



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**LA PERMEABILIDAD INTESTINAL EN DIABETES TIPO
1 PODRÍA AFECTARSE POR LA INGESTIÓN DE
ADITIVOS ALIMENTARIOS, INDUCIENDO
ENFERMEDAD CELIACA**

Por:

Javier Enrique Peñuñuri Meza

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Cómo requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Javier Enrique Peñuñuri Meza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias



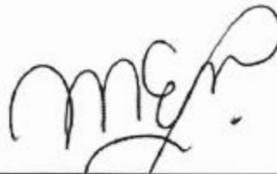
Dra. Ana María Calderón de la Barca
Directora de Tesis



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesora



Dra. Verónica Mata Haro
Asesora



Dra. María Esther Mejía León
Asesora



Dr. Juan Pedro Ortiz Sánchez
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “La Permeabilidad Intestinal en Diabetes Tipo 1 Podría Afectarse por la Ingestión de Aditivos Alimentarios, Induciendo Enfermedad Celiaca” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Javier Enrique Peñuñuri Meza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindada durante el tiempo de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., por aceptar y brindarme un espacio donde seguir preparándome.

A la Dra. Ana María Calderón, por haberme permitido seguir en su equipo de trabajo. Por todas y cada una de sus enseñanzas, gritos, regaños, risas y frases motivacionales. Por su gran y valiosa amistad, por todo eso y aún más, ¡gracias!

A los miembros de mi comité de tesis, las doctoras Gabriela Ramos, Verónica Mata y María Esther Mejía y al Dr. Juan Pedro Ortiz, por todo su apoyo y aportaciones a este trabajo.

A las Doctoras Gabriela García y Cynthia Bueno, por el apoyo en el reclutamiento de los participantes con diabetes tipo 1. También a los niños y padres de familia que accedieron a participar en este estudio.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de proteínas, a los que no y los que están, Reyna, Sandra, a la guayaba y la tostada (Valeria y Ana Cristina), Teté, Andrea, Rodrigo, Ericka, Angel, Verónica, Esmeralda, Diego, Cristhela, René, Adriana, Orlando.

Al laboratorio de microbiología e inmunología a cargo de la Dra. Verónica Mata, por el apoyo brindado en el desarrollo de este trabajo, en especial a la M.C. Leticia Felix, por aguantar a este “calilla”.

A todos y cada uno de los profesores que me ayudaron a seguir generando más conocimiento, en especial al Dr. Humberto González Ríos, a las Dras. Verónica Mata Haro y Gabriela Ramos Clamont Montfort, y a la M.C. Alma Delia Contreras Paniagua.

A René, porque se lo seguiré insistiendo, es uno de los mejores maestros que he podido tener. Gracias por las mañan, enseñanzas y muchos momentos de risas que se han tenido en todo este trayecto.

A Adriana, por cada plática y momentos divertidos que se tuvieron y las respuestas a varias dudas existenciales. ¡Muchas gracias!

Orlando, gracias por el apoyo brindado en el transcurso de este trayecto, por las pláticas matinales que terminaban en pura risa.

Al Sr. Dr. Individuo Sigala, por todo el apoyo brindado en este trayecto. Por esas pláticas astrales por las madrugadas en los ensayos; por las discusiones de temas asombrosos, como la regeneración de órganos y extremidades en anfibios. Por cada momento de risa y diversión, Gracias.

A Angel, por las pláticas, peleas, discusiones, risas y aprendizaje en el tiempo de conocernos. Por aquella reunión como “hombres casados” para poder discutir sobre nuestro papel en el rubro familiar, “estuvo genial”.

A Esmeralda y Diego, por el apoyo brindado en el cultivo celular y por todos los buenos momentos convividos, por hacer más ameno el tiempo de espera durante el trabajo con las células.

A mi familia, padres y hermanos por su apoyo incondicional en todo momento de este trabajo.

A la Familia Barragán Bórquez, por todo el apoyo proporcionado y por acogerme como un integrante más de ustedes, ¡Gracias!

A Noraly, que sin buscar nada en ella, lo encontré todo.

A mis amigos de siempre, Togawa, Adal, Evelyn, Daniel, Lupe, Claudia, Edna, Adriana, Julio, René, gracias por todo.

Descripción de un gran amigo, aquel que cuando más necesitas de alguien, no ocupas decirle nada y está allí para ti. Gracias Daniel por mostrarme que cuando algo no vale la pena, no es necesario dar ni un solo paso.

Gracias Togawa y Adal, porque su carrilla y las risas nunca faltan y siempre conmigo.

Gracias Claudia, por siempre escuchar.

A mis amigos de maestría en especial Kike, Christopher, David. Por esas noches de viernes, que siempre terminaban en algo temprano. ¡Gracias!

A Héctor Galindo Murrieta, por su apoyo técnico y valiosa ayuda en este último estirón, ¡muchas gracias!

DEDICATORIA

A Dios, por prestarme salud, años de vida y la capacidad de generar este conocimiento.

A mis padres, Francisco y Rossy, por todo su gran apoyo y amor en este largo trayecto. A mis hermanos, porque, aunque me hacían enojar, de una u otra forma siempre han estado a mi lado en todo momento.

A ti, que un día te conocí sin saber que te convertirías en una de las mujeres más importantes en mi vida. A ti que me has dado todo tu amor, cariño, paciencia y comprensión. A ti, con la que nunca me imaginé pasar el resto de mi vida a tu lado. A ti, mi compañera de locuras, risas, aventuras y demás. A ti Noraly, mi amada esposa.

A dos de mis grandes maestros de vida: Don Ernesto Meza Zuñiga y Jesús Alberto Peñuñuri Monge. Donde quiera que se encuentren, he aquí nuestro trabajo.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Factores de Riesgo para Diabetes Tipo 1 y Enfermedad Celiaca.....	14
2.1.1. Diabetes Tipo 1.....	15
2.1.2. Enfermedad Celiaca.....	16
2.1.3. Similitudes entre Diabetes Tipo 1 y Enfermedad Celiaca.....	17
2.2. Permeabilidad Intestinal.....	19
2.2.1. Señalización por Zonulina.....	20
2.2.2. Apertura de Uniones Estrechas y Autoinmunidad.....	21
2.3. Aditivos Alimentarios.....	22
2.3.1. Enzimas.....	23
2.3.2. Emulsionantes.....	24
2.3.3. Hidrocoloides.....	25
2.4. Modelos para Estudiar el Efecto de los Aditivos.....	26
2.5. Perspectivas.....	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo General.....	30
4.2. Objetivos Particulares.....	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1. Participantes.....	31
5.2. Genotipificación de Haplotipos HLA-DQ2 y DQ8.....	31
5.3. Cuantificación de Anticuerpos.....	32
5.4. Evaluación del Efecto de los Aditivos Alimentarios en Células IEC-18.....	33
5.5. Análisis Estadísticos.....	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35

CONTENIDO (Continuación)

6.1. Características de los Participantes y Análisis de Consumo de Aditivos.....	35
6.2. Genotipificación de Alelos HLA DQ2 y DQ8.....	41
6.3. Cuantificación de Anticuerpos Contra Proteínas e Hidrocoloides.....	44
6.4. Asociación de Permeabilidad Intestinal y Consumo de Aditivos.....	48
6.5. Evaluación de Perfil Proinflamatorio y Permeabilidad en Células IEC-18.....	49
7. CONCLUSIÓN.....	54
8. RECOMENDACIONES.....	55
9. REFERENCIAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Grupos de alimentos consumidos por los niños con DT1, con > 6 aditivos.....	37
2	Distribución de absorbancias promedio para anticuerpos IgG contra β -lactoglobulinas de los participantes con DT1..	44
3	Comparación de tratamientos para cada citocina.....	50
4	Análisis de permeabilidad en células IEC-18 entre tratamientos	51

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Aditivos alimentarios más frecuentes en alimentos ultra-procesados, consumidos por niños con DT1 de este estudio y sus efectos evaluados en diferentes modelos animales y celulares.....	39
2	Riesgo genético asociado al desarrollo de DT1 y EC y permeabilidad intestinal aumentada de los participantes con DT1.....	43
3	Inmunoreactividad de IgG contra proteínas dietéticas e hidrocoloides en participantes con DT1.....	45
4	Componentes del modelo estadístico de asociación de permeabilidad intestinal y presencia de anticuerpos IgG contra proteínas dietarias e hidrocoloides.....	49
5	Valores de resistencia transepitelial en células IEC-18.....	51

RESUMEN

La diabetes tipo 1 (DT1) y la enfermedad celiaca (EC), son autoinmunes; comparten factores ambientales y genética (HLA-DQ2 y DQ8) de riesgo. Así, hasta un 16% de quienes padecen DT1, desarrollan EC. La inflamación y daño del epitelio intestinal en la DT1, que preceden EC, podrían agravarse por consumo de aditivos en los alimentos ultra-procesados. El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de aditivos alimentarios de consumo frecuente sobre la permeabilidad intestinal y la respuesta inmune humoral, en niños con DT1, así como en la línea celular IEC-18. Se analizaron recordatorios de 24-h de pacientes con DT1 para evaluar consumo de alimentos ultra-procesados y sus aditivos. A niños con DT1, se les analizaron anticuerpos contra proteínas y aditivos alimentarios, así como para DT1 y EC. Se evaluó el efecto de los aditivos sobre expresión de citocinas y permeabilidad en cultivo y monocapa, de células IEC-18. Se analizaron 117 recordatorios de 24-h, con 110 alimentos ultra-procesados de consumo frecuente, con hasta 79 aditivos diferentes; con gomas arábica (GA), xantana (GX) y guar (GG), pectina (P) y carragenina (C), como las más comunes. Participaron 30 niños con DT1; 15 de ellos con alelos asociados a permeabilidad aumentada (DQB1*0201 + DQA1*0301); 10 de ellos, con riesgo 1:71 a EC. El resto, con combinaciones de riesgo bajo. Un solo participante presentó autoanticuerpos de EC, 10/30 tuvieron IgG contra GA y C; 11/30 contra GX, P y GG; 4/30, 16/30 y 10/30 contra caseínas, gliadinas y β -lactoglobulina. No hubo diferencias de estos anticuerpos entre los participantes con y sin genética de riesgo a permeabilidad aumentada ($p > 0.05$), pero sí correlación (86.1%) entre los valores de ambos parámetros ($p < 0.05$). Asimismo, GA, P, C y la mezcla de aditivos, indujeron la producción de IL-6 ($p < 0.05$) y para IFN- γ , solamente C ($p < 0.05$) en el cultivo de IEC-18. GA, GX, C y P, aumentaron la permeabilidad en la monocapa celular ($p < 0.05$), permitiendo el paso del marcador desde la zona apical, concomitante con disminución de la resistencia transepitelial ($p < 0.05$). En conclusión, la genética no influyó sobre la permeabilidad, pero el consumo de aditivos en los niños DT1, pudiera influir en el desarrollo de EC, al mediano o largo plazo.

Palabras clave: diabetes tipo 1, aditivos alimentarios, permeabilidad intestinal

ABSTRACT

Type 1 diabetes (T1D) and celiac disease (CD) are autoimmune disorders that share environmental and genetic (HLA-DQ2 y DQ8) risk factors. Therefore, up to 16% of the T1D patients develop CD. The inflammation and intestinal epithelial disturbance of T1D, preceding CD, could be triggered by food additives from ultra-processed foods. Our objective was to evaluate the effect of food additives of frequent intake on gut permeability and the humoral immune response in T1D patients, as well as on the monolayer of cellular line IEC-18. Data of ultra-processed foodstuffs and their additives were collected from 24-h recalls of T1D patients. Antibodies against dietary proteins and food additives as well as these related to T1D and EC were analyzed in sera from T1D children at diagnosis. The effect of food additives on the cytokines expression and monolayer permeability were measured in IEC-18 cells. There were 117 food records with 110 ultra-processed foodstuffs of frequent intake with up to 79 different additives; the most common were arabic (AG), xanthan (XG) and guar (GG) gums, pectin (P) and carrageenan (C). Thirty T1D children were included; 15 of them with DQB1*0201 + DQA1*0301 alleles associated to increased intestinal permeability; 10 of them with 1:71 risk of CD. Others, presented low risk alleles. Just one of them presented auto-antibodies associated to CD, 10/30 with antibodies against AG and C; 11/30 against GX, P and GG; 4/30, 16/30 and 10/30 against caseins, gliadins and β -lactoglobulin. There were no differences ($p>0.05$) between participants with or not genes associated to increased permeability, but 86.1% correlate among increased permeability and antibodies against proteins and food additives ($p<0.05$). Additionally, AG, P and C and the additives mix induced IL-6 and just C induced IFN- γ in the IEC-18 cells. AG, XG, C and P significantly ($p<0.05$) increased the cellular monolayer permeability. There was also a decreased trans-epithelial resistance ($p<0.05$) in IEC-18 cells monolayer. In conclusion, the analyzed genetics did not influence the permeability in T1D children, but the food additives intake could influence the CD development in the medium or long term.

Keywords: type 1 diabetes, food additives, intestinal permeability

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes tipo 1 (DT1) y la enfermedad celiaca (EC), son alteraciones autoinmunes que, comparten entre sí genética de riesgo, mediada por los haplotipos HLA-DQ2 y -DQ8, además de diversos factores como infecciones y el uso de antibióticos. La prevalencia de ambas enfermedades ha ido en aumento a nivel mundial, con 1:300 para DT1 y de 1:200 a 1:100 para EC. Además, la prevalencia de EC en personas con DT1 es hasta del 10-15%.

La EC se reconoce desde la antigüedad como una enteropatía con daño en la mucosa del intestino y, por tanto, con problemas de absorción de nutrientes. Es solo recientemente, que se considera la permeabilidad intestinal incrementada también en la DT1. En nuestra población, tal incremento se asocia con los alelos DQB1*0201 y A1*0301 en conjunto. Además de algunos metabolitos y estructuras microbianas, los dietarios como el gluten, pudieran afectar las uniones estrechas entre las células del epitelio intestinal.

Además del gluten, otros componentes de los alimentos pudieran influir en la ruptura de uniones estrechas y estimular una respuesta inmune, tales son los aditivos que se añaden a los alimentos procesados para mejorar sabor, apariencia y propiedades tecnológicas. Aunque algunos aditivos se han usado durante siglos, su consumo se ha magnificado con la producción masiva de alimentos ultra-procesados, hoy en día. La ingestión de aditivos enzimáticos, emulsionantes e hidrocoloides, puede modificar la composición de la microbiota intestinal, inducir citocinas pro-inflamatorias y aumento de la permeabilidad intestinal. En este contexto, se podría explicar el incremento en la prevalencia de enfermedades autoinmunes, así como otras enteropatías.

Así, es importante estudiar el efecto de los aditivos alimentarios sobre la permeabilidad intestinal de personas con DT1, con alelos B1*0201 y A1*0301, para contribuir a la búsqueda de factores que los llevan a desarrollar EC y en un futuro, manipularlos para retardar o impedir esa evolución.

2. ANTECEDENTES

2.1. Factores de Riesgo para Diabetes Tipo 1 y Enfermedad Celiaca

La autoinmunidad se debe a un fracaso de la tolerancia frente a moléculas propias. Esto puede ser por la exposición de linfocitos específicos a sus antígenos, por diversos mecanismos, como la apoptosis defectuosa sobre linfocitos T citotóxicos o fallas en la selección negativa de linfocitos. En la mayoría de las enfermedades autoinmunes, los afectados heredan segmentos génicos que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Abbas et al., 2012; Lo et al., 2011).

Los genes del antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés) de clase II, son los que confieren el mayor riesgo a enfermedades autoinmunes, principalmente los isotipos DR y DQ, como en diabetes tipo 1 (DT1) y enfermedad celiaca (EC). Dichas enfermedades comparten genética de riesgo, especialmente los haplotipos DR3-DQ2 y DR4-DQ8, conformados por los alelos DQA1*0501/DQB1*0201 y DQA*0301/DQB1*0302, respectivamente (Mejía-León et al., 2015). Aunque la genética es el principal factor de riesgo para estas enfermedades, solo explica entre el 35 y 50% de su desarrollo (Tollefsen et al., 2012).

Además de la genética, para el desarrollo de DT1 y EC, son necesarios otros factores relacionados con el ambiente, como el tipo de parto, ausencia de lactancia materna, introducción de alimentos sólidos a temprana edad, así como infecciones y tratamientos con antibióticos. Estos factores están involucrados en la composición de la microbiota intestinal, cuya disbiosis se asocia al incremento en la permeabilidad intestinal (Mejía-León et al., 2014) y con esto, el ingreso de antígenos que perturban la homeostasis del sistema inmune.

2.1.1. Diabetes Tipo 1

La DT1 es una enfermedad autoinmune, caracterizada por la destrucción de las células β productoras de insulina, provocando su total deficiencia. Esto induce niveles de glucosa elevada en ayunas (>126 mg/dL), al igual que en pruebas de tolerancia oral a la glucosa (>200 mg/dL), niveles de hemoglobina glicada por arriba de 7.5%, y en algunos casos cetoacidosis (ADA, 2017). La DT1 autoinmune se caracteriza, además de los síntomas clásicos de polifagia, poliuria y polidipsia, por al menos la presencia de uno de los autoanticuerpos: anti-insulina, anti-tirosina fosfatasa pancreática, anti-glutamato descarboxilasa o anti-transportador de zinc 8 (ADA, 2017). Esta enfermedad representa entre el 5-10% de los casos de diabetes a nivel mundial (Pettit et al., 2014).

La DT1 ha ido en aumento en las últimas décadas. Según Dabelea et al. (2014), en jóvenes estadounidenses incrementó la prevalencia un 30% entre los años 2000 y 2009, estimando que 1.93 por cada 1,000 jóvenes la padecen. En México, al igual que en el mundo, también se incrementó la incidencia de 3.4 a 6.2 casos por cada 100,000 jóvenes menores de 19 años, entre los años 2000 y 2010 (Gómez-Díaz et al., 2012).

Para el diagnóstico de la DT1 se realizan pruebas de glucosa en ayunas y postprandial, pruebas de tolerancia oral a la glucosa y de hemoglobina glicosilada (ADA, 2017). Debido a que estos indicadores son también para diabetes tipo 2, es necesario la cuantificación de péptido C y el análisis de autoanticuerpos, para diagnosticar DT1.

En la autoinmunidad, las moléculas HLA-DQ2 o DQ8, presentes en las células presentadoras de antígenos (CPA), reconocen epítopes de proteínas de células β pancreáticas, que no fueron fagocitadas por defectos en macrófagos. Las CPA, presentan los epítopes a los receptores de linfocitos T $CD4^+$, liberan citocinas proinflamatorias, como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral α (TNF α). Además, se libera interferón- γ (IFN- γ) promoviendo la activación de linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos directamente sobre las células β del páncreas (Jaberi-Douraki et al., 2014). Los linfocitos $CD4^+$ cooperadores, activan a linfocitos T efectores, que estimulan a linfocitos B para la secreción de anticuerpos; en la DT1, son autoanticuerpos, ya que son contra antígenos propios (Abbas et al., 2012).

2.1.2. Enfermedad Celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía autoinmune ocasionada por la intolerancia al gluten del trigo, en personas genéticamente susceptibles (Canova et al., 2016). Se caracteriza por la presencia de síntomas como diarrea, malnutrición y baja talla (Stamnaes y Sollid, 2015), aunque para confirmar el diagnóstico, es necesario una biopsia duodenal que muestre atrofia y aplanamiento de las vellosidades intestinales (Catassi y Fasano, 2010). Sin embargo, se puede ayudar al diagnóstico de la EC mediante la evaluación de la genética de riesgo (HLA-DQ2 y DQ8, principalmente), anticuerpos anti-gliadinas y autoanticuerpos anti-transglutaminasa tisular, además de la presencia de síntomas y su remisión en dieta sin gluten (Sevinç et al., 2016). Ya que la EC es causada por la ingestión del gluten, el único tratamiento es eliminarlo de la dieta (Løvik et al., 2017). Sin embargo, en algunos casos aun con el apego a la dieta sin gluten, continúan los síntomas de EC (Lanzini et al., 2009).

El desarrollo de la EC se da cuando las gliadinas, proteínas del gluten solubles en alcohol, llegan al intestino delgado en donde no son completamente hidrolizadas por las enzimas digestivas. Los péptidos resultantes, interaccionan con receptores en la mucosa intestinal, activando la inmunidad innata y produciendo citocinas proinflamatorias, como la IL-15 (Vincentini et al., 2015). Dichas citocinas inducen ruptura de uniones estrechas, permitiendo el paso de los péptidos de gliadinas, que una vez en la lámina propia, son deamidados por la transglutaminasa tisular 2. Así, los péptidos son reconocidos por las CPA en el contexto del HLA-DQ2 y DQ8, con mucha mayor afinidad, que los péptidos no deamidados (Vincentini et al., 2015; Heil et al., 2017; Schumann et al., 2017).

Al ser reconocidos por las CPA, tanto los péptidos de gliadinas, como los neo-epítopes generados por la transglutaminasa, son presentados a linfocitos CD4⁺ que liberaran citocinas proinflamatorias hacia respuestas Th1 (como el IFN γ). Por esta vía, se activan las células *natural killer* y los linfocitos intraepiteliales, ocasionando daño a los enterocitos. Así mismo, se liberan citocinas por la vía de respuesta Th2, promoviendo la producción de autoanticuerpos anti-transglutaminasa y anticuerpos anti-gliadinas (Di Sabatino y Corazza, 2009; Leffler et al., 2015).

2.1.3. Similitudes Entre Diabetes Tipo 1 y Enfermedad Celiaca

La DT1 y la EC, son dos enfermedades diferentes, con varias características en común. Como se mencionó antes, son desórdenes autoinmunes y mediadas por las moléculas del HLA-DQ2/DQ8, confiriendo mayor afinidad en las CPA hacia los autoantígenos, lo que propicia el desarrollo de la enfermedad. En sonorenses, las combinaciones que confieren un mayor riesgo genético para DT1, son DQ2 y DQ8 en combinación, mientras que para EC es el haplotipo DQ8 por si solo o combinado con el alelo DQB1*0201 (Mejía-León et al., 2015). Este último alelo, aumenta el riesgo a desarrollar EC en caucásicos con DT1 (Kuitunen et al., 2002). En sonorenses con DT1, la combinación B1*0201 con A1*0301, se ha asociado con aumento de la permeabilidad intestinal (Aguilar Salido, 2017).

Además de la genética, la DT1 y la EC comparten otros factores de riesgo, como el parto por cesárea, regímenes de alimentación inadecuados en el primer año de vida y el uso indiscriminado de antibióticos. Estos factores, coinciden en su influencia sobre la composición de la microbiota intestinal, pudiendo inducir disbiosis, como en los niños sonorenses con DT1 de Mejía-León et al. (2014) y aquellos niños con EC (Sigala-Robles, 2016). Lo mismo se ha descrito en otras poblaciones del mundo (Giongo et al., 2011; Murri et al., 2013; Alkanani et al., 2015; Dietert, 2014; Kostic et al., 2015).

La disbiosis intestinal puede inducir cambios en la capa de mucina que recubre el epitelio intestinal, como se explica en el modelo de Davis-Richardson y Triplett (2015). En un régimen de alimentación con alto consumo de fibra y bajo en grasa y gluten, se promoverá una microbiota más saludable, predominando géneros de bacterias productoras de mucina como *Prevotella*, que ayudan a mantener la integridad del epitelio y las uniones estrechas íntegras. En cambio, si se tiene una dieta alta en grasa y gluten y baja en fibra, se favorecerá el desarrollo de bacterias degradadoras de mucina. Tales son las del género *Bacteroides*, que ocasionan lesión en el epitelio intestinal y causan aumento en la permeabilidad. Así como la dieta ocasiona cambios en la composición de la microbiota, el uso de antibióticos reduce y altera la diversidad de la microbiota (Korpela et al., 2016). Debido a la disbiosis, diversas infecciones causadas ya sea por patógenos bacterianos o virales, pueden desencadenar respuesta inmune a partir de las CPA en los nódulos

linfáticos del páncreas, en el caso de DT1 (Varala et al., 2012). Así mismo, pueden dar paso al desarrollo de EC al afectarse el epitelio intestinal, dando entrada a los péptidos de gliadinas (Meresse et al., 2012).

La prevalencia de 5-10% de EC en personas con DT1, es más alta que la prevalencia de EC por si sola (1%) en población general. Por esta razón, los endocrinólogos promueven la revisión paulatina de biomarcadores para EC, en pacientes con DT1 (Tsouka et al., 2015; Laitinen et al., 2017). En un estudio de 44 niños y adolescentes con DT1 sonorenses, al analizar anticuerpos anti-transglutaminasa, 3 presentaron índices positivos elevados (Mejía-León et al., 2015). No se realizaron otras pruebas para confirmar el diagnóstico, pero cuando no se puede realizar la biopsia intestinal, con la detección de los haplotipos de riesgo y anticuerpos específicos elevados, se puede inferir la EC (Husby et al., 2012). El gluten además de ser el agente causal de la EC, también se ha asociado al desarrollo de la DT1 en niños con predisposición genética. En un estudio alemán de seguimiento (641 niños con antecedente familiar), la exposición a alimentos con gluten antes de los 3 meses de edad, aunque poco común (19 niños), aumentó el riesgo a desarrollar autoanticuerpos, en comparación a niños amamantados exclusivamente (Chmiel et al., 2015). También, en modelos animales genéticamente propensos a DT1, se ha podido prevenir o promover la enfermedad, mediante dietas sin o con gluten, por la modificación de la microbiota intestinal (Patrick et al., 2013; Marietta et al., 2013).

Una dieta libre de gluten pudiera servir como prevención al desarrollo de DT1. Larsen et al. (2015), utilizando ratones diabéticos no obesos y ratones propensos genéticamente, demostraron que, con una dieta libre de gluten, se dan cambios en la respuesta inmune innata, propiciada por células dendríticas. Los autores encontraron aumento en la expresión de marcadores de activación de células dendríticas MHC II, CD40 y CCR7. Además, aumentó la expresión de ARNm de marcadores de la inmunidad innata (CD11b, CD11c, CD103) en varios tejidos, incluyendo el páncreas.

Mariño et al. (2017), probaron dietas, en ratones diabéticos no obesos, adicionadas con acetato y butirato. Encontraron que la suplementación con estos ácidos grasos, protege contra el desarrollo de DT1, al inhibir la expansión clonal de células T autoinmunes por la proliferación de células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺. Así mismo, aumentaron los genes

de transcripción del receptor GRP43 (específico para butirato y acetato) en células mononucleares, disminuyendo los procesos inflamatorios.

Las células dendríticas CD103+, son responsables del desarrollo y expansión de las células T reguladoras FoxP3+, consideradas la clave en el desarrollo de la autoinmunidad, cuando tienen un defecto en su proliferación (Badami et al., 2011). Con lo encontrado por Larsen et al. (2015), se puede inferir que se crea un ambiente protector en dietas sin gluten, al estimular la expansión de células tolerogénicas.

2.2. Permeabilidad Intestinal

El epitelio intestinal es la principal barrera de defensa en el intestino. Impide el libre paso de antígenos dietarios y de microorganismos (Xu et al., 2016). Así mismo, juega un papel importante en la absorción de nutrientes y agua, también crea un ambiente simbiótico con la microbiota intestinal (Lechuga e Ivanov, 2017).

La mucosa intestinal es una barrera física, compuesta de endotelio vascular y una monocapa celular cubierta de mucina. Tiene también una barrera interna funcional, formada por secreciones digestivas, moléculas y células del sistema inmune y péptidos antimicrobianos producidos por las células de Paneth, en las criptas del intestino delgado. La interacción de ambas barreras mantiene la permeabilidad selectiva (Bischoff et al., 2014).

La estructura y la permeabilidad del intestino están moduladas por diversos factores fisiológicos y ambientales, como los metabolitos de la microbiota, así como también por los nutrientes de la dieta (Turner, 2009; Bischoff et al., 2014). De acuerdo a Bischoff et al. (2014), la permeabilidad intestinal es una característica funcional en sitios dados del intestino, que se puede medir analizando los flujos a través del epitelio. La permeabilidad se controla por complejos proteínicos localizados en la superficie lateral de la pared de las células epiteliales (Lechuga e Ivanov, 2017). Estos complejos proteínicos son las uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas.

Las uniones adherentes son necesarias para mantener cerrado el espacio paracelular, por medio de las uniones estrechas, compuestas principalmente por cadherinas. Estas últimas, son una familia de proteínas transmembranales, que forman interacciones fuertes y homotípicas, entre células adyacentes (Turner, 2009). Por su parte, las propiedades adhesivas de las uniones estrechas son atribuidas principalmente a tres familias de proteínas integrales. Estas proteínas son algunos miembros de las claudinas, proteínas MARVEL asociadas a uniones estrechas (TAMP, por sus siglas en inglés) y proteínas similares a inmunoglobulinas, como moléculas de uniones adherentes. Además, ciertas proteínas periféricas, como las proteínas *Zonula occludens* 1 y 2 (ZO1-2), intervienen en la regulación de la estabilidad y la remodelación de las uniones estrechas (Ivanov, 2012).

2.2.1. Señalización por Zonulina

En condiciones fisiológicas, un 90% de los antígenos que atraviesan la mucosa intestinal, lo hacen por la vía transcelular. El 10% restante, puede atravesar la mucosa intestinal a través de los espacios intersticiales entre un enterocito y otro, mediante la vía paracelular (Sturgeon y Fasano, 2016). Esta última vía es la mayor contribuyente al flujo pasivo de solutos a través del epitelio intestinal, depende de la regulación de las uniones estrechas y contribuye al balance entre la tolerancia y la respuesta inmune hacia antígenos no propios (Fasano, 2011; Fasano, 2012b).

La zonulina es una proteína análoga a la toxina *Zonula occludens* (Zot, enterotoxina secundaria de *Vibrio cholerae*), de 45 kDa; participa en la modulación de la permeabilidad intestinal, así como también en la inmunidad innata intestinal. La zonulina se sobreexpresa en enfermedades autoinmunes, tales como la DT1 y EC, en donde están afectadas las uniones estrechas (Tripathi et al., 2009).

La exposición al gluten dietario y a las bacterias de la microbiota intestinal, son los principales inductores de la zonulina por los enterocitos (Fasano, 2012a). Ésta, es reconocida por receptores específicos de membrana, el receptor de crecimiento epidérmico y el receptor activado por proteasas-2 (Fasano, 2011). Después, la zonulina

activa la fosfolipasa C, que hidroliza al fosfatidil-inositol para liberar tris-1,4,5 inositol-fosfato y diacilglicerol y activar a la proteína cinasa C. Su acción puede darse directamente por la vía del diacilglicerol o por la liberación de iones de calcio intracelular. La proteína cinasa C, cataliza la fosforilación de proteínas activadoras, con la subsecuente polimerización de G-actina soluble en F-actina. Esto, provoca reordenamiento de los filamentos de actina, así como el desacoplamiento de proteínas del complejo en las uniones estrechas, escindiéndolas (Fasano, 2012c).

2.2.2. Apertura de Uniones Estrechas y Autoinmunidad

El desarrollo de las enfermedades autoinmunes se asocia con el aumento de la permeabilidad intestinal. La inmunidad innata juega un papel importante en el reconocimiento de antígenos que atraviesan por los espacios intersticiales, así como también la inmunidad adaptativa en la tolerancia antigénica (Vanuytsel et al., 2013). Recientemente, Aguilar Salido (2017), evaluó la permeabilidad intestinal de 24 niños sonorenses con DT1 o sin manifestarla, pero con riesgo familiar. Encontró que, independientemente de la presencia de DT1, los niños con la combinación de alelos DQB1*0201 + DQA1*0301 de los genes del HLA, tenían alterada la permeabilidad intestinal. Tal resultado es análogo al de Kuitunen et al. (2002), donde el alelo DQB1*0201 se asoció con la presencia de intestino poroso, en una población caucásica con predominancia del HLA-DQ2; mientras, en nuestra población hay casi igual prevalencia de HLA-DQ2 y DQ8 (Mejía-León et al., 2015). Así, la genética pudiera predisponer a la alteración de la permeabilidad intestinal, permitiendo el ingreso de antígenos y/o aditivos alimentarios, que contribuyan al desarrollo de autoinmunidad.

Cada antígeno tiene su vía de reconocimiento, por la cual se puede liberar zonulina, causando aumento de la permeabilidad intestinal. Por ejemplo, el receptor CXCR3 en la zona apical de los enterocitos, reconoce los péptidos de gliadinas, provenientes del gluten dietario. Como el gluten se encuentra en muchos alimentos, su consumo crónico ocasiona

un estado de activación constante de las vías de zonulina, sin regresar al estado de relajación (Lammers et al., 2008; Di Sabatino et al., 2015; Fasano, 2012b).

El gluten, además de inducir la apertura de uniones estrechas, promueve también la secreción de interleucina 15 (IL-15). Esta citocina tiene la habilidad de bloquear el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β), promoviendo la proliferación de células T mucosales, además de afectar la proliferación de linfocitos T reguladores tolerogénicos (Hardy y Tye-Din, 2016). Las poblaciones celulares de repuesta tipo Th1 expresan el receptor CXCR3. Durante el proceso de inflamación a causa del gluten, hay producción de IFN- γ y se produce CXCL10, que es un ligando del CXCR3. Esta interacción entre receptor/ligando, influye en el aumento y perpetuación del proceso inflamatorio en EC (Bondar et al., 2014). Los alimentos industrializados contienen aditivos para mejorar propiedades sensoriales y tecnológicas; algunos de estos, podrían estimular la producción de zonulina y apertura de las uniones estrechas, induciendo respuestas inmunes anómalas.

2.3. Aditivos Alimentarios

Desde la segunda mitad del siglo XIX, la mecanización en la industria alimenticia desarrolló fórmulas para producir, distribuir y vender en masa sus productos (Monteiro et al., 2013). Con el ritmo de vida actual, el consumo de este tipo de alimentos y bebidas va en aumento; se invierte un 20% del ingreso familiar en este rubro (Moodie et al., 2013). Los alimentos industrializados son formulaciones con distintos ingredientes y aditivos, para lograr cualidades sensoriales y apariencia de alimentos con procesamiento mínimo, así como para hacerlos más atractivos. Entre estos productos se encuentran, bebidas azucaradas, panes, salsas, mermeladas, embutidos, galletas y diferentes productos libres de gluten (Martínez Steele et al., 2017).

En años recientes, los productos libres de gluten se han hecho muy populares (Pellegrini y Agostoni, 2015) y la dieta sin gluten es seguida no solo por las personas con EC y otras enfermedades. Muchas personas sanas o con síntomas gastrointestinales, pero sin diagnóstico, consideran que los productos libres de gluten son más sanos o nutritivos que

los convencionales, incluso, creen que son eficaces para perder peso (Miranda et al., 2014; Vici et al., 2016). Independientemente de si los consumen personas sanas o enfermas, por lo común los productos de panificación, repostería y pastas sin gluten, contienen aditivos en mayor proporción que los convencionales, a fin de emular las propiedades del gluten. Hay además creciente conciencia de la relación de salud con la alimentación y se demandan productos naturales, saludables e innovadores, como los “funcionales”. Así mismo asociadas o no a estos productos, han aumentado las intolerancias alimentarias. Esto, ha llevado a las industrias de alimentos y a los investigadores a realizar esfuerzos para buscar satisfacer las necesidades de los demandantes. Entre estos esfuerzos están las reformulaciones de los alimentos con compuestos funcionales o nutracéuticos, a los que se añaden diversos aditivos alimentarios, por ejemplo, enzimas, emulsionantes e hidrocoloides (Conte et al., 2016; Ngemakwe et al., 2014; Collar et al., 2014).

2.3.1. Enzimas

Una de las estrategias en las industrias de alimentos para atender la demanda de los consumidores, es el uso de enzimas microbianas con diferentes propósitos. Por ejemplo, se usan para mejorar la textura, apariencia o dureza de la carne y para incrementar la consistencia en productos marinos. También se aplican enzimas para mejorar calidad y textura en lácteos; reducir el contenido de calorías y mejorar la textura y elasticidad en dulces y productos de panificación (Conte et al., 2016; Lerner y Matthias, 2015a).

La transglutaminasa (EC 2.3.2.13), es una enzima de origen animal, involucrada en la patogénesis de la EC, como se describió antes. Actualmente se produce en reactores bacterianos, para su uso en la industria de los alimentos, en donde se conoce como transglutaminasa microbiana (TGm). Esta enzima, cataliza la formación de un enlace entre el grupo carboxamida- γ de los residuos de glutamina y el primer grupo carboxilo- ϵ de otro grupo amino cualquiera. Además, puede catalizar otras dos reacciones: transferencia de grupos acilos y deamidación (Lerner y Matthias, 2015a; Kieliszek y Misiewicz, 2014).

La TGm se utiliza en diversos alimentos industrializados de consumo común, para inducir la formación de retícula, como en el pan, en lugar del gluten en los alimentos que lo restringen. Las proteínas en los alimentos así tratados pueden convertirse en neo-epítopes con potencial inmunogénico (Lerner y Matthias, 2015b). Especialmente problemática puede ser la deamidación de gliadinas, reacción clave para exacerbar enfermedad celiaca (Dekking et al., 2008). En dos estudios independientes se demostró que los anticuerpos de los niños con enfermedad celiaca reconocen los péptidos deamidados por la TGm, aun con mayor respuesta, que lo hacen a los resultantes de la acción de la TG tisular (Matthias et al., 2016; Cabrera-Chávez et al., 2008). Sin embargo, en un estudio reciente no detectan ese efecto (Heil et al., 2017), aunque el método usado para ello no es muy sensible (Calderón de la Barca y Sigala-Robles, 2018).

2.3.2. Emulsionantes

Los emulsionantes son sustancias con residuos lipófilos e hidrófilos que dispersan moléculas de grasa en suspensión acuosa, estabilizando las mezclas y retardando la separación en fases (Wright et al., 2016). En alimentos y bebidas, ayudan a mantener textura, hidratación, plasticidad, fluidez, consistencia, volumen, estructura, resistencia al calor y sabor (Glade et al., 2016). Su uso está generalizado en alimentos industrializados de consumo común, así como en aquellos sin gluten (Ngemakwe et al., 2014).

Al igual que la TGm, los emulsionantes se han relacionado con trastornos intestinales, como la colitis, síndrome del intestino irritable y con autoinmunidad, a partir de disbiosis intestinal (Shamriz et al., 2016). También, se han asociado con el aumento de la permeabilidad intestinal, causando un daño en la mucosa (Csáki, 2011). Algunos emulsionantes como el polisorbato-80 (P-80) y la carboximetil celulosa (CMC), afectan la absorción de lípidos en el intestino, llevándolos al colon en donde intervienen en la composición de la microbiota, así como en procesos inflamatorios (Cani y Everard, 2015). De acuerdo con Chassaing et al. (2015), estos emulsionantes disminuyen la proporción del orden de *Bacteroidales*, que se asocian a una microbiota saludable con géneros como

Prevotella, en ratones. Por el contrario, aumentaron *Ruminococcus gnavus*, una especie mucolítica.

De igual manera el P-80 y la CMC, incrementaron los niveles de lipopolisacáridos bioactivos y flagelina, induciendo anticuerpos IgG específicos, efecto que se correlaciona con incremento de la permeabilidad intestinal. De igual forma, encontraron células inmunes infiltradas entre las células del colon y aumento de citocinas proinflamatorias (Chassaing et al., 2015).

2.3.3. Hidrocoloides

Los hidrocoloides son un grupo diverso de polímeros de cadenas largas, constituidos de múltiples clases de polisacáridos. Los hidrocoloides están entre los aditivos más utilizados en la industria alimentaria. Funcionan como agentes espesantes, gelificantes, clarificantes, espumantes, emulsionantes y estabilizantes, además tienen aplicación en la formación de películas comestibles. Entre los hidrocoloides más comunes se encuentran los almidones, pectinas, inulina, gelatinas, agares, goma guar, goma xantana, carragenanos, alginatos y goma arábica (Li y Nie, 2015).

De acuerdo con Li y Nie (2015), los hidrocoloides podrían considerarse como fibra dietaria, que el *Codex Alimentarius* (ALINORM 09/32/26) considera un componente importante dentro de una dieta saludable. La inulina, por ejemplo, es un aditivo alimentario considerado como fibra dietaria, que se añade a los alimentos por su valor nutricional y propiedades tecnológicas, proporcionando una mejor textura y consistencia (Cassani et al., 2017; Bayarri et al., 2010). Además de ser fibra, también es utilizada como prebiótico, ya que sirve como sustrato a grupos de bacterias benéficas en el intestino. Sin embargo, para las personas con síndrome de colon irritable, su ingestión puede ser contraproducente, ya que está dentro de los compuestos fermentables en colon (Adebola et al., 2013; El-Salhy et al., 2014).

El consumo alto de fibra en pacientes con síndrome del intestino irritable, se asocia directamente con la composición de la microbiota y a su vez con el incremento de los

síntomas de este trastorno intestinal (El-Salhy, 2012). El-Salhy et al. (2014), mencionan que el género dominante en pacientes con síndrome del intestino irritable es *Clostridium spp.*, y es causante de dolor y distensión abdominal, debido a la producción de gas, ya que las especies de este género, usan la fibra como sustrato.

Según Png et al. (2010), dos especies de bacterias mucolíticas, *Ruminococcus gnavus* y *R. torques*, se encuentran aumentadas en comparación con géneros bacterianos asociados a la producción de mucina, en la microbiota fecal de pacientes con síndrome del intestino irritable. Según Eswaran et al. (2011), 4% de los pacientes con síndrome del intestino irritable, padecen EC, pudiéndosele atribuir el daño de la capa de mucina al aumento de dichas bacterias mucolíticas. La disbiosis intestinal, además del continuo contacto con antígenos dietarios, estimula la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-8, TNF- α e IL-1 β , que ocasionan daño a los enterocitos, induciendo aumento en la permeabilidad intestinal (Hayes et al., 2014).

2.4. Modelos para Estudiar el Efecto de los Aditivos

El uso de aditivos está regulado por el *Codex Alimentarius* y la Norma Mexicana correspondiente, que consideran la seguridad de acuerdo a la evaluación de toxicidad e ingestión promedio de adultos y niños sanos (CAC/GL 3-1989, revisión 2014; NOM-051-SSA-SCFI/SSA1-2010).

Uno de los retos para evaluar el efecto de los aditivos alimentarios en la salud, es que está regulada la cantidad máxima permitida en los alimentos, más no se conoce el consumo de cada aditivo, ya que una misma persona lo puede consumir de diversas fuentes en un mismo día. Así mismo, el contenido de aditivos puede variar dentro de los grupos de alimentos o bebidas, así como también varían los niveles requeridos para lograr el efecto tecnológico deseado (Tennant y Bruyninckx, 2017). Por lo anterior, para estudiar el efecto de los aditivos, se diseñan ensayos con diversos modelos experimentales, como animales o líneas celulares, además de técnicas y herramientas de diferentes áreas, como biología molecular, inmunquímica y bioquímica.

Para evaluar los efectos de la ingestión de sustancias como los aditivos alimentarios, es necesario considerar aspectos como el estado fisiológico, para escoger un modelo experimental adecuado. Éste, ya sea *in vivo* o *in vitro*, representa sólo una parte del problema ya que no ofrece *per se* una explicación que ayude a resolverlo (Magaña-Gómez y Calderón de la Barca, 2017). En la investigación, se utilizan modelos animales y celulares. Para replicar el estado fisiológico que se quiere modelar, se pueden utilizar animales genéticamente modificados o líneas celulares específicas, apegándose en lo posible a la condición a estudiar.

Un ejemplo de evaluación de la toxicidad es la de Gao et al. (2016) en donde estudian el efecto del emulsionante monoestearato de glicerina en presencia de ésteres de ftalato, donde se demuestra que hay afecciones en tejido testicular y disminución de testosterona, afectando así la capacidad reproductiva de ratas macho. Otro caso, es la evaluación de los efectos benéficos del almidón resistente y fibras solubles sobre una condición fisiológica específica, el síndrome de intestino irritable, en ratones *knockout* para IL-10 (Bassaganya-Riera et al., 2011).

En los modelos celulares, se puede inferir acerca de los posibles efectos en la salud, a partir del comportamiento de las células en estudio. Ortiz-Sánchez et al. (2016), evaluaron la producción de citocinas y la permeabilidad debidas al efecto de péptidos de gliadinas y zeínas, en una monocapa de la línea celular CACO-2, así como en biopsias duodenales de pacientes con EC. Guo et al. (2017), usando células CACO-2 y HT29-MTX (simulando células de Golbet, productoras de mucina), evaluaron el efecto de nanopartículas de dióxido de titanio, sobre la función del intestino. Demostraron que la función intestinal se ve alterada por la presencia de estas nanopartículas, hubo aumento de especies reactivas de oxígeno y aumento en la señalización y producción de citocinas proinflamatorias. Asimismo, se redujeron las microvellosidades, afectando la absorción de nutrientes.

También se pueden emplear modelos celulares alternativos no humanos, tal es el caso de las células IEC-18. Versantvoort et al., (2002), encontraron que las células IEC-18 (provenientes de íleon de ratón) son comparables con la línea celular CACO-2 (provenientes de adenocarcinoma de colon humano). Probaron diferentes sustancias como manitol, glicil-sarcocina, *O*-metil-*D*-glucosa entre otras, en monocapas cultivadas sobre membranas permeables, donde encontraron que los flujos paracelulares en ambos modelos

celulares, son equiparables. Los autores afirman que las células IEC-18, pueden ser más útiles en sistemas donde se requiera transporte pasivo.

2.5. Perspectivas

Se ha comprobado que algunos emulsionantes y ciertos hidrocoloides, que son aditivos alimentarios comunes en los alimentos procesados, tienen la capacidad de provocar cambios en la composición de la microbiota intestinal (Cani y Everard, 2015; Shamriz et al., 2016). Esto, aumenta los géneros de bacterias degradadores de mucina en pacientes con síndrome del intestino irritable (Eswaran et al., 2011; Chassaing et al., 2015). Así mismo, inducen la producción de anticuerpos específicos a proteínas bacterianas como la flagelina, y hacia lipopolisacáridos, lo que afecta la permeabilidad intestinal (Csáki, 2011; Chassaning et al., 2015). También, hay una mayor cantidad de linfocitos T infiltrados, que estimularán la producción de citocinas proinflamatorias, promoviendo daño en el intestino. Por su parte, se inducen anticuerpos contra la enzima TGm como a los productos de su deamidación, que, por homología, reconocen a la TGt, en personas con alto riesgo a DT1 o EC (Cabrera-Chávez et al., 2008).

El consumo de aditivos en alimentos procesados podría generar respuesta inmune exacerbada en algunos pacientes caucásicos con DT1 que tengan el alelo HLA-DQB1*0201, e inclusive propiciar el desarrollo de EC (Kuitunen et al., 2002) o quizá en los de nuestra población con los alelos B1*0201 y A1*0301, en conjunto. Por consiguiente, el análisis del efecto de los aditivos de alimentos sobre mucosa intestinal de personas con DT1, contribuirá al conocimiento de su riesgo a desarrollar EC.

3. HIPÓTESIS

Hay aditivos alimentarios que afectan la permeabilidad intestinal en pacientes con diabetes tipo 1 que presentan los alelos HLA-DQB1*0201/DQA1*0301, lo que promueve una respuesta inmune exacerbada, además de la producción de citocinas proinflamatorias; así mismo, se producen anticuerpos específicos a antígenos dietarios, todo lo cual puede llevar a enfermedad celiaca.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto de aditivos alimentarios de consumo frecuente sobre la permeabilidad intestinal y la respuesta inmune humoral, cuantificar autoanticuerpos anti-transglutaminasa en personas con diagnóstico de diabetes tipo 1, así como la permeabilidad y respuesta inmune humoral en monocapa y cultivo, respectivamente, en células de íleon de ratón IEC-18.

4.2. Particulares

Identificar los aditivos alimentarios de consumo más frecuente por los pacientes con DT1.

Cuantificar anticuerpos IgA anti-TG, IgG contra proteínas dietéticas y contra hidrocoloides en suero, así como haplotipos HLA-DQ2 y DQ8 en pacientes con DT1.

Evaluar el efecto de algunos aditivos alimentarios sobre la permeabilidad y respuesta inmune de células IEC-18 en monocapa y cultivo, respectivamente.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Participantes

Se invitó a pacientes con diagnóstico de DT1, de las consultas de endocrinología pediátrica del Hospital Infantil del Estado de Sonora (HIES) y del Hospital General de la Zona 14 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Los padres firmaron su consentimiento en la participación de los menores de edad, después de explicarles el objetivo del estudio.

La información sobre los aditivos de uso común se tomó de un estudio previo de 41 niños con DT1 del mismo origen; además de 18 muestras de sus sueros almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aguilar-Salido, 2017). Se analizaron recordatorios de 24 h, de los cuales se seleccionaron los alimentos procesados industrializados de consumo frecuente, además de escogerse algunos de los aditivos más usados, de acuerdo con el etiquetado. Los sueros se analizaron para la cuantificación de anticuerpos anti- proteínas dietéticas, hidrocoloides y TG, como se describe más adelante.

5.2. Genotipificación de Haplotipos HLA-DQ2 y DQ8

La genotipificación de haplotipos HLA-DQ2 y DQ8, se realizó extrayendo ADN genómico (ADNg) de gotas de sangre seca y analizando por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), en tiempo real (Aguayo-Patrón et al., 2016). Para la extracción de ADNg, se cortaron círculos de 6 mm del papel filtro con un perforador, donde se colectó la muestra. Se procedió a realizar la lisis de glóbulos rojos, añadiendo buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, 320mM sacarosa, 5 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, pH 8.0), a microtubos para centrifuga que contenía la sangre seca. Se agitó durante 15 min. Posteriormente, se lavó 3X con agua milli-Q en agitación durante 5 min. Se añadió

buffer A (100 mM NaOH, 2% Tween 20) y se incubó 12 min a 95°C. Finalmente se añadió buffer B (100 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8.0) y se agitó durante 10 min.

Para identificar los haplotipos se usaron iniciadores para los alelos DQA1*0501 (sentido: 5'-ACGGTCCCTCTGGCCAGTA-3' y antisentido: 5'-AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC-3') y para DQB1*0201 (sentido: 5'-GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3' y antisentido: 5'-GCAAGGTCGTGCGGAGCT-3') para el haplotipo HLA-DQ-2.5; DQA1*0301 (sentido: 5'-TTCACCTCGTCAGCTGACCAT-3' y antisentido: 5'-CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT-3') y DQB1*0302/3 (sentido: 5'-GACGGAGCGCGTGCGTTA-3' y antisentido: 5'-CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT-3') para el HLA-DQ-8.

El análisis se realizó en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus™ (Applied Biosystems, California, EUA). Las condiciones de corrida fueron una temperatura inicial de 95°C durante 7 min, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 61°C y 30 s a 72°C. Se obtuvieron las curvas de disociación, mediante el incremento de 0.1°C, para identificar la amplificación de los alelos.

5.3. Cuantificación de Anticuerpos

Se cuantificaron anticuerpos anti-transglutaminasa (anti-TG) en suero (Cabrera-Chávez et al., 2008), incubando los pozos de microplaca para ELISA con 5 µg/mL de transglutaminasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en buffer de cubierta pH 9.6 (3.5 mM NaHCO₃, 1.5 mM Na₂CO₃, 0.05% rojo fenol) al menos 12 h. Se lavó la placa 4X con buffer de lavado y dilución (0.1 M Tris/HCl, 1.5 mM NaN₃, 0.05% tween 20, 0.05% rojo fenol) y se incubó con gelatina de pescado (Sigma Aldrich, St Louis, MO) al 1% por 1.5 h a 25°C. Después de 4 lavados, se incubó con los sueros durante 4 h a 25°C. Se lavó nuevamente la placa 4X y se incubó con anticuerpos anti-IgA humana conjugada con peroxidasa (DAKO, Carpinteria, CA), 1 h. Finalmente se lavó 3X con buffer de lavado y uno más con buffer de fosfatos a pH 7.2 (1M K₂HPO₄, 1 M KH₂PO₄, 0.9% NaCl). Se añadió 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB; Sigma Aldrich), en buffer acetato de sodio 0.1 M y H₂O₂ al 30%. Se desarrolló la reacción durante 20 min y se detuvo añadiendo

H₂SO₄ al 1M y se midió absorbancia a 450 nm, en un lector de ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA).

Se analizó IgG en forma similar a la descripción previa, modificando la inmovilización inicial de transglutaminasa por cada hidrocoloide o proteína de la dieta a probar en las microplacas de ELISA y con anticuerpos secundarios anti-IgG humana conjugados con peroxidasa (DAKO, Carpinteria, CA).

5.4. Evaluación del Efecto de los Aditivos Alimentarios en Células IEC-18

Se utilizó la línea celular IEC-18, cultivándose en cajas de 25 cm² en medio Eagle's modificado por Dulbecco's (Gibco, Grand Island, NY), adicionado con 10% suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY), 4mM L-glutamina, 100U/mL penicilina, 100 ug/mL estreptomycin, 2.5 µg/mL anfotericina B (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado tres veces a la semana y se hicieron subcultivos al 100% de confluencia. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con las resiembras 17-19.

Se sembraron células en placas de 96 pozos por triplicado a una densidad de 4x10³ cel/mL y fueron retadas con los aditivos en estudios para la cuantificación de IL-6 e IFN-γ. A cada grupo se les añadió una concentración de 500 µg/mL de cada aditivo. Además, se empleó un grupo adicional donde se hizo una mezcla con los aditivos a la misma concentración y un grupo control sin retar. Se recolectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C hasta su empleo. Para cuantificar las citocinas, se emplearon los juegos de reactivos Quantikine® ELISA Mouse IL-6 y Quantikine® ELISA Mouse IFN-γ (R&D systems, Minneapolis, MN), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se analizó permeabilidad en monocapa de células IEC-18, de acuerdo con Fiorentino et al. (2014), con modificaciones. Las células se sembraron en filtros permeables de 0.33 cm² de politetrafluoroetileno cubiertos con colágeno, con poro de 0.4 µm (Corning No LOTE 10613011. Corning, NY), por triplicado durante 4 días, a una densidad de 3.6x10⁴ cel./mL, hasta confluencia del 100 % y estados de polarización y diferenciación. Se midió

la resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) después de los retos, con un electrodo ajustable de AgCl (Millicell ERS; Millipore Co., Bedford, MA), adaptado a un multímetro de flujo (Everett, WA, USA), en Kilo ohms ($K\Omega$).

La permeabilidad de la monocapa se evaluó después de incubar 24 h a 37°C, con cada aditivo, la zona apical de las células. Se hicieron lavados tanto en la superficie apical como basolateral con PBS. Después, se añadieron en la zona apical 5 mg/mL de azul de dextrano (peso molecular 5000 Da) en medio de cultivo (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). En la zona basolateral, solo se añadió medio de cultivo. Se incubó 24 h y se colectó la zona basolateral para cuantificar la concentración de azul de dextrano midiendo absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas de ELISA (BIO RAD, mod. 550, Japón). Se realizó una curva estándar de azul de dextrano, partiendo de una concentración de 5 mg/mL.

5.5. Análisis estadísticos

Para los participantes, se realizó estadística descriptiva y se hizo una prueba de T para dos proporciones para buscar diferencias entre el grupo de participantes con genética y sin genética de riesgo a permeabilidad intestinal aumentada. También, se realizó una prueba de regresión lineal múltiple, con un valor de $p < 0.05$, para buscar la asociación entre el análisis de anticuerpos anti-hidrocoloides y anti-proteínas dietarias, con respecto a la permeabilidad intestinal en el paquete estadístico NCSS 2007®.

Para el análisis de citocinas IL-6 e IFN- γ , y permeabilidad en las células IEC-18, se realizó un diseño completamente al azar con un ANOVA de una sola vía a una significancia de $p < 0.05$. Asimismo, se realizaron comparaciones de medias por Tukey-Kramer, para buscar diferencias entre los tratamientos, con el software GraphPAD Prism 8.0.0. Para las mediciones de TEER se realizaron pruebas de T pareada entre las lecturas pre- y post-tratamiento, con un valor de $p < 0.05$, en el paquete estadístico NCSS 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Características de los Participantes y Análisis de Consumo de Aditivos

Se estudiaron 30 niños con diagnóstico de DT1 (14 del sexo masculino y 16 del femenino), de los cuales 18 fueron de un estudio previo (Aguilar Salido, 2017) dirigido por la Dra. Calderón de la Barca, asesora de esta tesis y el resto fueron posteriormente invitados al estudio. Todos los participantes residían en Sonora, y acudían a consulta de endocrinología pediátrica al HIES o al IMSS zona 14. El rango de edades a la toma de muestra fue de 3-17 años; con periodos de evolución distinto. Los de menos a 3 meses de evolución (n= 16), se consideraron de reciente diagnóstico (RD), con edad promedio de 10.3 ± 3.8 años y en evolución (E) aquellos con > 3 meses de diagnóstico (n= 14), con edad de 11.9 ± 2.3 años. Del 83.3% (25/30) de la muestra se conocen los valores de hemoglobina glicosilada (HbA1c). De estos, solo ocho participantes tenían control de la enfermedad (3 RD y 5 E), con valores $< 7\%$ de HbA1c ($6.3 \pm 0.6 \%$), los otros 17 (9 RD y 8 E) presentaron descontrol, con valores $> 7\%$ ($10.6 \pm 2.6 \%$).

Se analizaron 117 recordatorios de 24 h, provenientes de 41 niños menores de 18 años, con diabetes tipo 1, de otro estudio previo (Aguilar-Salido, 2017), de la misma región y consulta médica que los participantes actuales. Se encontraron 110 alimentos procesados industrializados de consumo común entre los niños. Destacan entre éstos, los productos como pan de caja, galletas, cereales para desayuno y barras de cereales. Hay así mismo, bebidas preparadas y/o para preparar, como refrescos gasificados, bebidas azucaradas y reducidas en azúcar y polvos instantáneos. También están incluidos, productos lácteos como yogurt, queso y aderezos; embutidos y alimentos procesados, como jamón, salchichas, atún y sardinas enlatados. Hay además botanas, como papas fritas y palomitas de maíz, así como sazónadores, además de algunos productos libres de gluten.

No se esperaba encontrar productos libres de gluten en las dietas de los niños con DT1; sin embargo, muchas personas tienen la creencia de que estos productos son más saludables, o que son efectivos para la pérdida de peso, lo cual no tiene ningún soporte

científico (Capriles et al., 2016). Así mismo, Calderón de la Barca y Mejía León (2017), mencionan que las dietas libres de gluten se deben de asignar a personas que tengan, ya sea EC o algún otro desorden relacionado con el trigo. Sin embargo, los productos industrializados sin gluten no son una buena opción para los niños, debido a su desbalance de nutrientes.

Se analizó el contenido de aditivos alimentarios de los productos industrializados de acuerdo con el etiquetado, encontrándose 79 aditivos diferentes, que se ordenaron de acuerdo a su presencia en los alimentos más comunes de los recordatorios. Entre ellos, se destacan algunas gomas y otros polisacáridos, antioxidantes, edulcorantes y fibras. Algunos grupos de aditivos como las enzimas, hidrocoloides y emulsionantes pueden ocasionar efectos antifisiológicos en humanos, en modelos animales y celulares (Martino et al., 2017; Woods et al., 2012).

Los alimentos en el presente estudio se dividieron en grupos de acuerdo con el número de aditivos: entre 1 y 2, de 3 a 5 y ≥ 6 . La mayoría tenía entre 3-5 aditivos ($n= 46$), seguido por aquellos con 1-2 aditivos ($n= 44$). El grupo donde los productos contenían más de 6 aditivos fue mucho menor ($n= 16$), comparado con los rangos 1-2 y 3-5. Hubo 4 productos industrializados, cuya etiqueta no indicaba aditivo alguno y declaraban no tener gluten.

Se clasificaron los productos, formando 4 grupos de acuerdo con su etiquetado: aquellos que declaran gluten (G), los que no declaran tener gluten y/o trigo (SG), libres de gluten (GF) y sazoadores (S). En la figura 1, se muestra que el grupo de alimentos GF, son los que contienen mayor número de aditivos (> 6). Esto era de esperarse, puesto que, a los productos de panificación, repostería y pastas sin gluten, se requiere añadir diferentes aditivos, que les aporten viscoelasticidad y otras propiedades tecnológicas. Además, los productores buscan la forma de hacer estos productos atractivos y con propiedades organolépticas similares a sus contrapartes (Capriles y Arêas, 2013; Ngmakwe et al., 2014; Conte et al., 2016).

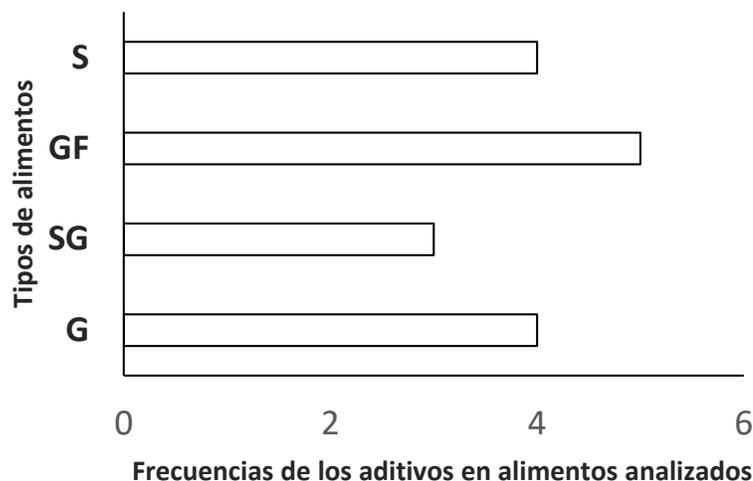


Figura 1. Grupos de alimentos consumidos por los niños con DT1, con > 6 aditivos. G: productos que declaran contener gluten; SG: no declaran tener gluten y/o trigo; GF: libres de gluten; S: sazonzadores.

El uso de los aditivos en alimentos está regulado en México por la Norma Oficial Mexicana 051 (NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados -Información comercial y sanitaria), la cual regula el etiquetado y las cantidades máximas permitidas para cada tipo de producto. Sin embargo, el mal manejo del etiquetado de los productos hace pensar que están libres de aditivos o son más nutritivos al no tener aditivos y/o conservadores. Esto hace que el estudio del consumo de aditivos y su evaluación se complique, ya que no se conoce el dato real o si lo que dice en la etiqueta es del todo cierto (Tennant y Bruyninck, 2017). En este trabajo, hubo varios productos que declaran solamente contener enzimas, más no especifican cuales.

Hay estudios en diferentes modelos, en los que se evalúa y se ha demostrado que algunos aditivos tienen efectos adversos a la salud. En la Tabla 1, se enlistan estudios de los aditivos más frecuentes (22/79) entre los productos industrializados relatados en esta tesis. No todos los efectos son adversos, como la goma guar y la inulina, que promueven respuesta antiinflamatoria además de aumentar producción de ácidos grasos de cadena corta, así como también ayudan a disminuir indicadores de permeabilidad intestinal, como los niveles de zonulina en circulación sanguínea (Takaqi et al., 2016; Russo et al., 2012).

De los aditivos encontrados, se seleccionaron 5: goma xantana, carragenina, pectina, goma arábica y goma guar, en orden de mayor a menor frecuencia. Todos estos son utilizados como agentes espesantes, estabilizantes, agentes de relleno y gelificantes. Estos aditivos son hidrosolubles (Phillips y Williams, 2009), lo que facilita su manejo en sistemas acuosos de baja salinidad como los fisiológicos. Esto es útil, para algunas de las pruebas aplicadas en este estudio.

TABLA 1. Aditivos alimentarios más frecuentes en alimentos ultra procesados, consumidos por los niños con DT1 de este estudio y sus efectos evaluados en diferentes modelos animales y celulares.

Aditivo	Frecuencia	Efectos evaluados	Referencia
Goma xantana	20	Enterocolitis necrosante en niños prematuros.	Woods et al., 2012
		Células murinas, aumento de IL-12 y TNF- α y actividad antitumoral.	Takeuchi et al., 2009
Lecitina de soya	19	Caso de infante. Aumento de inmunoreactividad IgE y de permeabilidad intestinal (relación lactulosa/manitol urinario)	Renaud et al., 1994
Glutamato monosódico	15	Modelo murino, inducción de dolor por activación de receptores N-metil-D-aspartato	O'Brien y Cairns, 2016
Maltodextrina	12	Modelo murino, alteración de la barrera mucosal	Nickerson et al., 2014
Carragenina	12	Línea celular NCM460, aumento de factores de transcripción NF κ B y secreción de IL-8	Bhattacharyya et al., 2008
		Modelo celular, disminución de la expresión de Zo-1	Choi et al., 2012
		Células CACO-2, HT-29 y HCT-8, sin efecto en permeabilidad, expresión de citocinas proinflamatorias, estrés oxidativo ni citotoxicidad.	McKim et al., 2016
Pectina	9	Modelo murino, disminución de la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias	Ishisono et al., 2017
		Disminución de la permeabilidad inducida por TNF α en células CACO-2.	Yue et al., 2015
TBHQ	9	Modelo celular, esplenocitos. Promueve respuesta antiinflamatoria Th2, inhibe IFN γ y aumenta IL-2	Zagorski et al., 2018
Extracto levadura	9	Modelo colónico de fermentación, modula microbiota a saludable.	Doo et al., 2017
Gluten	8	Biopsias de enfermos celíacos, reconocimiento de gliadinas por células T CD4+ con expresión HLA-DQ2	Molberg et al., 1997

Aditivo	Frecuencia	Características del estudio	Referencia
Sucralosa	7	Modelo murino, disbiosis intestinal y aumento en la expresión de genes de citocinas proinflamatorias en hígado. Modelos celulares: Caco-2, HT-29 y HEK-293. Disminución de viabilidad celular y fragmentación de AND.	Biang et al., 2017 Van Eyk, 2014
Carboximetil-celulosa	6	Simulación gastrointestinal y modelo murino, alteración de microbiota de alto potencial proinflamatorio	Chassaing et al., 2017
Enzimas	6	Transglutaminasa microbiana. Reconocimiento por IgA en sueros de pacientes celíacos	Cabrera-Chávez et al., 2008
Acelsufame K	5	Modelos celulares: Caco-2, HT-29 y HEK-293. Disminución de viabilidad celular.	Van Eyk, 2014
Aspartame	5	Modelos celulares: Caco-2, HT-29 y HEK-293. Disminución de viabilidad celular.	Van Eyk, 2014
Eritorbato de sodio	5	Resultado negativo en pruebas de potencial mutagénico y negativo en pruebas de carcinogénesis en roedores	Ishidate et al., 1984
Proteína de soya	5	Modelo celular, activación de TLR línea celular THP-1 y aumento en la producción de citocinas proinflamatorias en células dendríticas	Kiewiet et al., 2018
Dióxido de silicio	4	Líneas celulares MH-S y RAW264.7 (murino), aumento de citotoxicidad y actividad proinflamatoria	Di Cristo et al., 2016
BHA/BHT	3/3	Línea celular de leucemia promielocítica humana (HL-60), inducción de efecto citotóxico y aumento de señalización para apoptosis	Saito et al., 2003
Goma arábica	3	Reduce proteína C-reactiva en insuficiencia renal crónica humana.	Elamin et al., 2017
Goma guar	3	Modelo murino, inhibición de la expresión de RNAm de TNF α , modulación de la microbiota y aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta	Takaqi et al., 2016
Inulina	3	Humanos, disminución de la relación lactulosa/manitol, indicador de permeabilidad	Russo et al., 2012
Sorbato de potasio	3	Linfocitos periféricos humanos, efecto genotóxico	Mamur et al., 2010

6.2 Genotipificación de Alelos HLA DQ2 y DQ8

Los resultados del análisis de los alelos que conforman los haplotipos HLA-DQ2/DQ8 asociados a DT y EC, de 30 niños participantes, se muestra en la Tabla 2. Utilizando el gradiente de riesgo genético asociado a EC, en población sonoreNSE (Mejía León et al., 2015), se clasificó a los participantes como de alto (de 1:6 a 1:27), mediano (de 1:32 a 1:123) o bajo (de 1:126 a 1:294) riesgo. Así mismo, se registró en otra columna de la misma Tabla 2, si tenían o no predisposición genética a perturbación de la permeabilidad intestinal, con los alelos B1*0201 y A1*0301 (Aguilar Salido, 2017).

Diez de 30 pacientes con DT1 compartían los mismos alelos de riesgo: A1*0501, B1*0201 y A1*0301, combinación que en población sonoreNSE se considera con riesgo de 1:71 para EC (Mejía León et al., 2015). Además, esos 10 pacientes, coinciden en la genética de predisposición de permeabilidad aumentada, además de otros 5 en la misma Tabla 2, incluyendo al paciente codificado como P13 con riesgo alto de EC y riesgo de permeabilidad aumentada. El resto de los participantes, presentaron genética de riesgo de EC desde bajo, hasta alto.

En nuestro estudio, como se verá más adelante, solo un niño (P9) tiene actualmente autoanticuerpos asociados a EC, lo que correspondería a 1:30. Esto es casi el doble de la prevalencia en población mexicana abierta (1:59), publicada por Remes-Troche et al. (2013). Sin embargo, en un estudio previo (Mejía-León et al., 2014), la prevalencia con autoanticuerpos contra TG fue 3 veces mayor. De acuerdo con Goh y Banerjee (2007), el desarrollo de EC en DT1, no lleva un curso predictivo. En 113 niños londinenses con DT1, encontraron que 7 desarrollaron EC, dando una prevalencia de 1:16. En dicho estudio, muestran que menos de la mitad de los niños desarrollaron la EC durante el primer año de evolución de la DT1 y el resto, después de 5 años. En nuestro estudio, poco más de la mitad de los niños, no tenían los 3 meses de evolución de la DT1, quizá por esto la prevalencia de EC fue menor.

De acuerdo a Boudraa et al. (1996) y Hagopian et al. (2017), la prevalencia de EC en los pacientes con DT1, puede ser hasta de 1:6.1. En el estudio “Determinantes ambientales de

diabetes en la juventud (TEDDY, por sus siglas en inglés), analizaron prospectivamente coocurrencia de EC en DT1, en una cohorte de niños en riesgo genético, del nacimiento hasta los 15 años, mediante detección de autoanticuerpos. La prevalencia de EC fue de 1:65.5 en los niños con DT1 (con autoanticuerpos para cada caso), es decir 90 de 5,891 niños que participaron en el estudio TEDDY (Hagopian et al., 2017). Esto es, poco menos del doble del 1:100 en población general.

La EC en DT1, puede desarrollarse de una manera asintomática en ausencia de síntomas gastrointestinales (Joshi et al., 2014), y de acuerdo con Camarca et al. (2012), el promedio en tiempo del diagnóstico de EC en DT1 es de 2 a 3 años. Es por ello que se recomienda el análisis de autoanticuerpos IgA e IgG anti-transglutaminasa tisular, así como también anticuerpos IgG contra péptidos de gliadinas deamidadas, al diagnóstico y posteriormente a los 2 y 5 años de desarrollo de la DT1 (ADA, 2018).

Tabla 2. Riesgo genético asociado al desarrollo de EC y permeabilidad intestinal aumentada de los participantes con DT1

Participantes	DQ2		DQ8		Riesgo a EC*	Riesgo a Permeabilidad [‡]
	A1*0501	B1*0201	A1*0301	B1*0302		
P1	+	+	+	-	Medio	+
P2	-	-	+	-	Bajo	-
P3	+	+	+	-	Medio	+
P4	+	+	+	-	Medio	+
P5	+	+	+	-	Medio	+
P6	+	+	-	-	Alto	-
P7	+	+	+	-	Medio	+
P8	-	+	+	-	Bajo	+
P9 [‡]	-	-	+	-	Bajo	-
P10	+	-	-	+	Medio	-
P11	-	-	+	-	Bajo	-
P12	+	+	-	-	Alto	-
P13	+	+	+	+	Alto	+
P14	+	+	+	-	Medio	+
P15	-	+	+	-	Bajo	+
P16	-	-	+	-	Bajo	-
P17	-	-	+	-	Bajo	-
P18	-	-	-	+	Bajo	-
P19	+	+	+	-	Medio	+
P20	-	+	+	-	Bajo	+
P21	-	-	+	-	Bajo	-
P22	-	-	-	+	Bajo	-
P23	-	-	+	-	Bajo	-
P24	+	+	+	-	Medio	+
P25	-	+	+	-	Bajo	+
P26	-	-	+	-	Bajo	-
P27	+	-	-	+	Medio	-
P28	-	-	+	-	Bajo	-
P29	+	+	+	-	Medio	+
P30	+	+	+	-	Medio	+

* Riesgo genético EC de acuerdo con Mejía-León et al., 2015.

[‡] Presencia de alelos B1*0201 + A1*0301

[‡] Participante con autoanticuerpo contra TG

6.3. Cuantificación de Anticuerpos Contra Proteínas e Hidrocoloides

Se analizaron anticuerpos IgG contra tres proteínas de la dieta: gliadinas, caseínas y β -lactoglobulina, y contra los 5 aditivos de consumo más frecuente en las dietas de los niños con DT1: goma xantana, carragenina, pectina, goma arábica y goma guar. Además, como referente negativo se incluyó un aditivo adicional, maltodextrina, que no es un polímero y, por tanto, no induce la producción de anticuerpos. Se establecieron puntos de corte para cada uno de los tratamientos sumando el promedio de los valores de absorbancias aparentemente negativos más dos desviaciones estándar y se calcularon índices (Lagerqvist et al., 2001). En la Figura 2, se puede apreciar la distribución de las absorbancias para el caso de IgG contra caseínas. Los puntos de corte para gliadinas y transglutaminasa se tomaron de datos previos de la misma población (Cabrera-Chávez et al., 2008). Todos los índices ≥ 1 son considerados positivos.

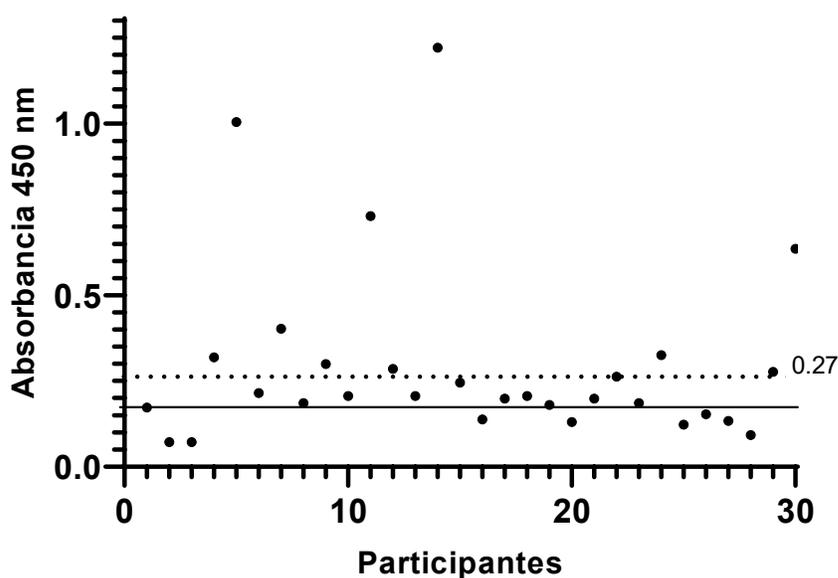


Figura 2. Distribución de absorbancias promedio para anticuerpos IgG contra β -lactoglobulinas de los participantes con DT1. La línea sólida representa la media y la línea punteada representa el punto de corte para β -lactoglobulinas y todos los puntos sobre ésta, se consideran positivos.

Se obtuvo un punto de corte de 1.45 para IgG contra caseínas, 0.270 para β -lactoglobulina, 0.260 para goma xantana, 0.344 para carragenina, 0.372 para pectina, 0.331 para goma arábica y 0.340 para goma guar. En la Tabla 3, se muestran los datos de los participantes que resultaron positivos para cada uno de los antígenos en estudio. Los participantes se agruparon de acuerdo con la presencia o ausencia de genes asociados a permeabilidad intestinal perturbada.

Tabla 3. Inmunoreactividad de IgG contra proteínas dietéticas e hidrocoloides en participantes con DT1.

Antígeno	DQ-B1*0201 + A1* 0301 (n= 15)	Otras combinaciones (n=15)
Proteínas dietéticas		
Gliadinas	10/15	6/15
Caseínas	2/15	2/15
β -lactoglobulina	6/15	4/15
Hidrocoloides		
Goma xantana	6/15	5/15
κ -Carragenina	6/15	4/15
Pectina	6/15	5/15
Goma arábica	5/15	5/15
Goma guar	5/15	6/15
Maltodextrina	0/15	0/15

No se encontraron diferencias entre los participantes con riesgo genético o sin él a permeabilidad intestinal aumentada sobre la producción de anticuerpos IgG contra proteínas dietéticas e hidrocoloides ($p < 0.05$). Se pudiera pensar que aumenta el número de casos con anticuerpos IgG contra los antígenos proteicos en aquellos participantes con los genes de riesgo, pero estos son similares entre los que tienen y no tienen los genes asociados a permeabilidad aumentada, en todos los tratamientos.

Se encontró, que 4/30, 16/30 y 10/30 participantes, presentaron anticuerpos IgG contra caseínas, gliadinas y β -lactoglobulina, respectivamente. Por su parte, 10/30 participantes tuvieron positividad a carragenina y goma arábica y 11/30 a goma xantana, pectina y goma guar. Esto puede indicar que estos participantes se encuentran en un proceso inflamatorio, con la permeabilidad alterada y por tanto los antígenos de la dieta se han internalizado en la lámina propia, induciendo la producción de anticuerpos.

De entre los 30 niños con DT1, contrastan dos casos: P9 y P13 (Tabla 2). El primero de 11 años de edad y muy reciente debut, presentó autoanticuerpos contra la TG, aunque su riesgo genético era muy bajo para EC. El segundo caso, es un adolescente de 17 años, con más de 4 años de evolución de DT1 y factores de riesgo altos para EC, pero sin autoanticuerpos contra la TG, característicos de esa enfermedad. En los siguientes párrafos se describen otros factores asociados al desencadenamiento de la EC.

El niño P9, con menos de un mes de evolución de DT1, solo presentó anticuerpos IgG contra caseínas, de entre todas las pruebas realizadas. Nació por parto vaginal, en tiempo de gestación completo, tuvo un solo tratamiento con antibiótico durante su primer año de vida; fue amamantado parcialmente solo 3 meses y a los 7 meses, se le introdujeron cereales. Presentó distensión abdominal, meteorismo y constipación, los cuales son algunos síntomas de EC, desde 2.5 años antes del diagnóstico de DT1. Esta última, se desarrolló con síntomas clásicos. Podría ser que la EC se desarrollara mucho antes que la DT1, con los síntomas gastrointestinales descritos, pero sin mucho daño en la mucosa intestinal.

El caso P13 presenta una genética de riesgo muy alta para EC, pero no la evidencia. Esto a pesar de que su permeabilidad intestinal debe estar perturbada ya que presentó anticuerpos IgG contra las tres proteínas y los cinco hidrocoloides analizados. Sus antecedentes perinatales son también factores de riesgo para EC: nacimiento por cesárea, de embarazo con complicaciones y 8 meses de gestación. Recibió 5 tratamientos con antibióticos durante su primer año y fue amamantado solo 2 meses. Se inició la introducción de cereales a los 5 meses. La DT1 se desarrolló con síntomas clásicos, incluyendo una pérdida excesiva de peso.

Hay diversos factores involucrados en el desarrollo de DT1 y EC, como lo son factores perinatales, dieta y microbiota que en conjunto conllevan a una mejor explicación del

desarrollo de la enfermedad (Mejía-León y Calderón de la Barca, 2015). En la misma población de niños sonorenses, un estudio previo refiere la producción de anticuerpos IgG contra caseínas en 20/47 y contra β -lactoglobulinas en 15/47 niños con DT1, lo que se considera indicción indirecta de permeabilidad intestinal perturbada (Mejía-León y Calderón de la Barca, 2016). Los resultados en nuestro estudio son comparables solo para β -lactoglobulina, quizá debido a diferencias en la alimentación o el tiempo de evolución y grado de control de la DT1.

Algunas proteínas dietarias, como las gliadinas del trigo, pueden internalizarse a la lámina propia por diferentes mecanismos, ocasionando la producción de anticuerpos. Atraviesan la mucosa intestinal por complejos inmunes mediados por IgA (IgA-gliadina), que hacen que lleguen intactas al lumen intestinal. Esto debido a receptores CD71 en los enterocitos, que dan paso al inmunocomplejo, donde posteriormente se da una respuesta inmune anómala en sujetos con predisposición genética (Matysiak-Budnik et al., 2008).

Las proteínas como las caseínas y β -lactoglobulina, no son completamente hidrolizadas y los péptidos se internalizan a la lámina propia induciendo la producción de anticuerpos. Las β -caseínas tienen homología con la proteína GLUT-2 (transportador de glucosa-2), en la superficie de las células productoras de insulina. En personas genéticamente susceptibles a DT1, se pueden presentar reacciones cruzadas entre los anticuerpos contra β -caseínas y el GLUT-2, pudiendo promover el desarrollo de la enfermedad (Alting et al., 1997; Chia et al., 2017).

Los hidrocoloides en estudio son emulsionantes y de acuerdo con Csáki (2011), tienen la particularidad de alterar la permeabilidad intestinal. Lugea et al. (2000), estudiaron la relación entre la hidrofobicidad y la permeabilidad intestinal en ratas. Descubrieron que el tratamiento con un agente tensoactivo no iónico redujo la hidrofobicidad superficial y aumentó la permeabilidad colónica, haciendo al intestino más sensible a los antígenos.

El análisis de inmunoreactividad de IgG contra proteínas e hidrocoloides, es una forma indirecta de inferir el estado de la permeabilidad intestinal en los niños participantes (Mejía-León y Calderón de la Barca, 2016).

6.4. Asociación de Permeabilidad Intestinal y Consumo de Aditivos Alimentarios

De los 18 participantes previamente incluidos en el estudio de Aguilar-Salido (2017), 13 presentaron permeabilidad aumentada, medida como lactulosa plasmática después de 1 h de ingestión. Además, 9 de esos mismos niños, presentaron la genética de riesgo para permeabilidad intestinal aumentada; lo cual no fue buen predictor de la permeabilidad afectada, ya que no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) entre los que presentaron permeabilidad y los que no.

En nuestro estudio, se buscó la asociación de los datos de permeabilidad intestinal medida con la prueba de lactulosa con la presencia de anticuerpos IgG contra los 5 hidrocoloides y las 3 proteínas. El modelo de predicción explica un 86.1% de la permeabilidad intestinal ($p=0.043$), por la presencia de los anticuerpos IgG contra esos antígenos. En otras palabras, hay más del 86% de probabilidad de que entre los consumidores de estos aditivos, se pueda presentar alteración en la mucosa intestinal. En las variables del modelo ninguna fue significativa *per se*, pero en conjunto, se refuerza la explicación de la permeabilidad incrementada (Tabla 4).

La maduración del tracto gastrointestinal es un proceso dinámico desde el nacimiento y puede evaluarse midiendo la permeabilidad intestinal. Ésta, es menos selectiva al nacimiento y va gradualmente haciéndose más selectiva en las primeras semanas de vida. Diversos factores se ven involucrados en el proceso de maduración del intestino, como las semanas de gestación y el tipo de lactancia y alimentación (Colomé et al., 2006).

Por otra parte, se pueden evaluar marcadores de inflamación, como lo son algunas citocinas. Éstas, pueden perturbar la permeabilidad intestinal, modificando el arreglo conformado por los complejos proteínicos de las uniones estrechas, induciendo aumento del transporte paracelular (Capaldo y Nusrat, 2009). Si bien, en personas genéticamente susceptibles o ya con diagnóstico de DT1 y EC, hay un estado de inflamación, se pueden exacerbar síntomas e inclusive propiciar el desarrollo de EC, en aquellas con DT1.

La genética es necesaria para el desarrollo tanto de DT1 como de EC. Sin embargo, los análisis de este trabajo entre grupos con la combinación de alelos de riesgo para permeabilidad aumentada, no hay diferencias. Hasta este punto, los valores de

permeabilidad intestinal se explican por la presencia de los anticuerpos contra los antígenos dietarios en estudio, por el consumo de alimentos ultra-procesados. Por lo que se puede inferir que la permeabilidad, más que por la genética, está principalmente influenciada por la dieta.

Tabla 4. Componentes del modelo estadístico de asociación de permeabilidad intestinal y presencia de anticuerpos IgG contra proteínas dietarias e hidrocoloides.

Variables	R	R²	Nivel de probabilidad
Modelo		0.8611	0.0043*
Gliadinas	-0.4793	0.0070	0.5435
B-lactoglobulina	-0.0874	0.0014	0.7814
Caseínas	0.1872	0.0102	0.4659
Goma xantana	1.2425	0.0200	0.3144
Carragenina	-0.5857	0.0146	0.3866
Pectina	0.1288	0.0009	0.8238
Goma arábica	0.3250	0.0026	0.7079
Goma guar	-0.1943	0.0065	0.5562

Regresión lineal múltiple, *, diferencia estadística ($p < 0.05$)

6.5. Evaluación de Perfil Proinflamatorio y Permeabilidad en Células IEC-18

En los retos con los aditivos alimentarios a las células IEC-18 en cultivo, se encontraron diferencias entre los tratamientos con respecto al grupo control, tanto en la cuantificación de IL-6 como en IFN- γ ($p < 0.05$). Goma arábica, carragenina y pectina por sí solas, indujeron una mayor producción de IL-6 con respecto al control y a goma guar y goma xantana. También, en el tratamiento con la mezcla de los 5 aditivos hubo una mayor

concentración de esta citocina ($p < 0.05$), con respecto al grupo control (Figura 3A). En relación con la producción de IFN- γ , solamente el tratamiento con carragenina aumentó la producción de esta citocina ($p < 0.05$), comparada con el resto de los tratamientos y al control (Figura 3B). Sin embargo, aunque significativos, estos valores no son fisiológicos.

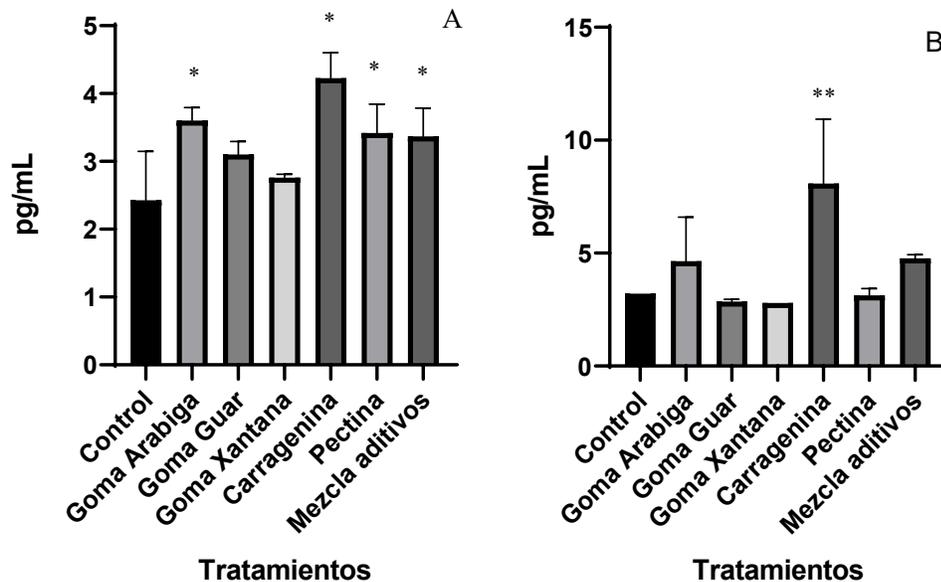


Figura 3. Comparación de tratamientos para cada citocina. A: cuantificación de IL-6. B: cuantificación de IFN- γ . ANOVA, comparación de medias por Tukey-Kramer *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

Asimismo, en el análisis de permeabilidad de la monocapa de células IEC-18, los tratamientos la afectaron significativamente ($p < 0.0001$), en comparación con el control. En la Figura 4, se observa que las gomas arábica y xantana, carragenina y pectina aumentaron el flujo a través de la monocapa ($p < 0.05$), en comparación con goma guar y la mezcla de aditivos. Además, disminuyeron los valores de la resistencia transepitelial en los tratamientos con respecto al control, con excepción de la goma guar (tabla 5).

Tabla 5. Valores de resistencia transepitelial en células IEC-18

Tratamiento	Medición 1 ($\bar{X} \pm DE K\Omega$)	Medición 2 ($\bar{X} \pm DE K\Omega$)	Diferencia Med 1 – Med 2 ($\bar{X} \pm DE K\Omega$)
Goma arábica	121.3 ± 0.57	104.6 ± 0.57	16.6 ± 0.57 †
Goma guar	120.0 ± 2.00	115.6 ± 2.08	4.3 ± 2.04
Goma xantana	117.6 ± 1.52	102.0 ± 1.00	15.6 ± 1.29 †
Carragenina	120.0 ± 1.00	102.6 ± 0.66	17.3 ± 1.08 *
Pectina	124.3 ± 0.57	106.6 ± 1.52	17.6 ± 1.15 *
Mezcla de aditivos	121.6 ± 1.15	102.0 ± 2.64	19.6 ± 2.04 *
Control	115.6 ± 1.52	112.0 ± 2.00	3.6 ± 1.77

Prueba de T pareada

* p < 0.01

† p < 0.001

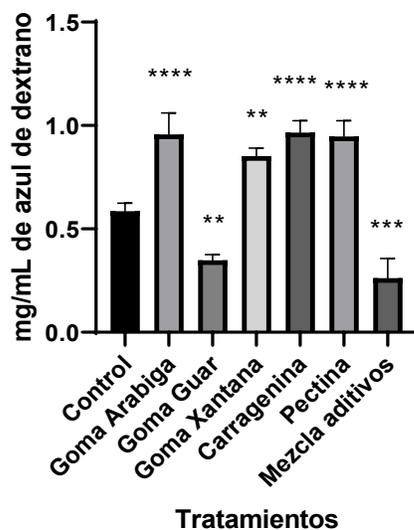


Figura 4. Análisis de permeabilidad en células IEC-18 entre tratamientos. ANOVA, Tukey-Kramer. Símbolos diferentes, significan diferencias estadísticas entre tratamientos. **: p < 0.005; ***: p < 0.0005; ****: p < 0.0001.

Los resultados de otros autores en cuanto al efecto de la carragenina en líneas celulares, son contradictorios. Bhattacharyya et al. (2013), demostraron que puede inducir la producción de IL-6 por el reconocimiento de TLR-4, en la superficie de células intestinales, como ocurrió en nuestro trabajo. Por el contrario, McKim et al. (2016), refieren que este aditivo no mostró efectos sobre la permeabilidad, la producción de citocinas IL-8 e IL-6 ni sobre el estrés oxidativo, en dos líneas celulares intestinales humanas <<HCT-8 y HT-29>>.

En oposición a los hallazgos de nuestro trabajo, se ha demostrado que la pectina tiene capacidad de atenuar la producción de citocinas proinflamatorias. Bermudez-Brito et al. (2015), demostraron que hay una disminución en la producción de IL-6 y otras citocinas proinflamatorias, en células dendríticas. Esto por los TLR, que reconocen las fibras, modulando la respuesta inmune de un perfil proinflamatorio a uno antiinflamatorio. De acuerdo con nuestro estudio, se ha demostrado que la goma guar tiene efecto protector sobre la permeabilidad celular. Majima et al. (2017), estimularon monocapa de células CACO-2 con IFN- γ , para alterar la permeabilidad, y la trataron con 10 mg/mL de goma guar. Encontraron que los valores de TEER no variaron y disminuyó el flujo paracelular. La IL-6, incrementa la permeabilidad en células epiteliales debido a la liberación de zonulina y por el reordenamiento de proteínas de actina e incremento de su contracción (Desai et al., 2002). También tiene la capacidad de disminuir los niveles de resistencia transepitelial e incrementar el flujo paracelular de manitol a través de la monocapa de células epiteliales CACO-2 (Tazuke et al., 2003). Al-Sadi et al. (2014) encontraron que la IL-6 modula la permeabilidad en células CACO-2 mediante la vía de activación de factores de transcripción AP-1. Éstos, promueven la activación de genes de claudina-2 (proteína asociada a los canales de flujo de agua), induciendo la transcripción y expresión de estas proteínas, lo cual incrementa la permeabilidad (Rosenthal et al., 2010).

Al igual que la IL-6, el IFN- γ promueve el reordenamiento de las proteínas de las uniones estrechas (Capaldo y Nusrat, 2009). Esto, por la contracción de las proteínas de miosina, promoviendo la endocitosis de las uniones estrechas, causando un aumento en la permeabilidad (Bruewer et al., 2005).

La Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, especifica las concentraciones máximas permitidas de cada aditivo en los alimentos. Las concentraciones de los aditivos

empleados en este estudio de acuerdo con la norma son de 1 mg/mL para carragenina, goma xantana y goma guar, y de 10 mg/mL para pectina en fórmulas infantiles, y para cualquier otro grupo de alimentos, está permitido el uso de forma libre hasta obtener el resultado o función tecnológica deseada.

A concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$, se encontró que hay inducción de citocinas proinflamatorias y hay perturbación en monocapa celular como modelo de permeabilidad. El consumo cotidiano de los alimentos ultra-procesados con sus aditivos, aunado al desbalance de nutrientes, podrían inducir un estado de inflamación constante. La presencia de genes de riesgo a EC en personas con DT1 y el consumo cotidiano de estos aditivos, pudiese influir en el desarrollo de EC, por la producción de citocinas proinflamatorias y el aumento de la permeabilidad intestinal.

7. CONCLUSIÓN

El total de los niños del estudio, tiene genética de riesgo asociada al desarrollo EC, en algún grado y la mitad, presenta la combinación de alelos de riesgo a permeabilidad aumentada, aunque no se encontró efecto significativo debido a esto. Los niños participantes presentaron IgG contra los antígenos proteicos: gliadinas, caseínas y β -lactoglobulinas y hacia hidrocoloides: goma guar, goma xantana, pectina, goma arábica y carragenina; de donde se infiere perturbación de la permeabilidad intestinal, con una correlación del 86.1%. Esto es, hay más del 86% de probabilidad de que los participantes, al consumir estos aditivos, puedan padecer perturbación en su permeabilidad intestinal. Por consiguiente, no sería el factor genético el de mayor influencia sobre la perturbación de la mucosa intestinal, sino la dieta.

Los retos con los aditivos no lograron estimular significativamente la producción de citocinas proinflamatorias en las células IEC-18, pero sí se detectó un efecto sobre la permeabilidad de la monocapa. Las gomas arábica y xantana, carragenina y pectina, aumentaron el flujo paracelular, así como también disminuyeron los valores de TEER, en la monocapa celular.

Así, el consumo crónico de algunos aditivos en alimentos ultra-procesados, podría aumentar el riesgo a desarrollar EC, que de por sí ya tienen los pacientes con DT1, porque padecen un proceso inflamatorio y tienen la genética y otros factores de riesgo comunes para ambas enfermedades.

8. RECOMENDACIONES

Dado a que se encontró producción de citocinas proinflamatorias en el modelo celular empleado, para tener mejor inferencia del proceso inflamatorio, se recomienda emplear retos con células del sistema inmune humano. Así mismo, la prevención del consumo de alimentos ultra-procesados mediante pláticas o talleres nutricionales, pudiera ayudar a evitar el desarrollo de una segunda enfermedad autoinmune, como la EC, en los pacientes con DT1.

9. REFERENCIAS

- Abbas A.K., Litchman A.H. y Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. Séptima edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España.
- ADA. American Diabetes Association. 2017. Classification and diagnosis of diabetes. Standards of medical care in diabetes-2017. *Diabetes care* 40: S11-S24.
- ADA. American Diabetes Association. 2018. Classification and diagnosis of diabetes. Standards of medical care in diabetes-2018. *Diabetes Care* 41: S126-S136.
- Adebola O., Corcoran O. y Morgan W.A. 2013. Protective effects of prebiotics inulin and lactulose from cytotoxicity and genotoxicity in human colon adenocarcinoma cells. *Food Research International* 52: 269-274.
- Aguayo-Patrón S., Beltrán-Sauceda L. y Calderón de la Barca A.M. 2016. A population-wide applicable HLA-DQ2 and DQ8 genotyping using DNA from dried blood spots and duplex allele-specific qPCR amplification. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 76: 581-587.
- Aguilar Salido A.d.C. (2017). Permeabilidad intestinal, disbiosis y dieta asociadas a diabetes tipo 1. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Al-Sadi R., Ye D., Boivin M., Guo Sh., Hashimi M., Ereifej L. y Ma T.Y. 2014. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLOS ONE* 9: e85345.
- Alkanani A.K., Hara N., Gottlieb P.A., Ir D., Robertson C.E., Wagner B.D., Frank D.N. y Zipris D. 2015. Alterations in intestinal microbiota correlate with susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* 65: 3510-3520.
- Alting A.C., Meijer R.J.G.M. y Van Beresteijn E.C.H. 1997. Incomplete elimination of the ABBOS epitope of bovine serum albumin under simulated gastrointestinal condition of infants. *Diabetes Care* 20: 875-880.
- Badami E., Sorini C., Coccia M., Usuelli V., Molteni L., Bolla A.M., et al. 2011. Defective differentiation of regulatory FoxP3+ T cells by small-intestinal dendritic cells in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 60: 2120-2124.
- Bassaganya-Riera J., DiGuardo M., Viladomiu M., de Horna A., Sanchez S., Einerhand A.W.C., et al. 2011. Soluble fibers and resistant starch ameliorate disease activity in interleukin-10-deficient mice with inflammatory bowel disease. *The Journal of Nutrition* 141: 1318-1325.
- Bayarri S., Chuliá I. y Costell E. 2010. Comparing λ -carrageenan and an inulin blend as fat replacers in carboxymethyl cellulose dairy desserts. Rheological and sensory aspects. *Food Hydrocolloids* 24: 578-587.
- Bermudez-Brito M., Sahasrabudhe N.M., Rösch C., Schols, H.A., Faas M.M., y de Vos P. 2015. The impact of dietary fibers on dendritic cell responses in vitro is dependent

on the differential effects of the fibers on intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 59: 698-710.

- Bhattacharyya S., Dudeja P.K. y Tobacman J.K. 2008. Carrageenan-induced NF κ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27 or by Bcl10. *Biochimica et Biophysica Acta* 1780: 973-982.
- Bhattacharyya S., Xue L., Deckota S., Chang E., Morris S. y Tobacman J.K. 2013. Carrageenan-induced colonic inflammation is reduced in Bcl10 null mice and increased in IL-10-deficient mice. *Mediators of inflammation*. 2013: 397642.
- Biang X., Chi L., Gao B., Tu P., Ru H. y Lu K. 2017. Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Frontiers in Physiology*, 8: 487.
- Bischoff S.C., Barbara G., Buurman W., Ockhuizen T., Schulzke J-D., Serino M., et al. 2014. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *Gastroenterology* 14:189.
- Bondar C., Araya R.E., Guzman L., Cueto Rua E., Chopita N. y Chirido F.G. 2014. Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PLOS ONE* 9: e89068.
- Boudraa G., Hachelaf W., Benbouabdellah M., Belkadi M., Benmansour F.Z. y Touhami M. 1996. *Acta Pæditrica* S412: 58-60.
- Bruewer M., Utech M., Ivanov A.I., Hopkins A.M., Parkos C.A., Nusrat A. 2005. Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *The FASEB Journal* 19: 923-933.
- Cabrera-Chávez F., Rouzaud-Sández O., Sotelo-Cruz N. y Calderón de la Barca A.M. 2008. Transglutaminase treatment of wheat and maize prolamins and bread increases the Serum IgA reactivity of celiac disease patients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 1387-1391.
- Calderón de la Barca A.M. y Mejía León M.E. 2017. La dieta sin gluten debe administrarse solo a niños con diagnóstico de enfermedad celiaca asociada al trigo. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora* 34: 99-108.
- Calderón de la Barca A.M. y Sigala-Robles R. 2018. Comment on Microbial Transglutaminase Used in Bread Preparation at Standard Bakery Concentrations Does Not Increase Immunodetectable Amounts of Deamidated Gliadin. *Journal of Agricultural Food Chem.* 66:748.
- Camarca M.E., Mozzillo E., Nugnes R., Zito E., Falco M., Fattorusso V., et al. 2012. Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Italian Journal of Pediatrics* 38: 10.
- Cani D.P. y Everard A. 2015. Keeping gut lining at bay: impact of emulsifiers. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 25: 273-274.
- Canova C., Pitter G., Ludvigsson J.F., Romor P., Zanier L., Zanotti R. y Simonato L. 2016. Celiac disease and risk of autoimmune disorders: a population-based matched birth cohort study. *The Journal of Pediatrics* 174: 146-152.

- Capaldo C.T. y Nusrat A. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1788: 753-910.
- Capriles V.D. y Arêas J.A.G. 2013. Effects of prebiotic inulin-type fructans on structure, quality, sensory acceptance and glycemic response of gluten-free breads. *Food & Function* 4: 104.
- Capriles V.D., dos Santos F.G. y Arêas J.A. G. 2016. Gluten-free breadmaking: Improving nutritional and bioactive compounds. *Journal of Cereal Science* 67: 83-91.
- Cassani L., Tomadoni B., Moreira M.R., Ponce A. y Agüero M.V. 2017. Optimization of inulin: Oligofructose proportion and non-thermal processing to enhance microbiological and sensory properties of fiber enriched strawberry juice. *LWT – Food Science and Technology* 80: 446-455.
- Catassi C. y Fasano A. 2010. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *The American Journal of Medicine* 123: 691-693.
- Chassaing B., Koren O., Goodrich J., Poole A., Srinivasan S., Ley R.-E. y Gewirtz T. 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 519: 92-96.
- Chia J.S.J., McRae J.L., Kukuljan S., Woodford K., Elliott R.B., Swinburn B. y Dwyer K.M. 2017. A1 beta-casein milk protein and other environmental pre-disposing factors for type 1 diabetes. *Nutrition & Diabetes* 7: e274.
- Chmiel R., Beyerlein A., Knopff A., Hummel S., Ziegler A-G. y Winkler C. 2015. Early infant feeding and risk of developing islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Acta Diabetologica* 52: 621-624.
- Choi H.J., Kim J., Park S-H., Do K.H., Yang H. y Moon Y. 2012. Pro-inflammatory NFκB and early growth response gene 1 regulate epithelial barrier disruption by food additive carrageenan in human intestinal epithelial cells. *Toxicology Letters* 211: 289-295.
- Codex Alimentarius commission*. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. ALINORM 09/32/26.
- Codex Alimentarius commission*. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. CAC/GL 3-1989.
- Collar C., Conte P., Fadda C. y Piga A. 2014. Gluten-free dough-making of specialty breads: Significance of blended starches, flours and additives on dough behaviour. *Food Science and Technology International* 21: 523-536.
- Colomé G., Sierra C., Blasco J., García, M.V., Valverde E. y Sánchez E. 2006. Intestinal permeability in different feedings in infancy. *Acta Pædiatrica* 96: 69-72.
- Conte P., Fadda C., Piga A. y Collar C. 2016. Techno-functional and nutritional performance of commercial breads available in Europe. *Foods Science and Technology International* 22: 621-633.
- Csáki K. F. 2011. Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. *Medical Hypotheses* 76: 676-681.

- Dabelea D., Mayer-Davis E.J., Saydah S., Imperatore G., Linder B., Divers J., Bell R., Badaru A., Talton J.W., Crume T., D. Liese A., Merchant A.T., Lawrence J.M., Reynolds K., Dolan L., Liu L.L. y Hamman R.F. 2014. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 – 2009. *JAMA* 311: 1778-1786.
- Davis-Richardson A.G. y Triplett E.W. 2015. A model for the role of gut bacteria in the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *Diabetologia* 58: 1386-1393.
- Dekking E.H.A., Van Veelen P.A., de Ru A., Kooy-Winkelaar E.M.C, Gröneveld T., Nieuwenhuizen W.F. y Koning F. 2008. Microbial transglutaminases generate T cell stimulatory epitopes involved in celiac disease. *Journal of Cereal Science* 47: 339-346.
- Desai T.R., Leeper N.J., Hynes K.L. y Gewertz B.L. 2002. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway. *Journal of Surgical Research* 104: 118-123.
- Di Cristo L., Movia D., Bianchi M.G., Allegri M., Mohamed B.M., Bell A.P., et al. 2016. Proinflammatory effects of pyrogenic and precipitated amorphous silica nanoparticles in innate immunity cells. *Toxicological Sciences* 150: 40-53.
- Di Sabatino A. y Corazza G.R. 2009. Coeliac disease. *Lancet* 373: 1480-1493.
- Di Sabatino A., Vincenzo Lenti N., Giuffrida P., Vanoli A. y Corazza G.R. 2015. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmunity Reviews* 14: 1161-1169.
- Dietert R.R. 2014. The microbiome in early life: self-completion and microbiota protection as health priorities. *Birth Defects Research (Part B)* 101: 333-340.
- Doo E-H., Chassard C., Schwab C. y Lacroix C. 2017. Effect of dietary nucleosides and yeast extract on composition and metabolic activity of infant gut microbiota in PolyFermS colonic fermentation models. *FEMS Microbiology Ecology* 93: fix088.
- Elamin S., Alkhawaja M. J., Bukhamsin A. Y., Idris M. A. S., Abdelrahman M. M., Abutaleb N. K. y Housawi A. A. 2017. Gum Arabic reduces C-reactive protein in chronic disease patients without affecting urea or indoxyl sulfate levels. *International Journal of Nephrology* 2017: 9504740.
- El-Salhy M. 2012. Irritable bowel syndrome: diagnosis and pathogenesis. *World of Journal of Gastroenterology* 18: 5151-5163.
- El-Salhy M., Gilja O.H., Gundersen D., Hatlebakk J.G. y Hausken T. 2014. Interaction between ingested nutrients and gut endocrine cells in patients with irritable bowel syndrome (review). *International Journal of Molecular Medicine* 34: 363-371.
- Eswaran S., Tack J. y Chey W. D. 2011. Food: The forgotten factor in the irritable bowel syndrome. *Gastroenterology Clinics North America* 40: 141-162.
- Fasano A. 2011. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: The biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiological Reviews* 91: 151-175.

- Fasano A. 2012a. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1258: 25-33.
- Fasano A. 2012b. Intestinal permeability and its regulation by zonulin: diagnostic and therapeutic implications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 10: 1096-1100.
- Fasano A. 2012c. Leaky gut and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology* 42: 71-78.
- Fiorentino M., Levine M.M., Sztein M.B. y Fasano A. 2014. Effect of wild-type *Shigella* species and attenuated *Shigella* vaccine candidates on small intestinal barrier function, antigen trafficking, and cytokine release. *PLOS ONE* 9: e85211.
- Gao H-T., Xu, R., Cao W-X., Zhou X., Yan Y-H-M., Lu L., et al. 2016. Food emulsifier glycerin monostearate increases internal exposure levels of six priority controlled phthalate esters and exacerbates their male reproductive toxicities in rats. *PLOS ONE* 11: e0161253.
- Giongo A., Gano K.A., Crabb D.B., Mukherjee N., Novelo L.L., Casella G., et al. 2011. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The International Society for Microbial Ecology Journal* 5: 82-91.
- Glade M.J., Meguid M.M. y M.F.A. 2016. A glance at... dietary emulsifiers, the human intestinal mucus and microbiome, and dietary fiber. *Nutrition* 32: 609-614.
- Goh C. y Banerjee k. 2007. Prevalence of coeliac disease in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus in a clinical based population. *Postgraduate Medical Journal* 83: 132-136.
- Gómez-Díaz R.A., Pérez G., Hernández-Cuesta I.T., Rodríguez-García J. del C., Guerrero-López R., Aguilar-Salinas C.A. y Wachter N.H. 2012. Incidence of type 1 diabetes in Mexico: data from an institutional register 2000-2010. *Diabetes Care* 35: e77.
- Guo Z., Martucci N.J., Moreno-Olivas F., Tako E. y Mahler G.J. 2017. Titanium dioxide nanoparticle ingestion alters nutrient absorption in an *in vitro* model of the small intestine. *NanoImpact* 5: 70-82.
- Hagopian W., Lee H-S., Liu E., Rewers M., She J-X., Ziegler A. G., et al. 2017. Co-occurrence of type 1 diabetes and celiac disease autoimmunity. *Pediatrics* 140: e20171305.
- Hardy M.Y. y Tye-Din J.A. 2016. Coeliac disease: a unique model for investigating broken tolerance in autoimmunity. *Clinical & Translational Immunology* 5: e112.
- Hayes P.A., Fraher M.H. y Quigley E.M.M. 2014. Irritable bowel syndrome: the role of Food in pathogenesis and management. *Gastroenterology & Hepatology* 10: 164-174.
- Heil A., Osham J., Büchold C., Pasternack R., Yokoyama K., Kumazawa Y. y Hils M. 2017. Microbial transglutaminase has a lower deamidation preference than human tissue transglutaminase on a celiac disease relevant wheat gliadin T-cell epitope. *Journal of Cereal Science* 70: 47-56.

- Husby S., Koletzko S., Korponay-Szabó I.R., Mearin M.L., Phillips A., Shamir R., et al. 2012. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 54: 136-160.
- Ishidate Jr M., Sofuni T., Yoshikawa K., Hayashi M., Nohmi T., Sawada M. y Matsuoka A. 1984. Primary mutagenicity screening of Food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology* 22: 623-636.
- Ishisono K., Yabe T. y Kitaguchi K. 207. Citrus pectin attenuates endotoxin shock via suppression of Toll-like receptor signaling in Peyers patch myeloids cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* 50: 38-45.
- Ivanov A.I. 2012. Structure and regulation of intestinal epithelial tight junctions: Currents concepts and unanswered questions. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 763: 132-148.
- Jaberi-Douraki M., Liu S.W., Pietropaolo M. y Khadra A. 2014. Autoimmune responses in T1DM: quantitative methods to understood onset, progression and prevention of disease. *Pediatric Diabetes* 15: 162-174.
- Joshi A. S., Varthakavi P. K., Bhagwat N. M., Chadha M. D. y Mittal S. S. 2014. Coeliac autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Arab Journal of Gastroenterology* 15: 53-57.
- Kieliszek M. y Misiewicz A. 2014. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica* 59: 241-250.
- Kiewiet M. B. G., Dekkers R., Ulfman L. H., Groeneveld A., de Vos P. y Faas M. M. 2018. Immunomodulating protein aggregates in soy and whey hydrolysates and their resistance to digestion in an *in vitro* infant gastrointestinal model: new insights in the mechanism of immunomodulatory hydrolysates. *Food & Function* 9: 604-613.
- Korpela K., Salonen A., Virta L.J., A. Kekkonen R., Forslund K., Bork P. y M. de Vos W. 2016. Intestinal microbiome is related to lifetime antibiotic use in Finnish pre-school children. *Nature Communications* 7: 10410.kiel
- Kostic A. D., Gevers D., Siljander H., Vatanen T., Hyötyläinen T., Hämäläinen A-M., et al. 2015. The dynamics of the human infant gut microbiome in development and in progression towards type 1 diabetes. *Cell Host & Microbiome* 17: 260-273.
- Kuitunen M., Saukkonen T., Ilonen J., Åkerblom H.K. y Savilahti E. 2002. Intestinal permeability to mannitol and lactulose in children with type 1 diabetes with the HLA-DQB1*02 allele. *Autoimmunity* 35: 365-368.
- Lagerqvist C., Ivarsson A., Juto P., Persson L. A. y Hernell O. 2001. Screening for adult coeliac disease; which serological marker(s) to use? *Journal of Internal Medicine* 250: 241-248.
- Laitinen A.U., Agardh D., Kivelä L., Huhtala L., Lähdeaho M-L., Kaukinen L. y Kurppa K. 2017. Coeliac patients detected during type 1 diabetes surveillance had similar issues to those diagnosed on a clinical basis. *Acta Paediatrica* 106: 639-646.

- Lammers K.M., Lu R., Brownley J., Lu B., Gerard C., Thomas K., et al. 2008. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135: 194-204.
- Lanzini A., Lanzarotto F., Villanacci V., Mora A., Bertolazzi S., Turini D., et al. 2009. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 29: 1299-1308.
- Larsen J., Weile C., Antvorskov J.C., Engkilde K., Borch Nielsen S.M., Josefsen K. y Buschard K. 2015. Effect of dietary gluten on dendritic cells and innate immune subsets in BALB/c and NOD mice. *PLOS ONE* 10: e0118618.
- Lechuga S. e Ivanov A. 2017. Disruption of the epithelial barrier during intestinal inflammation: Quest for new molecules and mechanisms. *Molecular Cell Research* 1864: 1183-1194.
- Leffler D.A., Green P.H.R. y Fasano A. 2015. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nature Reviews* 12: 561-571.
- Lerner A. y Matthias T. 2015a. Possible association between celiac disease and bacterial transglutaminase in food processing: a hypothesis. *Nutrition Reviews* 73: 544-552.
- Lerner A. y Matthias T. 2015b. Food industrial microbial transglutaminase in celiac disease: treat or trick. *International Journal of Celiac Disease* 3:1-6.
- Li J-M. y Nie Sh-P. 2015. The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids* 53: 46-61.
- Lo B., DE Swattord A., Shafer-Weaver K.A., Jerome L.J., Rakhlin L., Mathern D.R., et al. 2011. Antibodies against insulin measured by electrochemiluminescence predicts insulinitis severity and disease onset in non-obese diabetic mice and can distinguish human type 1 diabetes status. *Journal of Translational Medicine* 9:203.
- Løvik A., Skodje G., Bratlie J., Brottveit M. y Lundin K.E. A. 2017. Diet adherence and gluten exposure in coeliac disease and self-reported non-coeliac gluten sensitivity. *Clinical Nutrition* 36: 275-280.
- Lugea A., Cassalot J., Guarner F. y Malagelada J-R. 2000. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* 46: 515-521.
- Magaña-Gómez J. y Calderón de la Barca A.M. 2017. Human Health Concerns Related to the Consumption of Foods from Genetically Modified Crops. Capítulo 12. En: Coll, M. y Wajnberg, E: *Environmental Pest Management: Challenges for Agronomists, Ecologists, Economists and Policymakers*. Primera edición. John Wiley & Sons Ltd: 275-296.
- Majima A., Handa O., Naito Y., Suyama Y., Onozawa Y., Higashimura Y., et al. 2017. Real-time monitoring of trans-epithelial electrical resistance in cultured intestinal epithelial cells: the barrier protection of water-soluble dietary fiber. *Digestive Diseases* 18: 151-159.

- Mamur S., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F. y Yılmaz S. 2010. Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in Vitro*, 24: 790-794.
- Marietta E.V., Gomez A.M., Yeoman C., Tilahun A.Y., Clark C.R., Luckey D.H., et al. 2013. Low incidence of spontaneous type 1 diabetes in non-obese diabetic mice raised on gluten-free diet is associated with changes in the intestinal microbiome. *PLOS ONE* 8: e78687.
- Mariño E., Richards J.L., McLeod K.H., Stanley D., Yap Y.A., Knight J., et al. 2017. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes. *Nature Immunology* 18: 552-562.
- Martínez Steele E., Popkin B.M., Swinburn B. y Monteiro C.A. 2017. The share of ultra-processed foods and the overall nutritional quality of diets in the US: evidence from a nationally representative cross-sectional study. *Populations Health Metrics*. 15: 6.
- Martino J. V., Limbergen J. V. y Cahill L. E. 2017. The role of carrageenan and carboxymethylcellulose in the development of intestinal inflammation. *Frontiers in Pediatrics* 5: 96.
- Matthias T., Jeremias P., Neidhöfer S. y Lerner A. 2016. The industrial Food additive, microbial transglutaminase, mimics tissue transglutaminase and is immunogenic in celiac disease patients. *Autoimmunity Reviews* 15: 1111-1119.
- Matysiak-Budnik T., Cruz Moura I., Arcos-Fajardo M., Lebreton C., Ménard S., Candalh C., et al. 2008. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of Experimental Medicine* 205: 143-154.
- McKim J. M., Bass H., Rice G. P., Willoughby Sr. J. A., Weiner M. L. y Blakemore W. 2016. Effects of carrageenan on cell permeability, cytotoxicity, and cytokine gene expression in human intestinal and hepatic cell lines. *Food and Chemical Toxicology* 96: 1-10.
- Mejía-León M. E. y Calderón de la Barca A. M. 2016. Serum IgG subclasses against dietary antigens in children with type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Research and Therapy* 2(1). DOI: <http://dx.doi.org/10.16966/2380-5544.115>.
- Mejía-León M.E., Petrosino, J.F., Ajami N.J., Domínguez-Bello M.G. y Calderón de la Barca A.M. 2014. Fecal microbiota imbalance in Mexican children with type 1 diabetes. *Scientific Reports* 4: 3814.
- Mejía-León M.E., Ruiz-Dyck K.M. y Calderón de la Barca A.M. 2015. Gradiente de riesgo genético HLA-DQ para diabetes tipo 1 y enfermedad celiaca en el noroeste de México. *Revista de Gastroenterología de México* 80: 135-143.
- Mejía-León M.E. y Calderón de la Barca A.M. 2015. Perinatal factors and type 1 diabetes-associated dysbiosis in Mexican infants. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* 72: 333-338.
- Meresse B., Malamut G. y Cerf-Bensussan N. 2012. Celiac Disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36: 907-919.

- Miranda J., Lasa A., Bustamante M.A., Churruca I. y Simon E. 2014. Nutritional differences between a gluten-free diet and a diet containing equivalent products with gluten. *Plant Foods for Human Nutrition* 69: 182-187.
- Molberg Ø., Kett K., Scott H., Thorsby E., Sollid L. M. y Lundin K. E. A. 1997. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scandinavian Journal of Immunology* 46: 103-108.
- Monteiro C.A., Moubarac J.-C., Cannon G., Ng S.W. y Popkin B. 2013. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obesity Reviews* 14: 21-28.
- Moodie R., Stuckler D., Monteiro C., Sheron N., Neal B., Thamarangsi T., et al. 2013. Profits and pandemics: preventions of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. *Lancet* 381: 670-679.
- Murri M., Leiva I., Gomez-Zumaquero J.M., Tinahones F.J., Cardona F., Soriguer F. y Queipo-Ortuño M.I. 2013. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC Medicine* 11: 46.
- Ngemakwe N., Roes-Hill L. y Jideani VA. 2014. Advance in gluten-free bread technology. *Food Science and Technology International* 21: 256-276.
- Nickerson K. P., Homer C. R., Kessler S. P., Dixon L. J., Kabi A., Gordon I. O., et al. 2014. The dietary polysaccharide maltodextrin promotes *Salmonella* survival and mucosal colonization in mice. *PLOS ONE* 9: e101789.
- O'Brien M. y Cairns B. E. 2016. Monosodium glutamate alters the response properties of rat trigeminovascular neurons through activation of peripheral NMDA receptors. *Neuroscience* 334: 236-244.
- Ortiz Sánchez J.P., Mata Haro V., Cabrera Chávez F. y Calderón de la Barca A.M. 2016. Prolamins of maize and wheat differentially affect intestinal cells both in biopsies of celiac patients and CACO-2 cell line. *Food and Agricultural Immunology* 27: 259-272.
- Patrick C., Wang G-S., Lefebvre D.E., Crookshank J.A., Sonier B., Eberhard C., et al. 2013. Promotion of autoimmune diabetes by cereal diet in the presence or absence of microbes associates with gut immune activation, regulatory imbalance, and altered cathelicidin antimicrobial peptide. *Diabetes* 62: 2036-2047.
- Pellegrini N., y Agostoni C. 2015. Nutritional aspects of gluten-free products. *Journal of Science of Food and Agriculture* 95: 2380-2385.
- Pettit D.J., Talton J., Dabelea D., Divers J., Imperatore G., Lawrence J.M., et al. 2014. Prevalence of diabetes in U.S. youth in 2009: The SEARCH for diabetes in youth study. *Diabetes Care* 37: 402-408.
- Phillips G. O. y Williams P. A. 2009. *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing Limited. 2da edición. Great Abington, Cambridge. Pp: 1003
- Png Ch.W., Lindén S.K., Gilshenan K.S., Zoetendal E.G., McSweeney C.S., Sly L.I., et al. 2010. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBS mucosa augment in

- vitro utilization of mucin by other bacteria. *American Journal of Gastroenterology* 105: 2420-2428.
- Remes-Troche J.M., Nuñez-Alvares C. y Uscanga-Dominguez L.F. 2013. Celiac disease in Mexican population: an update. *American Journal of Gastroenterology* 108: 283-284.
- Renaud C., Cardiet C. y Dupont C. 1996. Allergy to soy lecithin in a child. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 22: 328-329.
- Rosenthal R., Milatz S., Krug S.M., Oelrich B., Schulzke J-D., Amasheh S., et al. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular cation channel. *Journal of Cell Science* 123: 1913-1921.
- Russo F., Linsalata M., Clemente C., Chiloiro M., Orlando A., Marconi E., et al. 2012. Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy Young volunteers. *Nutrition Research* 32: 940-946.
- Saito M., Sakagami H. y Fujisawa S. 2003. Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT). *Anticancer Research* 23: 4693-4701.
- Schumann M., Siegmund B., Schulzke J.D. y Fromm M. 2017. Celiac disease: role of the epithelial barrier. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 3: 150-162.
- Sevinç E., Hilmi Cetin F. y Demet Cetin F. y Demet Coşkun B. 2016. Psychopathology, quality of life, and related factors in children with celiac disease. *Journal de Pédiatrie* 93: 267-273.
- Shamriz O., Mizrahi H., Werbner M., Shoenfeld Y., Avni O. y Koren O. 2016. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 15: 859-869.
- Sigala Robles R. (2016). Dieta, microbiota y producción de ácidos grasos de cadena corta en niños sonorenses con enfermedad celiaca. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Stamnaes J. y Sollid L. M. 2015. Celiac disease: autoimmunity in response to food antigen. *Seminars in Immunology* 27: 343-352.
- Sturgeon C. y Fasano A. 2016. Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases. *Tissue Barriers* 4: e1251384.
- Takaqi T., Naito Y., Higashimura Y., Ushiroda Ch., Mizushima K., Ohashi Y., et al. 2016. Partially hydrolysed guar gum ameliorates murine intestinal inflammation in association with modulating luminal microbiota and SCFA. *British Journal of Nutrition* 116: 1199-1205.
- Takeuchi A., Kamiryu Y., Yamada H., Eto M., Shibata K., Haruna K., et al. 2009. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4. *International Immunopharmacology* 9: 1562-1567.

- Tazuke Y., Drongowski R.A., Teitelbaum D.H. y Coran A.G. 2003. Interleukin-6 changes tight junction permeability and intracellular phospholipid content in a human enterocyte cell culture model. *Pediatric Surgery International* 19: 321-325.
- Tennant D.R. y Bruyninckx C. 2017. Th potential application of European market research data in dietary exposure modelling of food additives. *Food Additives & Contaminants: Part A* 35: 4212-424.
- Tollefsen S., Hotta K., Chen X., Simonsen B., Swaminathan K., Mathews I.I., et al. 2012. Structural and functional studies of trans-encoded HLA-DQ2.3 (DQA1*03:01/DQB1*02:01) protein molecule. *Journal of Biology Chemistry* 287: 13611-13619.
- Tripathi A., Lammers K.M., Goldblum S., Shea-Donohue T., Netzel-Arnett S., Buzza M.S., et al. 2009. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 16796-16804.
- Tsouka A., H. Mahmud F. y Marcon M.A. 2015. Celiac disease alone and associated with type 1 diabetes mellitus. *Gastroenterology* 61: 297-302.
- Turner J.R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Immunology* 9: 799-809.
- van Eyk A. D. 2014. The effect of five artificial sweeteners on Caco2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology* 38: 318-327.
- Vanuytsel T., Vermeire A. y Cleynen I. 2013. The role of haptoglobin and its related protein, zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue Barriers* 1: e27321.
- Varala O. 2012. Is the origin of type 1 diabetes in the gut? *Immunology and Cell Biology* 90: 271-276.
- Versantvoort C.H.M., Ondrewater R.C.A., Duitzer E., Van de Sandt J.J.M., Gilde A.J. y Groten J.P. 2002. Monolayers of IEC-18 cells as an vitro model for screening the passive transcellular and paracellular transport across the intestinal barrier: comparison of active and passive transport with the human colon carcinoma Caco-2 cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 335-344.
- Vici G., Belli L., Biondi M. y Polzonetti V. 2016. Gluten free diet and nutrient deficiencies: A review. *Clinical Nutrition* 35: 1236-1241.
- Vincentini O., Maialetti F., Gonnelli E. y Silano M. 2015. Gliadin-dependent cytokine production in a bidimensional cellular model of celiac mucosa. *Clinical and Experimental Medicine* 15: 447-454.
- Woods C. W., Oliver T., Lewis K. y Yang Q. 2012. Development of necrotizing enterocolitis in premature infants receiving thickened feeds using SimplyThick. *Journal of Perinatology* 32: 150-152.
- Wright M.C., Stankovic I., Berendsen I.W., Woutersen R.A., Younes M., Rincon A.M. y Battachi D. 2016. Emulsifiers: Point of the art evaluation. *Toxicology Letters* 285S: S2-S10.

- Xu Ch-M., Li X-M., Qin B-z. y Liu 0. B. 2016. Effect of tight junction Protein of intestinal epithelium and permeability of colonic mucosa in pathogenesis of injured colonic barrier during chronic recovery stage of rats with inflammatory bowel disease. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 9: 148-152.
- Yue Y., Wu S, Li Z., Li X., Xiang J. y Ding H. 2015. Wil jujuble polysaccharides protect against experimental inflammatory bowel disease by enabling enhanced intestinal barrier function. *Food & Function* 6: 2568-2577.
- Zagorski J. W., Turley A. E., Freeborn R. A., VanDenBerg K. R., Dover H. E., Kardell B. R., et al. 2018. Differential effects of the Nrf2 activators tBHQ and CDDO-In on the early events of T cell activation. *Biochemical Pharmacology* 147: 67-76.