

**Proyecto CF 2019/316514 “Cambios en la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo esquelético, microbiota intestinal y concentraciones postprandiales de GLP-1 provocados por el consumo de la sucralosa”**

**Introducción**

La sucralosa es un edulcorante no nutritivo (ENN) que en estudios previos ha demostrado disminuir la sensibilidad a la insulina a través de mecanismos diversos como: 1) cambios en la composición de la microbiota intestinal, 2) interacción con receptores intestinales del sabor dulce, 3) liberación de incretinas, entre otros.

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de la ingesta de sucralosa en individuos sanos en: 1) sensibilidad a la insulina, 2) microbiota intestinal, 3) respuesta postprandial de glucosa, insulina, péptido C, péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), ghrelina y péptido tirosina tirosina (PYY), 4) marcadores de inflamación: lipopolisacárido (LPS), interleucina-6 (IL-6), proteína C reactiva (PCR) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

**Métodos**

Ensayo clínico aleatorizado triple ciego (NCT04182464) en el cual se incluyeron individuos entre 20 y 45 años, aparentemente sanos, con índice de masa corporal (IMC) entre 18.5 y 24.9 kg/m<sup>2</sup>, no consumidores habituales de ENN, sin diabetes, prediabetes o resistencia a la insulina.

La intervención consistió en el consumo de 3 cápsulas por día cada una con 90 mg de sucralosa pura (270 mg/d), equivalentes a 30% de la ingesta diaria admisible (IDA) de sucralosa o consumo de cápsulas con placebo (almidón de maíz) durante 30 días. Los hábitos dietéticos y de actividad física no fueron modificados. Se calculó un tamaño de muestra de 24 participantes que fueron aleatorizados a cada uno de los grupos.

El proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Investigación y Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (REF. 2635). Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes antes de la realización de cualquier procedimiento del estudio.

Se realizó una pinza (clamp) euglucémica hiperinsulinémica con dosis baja de (7 mU/m<sup>2</sup> de superficie corporal/min) y alta de insulina (50 mU/m<sup>2</sup> de superficie corporal/min) antes y después de la intervención para evaluar la sensibilidad a la insulina en hígado y músculo esquelético, respectivamente. Se calculó el valor M ajustado por la concentración promedio de insulina durante el estado estable del procedimiento, ajustándolo posteriormente por el peso corporal total (PCT) y por la masa libre de grasa (MLG) de cada individuo.

Se recolectaron muestras de heces al inicio y en la última visita y se realizó extracción de ADN y secuenciación del ARN ribosomal del gen 16S.

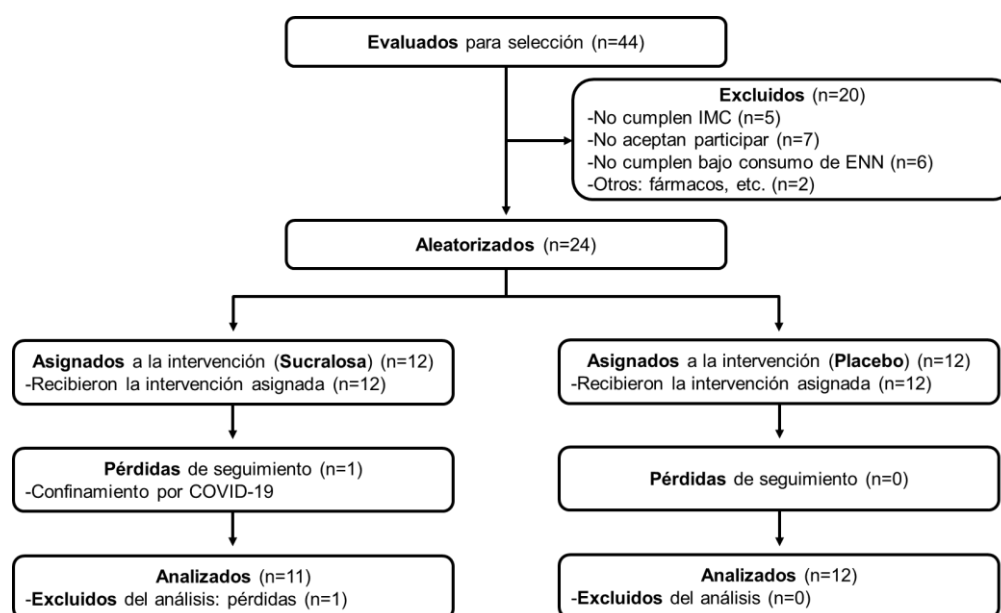
Se realizó una prueba con alimento mixto (MMTT) con 524 Kcal (49% carbohidratos, 17% proteína, 34% lípidos) y se cuantificaron basalmente marcadores de inflamación (LPS, IL-6,

TNF- $\alpha$ , PCR) y en los minutos 0, 30, 60, 90 y 120 glucosa, insulina, péptido C, GLP-1, ghrelina y PYY.

## Resultados

Se evaluaron a 44 sujetos de los cuales 20 se excluyeron por diversas causas. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo del proceso de selección de los participantes de acuerdo con las guías Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) para ensayos clínicos. Se incluyeron a 24 sujetos, de acuerdo con el tamaño de muestra calculado, que fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos del estudio: 12 en el grupo de intervención (sucralosa) y 12 en el grupo control (placebo). Se tuvo una pérdida de seguimiento en el grupo de intervención relacionada con el confinamiento por la pandemia del COVID-19.

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de selección de los participantes del estudio.



IMC: índice de masa corporal; ENN: edulcorantes no nutritivos; COVID-19: enfermedad por coronavirus 2019.

En la tabla I se muestran las características basales de los participantes. Se reclutaron a 6 mujeres y 6 hombres en cada uno de los grupos, con una mediana de edad de 24 años en ambos grupos y un IMC de  $22.5 \pm 1.7$  kg/m<sup>2</sup> en el grupo asignado a placebo y de  $21.4 \pm 1.8$  kg/m<sup>2</sup> en el grupo asignado a sucralosa. Las variables antropométricas, bioquímicas y clínicas de la población se encontraron en rangos normales, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables ( $p \geq 0.05$ ) entre ambos grupos.

Tabla I. Características basales de la población de estudio.

Variable	Grupo Placebo (n=20)	Grupo Sucralosa (n=20)	p*
----------	-------------------------	---------------------------	----

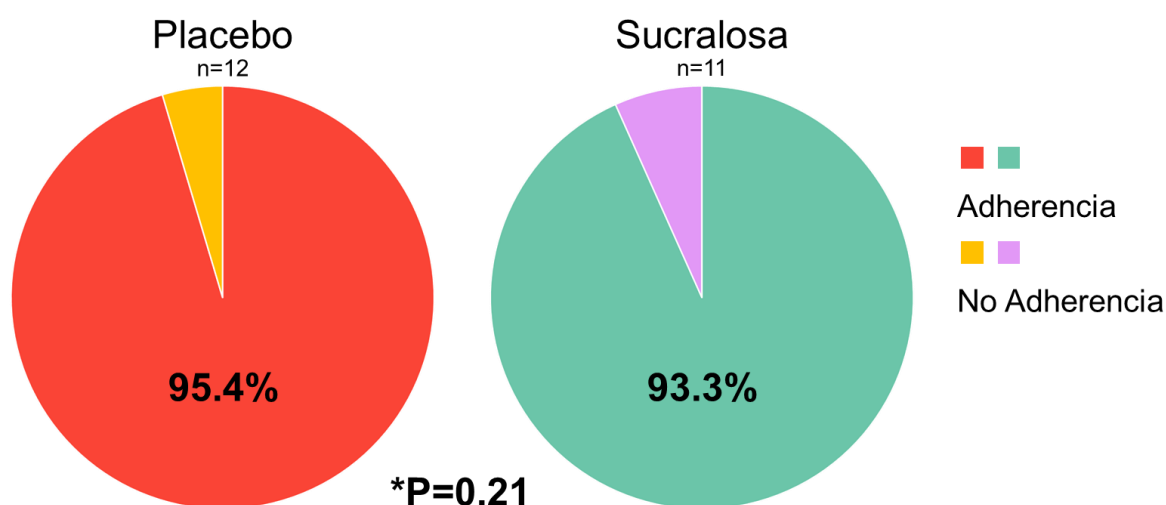
Sexo: mujer, n (%)	6 (50)	6 (50)	1.00
Edad, años	24.5 [23.0-25.7]	24.0 [22.2-25.0]	0.34
Peso, kg	64.4 ± 11.0	59.1 ± 8.2	0.20
Talla, m	1.68 ± 0.10	1.66 ± 0.10	0.55
IMC, kg/m <sup>2</sup>	22.5 ± 1.7	21.4 ± 1.8	0.15
Cintura, cm	75.7 ± 6.1	73.1 ± 7.4	0.36
Cadera, cm	95.3 ± 5.4	93.8 ± 4.3	0.49
ICC	0.79 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.49
Grasa corporal, %	27.5 ± 7.6	31.1 ± 4.8	0.18
MLG, kg	47.5 ± 11.7	41.6 ± 7.6	0.14
Grasa visceral, g	240 [139-311]	219 [126-342]	0.67
TAS, mmHg	109.2 ± 10.0	109.4 ± 9.7	0.96
TAD, mmHg	69.7 ± 6.3	70.4 ± 7.3	0.81
FC, lpm	71.7 ± 8.3	75.2 ± 13.8	0.46
Actividad física, Kcal/día	2,678 ± 604	2,453 ± 436	0.30
Energía consumida, Kcal/día	1,669 ± 280	1,538 ± 324	0.31
Ingestión de HC, % Kcal	42.2 ± 10.8	43.8 ± 6.6	0.68
Ingestión de proteína, % Kcal	21.7 ± 6.1	21.3 ± 4.4	0.86
Ingestión de lípidos, % Kcal	35.6 ± 7.7	34.9 ± 6.6	0.82
Ingestión de azúcares, % Kcal	10.0 ± 5.0	8.6 ± 3.8	0.47
Glucosa en ayuno, mg/dl	87.8 ± 4.8	87.3 ± 6.3	0.83
Glucosa 2 h CTOG, mg/dl	89.0 ± 18.0	86.9 ± 17.2	0.77
Insulina en ayuno, mU/l	5.8 ± 1.8	6.8 ± 2.2	0.25
HOMA-IR	1.26 ± 0.41	1.47 ± 0.57	0.26
Colesterol total, mg/dl	170.0 ± 32.1	171.6 ± 22.0	0.88
Colesterol LDL, mg/dl	99.2 ± 19.6	101.2 ± 18.0	0.79
Colesterol HDL, mg/dl	53.5 ± 15.9	52.9 ± 12.6	0.92
Triglicéridos, mg/dl	86.4 ± 35.2	87.4 ± 31.3	0.94
Ácido úrico, mg/dl	4.8 ± 0.9	5.0 ± 1.3	0.55
Creatinina, mg/dl	0.89 ± 0.20	0.78 ± 0.13	0.15

Datos expresados como medias ± desviación estándar o medianas [rangos intercuartiles] de acuerdo con la distribución de las variables cuantitativas. Las variables cualitativas se describen en frecuencias y (porcentajes). IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; MLG: masa libre de grasa; TAS: tensión arterial sistólica; TAD: tensión arterial diastólica; FC: frecuencia cardíaca; HC: hidratos de carbono; CTOG: curva de tolerancia oral a la glucosa, HOMA-IR: homeostasis model

assessment insulin resistance; LDL: lipoproteínas de baja densidad; HDL: lipoproteínas de alta densidad. \*Pruebas estadísticas para las diferencias: t-student para variables paramétricas, U de Mann-Whitney para no paramétricas y chi cuadrada para cualitativas.

El apego al consumo de las cápsulas fue alto en ambos grupos, con un promedio del 95.4% en el grupo placebo y del 93.3% en el grupo sucralosa, sin mostrar diferencia entre ambos grupos ( $p=0.21$ ). En la figura 2 se muestra la adherencia en ambos grupos. El consumo en promedio de sucralosa fue de  $245.7 \pm 16.0$  mg/día, lo que corresponde al  $27.9 \pm 3.2\%$  de la IDA de los participantes en este grupo acorde al Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). El periodo de intervención tuvo una duración en ambos grupos de 29.7 días en promedio.

Figura 2. Porcentaje de adherencia en el consumo de cápsulas en ambos grupos.



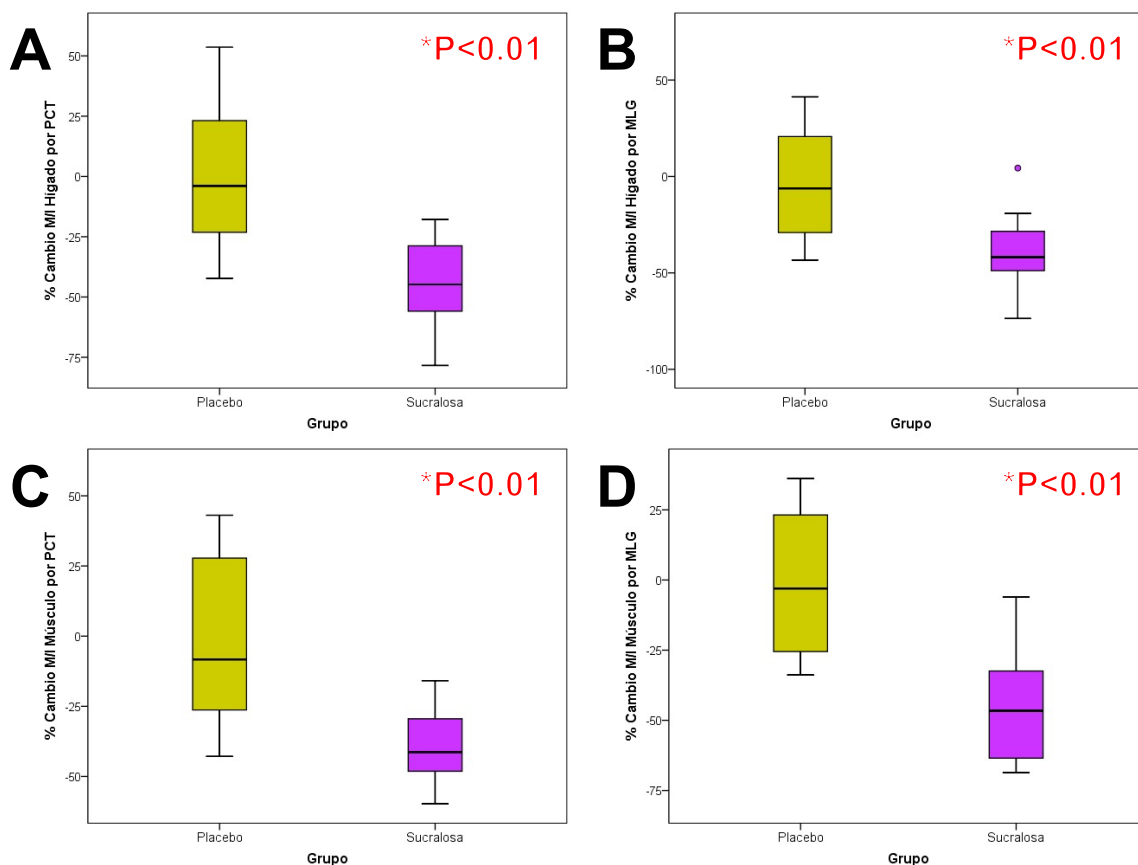
\*Prueba estadística para las diferencias: t-student.

No se detectaron diferencias entre los valores basales del índice M/I durante el clamp euglucémico hiperinsulinémico con dosis baja (sensibilidad a la insulina en hígado) o dosis alta (sensibilidad a la insulina en músculo esquelético) ajustado por PCT y ajustado por MLG entre los grupos. No hubo cambio significativo entre los valores basales y finales en el grupo placebo en este parámetro, sin embargo, en el grupo sucralosa se observó una reducción significativa ( $p<0.01$ ) en los índices M/I ajustado por PCT y por MLG para la evaluación de la sensibilidad a la insulina en hígado y en músculo esquelético.

Al calcular los porcentajes de cambio, la sensibilidad a la insulina en hígado (M/I ajustado por PCT) se redujo -3.9% [-25.4 a 24.5] en el grupo placebo y -44.7% [-61.6 a -26.8] en el grupo sucralosa ( $p<0.01$ ), observándose un efecto similar al ajustar el valor M/I ajustado por MLG (-6.2% [-32.3 a 28.5] en el grupo placebo y -41.8% [-50.0 a -26.2] en el grupo sucralosa;  $p<0.01$ ). La sensibilidad a la insulina en músculo esquelético ajustada por PCT se redujo -8.3% [-28.4 a 30.9] en el grupo placebo y -41.3% [-50.9 a -29.1] en el grupo sucralosa ( $p<0.01$ ), reportándose una diferencia mayor al ajustar el valor M/I por la MLG (-3.0% [-26.7 a 25.6] en el grupo placebo

y -46.5% [-67.4 a -31.4] en el grupo sucralosa;  $p < 0.01$ ). En la figura 3, se representan las diferencias entre grupos en los porcentajes de cambio para los valores M/I.

Figura 3. Diferencias en los porcentajes de cambio entre grupos para (A) Sensibilidad a la insulina en hígado por PCT, (B) por MLG, (C) Sensibilidad a la insulina en músculo esquelético por PCT y (D) por MLG.

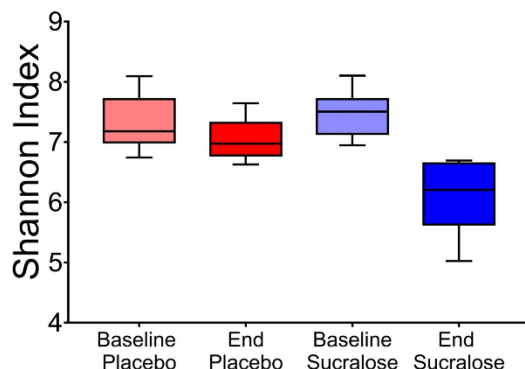


M/I: valor M ajustado por el promedio de la concentración de insulina en suero durante el periodo estable del clamp euglicémico hiperinsulinémico; PCT: peso corporal total; MLG: masa libre de grasa.

\*Prueba estadística para las diferencias: U de Mann-Whitney.

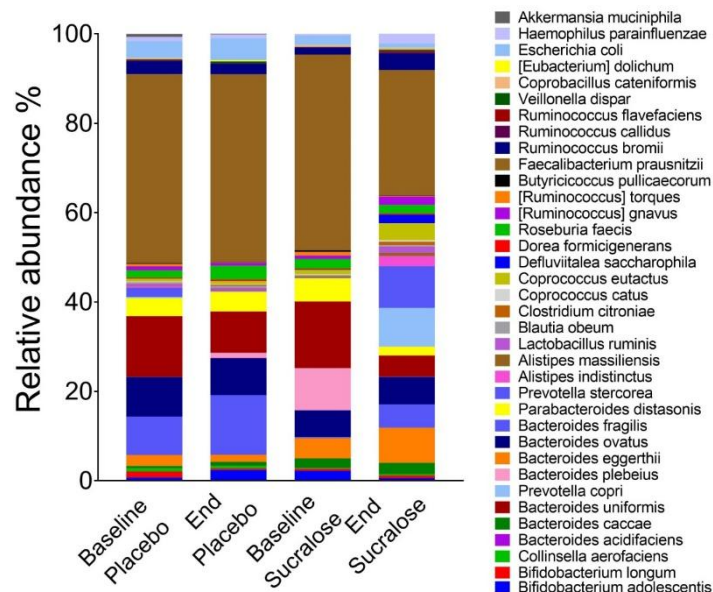
En relación con el objetivo del efecto de la sucralosa en la microbiota intestinal, se analizó la biodiversidad bacteriana (heterogeneidad de una comunidad en base al número de especies presentes y su abundancia relativa) con el índice de Shannon, observándose una reducción significativa después del consumo de la sucralosa ( $p < 0.0002$ ) sin detectarse cambios en el grupo placebo ( $p = 0.2369$ ). Esto se muestra en la figura 4.

Figura 4. Cambios en el índice de Shannon después del consumo de cápsulas con placebo o sucralosa durante 30 días.



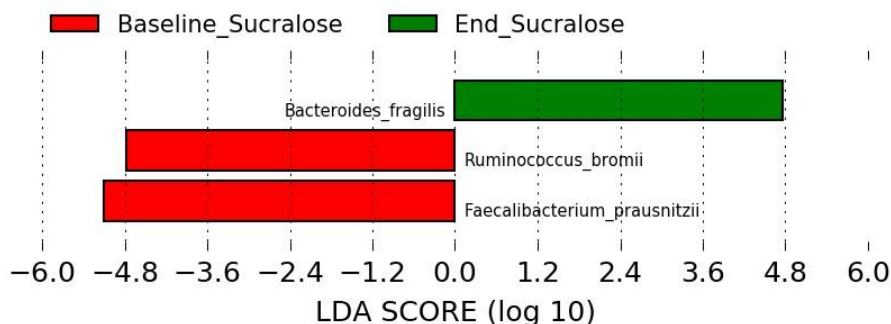
En la figura 5 se presenta la composición de la microbiota intestinal por phylums, géneros y especies de bacterias a través del porcentaje de abundancia relativa antes y después de la intervención en ambos grupos. Al comparar la composición de la microbiota intestinal en el estado basal entre los grupos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, posterior al periodo de intervención, en el grupo sucralosa se observó un aumento significativo en la abundancia relativa de los géneros *Anaerostipes* ( $p=0.03$ ), *Bacteroides* ( $p=0.03$ ) y *Odoribacter* ( $p=0.04$ ); al igual que una reducción significativa de los géneros *Prevotella* ( $p<0.01$ ), *Desulfovibrio* ( $p<0.01$ ) y *Lachnospira* ( $p=0.01$ ). Respecto a la abundancia relativa por especies de bacterias, en el grupo sucralosa se detectó un aumento estadísticamente significativo de *Bacteroides fragilis* ( $p<0.01$ ), *Bacteroides plebeius* ( $p=0.02$ ), *Bacteroides uniformis* ( $p=0.02$ ), *Prevotella stercorea* ( $p=0.01$ ); así como una disminución significativa de *Ruminococcus bromii* ( $p<0.01$ ), *Ruminococcus gnavus* ( $p<0.01$ ), *Ruminococcus flavefaciens* ( $p=0.02$ ), *Coprococcus eutactus* ( $p=0.01$ ), *Butyricoccus pullicaecorum* ( $p=0.02$ ), *Faecalibacterium prausnitzii* ( $p=0.02$ ) y *Defluviitalea saccharophila* ( $p=0.04$ ). En el grupo placebo no se detectaron cambios estadísticamente significativos al finalizar la intervención en la abundancia relativa de ningún género o especie de bacterias en comparación con el estado basal ( $p \geq 0.05$ ).

Figura 5. Cambios en la composición de la microbiota intestinal por (A) Phylums, (B) Géneros y (C) Especies de bacterias después del consumo de cápsulas con placebo o sucralosa durante 30 días.



Aunado a esto, al realizar el análisis discriminante lineal para hacer una predicción de la probabilidad de ver este efecto de acuerdo con la asignación de ambas intervenciones, no se encontraron efectos significativos asociados al grupo placebo y, en el grupo de sucralosa, se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de *Bacteroides fragilis*, al igual que una disminución ( $p < 0.05$ ) de *Ruminococcus bromii* y *Faecalibacterium prausnitzii* como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Cambios significativos identificados en la microbiota intestinal después del consumo de cápsulas de sucralosa durante 30 días, evaluados a través de la puntuación por análisis discriminante lineal (ADL).



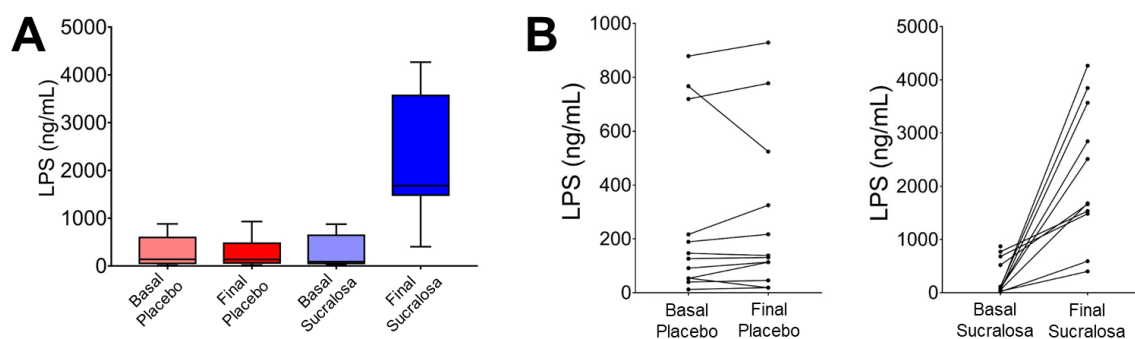
Se analizaron los cambios en las concentraciones postprandiales de glucosa, insulina, GLP-1, péptido C, ghrelina y PYY después de la MMTT. No se detectaron diferencias significativas entre las curvas basal y final en estos parámetros. En el grupo que recibió sucralosa se encontró una tendencia ( $p \leq 0.20$ ) a observar mayores concentraciones durante la curva al concluir la

intervención en los minutos 30 y 60 para insulina y en el minuto 30 para GLP-1 en comparación con la curva inicial.

Adicionalmente, se identificó una tendencia hacia el incremento en el área total bajo la curva (tAUC) de GLP-1 al finalizar la intervención en el grupo de sucralosa ( $p=0.09$ ) así como en el porcentaje de cambio entre grupos para este mismo desenlace, aumentando 31.3% [-2.9 a 49.0] en el grupo de sucralosa, mientras que en el grupo placebo se redujo -5.6% [-27.3 a 26.4] ( $p=0.05$ ). El área bajo la curva incremental (iAUC) de GLP-1 aumentó significativamente en el grupo asignado a sucralosa ( $p=0.04$ ), aunque el porcentaje de cambio entre grupos no alcanzó una diferencia significativa, a pesar de que en el grupo sucralosa se incrementó 45.5% [-95.7 a 143.6] mientras que en el grupo placebo disminuyó -13.3% [-68.0 a 43.5] ( $p=0.21$ ). Los cambios observados en las áreas bajo la curva de ghrelina y PYY total no fueron significativos en ninguno de los grupos.

No se detectaron cambios significativos para IL-6 y TNF- $\alpha$  en los valores antes de la intervención, al final de la intervención o en los porcentajes de cambio entre los grupos. La PCR mostró un aumento significativo ( $p=0.03$ ) en el grupo de sucralosa, incrementándose de 0.066 mg/dL [0.029-0.077] a 0.075 mg/dL [0.037-0.101], sin embargo, el porcentaje de cambio entre grupos para esta variable no fue estadísticamente significativo ( $p=0.11$ ), a pesar de que en el grupo sucralosa se incrementó 23.3% [9.9 a 68.1]. Se observó un incremento estadísticamente significativo en las concentraciones de LPS en el grupo asignado a sucralosa al finalizar la intervención. Los cambios en las concentraciones de LPS se muestran gráficamente en la figura 5.

Figura 5. Cambios en las concentraciones de lipopolisacárido (LPS) representados de forma (A) Grupal y (B) Individual después del consumo de cápsulas con placebo o sucralosa durante 30 días.



En la tabla II se muestran los cambios en el peso corporal, hábitos dietéticos (consumo energético y de hidratos de carbono, proteína, lípidos y azúcares) y en la actividad física realizada durante el periodo de intervención. No se encontraron diferencias significativas comparando los valores basales con los valores finales en cada grupo y comparando los porcentajes de cambio entre los grupos.



Tabla II. Cambios en peso corporal, hábitos dietéticos y actividad física durante el período de intervención en ambos grupos.

	Grupo Placebo (n=12)			Grupo Sucralosa (n=11)			p*	p°	p#
	Basal	Final	% Cambio	Basal	Final	% Cambio			
Peso, kg	64.9 ± 11.2	64.7 ± 11.2	-0.3 [-1.7 a 1.1]	59.3 ± 8.6	59.4 ± 8.2	0.3 [-1.2 a 0.9]	0.65	0.74	0.56
Energía, Kcal/día	1,669 ± 280	1,643 ± 357	-4.8 [-15.8 a 10.6]	1,538 ± 324	1,610 ± 485	1.8 [-19.8 a 23.7]	0.77	0.58	0.69
HC, % Kcal	42.2 ± 10.8	45.7 ± 12.0	7.0 [-16.5 a 22.5]	43.8 ± 6.6	44.0 ± 9.2	1.6 [-9.7 a 13.8]	0.22	0.91	0.56
Azúcares, % Kcal	10.0 ± 5.0	10.3 ± 6.8	-4.6 [-54.2 a 32.5]	8.6 ± 3.8	8.8 ± 3.7	-7.5 [-24.8 a 33.1]	0.84	0.91	0.65
Fibra, g/día	18.4 ± 10.3	18.3 ± 9.9	-6.2 [-28.0 a 41.4]	21.0 ± 8.4	22.7 ± 9.4	7.6 [-1.9 a 28.0]	0.95	0.24	0.34
Proteína, % Kcal	21.7 ± 6.1	21.5 ± 6.3	-4.2 [-8.3 a 16.4]	21.3 ± 4.4	20.3 ± 3.7	-5.1 [-21.4 a 6.7]	0.89	0.51	0.78
Lípidos, % Kcal	35.6 ± 7.7	32.7 ± 7.7	-2.1 [-25.5 a 10.6]	34.9 ± 6.6	35.5 ± 8.5	4.2 [-8.9 a 18.9]	0.21	0.80	0.34
AGS, % Kcal	6.4 ± 1.8	5.8 ± 1.9	-1.2 [-16.3 a 17.4]	6.2 ± 2.2	7.0 ± 2.0	12.5 [-8.2 a 36.4]	0.40	0.26	0.26
AGPI, % Kcal	4.1 ± 2.0	4.1 ± 2.0	-11.8 [-40.0 a 70.5]	3.2 ± 1.5	3.2 ± 2.4	7.5 [-30.6 a 30.1]	0.94	0.98	0.97
AF, Kcal/día	2,678 ± 604	2,587 ± 465	-2.3 [-8.2 a 4.3]	2,431 ± 451	2,340 ± 390	-3.3 [-7.9 a 4.9]	0.29	0.23	0.83

Datos expresados como medias ± desviación estándar o medianas [rangos intercuartiles] de acuerdo con la distribución de las variables. HC: hidratos de carbono; AGS: ácidos grasos saturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; AF: actividad física. \*Diferencia entre el valor basal y final del grupo placebo (prueba estadística: t-pareada); °Diferencia entre el valor basal y final del grupo sucralosa (prueba estadística: t-pareada); #Diferencia entre los porcentajes de cambio entre los grupos (prueba estadística: U de Mann-Whitney).

Se exploraron los efectos secundarios reportados por el consumo de las cápsulas en ambos grupos. Los efectos reportados fueron náuseas, cefalea, distensión abdominal, diarrea, sed y mareo. El número de participantes que experimentaron estos síntomas en cada uno de los grupos se muestra en la tabla III. Se observó mayor proporción (p=0.03) de participantes que experimentaron distensión abdominal (36.4%) y una tendencia a observar una mayor proporción (p=0.09) de participantes que experimentaron cefalea (27.3%) en el grupo asignado a consumir sucralosa en comparación con el grupo placebo (0%). La frecuencia de los demás síntomas fue baja (un participante en cada uno de los grupos), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Tabla III. Comparación de los efectos secundarios reportados por el consumo de las cápsulas de intervención en ambos grupos (sucralosa o placebo).

	Grupo Placebo (n=12)	Grupo Sucralosa (n=11)	p*
Náuseas	1 (8.3)	1 (9.1)	0.73

Cefalea	0 (0)	3 (27.3)	0.09
Distensión abdominal	0 (0)	4 (36.4)	<b>0.03</b>
Diarrea	0 (0)	1 (9.1)	0.47
Sed	1 (8.3)	0 (0)	0.52
Mareo	0 (0)	1 (9.1)	0.47

Datos expresados como frecuencias y porcentajes. \*Prueba estadística para las diferencias: prueba exacta de Fisher.