rábano). Después se realizaron 3 lavados de 10 minutos con solución PBS; por último se tiñeron con diaminobencidina y peróxido al 0.1%

durante 5 minutos y se observaron al microscopio, para analizar las diferencias entre los grupos de embriones.

VI.2.3 Métodos Estadísticos.

Se formaron grupos de estudio para cada edulcorante a tres diferentes concentraciones, en grupos de 15 embriones para cada dosis de cada compuesto en base a la IDA y un incremento logarítmico, además se tuvo un grupo control, un blanco de la solución isotónica y blanco del vehículo de los edulcorantes. Para comparar los grupos se utilizó ANOVA por modelos lineales generalizados, La Prueba Posthoc de Tukey (Mendenhall y col., 1986)

VII. RESULTADOS

Con la finalidad de observar los cambios fenotípicos por efecto de los edulcorantes en los embriones de pollo en estadio 13 (Hamburger y Hamilton, 1951; García, 2005), todos los embriones se sometieron a condiciones idénticas de temperatura, humedad y tiempo de incubación, como se describió en la metodología y se obtuvieron los siguientes resultados:

VII.1 Grupo Control

Los resultados de los porcentajes de embriones del grupo control fueron los siguientes: 94.5 ± 2.25 error estándar (ee) para los embriones normales, 3.8 ± 2.33 ee para los embriones anormales, 1.7 ± 1.6 ee para las resorciones y 5.46 ± 2.24 ee para la suma de embriones anormales más resorciones. La morfología de los embriones normales en estadio 13 se observa en la Figura 15. En la figura 16 se presenta un embrión normal.

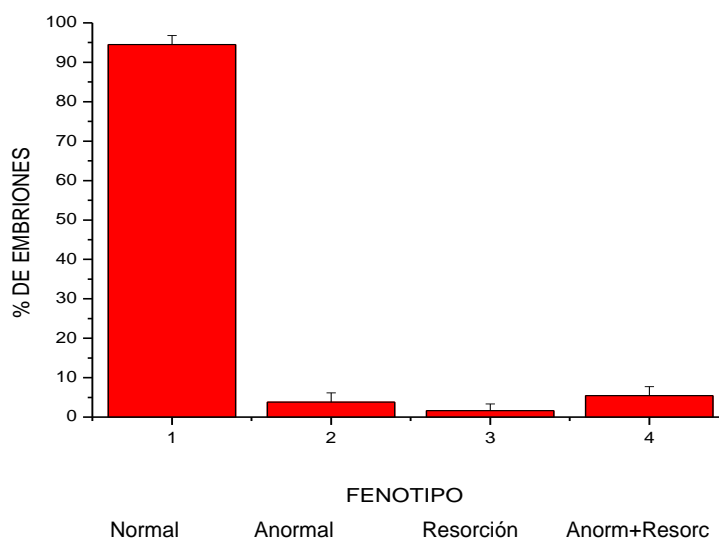


Figura 15. Grupo control. En esta gráfica y en las siguientes, se muestra en el eje de las abscisas los subgrupos de embriones: normales, anormales, resorciones y la suma de embriones anormales y resorciones; en el eje de las ordenadas se encuentra expresado en porcentaje de embriones para cada grupo. Nótese que en este grupo se presentó un bajo porcentaje de anomalías.



Figura 16. Embrión normal. En los embriones normales E13 se observan los primordios ópticos, las vesículas cerebrales, los somitas y la cauda.

VII. 2 Grupo Blanco

En este grupo se evaluó el efecto causado por el vehículo utilizado para preparar las soluciones de los distintos edulcorantes en los tratamientos (cloruro de sodio en agua al 0.9%). Los resultados de las medias son: 97.2 ± 2.8 ee para los normales, 0 ± 0 ee para anormales, 2.76 ± 2.76 ee para resorciones y anormales más resorciones (Figura 17). Al comparar los resultados del grupo control y el blanco no se observaron diferencias significativas.

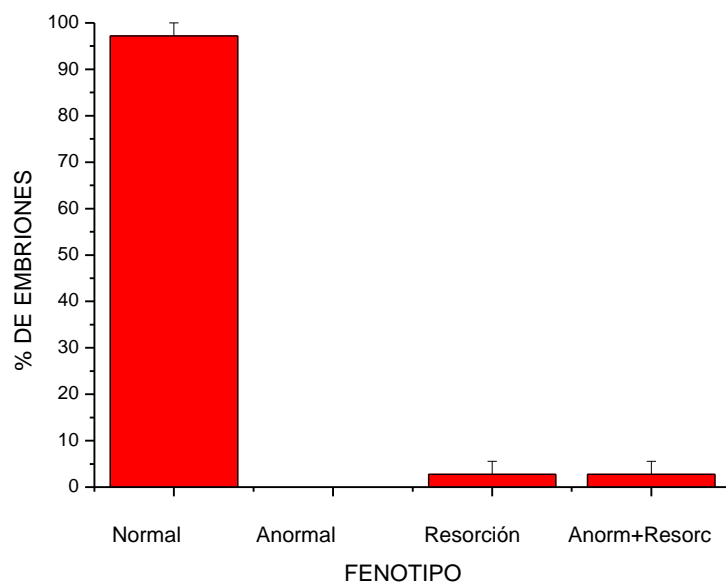


Figura 17. Grupo blanco. Los embriones tratados con el vehículo en que se prepararon los distintos edulcorantes presentaron pocas resorciones.

.VII.3 Tratamiento 1 con Neotame 1

Este grupo, se sometió a la IDA (0.26 mg/huevo) dosis de neotame dando los resultados que se muestran en la Figura 18, para los embriones normales la media fue de 78.3 ± 0.27 ee, 17.98 ± 3.43 ee en anormales, 3.7 ± 3.7 ee en resorciones y 21.68 ± 0.25 ee en la suma de anormales más resorciones. Al comparar los resultados de este grupo con los controles se encontró diferencia significativa en el porcentaje de embriones normales y anormales.

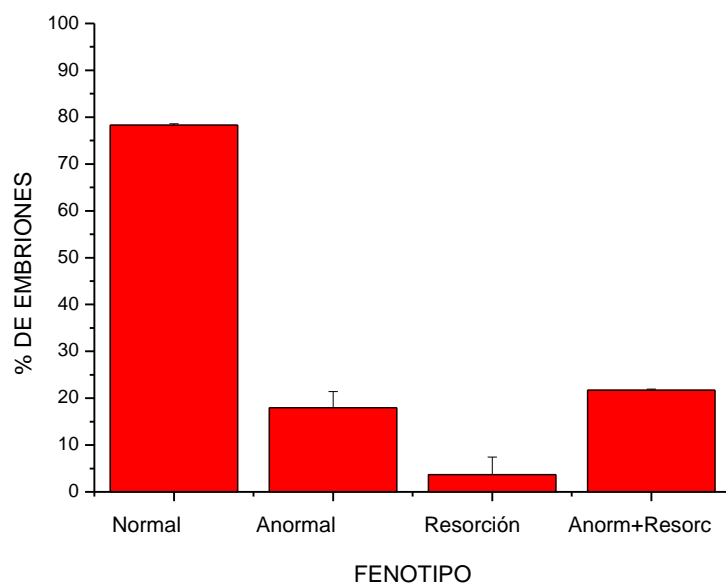


Figura 18. Tratamiento 1 con neotame 1. En ésta gráfica se puede observar como disminuye el fenotipo normal y se incrementa anormal en comparación con el control, siendo ambos cambios estadísticamente significativos.

En los grupos tanto controles como tratados con neotame se encontraron embriones que interrumpieron su desarrollo y formaron una resorción Figura 19.

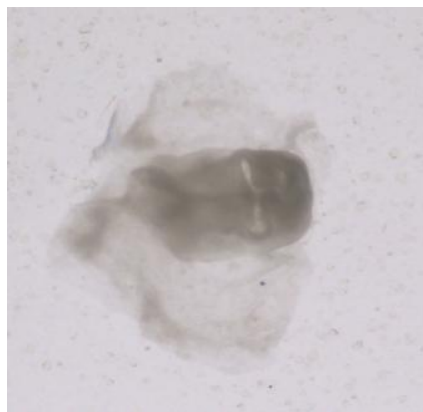


Figura 19. Resorción. La resorción se presenta en aquellos embriones que sufrieron cambios y se deformó el tejido totalmente, indicando la muerte del mismo. **VII.4 Grupo Tratamiento 2 con neotame 2**

Para el segundo tratamiento con 10 veces la dosis diaria aceptada (2.6 mg/huevo) los resultados son 62.68 ± 3.23 ee en los normales, 30.92 ± 4.04 ee en

anormales, 6.44 ± 4.02 ee en resorciones y 37.36 ± 3.25 e e en la suma de anormales más resorciones. Al comparar los embriones normales, anormales y resorciones mas anormales con los del grupo control se observó una diferencia significativa en los embriones normales y anormales.

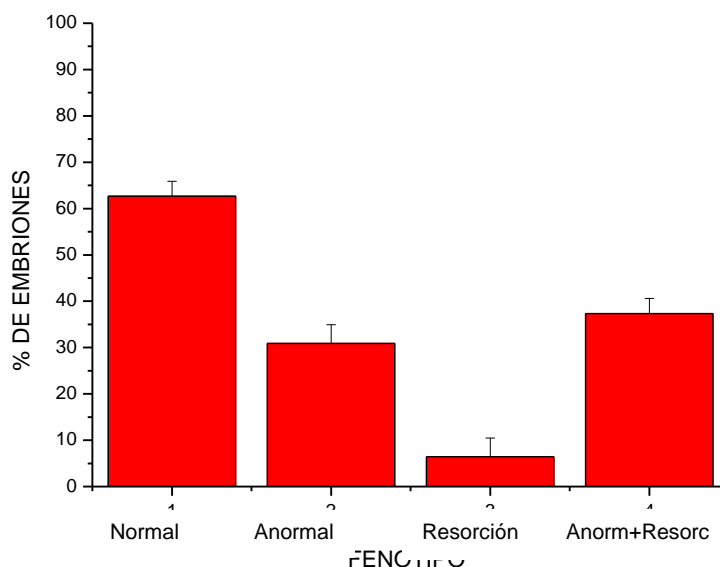


Figura 20. Tratamiento 2 con neotame 2. En esta gráfica se observan cambios estadísticamente significativos al comparar los embriones normales, anormales y anormales mas resorciones comparados con el control.

VII.5 Tratamiento 3 con neotame 3

Los resultados de los embriones tratados con 30 veces la dosis diaria aceptada (7.8 mg/huevo) de neotame indicaron unas medias de: 68.45 ± 5.08 ee en los normales, 29.16 ± 4.65 ee en anormales, 2.38 ± 2.38 ee en resorciones y 31.54 ± 5.08 ee en la suma de anormales más resorciones. Al comparar los resultados con el grupo control se encontró diferencia significativa en los grupos de embriones normales y anormales.

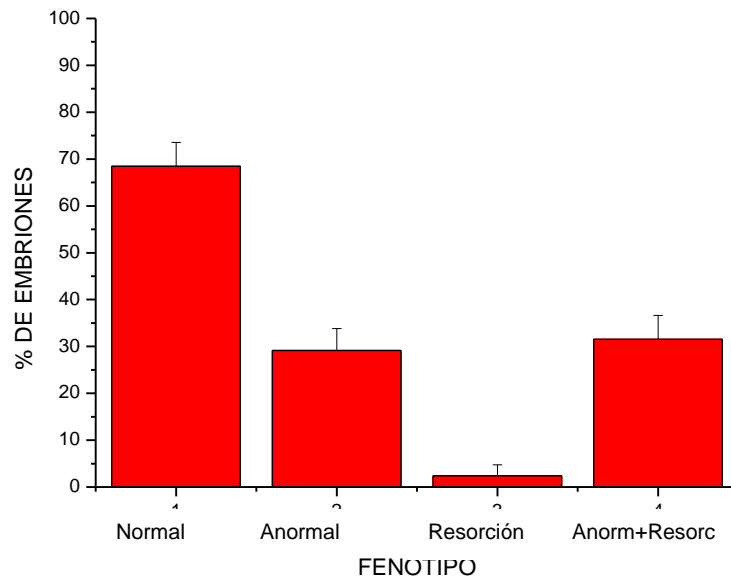


Figura 21. Tratamiento 3 con neotame 3. En este grupo de embriones se observaron cambios similares a los observados en el tratamiento 2, los cuales son significativos al compararlos con el control.

VII.6 Tratamiento 4 con Sucralosa 1.

Los resultados de los embriones tratados con la ingesta diaria aceptada de sucralosa (0.3 mg/huevo) indicaron una media de embriones normales de: 84.03 ± 3.18 , 11.96 ± 3.18 ee para los anormales, 0 ± 0 ee para las resorciones y 11.96 ± 3.18 ee para los embriones anormales más resorciones (Figura 22). Al comparar los resultados de este grupo con el grupo control no se encontraron diferencias significativas.

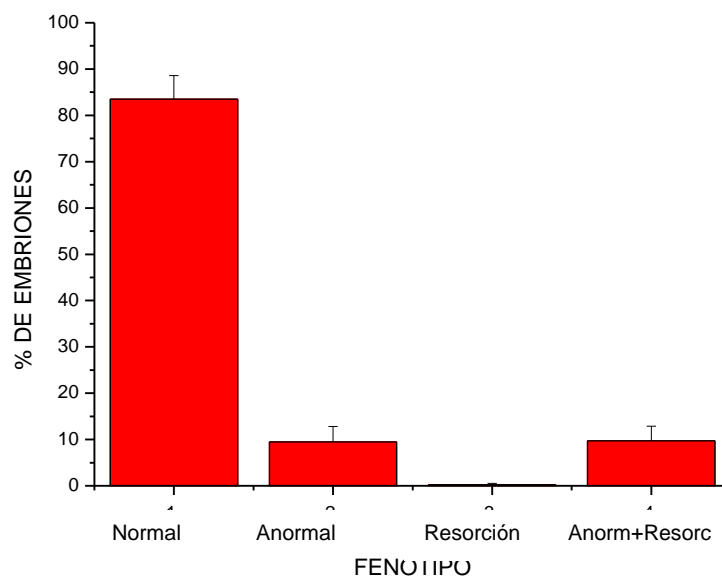


Figura 22. Tratamiento 4 con sucralosa.1 Los embriones tratados con esta dosis de sucralosa presentaron un 84% de embriones normales y no se observaron resorciones.

VII.7 Tratamiento 5 con Sucralosa 2

La Figura 23 muestra que los embriones para la dosis 10 veces más que la diaria aceptada (3 mg/huevo) de sucralosa, indicaron medias de 76.93 ± 5.51 ee en embriones normales, 20.22 ± 3.14 ee para embriones anormales, 2.77 ± 2.77 ee en resorciones y 23 ± 5.57 ee para la suma de resorciones más anormales. El análisis estadístico de este grupo comparado con el control indicó diferencia significativa en los embriones normales y anormales.

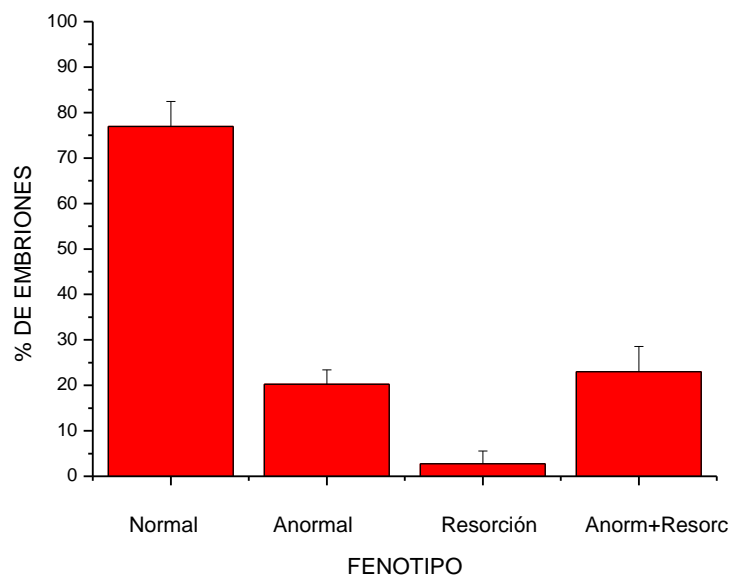


Figura 23. Tratamiento 5 con sucralosa 2. En este grupo se observó un incremento de anomalías respecto al tratamiento con sucralosa 1 y el 2.77% de resorciones.

VII.8 Tratamiento 6 con sucralosa 3.

Los embriones tratados con 30 veces la ingesta diaria aceptada (9 mg/huevo) de sucralosa indican resultados similares al tratamiento con 10 veces la dosis (Figura 24), los cuales son: 73.76 ± 6 ee en normales, 19.03 ± 2.57 ee para los anormales, 6.99 ± 3.85 ee para resorciones y 26.07 ± 5.98 ee para anormales y resorciones. Al comparar los embriones de este tratamiento con los del grupo control se encontraron diferencias significativas.

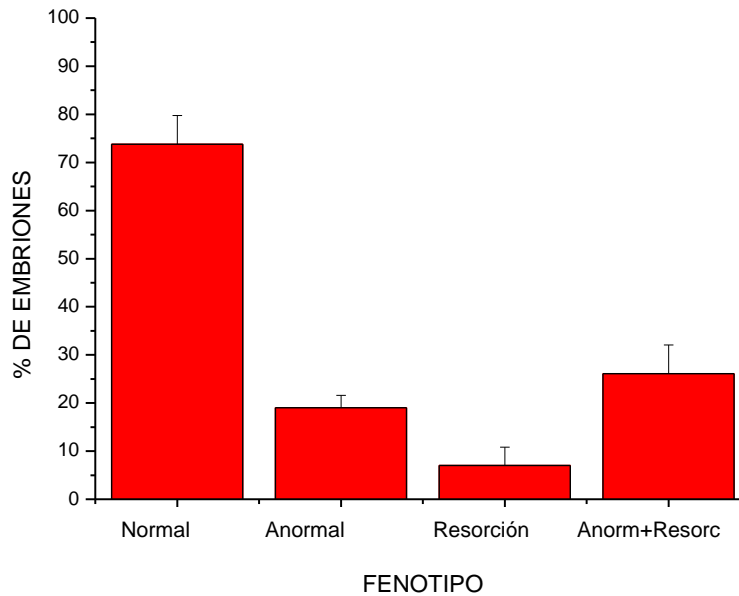


Figura 24. Tratamiento 6 con sucralosa 3. Los resultados observados son similares al tratamiento 2, en el que se observaron con un incremento de resorciones al 6.99%.

VII.9 Tratamiento 7 con Acesulfame K 1.

El primer grupo de embriones, se sometido a la ingesta diaria aceptada (0.9 mg/huevo) de acesulfame K, los resultados indican medias de 87.57 ± 7.96 ee para los normales, 9.39 ± 5.25 ee para anormales, 3.03 ± 3.03 ee para resorciones y 12.42 ± 7.96 ee para anormales y resorciones. El análisis estadístico indicó que no existe diferencia significativa al comparar los embriones normales y anormales con los del grupo control.

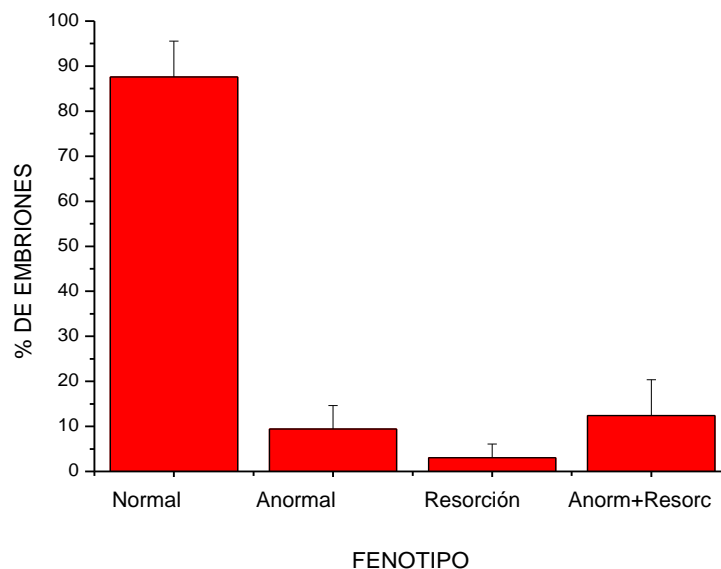


Figura 25. Tratamiento 7 con acesulfame K 1. Los embriones de este grupo no presentaron diferencias significativas con el grupo control y blanco.

VII. Tratamiento 8 con acesulfame K 2.

Como se puede observar en la gráfica de la Figura 26, los resultados de los embriones tratados con 10 veces la dosis de acesulfame k (9 mg/ huevo) presentaron medias de: 76.96 ± 2.3 ee para los normales, 18.48 ± 3.6 ee para anormales, 4.54 ± 4.54 ee para resorciones y para anormales más resorciones es de 23.05 ± 2.29 ee. El análisis estadístico indicó que no hay diferencia significativa al comparar los embriones normales y anormales de este tratamiento con los del grupo control.

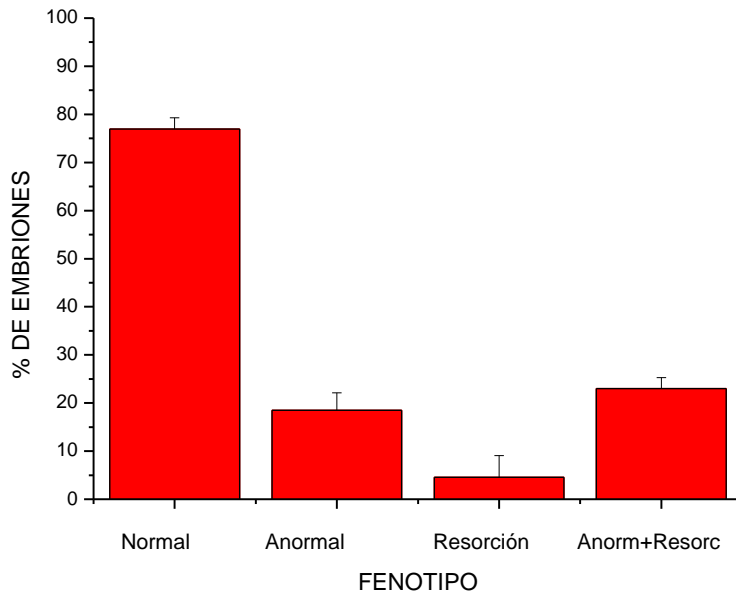


Figura 26. Tratamiento 8 de Acesulfame K 2. En este grupo se incrementaron las anomalías a 18.48% y resorciones a 4.54%, respecto al grupo control y al anterior.

La deficiencia en la formación de las vesículas cerebrales es otra de las anomalías presentes por efecto de los edulcorantes, apreciándose en la Figura 27.

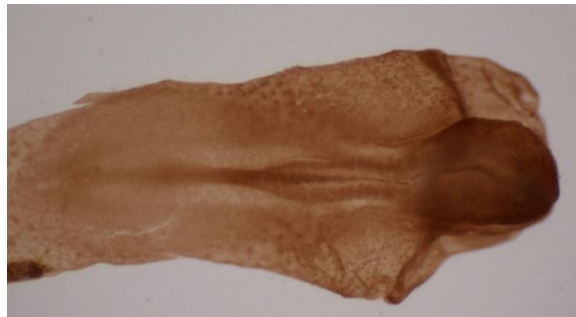


Figura 27. Deficiencia en la formación de vesículas. Entre las deficiencias observadas en los grupos tratados, se observaron deficiencias en la formación de vesículas cerebrales, en las cuales se tiene un cúmulo mayor de células sin forma precisa.

VII.11 Grupo Tratamiento 9 con acesulfame K 3

El tercer grupo embriones fueron tratados con 30 veces la dosis diaria aceptada (27 mg/huevo) de acesulfame K. Los resultados se presentan en la Figura 28 para con medias de 63.95 ± 13.8 ee para los normales, 25.05 ± 10.21 ee para anormales, 11.03 ± 3.59 ee para resorciones y 36.03 ± 13.8 ee en anomalías mas resorciones. Al comparar los resultados de los embriones de este tratamiento con los del grupo control se encontró diferencia significativa en los embriones normales y anormales.

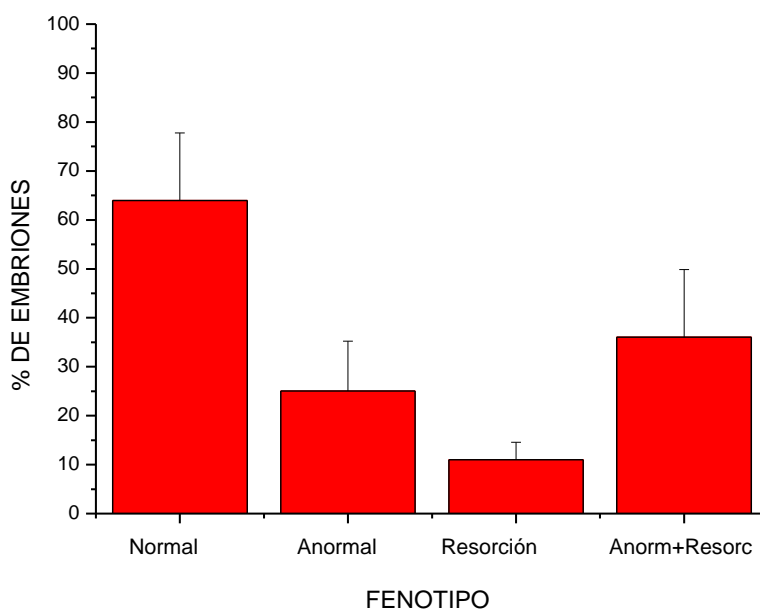
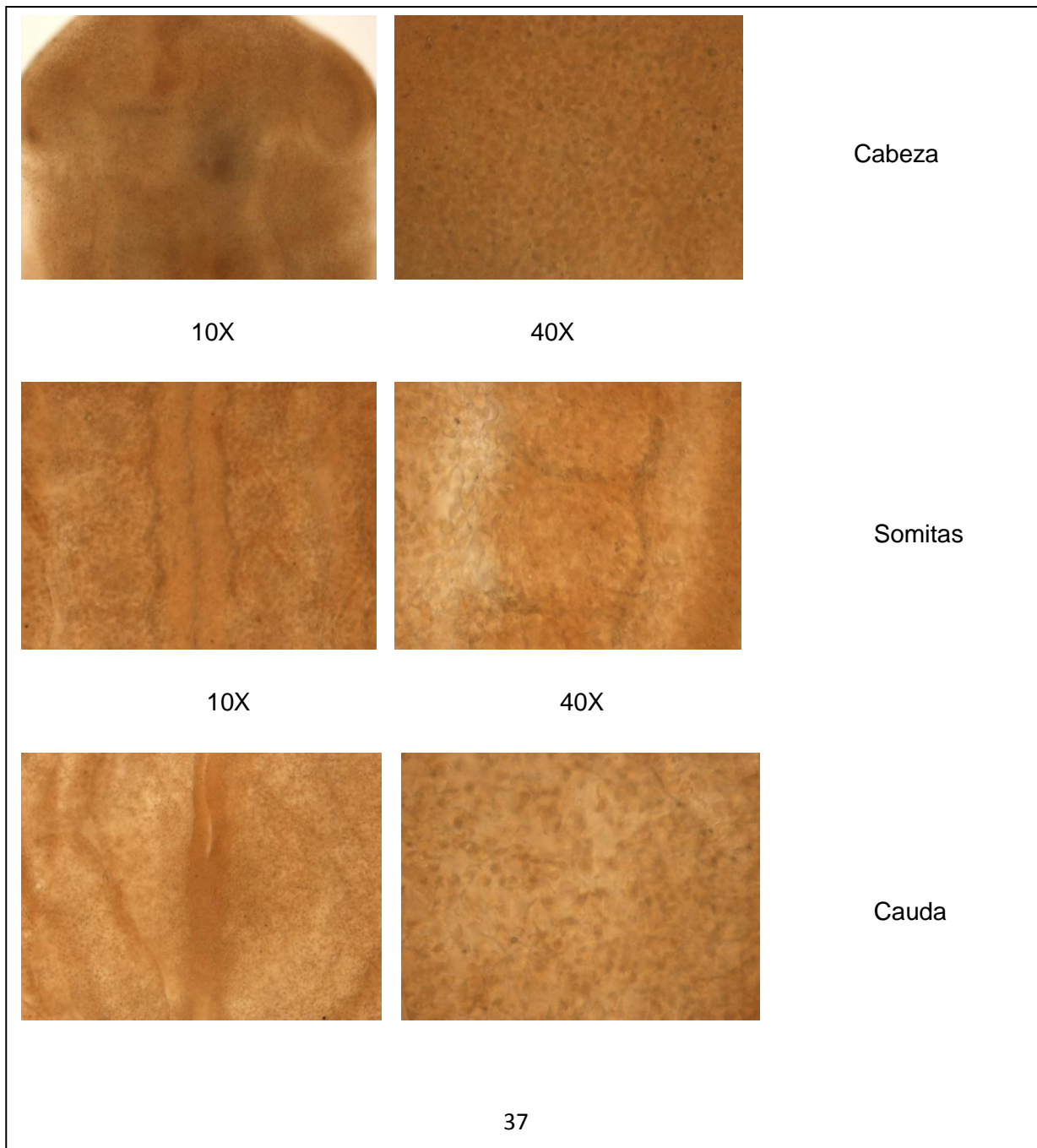


Figura 28. Tratamiento 9 con acesulfame k 3. En esta figura se observó un incremento al 11% de resorciones y una disminución de los embriones normales al 63%. Estos resultados son estadísticamente diferentes del grupo control.

VII.12 Distribución de los receptores a serotonina 5HT_{2c} por inmunohistoquímica.

De acuerdo a las pruebas realizadas con inmunohistoquímica (IHQ) para determinar la distribución de los receptores a serotonina 5HT_{2c} se obtuvieron los resultados siguientes.

En la Figura 29 se muestran las imágenes de las marcas inmunohistoquímicas en las regiones de cabeza, somitas y cauda de los controles.



10X

40X

Figura 29. Marca IHQ para receptores a serotonina 5HT_{2C} en embrión normal control Las fotografías muestran una disminución de la intensidad para la marca inmunohistoquímica de la región encefálica (cabeza) más intensa con respecto a las somitas y la cauda.

La inmunorreacción en los embriones tratados con 0.26 mg de neotame indicó una disminución de la marca marca inmunorreactiva al compararlos con el grupo control (Figura 30).

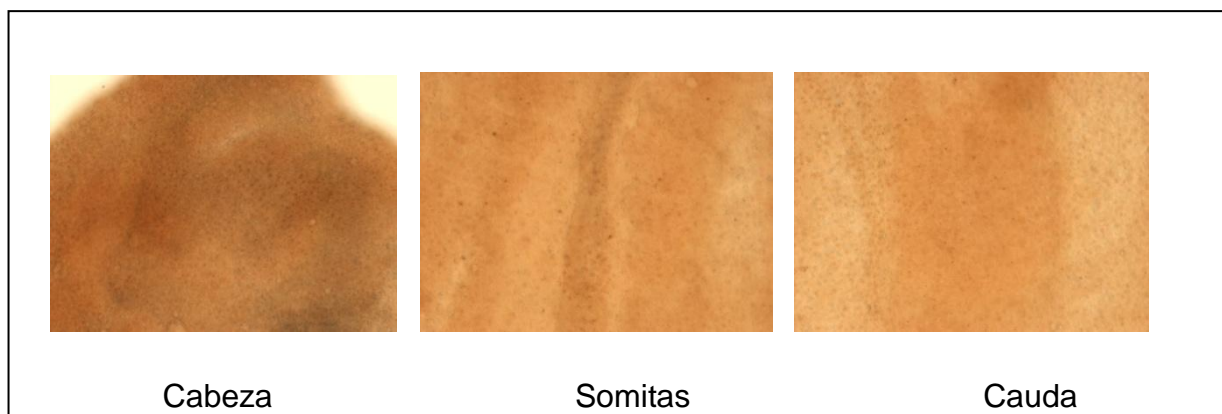


Figura 30. Distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} en embriones normales tratados con neotame. La marca inmunorreactiva en cada una de las regiones es menor a la observada en los embriones control.

El grupo de embriones tratados con sucralosa presentó una densidad de receptores a serotonina 5-HT_{2C} similar a la observada en el grupo control (Figura31).

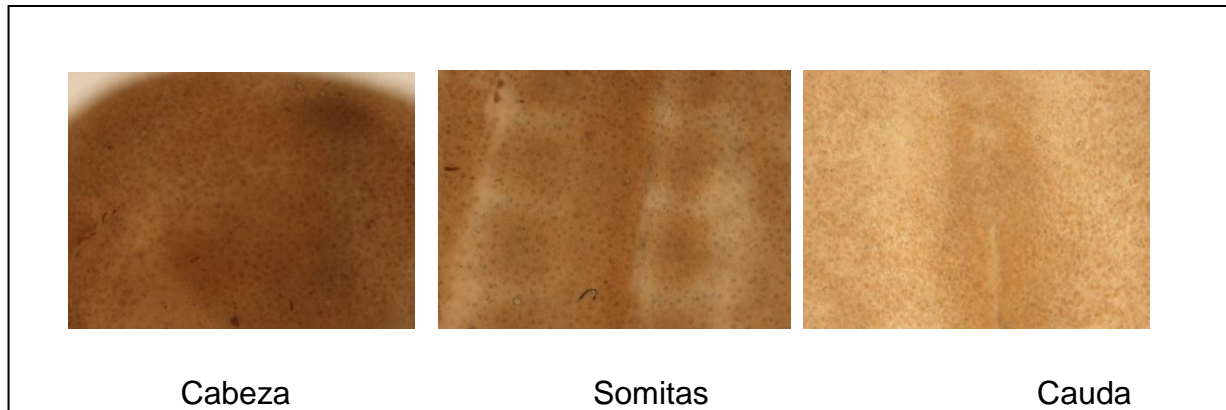


Figura 31. Marca inmunorreactiva para el receptor a serotonina 5-HT_{2C} en embriones tratados con sucralosa.. La inmunorreacción para los receptores a serotonina 5-HT_{2C} en los embriones tratados con sucralosa indicó una expresión similar a los controles.

Los embriones normales tratados con acesulfame k presentaron una disminución en la densidad de receptores a serotonina 5-HT_{2C} comparada con la observada en los embriones control (Figura 32).

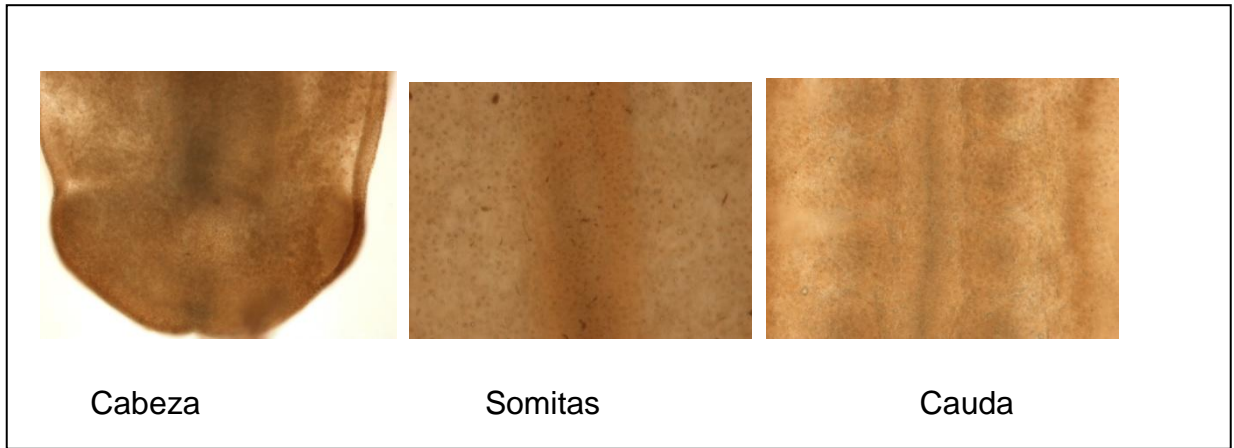


Figura 32. Distribución de los receptores a serotonina en embriones normales tratados con acesulfame k. Los resultados indicaron una disminución en la distribución que en el grupo control.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

En el grupo control y en el blanco se encontraron anomalías y resorciones, estos cambios pudieron deberse a modificaciones pequeñas en la temperatura y humedad de la incubadora o bien a mutaciones espontáneas, entre las que podemos encontrar errores en la replicación del DNA. Entre las causas que originan las mutaciones espontáneas, podemos encontrar las modificaciones denominadas tautómeros, que son isómeros que difieren en las posiciones de sus átomos y en los enlaces que se forman entre ellos, un ejemplo de esto es cuando la forma ceto que es la normal en el DNA, pasa a forma imino o enol que son raras. Otra posibilidad de emparejamiento erróneo es cuando las bases se ionizan.

Los emparejamientos erróneos originan mutaciones por transición que consisten en la sustitución de una base púrica por otra púrica o una pirimídica por otra pirimídica. Otra posibilidad aunque energéticamente poco posible es los emparejamientos de una púrica con una pirimidina o una pirimidina con otra purina, esto se conoce como mutaciones por transversión. Otra posibilidad son las lesiones en las bases nitrogenadas, una de ellas es la despurinización, la cual es común y consiste en la pérdida de un residuo de adenina o guanina, lo que origina sitios apurínicos. También es posible que las bases sufran daño por desaminación de la citosina que produce uracilo y origina un cambio puntual.

Las mutaciones espontáneas pueden ser reparadas y los cambios fenotípicos debidos a ellas, pueden asociarse a fallas en los sistemas de reparación o bien a la acumulación de dichas mutaciones (Griffits y col., 2002).

Con los resultados obtenidos relacionados con los cambios fenotípicos en los embriones de pollo bajo tratamiento se propone que el neotame es un edulcorante embriotoxico y además provoca la disminución de la expresión de receptores a serotonina, los cuales fueron reconocidos por Lauder y col., 2000, como morfógenos para el desarrollo del sistema nervioso. Es posible que la FDA aprobara el uso de neotame, en virtud que su poder edulcorante es de 7000 a 13000 veces mayor que el azúcar, por lo que la cantidad adicionada en los alimentos es muy baja. Sin embargo, se debe tomar en cuenta, que en las mujeres

embarazadas su toxicidad puede sumarse a la de otros compuestos y ser parte de la causa de aborto, el cual fue definido por la OMS, como la expulsión de un embrión o feto, cuyo peso es menor a 500 g. Entre las gestaciones, más o menos el 20% puede presentar amenaza de aborto y alrededor de la mitad de éstos, terminará como un aborto espontáneo (Hatasaka, 2001).

Los resultados de los embriones tratados con sucralosa a la dosis diaria aceptada, son consistentes con los reportados por Brusick y col., 2010, quien a pesar de haber declarado en 2009 la necesidad de realizar mejores estudios, en 2010 propone la inocuidad de la sucralosa.

Las anomalías y resorciones observadas en los embriones tratados con sucralosa, pueden deberse al ion cloro que es parte de la molécula, el cual se pensaba que era inocuo y se usa para el tratamiento de agua de acuerdo a lo reportado con Kroger y col., 2006. Sin embargo, en el mismo año, los resultados de los estudios de Doglotti (2006), indicaron que el cloro induce mutaciones y aberraciones cromosómicas.

Los resultados del incremento en los embriones anormales y resorciones al incrementar la dosis de sucralosa, son consistentes con los estudios realizados por Sasaki y col. (2002) en órganos de ratón con el ensayo cometa proponen que la sucralosa induce daño en el DNA. También son consistentes con los reportados por Kille en el 2000, quienes trabajaron con ratas y conejos hasta el fin de la gestación. Los resultados de este trabajo, tienen el potencial de localizar los cambios fenotípicos, antes que los embriones sean resorbidos en su totalidad, por lo que la metodología usada en este estudio es más precisa para conocer la toxicidad durante el desarrollo temprano del sistema nervioso.

Una posibilidad para explicar que la distribución de los receptores a serotonina 5-HT_{2C} en los embriones tratados con sucralosa son similares a los observados en el grupo control, puede asociarse a lo propuesto por Kidd y col. 2008, quienes estudiaron en células normales y neoplásicas la liberación de serotonina por la adición de diferentes compuestos. Esta amina autorregula la formación de sus

receptores y en etapas tempranas del desarrollo actúa como modulador, por lo que aún en presencia del edulcorante artificial se observa una densidad de receptores equivalente al grupo control.

Los resultados de este trabajo con la primera dosis aplicada de acesulfame k son consistentes con los reportados por Kroger y col., 2006, quienes proponen que el acesulfame k no induce tumores en pulmón. Sin embargo, al incrementar la dosis se aumentaron tanto las anormalidades como las resorciones, esto es consistente con los estudios realizados por Brandyopadhyay y col. 2008 con ensayo cometa en donde encontraron que el acesulfame k induce daño en el DNA. Como los resultados toxicológicos con acesulfame k son controvertidos, Karstadt en el 2010 propuso realizar nuevos estudios en los que se incluye el presente trabajo. Es interesante que el edulcorante modifique la expresión del receptor a serotonina 5-HT_{2C}, el cual se mencionó antes con los estudios de Lauder y col., 2000, se ha propuesto su como morfógeno en el desarrollo temprano del sistema nervioso, por lo que es muy importante limitar el uso del edulcorantes artificiales durante el embarazo temprano.

IX. CONCLUSIONES:

- 1) Las anomalías y resorciones del grupo control y blanco fueron menores al 3%.
- 2) El neotame es embriotóxico, no embrioletal.
- 3) La sucralosa a la dosis diaria recomendada es inocua durante la neurulación de embriones de pollo.
- 4) A dosis 10 y 100 veces mayor a la dosis diaria recomendada, la sucralosa es menos embriotóxica que el neotame.
- 5) El acesulfame k no es embriotóxico ni embrioletal a la dosis diaria recomendada.
- 6) En los embriones de pollo del grupo control se encontró la expresión de receptores a serotonina 5-HT_{2C} con una distribución decreciente desde la región craneal a la caudal.
- 7) Los embriones tratados con neotame, presentaron una disminución en la marca inmunorreactiva al compararlos con el control.
- 8) Los embriones tratados con sucralosa tienen una distribución de receptores a serotonina en las regiones craneal, somitas y caudal equivalente a la del grupo control.
- 9) La inmunotinción de los embriones tratados con acesulfame k, es menor que la encontrada en los controles.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar JA. “¿Dulce Alternativa? Edulcorantes artificiales.” Revista del consumidor, Procuraduría Federal del Consumidor, Abril 2004. 58-61

Allain A E., Meyrand P., Branchereau P. “Onthogenic changes of spinal GABAergic cell population are controlled by serotonin (5-HT) system: Implication of 5-HT₁ receptor family”, The Journal of Neuroscience, 25(38) 2005. 8714 – 8724

Bandyopadhyay A., Ghoshai S., Mukheriee A. “Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin”. Durg Chem Toxicology, 31(4) 2008; 447-57.

Bravo H, “Embriología del Sistema Nervioso”, Curso en línea de neuroanatomía, Departamento de Anatomía, Escuela de Medicina Pontificia Universidad Católica de Chile. 2007.

Brusick D, Borzelleca JF., Gallo M., Williams G., Kille J., WallaceHayes A., Xavier Pi-Sunver F., Wiliams C., Burks W. “Expert panel report on a study of Splenda in male rats”, Regul Toxicol Pharmacol, 55(1), 2009. **Brusick D., Grotz VL., Slesinski R., Kruger C.L., Hayes A.W.** “The absence of genotoxicity of sucralose”, Food Chem Toxicol.,40 (11) 2010, 3067-3072.

Colas J. F., Schoenwolf G. C., “Towards a cellular and molecular understanding of neurulation”, Developmental Dynamics, 221, 2001. 117-145

Côté F., Fligny C., Bayard E., Launay J M., Gershon M D., Mallet J., Vodjani G. “Maternal serothonin is crucial for murine embryonic development”. Proceedings of de National Academy of Science of the USA, 104(1), 2007. 329-334

Dogliotti E., “Molecular mechanisms of carcinogenesis by vinyl chloride”. Ann ist Super Sanita 42(2) 2006 163-9.

Durnev AD, Oreshchenko AV, Kulakova AV, Beresten NF, Seredenin SB., “Clastogenic activity of dietary sugar substitutes” *Vopr Med Khim* 41(4), 1995. 31-33.

Evers CA, Starr L, “Biology concepts and Applications” Ed. Thomson, 2006, ISBN 0-534-46224-3.

Featherstone John JB, “Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol”, *BioMedCentral Oral Health*, 6(Suppl1), 2006. S8

Finn JP, Lord GH., “Neurotoxicity studies on sucralose and its hydrolysis products with special reference to histopathologic and ultrastructural changes”, *Food Chem Toxicol*, 38 (Suppl2) 2000, S7-17.

Food and Drug Administration U.S. “Artificial Sweeteners: No Calories ... Sweet!” *FDA Consumer magazine*, July – August 2006. 406.

García G.D., “Implementación del modelo de embriones de pollo para el estudio del efecto de sustancias químicas durante la neurulación (el caso de progesterona). Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. 22- 24.

García A.G. Ontogenetic distribution of 5-HT_{2C}, 5-HT_{5A} and 5-HT₇ receptors in rat hippocampus, *Gene Expression* 13, 1-5

Gennady A., Buznikov H., Lambert H. W., Lauder J. M., “Serotonin and Serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis”, *Cell and Tissue Research*, 305, 2001, 177-186

Glennon R.A, Dukat M, Westkaemper R.B, “Serotonin receptor subtypes and ligands”, *American College of Neurophysopharmacology*, 2008.

Griffits A.J.F., Miller ., Suzuki DT. Lewontin RC., Gelbart W.M. *Genética*, 7a. Ed. Interamericana, México, 2002.

Hamburger, V., Hamilton, H. L., “A Series of Normal Stages in de Development of the Chick Embryo. J. Morphol, 88, 1951, 49 – 92

Hansson S. R., Mezey É, Hoffman B. J., “Serotonin transporter messenger RNA expression in neural crest-derived structures and sensory pathways of the developing rat embryo”. Neuroscience, 89(1), 1999, 243-265.

Hatasaka H.. “Pérdida gestacional recurrente: factores epidemiológicos, definiciones e incidencias”. The lancet. 336, 2001, 573-675.

Hranilovic D, Cicin-Sain L, Bordukalo-Niksic T, Jernej B, “Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior”, Behavioural Brain Research, 165, 2005. 271-277

International Sweeteners Association, “Ciclamato (E952)”, www.isabru.or/pdf/fs-Cyclamate_Spanish.pdf 2008

Institute of Food Tecnologists, “Sweet regulation”, The Society for Food Science and Tecnology Publications, mayo 16, 2007

Karstadt M. “Inadequate toxicity test of food additive acesulfame” Int J occup Environ Health, 16(1) 2010. 89-96.

Kidd M, Modlin IM, Gustafson BI, Drozov I, Hauso O, Pfragner R, “Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediate by bile salts, amines, tastants and olfactants” American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver physiology, 295(2), 2008. G260 – G272.

Kille JW, Tesh JM, McAnulty PA, Ross FW, Wiloughby CR, Bailey GP, Wilby OK, TEsh SA. “Sucralose: assessment of teratogenic potential in the rat and the rabbit” Food Chem Toxicol, 38 2000 S43-52.

Kroger M., Meister K. Y Kava R. “Low-Calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes : A Review of the Safety Issues”, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Institute of Food Technologists, 5, 2006. 35-47

Lauder J. M., Wilkie M. B., Wu C., Singh S., “Expression of 5HT(2A), 5HT(2B) and 5HT(2C) receptors in the mouse embryo”, International Journal of Developmental Neuroscience, 18(7), 2000. 653-662

Mann S. W., Yuschak M. M., Aughton P., Finn J. P., “A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats”, Food and Chemical Toxicology, 38(Suppl 2), 2000. S71 – S89.

Mendenhall W., Wackerly D. y Scheaffer R., Estadística Matemática con aplicaciones. Grupo Editorial Libreoamericana, México, 2a. Ed.399-440.

Moiseiwitsch J R., Lauder J. M., “Serotonin regulates mouse cranial neural crest migration”. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 92, 1995. 7182-7186

Moiseiwitsch J R. “The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development”. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, 11(2), 2000. 230 – 239.

NOM-174-SSA1-1998, Secretaría de Salud, págs. 3-4, www.salud.gob.mx , 2008.

Procuraduría Federal del Consumidor, “Refrescos de cola y de sabor”, Laboratorio Profeco Reporta, Revista electrónica del consumidor, 2003, www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_03/refresco.pdf, 2008.

Proyecto NOM-086-SSA1-1994, “Bienes y Servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales” Secretaría de Salud, www.salud.gob.mx , 2008.

Roman H. , Robillard PY, Husley TC., Laffitte A., Koutech K., Marpeau L., Barau G., “Obsetricial and neonatal outcomes in obese women”, PUB MED, West Indian Medical Journal, 56(5), 2007. 421.

Sasaki Y. F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Taniguchi K., Tsuda S., “The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives”, Mutation Research, 519, 2002. 103-119.

Sharma R P., Columbe R A Jr., “Effects of repeated doses of aspartame on serotonin and its metabolite in various regions of the mouse brain. Food Chemistry Toxicology, 25(8), 1987. 568 – 568

Thomas Pat, “Sucralose, Life after Aspartame”, The Ecologist, Sept. 2005.