

**UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO**

---

---

**División Académica de Ciencias de la Salud**



**“EFECTOS DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS SOBRE  
LA RESPUESTA GLUCÉMICA EN RATAS SANAS Y CON  
INTOLERANCIA A LA GLUCOSA”**

**Tesis que para obtener el grado de la:**

**Maestría en Ciencias Biomédicas**

**Presenta:**

**Meztli Ramos García**

**Directores:**

**Dr. en C. Jorge Luis Ble Castillo**

**Dr. en C. Juan C. Díaz Zagoya**

**Villahermosa, Tabasco**

**Marzo 2020**



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



Of. No. 0271/DACS/JAEP  
04 de marzo de 2020

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

**C. Meztli Ramos García**

Maestría en Ciencias Biomédicas  
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate, M. en C. Thelma Beatriz González Castro, Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Dr. Jorge Luis Ble Castillo y la Dr. Xavier Miguel Boldo León, impresión de la tesis titulada: **"EFECTOS DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS SOBRE LA RESPUESTA GLUCÉMICA EN RATAS SANAS Y CON INTOLERANCIA A LA GLUCOSA"**, para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Biomédicas, donde funge como Directores de Tesis el Dr. Jorge Luis Blé Castillo y el Dr. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya.

Atentamente

  
**Dra. Mirian Carolina Martínez López**  
Directora



C.c.p.- Dr. Jorge Luis Ble Castillo.- Director de Tesis  
C.c.p.- Dr. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya.- Director de Tesis  
C.c.p.- Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate.- Sinodal  
C.c.p.- M. en C. Thelma Beatriz González Castro.- Sinodal  
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop Sinodal  
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Sinodal  
C.c.p.- Dr. Xavier Miguel Boldo León.- Sinodal

C.c.p.- Archivo  
DC'MCML/MO'MACA/lkrd\*



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 10:50 horas del día 28 del mes de febrero de 2020 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

**“EFECTOS DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS SOBRE LA RESPUESTA GLUCÉMICA EN RATAS SANAS Y CON INTOLERANCIA A LA GLUCOSA”**

Presentada por el alumno (a):

Ramos	García	Meztli
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)

Con Matricula

1	8	1	E	5	7	0	0	7
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

**Maestra en Ciencias Biomédicas**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

#### COMITÉ SINODAL

Dr. Jorge Luis Ble Castillo  
Director de Tesis

Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate

M. en C. Thelma Beatriz González Castro

Dra. Isela Esther Juárez Rojop

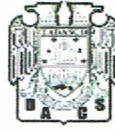
Dr. Jorge Luis Ble Castillo

Dr. Xavier Miguel Boldo León



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

“ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE”



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Dirección



## Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 12 del mes de Febrero del año 2020, el que suscribe, Meztli Ramos García, alumna del programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 181E57007 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **“Efectos de edulcorantes no nutritivos sobre la respuesta glucémica en ratas sanas y con intolerancia a la glucosa”**, bajo la Dirección del Dr. en C. Jorge Luis Ble Castillo y el Dr. en C. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: [meztli.garcia@hotmail.com](mailto:meztli.garcia@hotmail.com). Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Meztli Ramos García

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello



## DEDICATORIAS

### *A mi madre*

Eres una mujer que me hace llenar de orgullo, tu tenacidad y lucha constante han hecho de ti mi gran ejemplo a seguir, te amo y no va a haber manera de devolverte tanto que me has ofrecido. Esta tesis es un logro más que llevo a cabo, y sin lugar a dudas todo te lo debo a ti.

### *A mi padre*

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

### *A mis hermanos*

Por su paciencia durante este trayecto, sé que soy afortunada de tenerlos como hermanos y me siento muy orgullosa de ustedes.

### *A mi pareja*

Mi compañero, tu ayuda ha sido fundamental. Te agradezco muchísimo tu paciencia, tu experiencia y conocimientos compartidos.

### *A mi familia académica*

Este proyecto de tesis es el resultado del esfuerzo conjunto de los que formamos parte del gran equipo de trabajo del Laboratorio de Bioquímica de Enfermedades Metabólicas. De manera especial, dedico el producto de un gran esfuerzo a mis directores de tesis: Dr. Jorge L. Ble Castillo, Dr. Juan C. Díaz Zagoya y al Dr. Carlos García Vázquez. Gracias a cada uno por enseñarme e inculcarme el valor del trabajo en equipo, la perseverancia, la adaptación al cambio, la responsabilidad y el esfuerzo que conlleva el trabajo de investigación.



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por brindarme la oportunidad de formar parte del programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas y al CONACyT.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Departamento de Bioquímica, por abrir las puertas de sus instalaciones para poder llevar a cabo la fase experimental de este proyecto, el cual fue apoyado en parte por el programa PAPIIT IN213718.

A mis directores de tesis: El Dr. Jorge L. Ble Castillo, quien, con su invaluable enseñanza, paciencia, calidad humana y su extraordinaria experiencia científica, me ha permitido cerrar un ciclo muy importante en mi vida personal y profesional; al Dr. Juan C. Díaz Zagoya ampliamente por haberme permitido realizar la parte más importante del proyecto en su laboratorio y quien se caracteriza por impulsar en sus alumnos el desarrollo y la mejora continua.

Al Dr. Carlos García Vázquez, de manera muy especial por compartir su experiencia científica, sus consejos, su amistad invaluable y sus enseñanzas, las cuales han contribuido de manera crucial a mi formación.

A la Dra. Carina S. Alvarez Villagomez, quien desde el primer instante mostró mucho interés por ser parte de esta investigación.

Al maestro Rubén Córdova Uscanga siempre por su amplia disposición de apoyar. A sus alumnos de la Universidad Olmeca quienes brindaron su ayuda con mucho esfuerzo e interés en la fase culminante del experimento.

Al maestro Rodrigo Miranda Zamora y al técnico de laboratorio Marco por su amable labor de ayudar y facilitar la realización del trabajo experimental durante mi estancia en la Facultad de Medicina.



## ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....	V
ABREVIATURAS.....	VII
GLOSARIO.....	IX
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	5
1.1.1 Efectos de los ENNs sobre la respuesta glucémica y el control metabólico .....	5
1.1.1.1 Estudios agudos.....	5
1.1.1.2 Estudios crónicos.....	8
1.1.2 Efectos de los ENNs sobre el peso corporal y la ingesta calórica .....	12
1.1.2.1 Estudios en roedores.....	12
1.1.2.2 Estudios en humanos.....	15
2. JUSTIFICACIÓN .....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	19
5. OBJETIVOS .....	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos específicos .....	20
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Instituciones participantes.....	21
6.2 Animales .....	21
6.3 Descripción general del estudio .....	21
6.4 Edulcorantes .....	23
6.5 Procedimientos del estudio .....	23
6.5.1 Inducción de intolerancia a la glucosa mediante dieta hipercalórica.....	23
6.5.2 Evaluación del efecto de los edulcorantes.....	25
6.5.2.1 Tratamientos.....	25
6.5.2.2 Dosis.....	26



6.5.2.3 Mediciones de ingesta de alimento, líquidos y peso corporal.....	27
6.5.2.4 Ingesta calórica <i>ad libitum</i> .....	28
6.5.2.5 Prueba de tolerancia al almidón .....	28
6.5.3 Sacrificio .....	29
6.5.4 Determinaciones bioquímicas .....	29
6.5.5 Análisis estadístico .....	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 Inducción de IG mediante DHC.....	31
7.1.1 Efecto de la DHC sobre el peso corporal y la ingesta calórica .....	31
7.1.2 Efecto de la DHC sobre la respuesta glucémica.....	33
7.2 Evaluación del efecto de los edulcorantes .....	34
7.2.1 Asignación de tratamientos con ENNs.....	34
7.2.2 Ingesta diaria de los ENNs administrados .....	35
7.2.3 Efecto de los ENNs sobre el peso corporal .....	37
7.2.4 Efecto de los ENNs sobre la ingesta calórica .....	38
7.2.5 Efecto de los ENNs sobre la respuesta glucémica .....	39
7.2.5.1 Resultados de las curvas de glucosa finales .....	39
7.2.5.2 Resultados de las curvas de glucosa antes vs después de los tratamientos.....	42
7.2.6 Efecto de los ENNs sobre diversos parámetros bioquímicos en ayuno.	45
8. DISCUSIÓN .....	46
8.1 Inducción de IG mediante DHC.....	46
8.2 Efectos de los edulcorantes .....	48
8.2.1 Efectos sobre el peso corporal y la ingesta calórica .....	48
8.2.2 Efectos sobre la respuesta glucémica .....	50
9. CONCLUSIONES.....	57
10. RECOMENDACIONES .....	57
11. REFERENCIAS.....	58





## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

<b>TABLA</b>	<b>Página</b>
1. Contenido de ENN y glucosa en los sobres comerciales .....	23
2. Composición de la DN y la DAG durante el periodo experimental .....	25
3. Valores de la IDA de los ENNs establecida por la US FDA y su equivalente en sobres .....	27
<b>FIGURA</b>	<b>Página</b>
1. Descripción general del estudio .....	22
2. Distribución de los tratamientos .....	26
3. Efectos de la DHC sobre el peso corporal y la ingesta calórica durante la fase de inducción de IG .....	32
4. Efecto de la DHC sobre la respuesta glucémica postprandial durante una PTA realizada al final del periodo de inducción de IG .....	33
5. Asignación aleatorizada de los tratamientos con base al peso corporal y la respuesta glucémica de los animales.....	34
6. Variación en el consumo de ENNs a través de las 8 semanas de tratamiento .	36
7. Efecto de los ENNs sobre el curso temporal de los pesos corporales .....	37



8. Efecto de los ENNs sobre la ingesta calórica incremental .....	38
9. Efecto de los ENNs sobre la respuesta glucémica postprandial .....	41
10. Respuesta glucémica postprandial antes vs después de los tratamientos con los ENNs en ratas sanas.....	43
11. Respuesta glucémica postprandial antes vs después de los tratamientos con los ENNs en ratas con IG.....	44

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



## ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área bajo la curva
<b>ABCi</b>	Área bajo la curva incremental
<b>Ace-K</b>	Acesulfame-k
<b>DAG</b>	Dieta alta en grasas
<b>DHC</b>	Dieta hipercalórica
<b>DN</b>	Dieta normal
<b>DT1</b>	Diabetes tipo 1
<b>DT2</b>	Diabetes tipo 2
<b>EFSA</b>	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
<b>ENNs</b>	Edulcorantes no nutritivos
<b>GE</b>	Glucósidos de esteviol
<b>GIP</b>	Glucose-dependent insulintropic polypeptide (Polipéptido insulíntrico dependiente de glucosa)
<b>GLP-1</b>	Glucagon-like peptide 1 (Péptido similar al glucagón tipo 1)
<b>GLUT</b>	Glucose transporter (Glucotransportador)
<b>HDL</b>	High-Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidad)



<b>IDA</b>	Ingesta Diaria Admisible
<b>IDF</b>	International Diabetes Federation (Federación Internacional de Diabetes)
<b>IG</b>	Intolerancia a la glucosa
<b>JECFA</b>	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)
<b>MI</b>	Microbiota intestinal
<b>PTA</b>	Prueba de tolerancia al almidón
<b>Reb A</b>	Rebaudiósido A
<b>SGLT</b>	Sodium-dependent glucose co-transporters (Cotransportadores de glucosa dependientes de sodio)
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>US FDA</b>	US Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU)



## GLOSARIO

- Edulcorantes no nutritivos** Sustancias que se caracterizan por presentar alta potencia en dulzura con nulo aporte calórico que simulan el sabor dulce de la sacarosa.
- Ingesta diaria admisible** Estimación de la cantidad de un aditivo alimentario que una persona puede ingerir todos los días durante toda la vida sin afectar la salud.
- Intolerancia a la glucosa** Estado de hiperglucemia intermedia entre la regulación normal de la glucosa y la diabetes. La IG se caracteriza por la elevación de la respuesta glucémica después de 2 horas de la ingesta de glucosa o alimentos.
- Respuesta glucémica** Respuesta postprandial a la glucosa en sangre provocada cuando un alimento que contiene carbohidratos es ingerido.



## RESUMEN

**Introducción:** Los edulcorantes no nutritivos (ENNs) son sustancias de alta potencia en dulzura con nulo aporte calórico que se han empleado como alternativa a la sacarosa para personas con obesidad, intolerancia a la glucosa (IG) o diabetes. Estudios previos han mostrado que el consumo de ENNs puede alterar la homeostasis de la glucosa en roedores. Sin embargo, sus efectos sobre la respuesta glucémica, la ingesta calórica y el peso corporal no son concluyentes.

**Objetivo:** Evaluar los efectos de ENNs sobre la respuesta glucémica en ratas sanas y ratas con IG. **Metodología:** Se realizó un estudio crónico, paralelo y aleatorizado en ratas Wistar sanas (n = 48) y ratas con IG (n = 64) inducida mediante dieta hipercalórica. Ambos modelos animales recibieron los siguientes tratamientos durante 8 semanas: sucralosa (5 mg/kg/d), aspartame (50 mg/kg/d), estevia y rebaudiósido A (4 mg/kg/d), sacarosa 4% y glucosa 4% (control). Todos los ENNs comerciales se administraron a dosis equivalentes a la ingesta diaria admisible para humanos (IDA, US FDA). En los animales con IG se introdujeron dos grupos más, uno que recibió 30% de sacarosa y el otro solo agua. Todos los tratamientos se diluyeron en el agua de beber. Durante el período experimental, las ratas sanas recibieron una dieta estándar para roedores y las ratas con IG consumieron una dieta alta en grasas. Se determinaron cambios sobre la respuesta glucémica, el peso corporal y la ingesta calórica *ad libitum*. Se realizaron determinaciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y HDL. **Resultados:** No se encontraron diferencias significativas sobre la respuesta glucémica, el peso corporal y la ingesta calórica en ambos modelos. Los metabolitos en ayuno no se modificaron. **Conclusiones:** El consumo de ENNs artificiales o naturales, administrados con base a la IDA, no ejerció efectos sobre la respuesta glucémica, el peso corporal o la ingesta calórica en ratas sanas y ratas con IG.



## ABSTRACT

**Introduction:** Non-nutritive sweeteners (NNSs) are high-potency substances in sweetness without energy content that have been used as an alternative to sucrose for people with obesity, glucose intolerance (GI) or diabetes. Previous studies have shown that the consumption of NNSs can alter glucose homeostasis in rodents. However, its effects on glycemic response, caloric intake and body weight are unclear. **Objective:** To evaluate the effects of NNSs on glycemic response in healthy rats and rats with GI. **Methodology:** A chronic, parallel and randomized study in healthy Wistar rats (n = 48) and rats with GI (n = 64) induced by hypercaloric diet were used. Both animal models received the following treatments for 8 weeks: sucralose (5 mg/kg/d), aspartame (50 mg/kg/d), stevia (4 mg/kg/d) and rebaudioside A (4 mg/kg/d), sucrose 4% and glucose 4% (control). All the commercial NNSs were administered at doses equivalent to the human acceptable daily intake (ADI, US FDA). In the animals with GI two more groups were introduced, one receiving 30% sucrose and the other one only water. All treatments were dissolved in drinking water. Healthy rats received standard rodent diet and rats with GI consumed a high-fat diet during the experimental period. Changes were determined on glycemic response, body weight and *ad libitum* caloric intake. Determinations of glucose, triglycerides, cholesterol and HDL were performed. **Results:** No significant differences were found regarding glycemic response, body weight or caloric intake in both models. Fasting metabolites were not modified. **Conclusions:** The consumption of artificial or natural NNSs had no effect on glycemic response, body weight or caloric intake in healthy rats and rats with GI.



## 1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es un grupo de alteraciones metabólicas caracterizada por hiperglucemia crónica (WHO, 2016). Según la IDF, 425 millones de personas en todo el mundo sufrieron diabetes durante 2017 y se espera que sean 629 millones para el 2045. México se encuentra entre los primeros cinco países con la mayor prevalencia de diabetes, representando uno de los mayores problemas de salud pública (IDF, 2017).

La intolerancia a la glucosa (IG) se define como un estado de hiperglucemia intermedia entre la regulación normal de la glucosa y la diabetes (Nathan y cols., 2007). La IG se caracteriza por la elevada respuesta glucémica después de 2 horas de la ingesta de glucosa o alimentos (ADA, 2011). La transición de la alteración temprana en la glucemia es gradual y se estima que alrededor del 70% de las personas con IG desarrollarán diabetes en el futuro (Nathan y cols., 2007).

El consumo de bebidas o alimentos con alto contenido de azúcares (sacarosa) se ha vinculado al desarrollo de las enfermedades metabólicas (Packard y cols., 2014). Por esta razón, la industria alimentaria ha propuesto alternativas a la sacarosa para aminorar el contenido calórico en los alimentos (Wang y cols., 2018). Los edulcorantes no nutritivos (ENNs) son sustancias que se caracterizan por presentar alta potencia en dulzura con nulo aporte calórico que simulan el sabor dulce de la sacarosa. Por su origen se clasifican en naturales (estevia) o artificiales como sucralosa, aspartame o acesulfame-k (ace-k) (Glendinning, 2018). Mundialmente el





consumo de ENNs se ha incrementado. Se proyecta que el mercado global de ENNs alcance los \$2.2 mil millones en el año 2020 con una tasa anual de 5.1% (PRNewswire, 2015). Se estima que el mayor crecimiento de ENNs en el mercado sea generado en América Latina y China (Kim y cols., 2019; USDA, 2012). En un estudio reciente, México mostró la más alta proporción de productos alimenticios que contienen ENNs (11%) comparado con E.U.A (4%), Nueva Zelanda (1%) y Australia (<1%) (Dunford y cols., 2018). Actualmente, los tres ENNs artificiales más populares a nivel mundial y nacional son sucralosa, aspartame, y estevia que recientemente se ha introducido en el mercado (Lohner y cols., 2017; USDA, 2012).

La seguridad en el consumo de los ENNs ha sido evaluada por diferentes organismos internacionales de salud como la US Food and Drug Administration (US FDA), el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), la European Food Safety Authority (EFSA) y la Secretaría de Salud en México (Romo-Romo Alonso, 2017). Para cada ENN, se ha establecido la ingesta diaria admisible (IDA) como la estimación de la cantidad de un aditivo alimentario que una persona puede ingerir todos los días durante toda la vida sin afectar la salud (FDA, 2018). A pesar de sus características en común en cuanto a potencia de dulzura y aporte calórico, cada ENN es metabólicamente distinto (Nettleton y cols., 2016).

Por ejemplo, la sucralosa es un disacárido clorado derivado de la sacarosa que tiene capacidad edulcorante 600 veces mayor que la sacarosa. La IDA de este ENN corresponde a 5 mg/kg/d (FDA, 2018). La mayor parte de la sucralosa no es absorbida en el tracto gastrointestinal (TGI) y es excretada sin modificaciones en



las heces (Fitch & Keim, 2012). Por su parte, el aspartame es un dipéptido 200 veces más dulce que la sacarosa, se hidroliza en el lumen intestinal en tres componentes (fenilalanina, ácido aspártico y metanol) y se absorbe en el intestino delgado (Kreuch y cols., 2018). La IDA del aspartame corresponde a 50 mg/kg. Por otro lado, la estevia es el nombre común para el extracto de glucósidos de esteviol (GE) que se obtiene de las hojas de *Stevia rebaudiana* (Anton y cols., 2010). La estevia se ha empleado como una alternativa natural a la sacarosa (300-400 veces más dulce que la sacarosa), por lo que es el ENN natural de mayor consumo (Rosales-Gomez y cols., 2018). La IDA corresponde a 4 mg/kg/d (FDA, 2018). Los dos GE que se encuentran en mayor proporción en la hoja de estevia son el esteviósido (4-13% en peso seco) y el rebaudiósido A (Reb A; 2-4% en peso seco) (Goyal y cols., 2010). La estructura molecular de todos los GE está compuesta de una molécula central de esteviol que se enlaza con diferentes grupos de azúcares. Cada GE pasa a través del TGI sin ser absorbido. Una vez que llegan al colon, los restos de azúcar unidos al esteviol son eliminados por la microbiota intestinal (MI), por lo tanto representan una fuente de energía para la microbiota y el hospedero (Lobach y cols., 2019).

Los ENNs se han recomendado ampliamente para ayudar a controlar la ingesta calórica, el peso corporal o los niveles de glucosa en personas con obesidad, IG o diabetes (Laviada & Molina Segui, 2017). Sin embargo, la mayoría de los estudios han reportado que el consumo de ENNs puede inducir alteraciones en el metabolismo glucémico en roedores (Suez y cols., 2014) y en humanos (Romo-



Romo y cols., 2018). Se han sugerido algunos posibles mecanismos para explicar los efectos de los ENNs sobre el metabolismo. Por ejemplo, la activación de los receptores de sabor dulce (T1R2/T1R3) orales o extraorales que puede provocar la alteración de la regulación de los circuitos de recompensa del cerebro o la alteración de las concentraciones de hormonas intestinales (incretinas y grelina) que participan en el control glucémico y el balance energético. Otros estudios han propuesto que la modificación de la MI puede inducir la sobrerregulación de vías proinflamatorias y promotoras de la adipogénesis que puede conducir al desarrollo de obesidad o diabetes (Olivier-Van Stichelen y cols., 2019; Rother y cols., 2018). Estos mecanismos no son exclusivos ni excluyentes, es decir, algunos de ellos se encuentran interrelacionados y pueden actuar sinérgicamente (Pepino, 2015). La mayor parte de estos efectos se han reportado en modelos animales (Rogers y cols., 2016). En roedores, estudios previos han indicado que el consumo de ENNs ejerce efectos adversos sobre la respuesta glucémica, conduciendo al desarrollo de IG (Palmnäs y cols., 2014; Suez y cols., 2014). Los estudios epidemiológicos han asociado el consumo de ENNs con la ganancia de peso, el desarrollo de IG y alteraciones en el control metabólico (Chia y cols., 2018; Frankenfeld y cols., 2015; Kuk & Brown, 2016). Por su parte, algunos estudios experimentales en humanos no han encontrado efectos perjudiciales de la ingesta crónica de ENNs sobre el control glucémico o el peso corporal (Grotz y cols., 2017; Sylvetsky & Rother, 2018). Debido a los diversos resultados obtenidos en los diferentes estudios, no ha sido posible establecer un consenso en relación a la seguridad del consumo de estas sustancias como alternativas factibles para el control del peso corporal y el manejo



de la glucosa (Farhat y cols., 2019), lo que ha generado confusión en el consumidor sobre qué tipo de edulcorante es la mejor opción.

## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Efectos de los ENNs sobre la respuesta glucémica y el control metabólico**

#### *1.1.1.1 Estudios agudos*

La evaluación aguda incluye estudios en humanos en los cuales, los ENNs han sido administrados en una sola dosis (Ayob y cols., 2014; Horwitz y cols., 1988; Olalde-Mendoza & Moreno-Gonzalez, 2013), mezclados en los alimentos (Bryant y cols., 2014; Gallagher y cols., 2016; Gregersen y cols., 2004), mediante infusiones gastrointestinales (Ma y cols., 2010), o como precarga antes de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (Tey y cols., 2016; Wu y cols., 2011). Brown y cols. (2011) mostraron que el consumo de sucralosa (Splenda<sup>®</sup>, 6 g) mezclada en 355 mL de agua no ejerció efectos significativos sobre la homeostasis de la glucosa en comparación con sacarosa en sujetos sanos. Bryant y cols. (2014) señalaron que el consumo de aspartame (150 mg), sacarina (20 mg) o ace-k (85 mg) en combinación con un edulcorante nutritivo como la glucosa (45 g) y 15 min después de la carga de glucosa oral no ejerció respuesta significativa sobre la glucemia y el apetito comparado a la bebida de prueba (solo glucosa) en sujetos sanos. Sylvetsky y cols. (2016) investigaron los efectos de ENNs sobre GLP-1, GIP, glucosa, insulina y péptido C en sujetos sanos. En orden aleatorio, treinta sujetos consumieron 355 ml



de agua con 0 mg, 68 mg, 170 mg o 250 mg de sucralosa, y 31 sujetos consumieron 355 ml de Diet Rite Cola™ sin cafeína (68 mg de sucralosa y 41 mg de ace-k) o Diet Mountain Dew™ (18 mg de sucralosa, 57 mg de aspartame, 18 mg de ace-k) y agua mineral con ENNs (68 mg de sucralosa y 41 mg de ace-k). En respuesta a una prueba de tolerancia a la glucosa oral, los refrescos de dieta aumentaron las concentraciones de GLP-1 (Diet Rite Cola™ y Diet Mountain Dew™ vs agua mineral) sin modificaciones en el vaciamiento gástrico y la saciedad. La sucralosa sola o mezclada con ace-k no ejerció efectos. Los niveles de insulina fueron más altos después de la ingesta de los ENNs sin alterar la glucemia. Los autores sugirieron que el sabor asociado con el tipo de refresco u otros ingredientes inmersos en la bebida pudieron haber contribuido a la estimulación de GLP-1. El incremento de las concentraciones de insulina pudo haber sido estimulado por los receptores del sabor dulce que se encuentran en las células  $\beta$ -pancreáticas, como se ha reportado en estudios *in vitro*. Estudios recientes en sujetos sanos que evaluaron los efectos de la ingesta de refrescos de dieta con aspartame y ace-k sobre la respuesta glucémica (Solomi y cols., 2019), y sucralosa (136 mg/d) o aspartame (425 mg/d) diluido en agua saborizada sobre glucosa, insulina, GLP-1, leptina y sensibilidad a la insulina (Ahmad y cols., 2019) no hallaron efectos significativos en un corto periodo de tiempo. En contraste, un estudio realizado por Tey y cols. (2016), en sujetos sanos que consumieron como precarga bebidas endulzadas con ENNs artificiales (0.44 g de aspartame) o naturales (0.33 g de reb A), una hora antes del almuerzo *ad libitum*, mostraron efectos mínimos sobre la respuesta glucémica e insulinémica y la ingesta calórica respecto a la bebida



endulzada con sacarosa (65 g). Un estudio previo realizado por Pepino y cols. (2013) señalaron que la ingesta de una sola dosis de sucralosa (48 mg) 10 minutos antes de una prueba de tolerancia a la glucosa oral afectó la sensibilidad a la insulina y las concentraciones de glucosa, insulina y péptido C en ayuno respecto al control (agua) en sujetos con obesidad. Los niveles de GLP-1, GIP y glucagón no mostraron cambios significativos. Un estudio llevado a cabo en tres poblaciones distintas, reportó que el consumo de 240 mL de refresco de dieta (Rite Cola) con sucralosa y ace-k antes de una carga de glucosa oral aumentó la secreción de GLP-1 en sujetos sanos (34%) y con diabetes tipo 1 (43%, DT1) pero no en sujetos con diabetes tipo 2 (DT2), mientras que las concentraciones de GIP, PYY, péptido C y glucosa plasmática no fueron modificadas por el tratamiento de prueba en ninguno de los grupos. El incremento observado en la secreción de GLP-1 fue atribuido a la unión de los ENNs a los receptores del sabor dulce localizados en las células L enteroendocrinas del TGI, provocando la activación de diferentes vías de señalización que promueven la liberación de esta hormona. Los autores hipotetizaron que la respuesta ausente en los niveles de GLP-1 en los sujetos con DT2, se correlaciona con los niveles más elevados de glucosa en sangre que a su vez se puede asociar con una menor expresión de los receptores de sabor dulce. No obstante, esto contradice los resultados observados en los sujetos con DT1, en quienes la glucosa en sangre fue la más elevada (Brown y cols., 2012). En general, los efectos del consumo agudo de ENNs sobre el control metabólico en personas con diabetes ha sido muy poco evaluado, por lo que se requiere más investigación al respecto.



### 1.1.1.2 Estudios crónicos

La mayor parte de los estudios crónicos en roedores, donde se administran los ENNs mezclados en los alimentos o en el agua de beber, reporta efectos perjudiciales sobre el metabolismo glucémico. En un estudio realizado por Suez y cols. (2014), se mostró que el consumo de sacarina (3333 mg/kg/d, 650x la IDA), sucralosa (1666 mg/kg/d, 100x la IDA) o aspartame (1333 mg/kg/d, 30x la IDA) en el agua de beber durante 11 semanas produce diferentes grados de IG comparados con agua, glucosa (50 g/kg/d) o sacarosa (33 g/kg/d) en ratones C57BL/6 delgados y obesos. El efecto fue mayor con la sacarina, por lo que fue el ENN que se empleó para los posteriores experimentos como referencia. En este mismo experimento, los investigadores trasplantaron la MI de aquellos ratones que consumieron sacarina o glucosa a ratones libres de gérmenes. Los resultados mostraron que los roedores libres de gérmenes que recibieron el trasplante fecal del grupo que consumió sacarina, desarrollaron IG comparados con los que se alimentaron con glucosa. El mismo grupo de investigadores estudió el efecto de la sacarina sobre el control de la glucemia en 7 sujetos sanos. Cuatro de los siete sujetos mostraron IG después de recibir 5 mg/kg dividida en 3 dosis diarias durante una semana. La IG encontrada en este estudio en roedores y humanos fue atribuida a los cambios en la composición y función de la MI causada por el desbalance en la proporción de ciertos taxones bacterianos. Suez y cols. (2014) realizaron un estudio integral en roedores y humanos que fue pionero en reportar que el consumo de ENNs induce IG por alteración de la MI. No obstante, se han observado algunas limitaciones en



el diseño de este estudio. Por ejemplo, la administración de dosis de edulcorante fue excesiva, el tamaño de muestra reducido, no se reportaron las mediciones basales de la prueba de tolerancia a la glucosa oral y el consumo de alimento y agua no fue controlado. En otro estudio, se evaluó el consumo de aspartame a bajas dosis (5-7 mg/kg/d) diluido en el agua de beber durante 8 semanas sobre el control glucémico y la MI en un grupo de ratas Sprague-Dawley alimentado con dieta estándar y un grupo sometido a una dieta alta en grasas. El tratamiento con aspartame en ambos grupos aumentó los niveles de glucosa en ayuno y afectó la eliminación de glucosa estimulada por insulina con respecto al control (agua). De acuerdo al análisis metabólico, el aspartame puede metabolizarse rápidamente, lo que provocó un incremento de propionato en comparación con otros ácidos grasos de cadena corta. Estas respuestas pueden afectar negativamente la tolerancia a la insulina. No se observaron cambios en los niveles de GIP en ambos grupos. Por otro lado, el análisis de la composición de la MI mostró que el aspartame incrementó la abundancia de *Enterobacteriaceae* y *Clostridium leptum*. Cambios en la proporción de estas bacterias se han asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina (Palrnäs y cols., 2014). En otro sentido, un estudio reciente mostró que el consumo de sucralosa (1.5%) bajo un régimen alimentario con DAG durante 16 semanas produjo efectos similares a la sacarosa (10%) en ratas Wistar. La sucralosa mostró aumento de la expresión de receptores del sabor dulce (T1R2 y T1R3), que a su vez estimularon las concentraciones de GIP y GLP-1, lo que provocó hiperinsulinemia. Además, el tipo de dieta en combinación con la sucralosa alteró la vía de señalización de la insulina en el tejido adiposo, disminuyendo las





concentraciones de GLUT-4, lo que resultó en hiperglucemia (Sánchez-Tapia y cols., 2019).

En contraste, otros estudios han mostrado resultados diferentes. Tovar y cols. (2017) evaluaron los efectos del consumo moderado de aspartame y sucralosa en el agua de beber sobre la tolerancia a la glucosa en ratas Sprague-Dawley sanas. Después de 6 semanas de tratamiento, la respuesta glucémica no mostró efectos significativos en comparación con el control (no especificado). Rosales-Gomez y cols. (2018) evaluaron el consumo de sucralosa (4.16 mg/mL), reb A (4.16 mg/mL), sacarosa (41.66 mg/mL) y agua (control) sobre el control metabólico en ratones CD1 alimentados con dieta estándar. Los animales que fueron alimentados con sucralosa mostraron una disminución en la glucemia y en las concentraciones de GIP sin modificar los niveles de insulina. Por otro lado, la estevia incrementó la glucemia, insulina, leptina y la secreción de GIP. Los autores sugirieron que la elevada respuesta del reb A derivado de la estevia que se utilizó en este estudio sobre estas variables es metabolizado por la MI a esteviósidos y posteriormente transformado en glucosa y una molécula de esteviol; el metabolito final de la estevia es la glucosa que se absorbe en el epitelio intestinal produciendo un efecto similar a la sacarosa.

En humanos, un estudio reciente realizado por Romo-Romo y cols. (2018), encontró que la ingesta de sucralosa (Splenda, 15% de la IDA) durante 14 días indujo disminución en la sensibilidad de la insulina respecto al control (bebida habitual sin intervención) en sujetos sanos. En contraste con este estudio, en otro trabajo se



determinó que el consumo diario de 2 latas de refresco de 355 mL cada una, conteniendo aspartame y ace-k durante 12 semanas no ejerció efectos sobre la sensibilidad a la insulina en sujetos no diabéticos (Bonnet y cols., 2018). En sujetos sanos, el consumo de sucralosa (1000 mg/día, 200x la IDA) administrada en cápsulas 3 veces al día con los alimentos por 12 semanas no indujo cambios sobre glucosa, insulina o HbA1c en ayunas respecto al placebo (Celulosa) (Grotz y cols., 2017). Además, la administración de bebidas saborizadas con aspartame (350-1050 mg/día) durante 12 semanas, no afectó la glucemia en individuos delgados (Higgins y cols., 2018).

En otro sentido, la estevia se ha convertido en el ENN natural de mayor consumo en los últimos años como sustituto del azúcar y de otros edulcorantes artificiales. Algunos estudios han informado que la estevia ejerce efectos antihiper glucémicos en ratas diabéticas (Ahmad & Ahmad, 2018) y en humanos (Gregersen y cols., 2004). Sin embargo, otros estudios en ratas han indicado que el consumo de dosis bajas de reb A (2-3 mg/kg/d) a largo plazo ejerce mínimos efectos sobre el metabolismo de la glucosa, aunque parece afectar la MI (Nettleton y cols., 2019). Maki y cols. (2008) encontraron que el consumo de 1000 mg de reb A en cápsulas (4 cápsulas de 250 mg cada una por día) durante 16 semanas no alteró los niveles de glucosa, insulina o péptido C comparado al placebo (cápsulas con celulosa microcristalina) en sujetos con DT2. En general, los efectos de la estevia sobre el metabolismo glucémico en roedores y humanos no son consistentes y la evidencia es muy escasa, por lo que se requiere más investigación al respecto.



### **1.1.2 Efectos de los ENNs sobre el peso corporal y la ingesta calórica**

Los estudios que evalúan el impacto del consumo de ENNs sobre el balance energético y el apetito en modelos animales y en humanos son limitados.

#### **1.1.2.1 Estudios en roedores**

En ratones CBA/CA, a los cuales se les administró soluciones endulzadas con sacarina, ace-k o aspartame vía oral durante 25 semanas, mostraron incremento del peso corporal sin afectar la ingesta calórica respecto al control (agua) (Polyak y cols., 2010). Rogers y cols. (2016) realizaron un estudio usando un modelo de rata Wistar en el que evaluaron los efectos del consumo de un suplemento de yogurt natural endulzado con 0.3% de sacarina, 0.4% de aspartame o 20% de sacarosa (además de comida y agua *ad libitum*) sobre el peso corporal y la ingesta calórica durante 12 semanas. Los resultados mostraron que la adición de este tipo de ENNs al yogurt derivó en aumento del peso corporal respecto a la sacarosa, sin embargo, la ingesta calórica total fue similar entre los grupos. No obstante, en este estudio no se empleó un grupo control dietario que sirviera como punto de referencia para evaluar los cambios sobre el peso de corporal. En un estudio similar, Swithers y Davidson (2008) documentaron una mayor ingesta de alimentos, aumento de peso y mayor adiposidad en ratas Sprague-Dawley que consumieron alimentos suplementados con sacarina. Este tipo de estudio plantea la hipótesis de que la exposición a los ENNs puede afectar la capacidad de incrementar la densidad calórica con los alimentos de sabor dulce, lo que conduce a una disminución de la compensación calórica de los alimentos de alta densidad calórica. Previamente se



ha señalado que el desbalance en la homeostasis energética impulsa el deseo de comer y por consiguiente el aumento de peso corporal (Feijó y cols., 2013; Foletto y cols., 2016; Swithers y cols., 2009; Swithers & Davidson, 2008).

En un estudio realizado por Bissonnette y cols. (2017), ratas Wistar fueron alimentadas con una dieta líquida (Osmolite) mezclada con ENNs (sacarina o estevia), edulcorantes nutritivos (sacarosa) o un control sin edulcorantes (Osmolite + agua destilada) por 6 semanas y evaluaron en cuatro fases los efectos sobre el consumo de alimento, la ingesta calórica, el peso corporal y la preferencia por el sabor dulce. Los resultados mostraron incremento significativo del consumo de una dieta líquida endulzada con ENNs sobre el peso corporal respecto a sacarosa. Sin embargo, no se observó aumento de la ingesta calórica y el peso corporal respecto al control. Las dietas alternativas entre los ENNs, la sacarosa y el control no afectaron el apetito. En otro sentido, Barrios-Correa y cols. (2018) administraron versiones comerciales de GE (0.025 g), sucralosa (0.012 g) o sacarosa (10%) mezclados en 100 mL de agua durante 6 semanas en ratones BALB/c. Ellos evaluaron la composición corporal y la expresión de JAK2, STAT3 y Akt totales y fosforilados, así como SOCS3 y ObRb en el tejido cerebral para determinar si la ingesta frecuente de estos ENNs induce cambios sobre la expresión de estas proteínas relacionadas con el apetito. Los resultados mostraron que los GE disminuyeron la ingesta calórica, la adiposidad y el peso corporal en machos y aumentaron la expresión de pJAK2 y pSTAT3 en el cerebro, mientras que la sucralosa promovió el aumento de peso corporal y de la expresión de pJAK2 en



hembras. Los autores sugirieron que el consumo de ENNs comerciales provoca cambios sobre las vías de señalización cerebrales que se han relacionado con el control del apetito y el equilibrio energético en roedores. En otro estudio los autores encontraron que el consumo de soluciones endulzadas con sacarina (0.005 M/L) durante 10 semanas provocó incremento en la expresión del receptor del sabor dulce T1R3 y de los receptores de grelina encontrados en las papilas gustativas y el hipotálamo en ratas Sprague-Dawley machos, efectos que no fueron observados en ratas hembras. Los autores sugirieron que los receptores periféricos de sabor dulce y los receptores periféricos y centrales de grelina pueden estar involucrados en los efectos provocados por el consumo de sacarina promoviendo el consumo de alimentos, que conlleva a la ganancia de peso corporal (Zhao y cols., 2018).

En otro sentido, Abou-Donia y cols. (2008) evaluaron el consumo de Splenda® disuelta en el agua de beber a diferentes dosis de sucralosa (1.1, 3.3, 5.5, 11 mg/kg/d) sobre la composición de la MI y el peso corporal en ratas Sprague-Dawley. Posterior a las 12 semanas de tratamiento, los autores observaron una reducción significativa en la abundancia de bacterias anaerobias generalmente beneficiosas (Bifidobacterias, Lactobacilos o *Bacteroides*). Los resultados también mostraron que los animales incrementaron el peso corporal comparado al control (agua). Los resultados de este tipo de estudios sugieren que las alteraciones de la MI causadas por el desbalance de las bacterias intestinales puede aumentar el riesgo de desarrollar obesidad mediante la modulación de procesos metabólicos que son esenciales para el organismo. En contraste, Uebanso y cols. (2017) indicaron que



el consumo de sucralosa (15 mg/kg/d) o ace-k (15 mg/kg/d) en el agua de beber durante 8 semanas no incrementó la ingesta calórica ni el peso corporal en ratones C57Bl/6J. Solamente la sucralosa mostró una reducción en la proporción de *Clostridium cluster XIVa*.

Otras investigaciones mencionadas previamente que evaluaron los posibles efectos del consumo prolongado de ENNs sobre la respuesta glucémica, también observaron que los ENNs pueden ejercer efectos adversos (Rosales-Gomez y cols., 2018), efectos beneficiosos (Palrnäs y cols., 2014) o no provocar respuestas fisiológicas (Soto y cols., 2017; Tovar y cols., 2017) sobre peso corporal en roedores.

#### 1.1.2.2 Estudios en humanos

Algunos estudios observacionales han reportado una asociación positiva entre el consumo de ENNs y el aumento del peso corporal (Fowler y cols., 2015; Fowler y cols., 2008), cuestionando el beneficio de emplear estas sustancias como sustitutos del azúcar para el control del peso. No obstante, este tipo de estudios no establece una relación causa-efecto, por lo que la interpretación de estos hallazgos no es concluyente.

En otro sentido, los estudios clínicos a largo plazo son escasos. Algunos de estos estudios han sugerido que el consumo de ENNs no ejerce efectos adversos sobre la ingesta calórica y el peso corporal en comparación con el consumo de sacarosa. Por ejemplo, Raben y cols. (2002) investigaron los efectos del consumo de bebidas



y alimentos conteniendo ENNs (aspartame, ace-k, sacarina o ciclamato) o sacarosa sobre la ingesta de alimentos *ad libitum* y el peso corporal durante 10 semanas en sujetos con sobrepeso. Los resultados mostraron que los sujetos que consumieron gran cantidad de sacarosa, principalmente en bebidas, aumentaron la ingesta calórica y el peso corporal, mientras que se observó una disminución sobre estas variables en aquellos sujetos que consumieron productos con ENNs. En sujetos sanos se observó que la ingesta diaria de aspartame a dos diferentes dosis (350 mg/d o 1050 mg/d) en bebidas saborizadas durante 12 semanas no provocó cambios sobre peso corporal, apetito y composición corporal (Higgins y cols., 2018). Otros estudios clínicos en sujetos con sobrepeso u obesidad han reportado que el consumo de bebidas o alimentos que contienen ENNs promueve la disminución del peso corporal en comparación con agua (Masic y cols., 2017; Peters y cols., 2014).

Actualmente, existe gran controversia sobre el beneficio de consumir ENNs como sustitutos del azúcar. A pesar de esto, podemos observar un uso cada vez mayor de estas sustancias como componentes de una gran variedad de productos alimenticios en nuestro país. La heterogeneidad en los resultados de los diferentes estudios generalmente es consecuencia de las limitaciones en el diseño de estudio, particularmente el empleo de dosis de ENNs muy elevadas y número de muestra muy reducido. Consideramos relevante evaluar estos efectos en estudios mejor controlados en animales, por lo que el presente trabajo constituye una nueva contribución al conocimiento actual sobre los efectos de los ENNs en el metabolismo glucémico en roedores.



## 2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes constituye un serio problema de salud pública a nivel mundial y nacional. Dentro de la historia natural de esta enfermedad, la IG representa una etapa previa a la diabetes, en la cual hay un incremento en los niveles de glucosa, pero no lo suficiente como para ser diagnosticada como diabetes. En la actualidad, existe controversia respecto a los efectos fisiológicos del consumo de ENNs sobre la homeostasis de la glucosa, por lo que no existe un consenso sobre los beneficios de su empleo como agentes preventivos o de control en personas con obesidad, IG, o diabetes. La mayoría de los estudios que evalúan los efectos de los ENNs sobre la respuesta glucémica presentan limitaciones en cuanto a su diseño. Por ejemplo, la ausencia de un registro calórico, un número de muestra reducido o la falta de un grupo control cuando se evalúan modelos de dietas altas en grasas. Además, para esclarecer los efectos que ejercen los ENNs sobre la respuesta glucémica, es importante emplear modelos experimentales en el cual las dosis empleadas se adapten a las cantidades reales que una persona consume habitualmente. Por lo anterior, decidimos administrar ENNs comerciales, y ajustar las dosis de acuerdo a una IDA para el humano y a la vez comparar ENNs artificiales vs naturales como la estevia, ya que hay muy pocos trabajos al respecto. El conocimiento generado de los efectos de los ENNs sobre la glucemia en este modelo animal propiciará otras investigaciones en humanos que permitan dilucidar los mecanismos involucrados en sus efectos a corto o largo plazo.





### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La IG se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes. La transición de las alteraciones metabólicas que caracterizan a la IG y que preceden a la diabetes pueden documentarse desde años atrás. Las estimaciones actuales indican que alrededor del 70% de personas con estados de hiperglucemia moderada eventualmente desarrollarán diabetes. El estilo de vida occidental ha visto a la IG y su progresión a diabetes convertirse en una de las mayores emergencias de salud pública a nivel mundial y nacional, motivo por el cual es de gran relevancia realizar estudios a este nivel de la gestación de la enfermedad.

Considerando la prevalencia actual de dichas alteraciones en el estado de salud, los productos alimenticios que contienen ENNs y los que se emplean como sustitutos de azúcar han ganado gran popularidad en las últimas décadas. Su consumo ha sido recomendado generalmente como una alternativa para reducir los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal en personas con obesidad, IG o diabetes debido a que brindan una gran potencia de dulzura sin proveer calorías al organismo.

Algunos estudios evalúan los efectos que estos aditivos generan sobre la ingesta calórica o la presión arterial, mientras que otros se enfocan en las consecuencias de su consumo sobre el peso corporal, obesidad, diabetes o cáncer. En general, se han publicado una serie de estudios que postulan una variedad de efectos



beneficiosos, aunque, como se ha mencionado anteriormente, la ingesta de ENNs podría conducir al efecto contrario para el que han sido recomendados.

Otro aspecto que dificulta la comprensión de los efectos de estos aditivos es que, a pesar de que se han reportado efectos adversos durante la administración crónica, generalmente se han empleado dosis que no corresponden a lo que habitualmente un humano podría consumir, lo que complica su comparación. Es por ello, que resulta oportuno examinar más a profundidad sobre estos productos comerciales a través de un diseño de estudio mejor controlado y que se adapte a las condiciones de la vida real. Por lo anterior, la pregunta de investigación surge de la necesidad de investigar dichos efectos sobre la respuesta glucémica. Para esto, se empleó un diseño paralelo, en el cual se comparó los efectos crónicos del consumo de ENNs comerciales en ratas Wistar sanas y con intolerancia a la glucosa.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuáles son los efectos del consumo de edulcorantes no nutritivos sobre la respuesta glucémica en ratas Wistar sanas y con intolerancia a la glucosa?



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar los efectos de edulcorantes no nutritivos sobre la respuesta glucémica en ratas Wistar sanas y con intolerancia a la glucosa.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Inducir intolerancia a la glucosa mediante un modelo de dieta hipercalórica.
2. Determinar los efectos de la administración de sucralosa, aspartame, estevia y rebaudiósido A sobre la ingesta calórica, el peso corporal y la respuesta glucémica postprandial.
3. Determinar los efectos de sucralosa, aspartame, estevia y rebaudiósido A sobre los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL en ayuno.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Instituciones participantes

El presente estudio se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en conjunto con el Laboratorio de Bioquímica de Enfermedades Metabólicas de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT).

### 6.2 Animales

En un estudio crónico, paralelo, aleatorizado y controlado, se emplearon ratas macho Wistar (N = 112) con peso corporal de 150-200 g de 6-8 semanas de edad obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales se alojaron en jaulas de policarbonato, bajo condiciones controladas de temperatura (18 °C a 26°C), ventilación (12 a 15 cambios de aire por hora), humedad relativa (45% a 60%) y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (7:00 am - 7:00 pm). Los cuidados y la experimentación animal se realizaron de acuerdo a la norma oficial mexicana, NOM - 062 – ZOO – 1999 y a los lineamientos establecidos por el comité de investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la UNAM.

### 6.3 Descripción general del estudio

La primera fase del estudio comprendió la inducción de IG mediante un modelo de dieta hipercalórica. Después de un periodo de habituación de una semana, los



animales se dividieron aleatoriamente en dos grupos: grupo dieta hipercalórica (DHC) y grupo dieta normal (DN). La IG fue inducida en el grupo DHC, el cual recibió una dieta alta en grasas (DAG) y sacarosa al 30% diluida en el agua de beber durante 8 semanas. El grupo DN (control) consumió una dieta estándar para roedores (LabDiet Rodent® 5001) y agua potable. En la segunda fase del estudio se evaluaron los efectos del consumo de ENNs durante 8 semanas en los dos modelos animales: 1) ratas sanas y 2) ratas con IG. Las ratas sanas consumieron DN y a aquellas con IG continuaron con la DAG durante el periodo experimental. Previo al inicio de la segunda fase, los animales tuvieron una semana de habituación y posteriormente, los animales de cada modelo se aleatorizaron y se asignaron a los diferentes tratamientos. En ambas fases, la ingesta de alimentos y líquidos fue *ad libitum*. Se realizó una prueba de tolerancia al almidón (PTA) antes y después del periodo experimental con los ENNs. Después de las 8 semanas de tratamiento, se recolectaron muestras de sangre para las determinaciones bioquímicas y se realizó el sacrificio de los animales (Fig. 1).

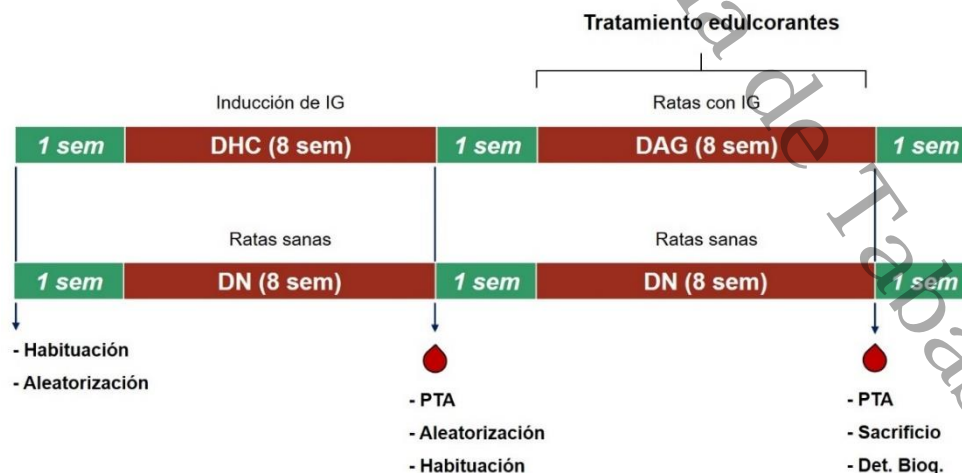


Figura 1. Descripción general del estudio.



## 6.4 Edulcorantes

Se emplearon marcas comerciales de sucralosa (Sweeny plus<sup>®</sup>), aspartame (Selecto Brand<sup>®</sup>) y estevia (Selecto Brand<sup>®</sup>), cuyos contenidos se muestran en la Tabla 1. La sacarosa se adquirió de una marca comercial (Zulka<sup>®</sup>, azúcar de caña refinada) y la glucosa pura de Roquette corporation. El extracto de reb A se adquirió de Anhui Minmetals, Hefei, China (98% de pureza).

**Tabla 1. Contenido de ENN y glucosa en los sobres comerciales**

Marca	ENN	Cantidad de edulcorante	Cantidad de glucosa
Sweeny plus	Sucralosa	1.3 %	98.7%
Selecto Brand	Aspartame	4%	96%
Selecto Brand	Estevia	3%	97%

## 6.5 Procedimientos del estudio

### 6.5.1 Inducción de intolerancia a la glucosa mediante dieta hipercalórica

Un grupo de ratas (n = 68) se sometió a DHC durante 8 semanas, la cual consistió de DAG y sacarosa. La DAG se preparó combinando el alimento comercial molido con manteca de cerdo. El alimento estándar molido (LabDiet Rodent<sup>®</sup> 5001) homogenizado con la manteca de cerdo proporcionaron en conjunto el 60% de las calorías como grasa. La preparación de esta dieta consistió en la molienda de



alimento estándar hasta obtener un polvo fino. Se pesaba 1 kg de alimento molido y se integraba a la manteca de cerdo, a la misma se le adicionaban 100 mL de agua/kg de alimento para formar una mezcla homogénea. Se elaboraban los pellets y se conservaban en bolsas de plástico a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. A la DAG se le incorporó una solución de sacarosa al 30% diluida en el agua de beber (300 g/L). El registro del consumo de alimentos y líquidos se realizó diariamente para calcular la ingesta calórica *ad libitum*. El pesaje de los animales se efectuó una vez por semana. Una semana después del periodo de inducción, se realizó la PTA para confirmar la IG.

En el presente estudio se decidió emplear el modelo de DHC porque se ha demostrado que el desarrollo de resistencia a la insulina, la disfunción en las células  $\beta$ -pancreáticas y la IG se desarrollan en un corto periodo de tiempo. Este modelo reproduce las características metabólicas de la intolerancia en el humano y simula las condiciones nutricionales por las cuales en los individuos se predispone la aparición de la enfermedad (la Fleur y cols., 2007).



### 6.5.2 Evaluación del efecto de los edulcorantes

Se desarrolló un estudio crónico que consistió de 8 semanas de tratamiento con ENNs. Los animales se asignaron por aleatorización estratificada para cada tratamiento de acuerdo al nivel de glucemia basal y al peso corporal de cada animal, (ver Fig. 5 en la sección de resultados). La aleatorización se llevó a cabo mediante la generación de números al azar por computadora en la página random.org. Los efectos del consumo de ENNs se evaluaron en los dos modelos animales: 1) ratas sanas (n = 48) y 2) ratas con IG (n = 64). Las ratas sanas recibieron DN y aquellas con IG consumieron DAG durante el periodo experimental. La composición calórica de la DN y la DAG se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Composición de la DN y la DAG durante el periodo experimental**

Componente	Cantidad	
	DN (n = 48)	DAG (n = 64)
<b>Carbohidratos (%)</b>	57.94	26.76
<b>Proteínas (%)</b>	28.67	13.24
<b>Grasas (%)</b>	13.38	60.00
<b>Calorías (kcal/g)</b>	3.36	4.66

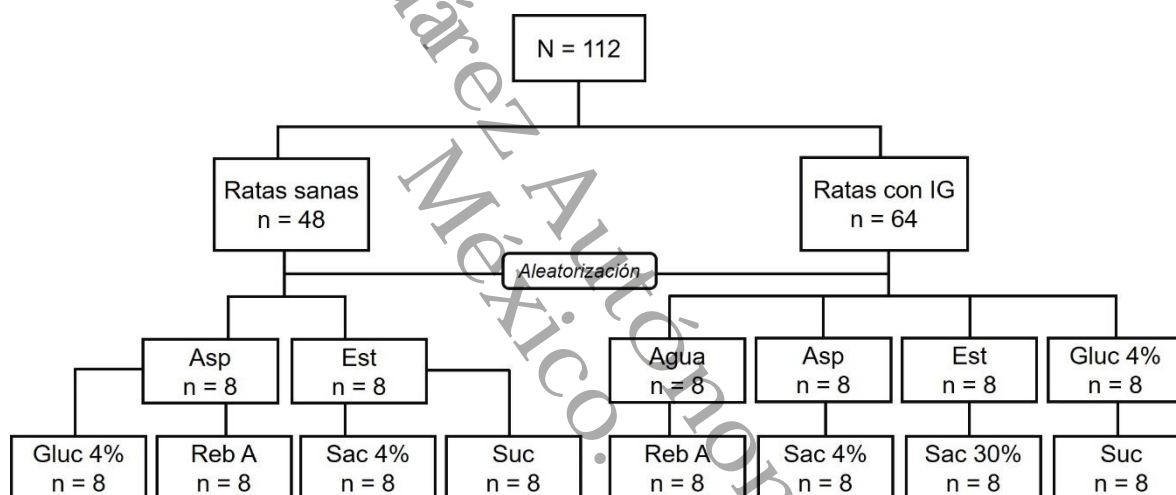
#### 6.5.2.1 Tratamientos

Los ENNs evaluados fueron sucralosa (n = 8), aspartame (n = 8), estevia (n = 8) y reb A (n = 8). El reb A se eligió porque es uno de los GE más abundantes en la hoja de estevia, con mayor potencia de dulzura (200-400x) que el esteviósido (150-300x) con respecto a sacarosa y el que deja menor resabio amargo al ingerirse (Nettleton





y cols., 2019). En ambos modelos se incluyó un grupo con sacarosa al 4% ( $n = 8$ ) y debido a que cada sobre comercial de sustituto de azúcar contiene un porcentaje de glucosa, se agregó un control de glucosa al 4% ( $n = 8$ ). En las ratas con IG se introdujeron dos grupos más, uno que recibió sacarosa al 30% ( $n = 8$ ) y el otro solo agua ( $n = 8$ ). Se asignaron 4 animales por caja (2 cajas por tratamiento). Todos los edulcorantes se diluyeron en el agua de beber. La distribución aleatorizada de los tratamientos en cada modelo, se muestra en la Fig. 2.



**Figura 2. Distribución de los tratamientos.** *gluc*, glucosa; *sac*, sacarosa; *suc*, sucralosa; *asp*, aspartame; *est*, estevia; *reb A*, rebaudiósido A.

#### 6.5.2.2 Dosis

La dosis empleada para cada edulcorante se definió con base en la IDA (US FDA) para el humano (Tabla 3). La dosis administrada de cada ENN se calculó con base en la:  $IDA \text{ (mg/kg de rata/día)} \times \text{peso promedio (kg)} / \text{promedio de ingesta diaria de agua}$  (Suez y cols., 2014). La preparación de todas las soluciones con sustituto de



azúcar se realizó diario ajustando la glucosa al 4% en la solución (ver Fig. 6 en la sección de resultados).

**Tabla 3. Valores de la IDA de los ENNs establecida por la US FDA y su equivalente en sobres**

ENN	IDA de la US FDA (mg/kg/d)	No. de sobres de edulcorantes de mesa equivalentes a la IDA
Sucralosa	5	23*
Aspartame	50	75*
Estevia	4	9*

\*Información obtenida de la US FDA (2018).

#### 6.5.2.3 Mediciones de ingesta de alimento, líquidos y peso corporal

Durante el periodo experimental se llevó a cabo un registro diario del consumo de alimento (g) y líquidos (mL). La estimación del consumo se realizó mediante la diferencia de la cantidad inicial del día previo menos la cantidad final de alimento o líquido encontrada. Las jaulas se controlaron cuidadosamente para detectar desperdicio de alimento. Los bebederos donde se mantenía el agua también eran revisados para detectar cualquier fuga u obstrucción que alterara el consumo. El pesaje de los animales se efectuó dos veces por semana para mejorar el ajuste en el consumo de los ENNs. Para llevar a cabo los registros de alimento y el pesaje de los animales se empleó una balanza de precisión (Precisa BJ 2200C).



#### 6.5.2.4 *Ingesta calórica ad libitum*

Se efectuaron los cálculos de la ingesta calórica de alimentos y líquidos consumidos durante el periodo experimental. Para esto, se sumó la cantidad de calorías ingeridas durante la semana y se dividió por el peso promedio de cada caja correspondiente de la semana. La ingesta calórica *ad libitum* se expresó en kcal/kg de peso corporal.

#### 6.5.2.5 *Prueba de tolerancia al almidón*

Se realizó la prueba de tolerancia al almidón (PTA) antes y después de los tratamientos con los edulcorantes. En cada PTA, los animales se sometieron previamente a un periodo de ayuno por 12 horas. Se realizó punción caudal de la rata y se determinó la glucemia basal (tiempo 0) utilizando un glucómetro (FreeStyle Optium Neo; Abbott, Alameda CA, USA). Posteriormente, todos los animales recibieron una carga de almidón rápidamente digerible (3 g/kg/rata; Amioca<sup>®</sup>, 100% digerible) vía orogástrica y se midió la glucosa postprandial después de 30, 60, 90 y 120 minutos. La Amioca<sup>®</sup> se emplea comúnmente como control en estudios metabólicos (Bodinhm y cols., 2014; Garcia-Vazquez y cols., 2019).



### **6.5.3 Sacrificio**

Al término de las 8 semanas de tratamiento con los edulcorantes, los animales se anestesiaron con una dosis baja de pentobarbital sódico (PiSA<sup>®</sup>, 35 mg/kg/peso) vía intraperitoneal con el objetivo de sedar al animal. El pentobarbital es un barbitúrico de acción prolongada. Este método evita el estrés o el dolor del animal, además, representa una alternativa eficaz de anestesia para estudios sobre metabolismo, ya que investigaciones previas indican que no interfiere con los niveles de glucosa o insulina en plasma en ratas Wistar (Guarino y cols., 2013; Sano y cols., 2016). Se culminó la eutanasia por medio de exanguinación vía punción cardiaca para obtener muestras de sangre para las determinaciones bioquímicas en suero. La manipulación de los animales se realizó sólo cuando se requería para evitar el estrés de los animales en la mayor medida posible.

### **6.5.4 Determinaciones bioquímicas**

Se colectaron muestras de sangre en tubos BD Vacutainer<sup>®</sup> y fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 7 min, el suero se separó por duplicado en viales de 2 mL y se congelaron inmediatamente a -70°C hasta su posterior análisis. La cuantificación de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total y HDL se realizaron en el Analizador Automatizado de Química Clínica A25 (BioSystems<sup>®</sup> Reagents & Instruments S.A, Antioquia, Colombia).



### **6.5.5 Análisis estadístico**

En los estudios experimentales el número adecuado de muestra depende de la técnica estadística con la cual se analicen los datos; en general, el mínimo tamaño de muestra comúnmente aceptado es de 6 (Charan & Kantharia, 2013). Sin embargo, es necesario estimar las pérdidas que pueden ocurrir por diversos factores. En este estudio decidimos incluir 8 animales por grupo, para tomar en cuenta posibles pérdidas que pudieran ocurrir en el transcurso del experimento. Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism versión 7.0 (San Diego, CA, U.S.A) para Windows. Para evaluar la normalidad de la distribución de los valores para cada variable, se analizaron los resultados mediante la prueba de D'Agostino-Pearson. Todos los datos se expresaron como media  $\pm$  error estándar de la media (EEM) y se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de  $p < 0.05$ .

En los resultados del modelo de inducción de IG, las áreas bajo la curva (ABC) de los pesos corporales, la ingesta calórica y la respuesta glucémica se compararon mediante la prueba  $t$  de Student no pareada; en los resultados de los efectos de los ENNs, el ABC de los pesos corporales, el ABC incremental (ABC<sub>i</sub>) de la ingesta calórica y las respuestas glucémicas finales se compararon con ANOVA de un factor *post hoc* de Dunnet. Los cursos temporales de la respuesta glucémica incremental antes vs después de los tratamientos se compararon mediante ANOVA de dos factores *post hoc* de Sidak. Las variaciones en los parámetros bioquímicos se compararon con ANOVA de un factor *post hoc* de Dunnet.



## 7. RESULTADOS

Para la evaluación de los efectos del consumo de los ENNs, un total de 112 ratas macho Wistar iniciaron este estudio, de las cuales 8 no lo completaron, seis ratas que pertenecían al modelo con IG y las otras dos que correspondían al modelo de ratas sanas. A continuación, se presenta el análisis de los datos para las 104 ratas que completaron el estudio.

### 7.1 Inducción de IG mediante DHC

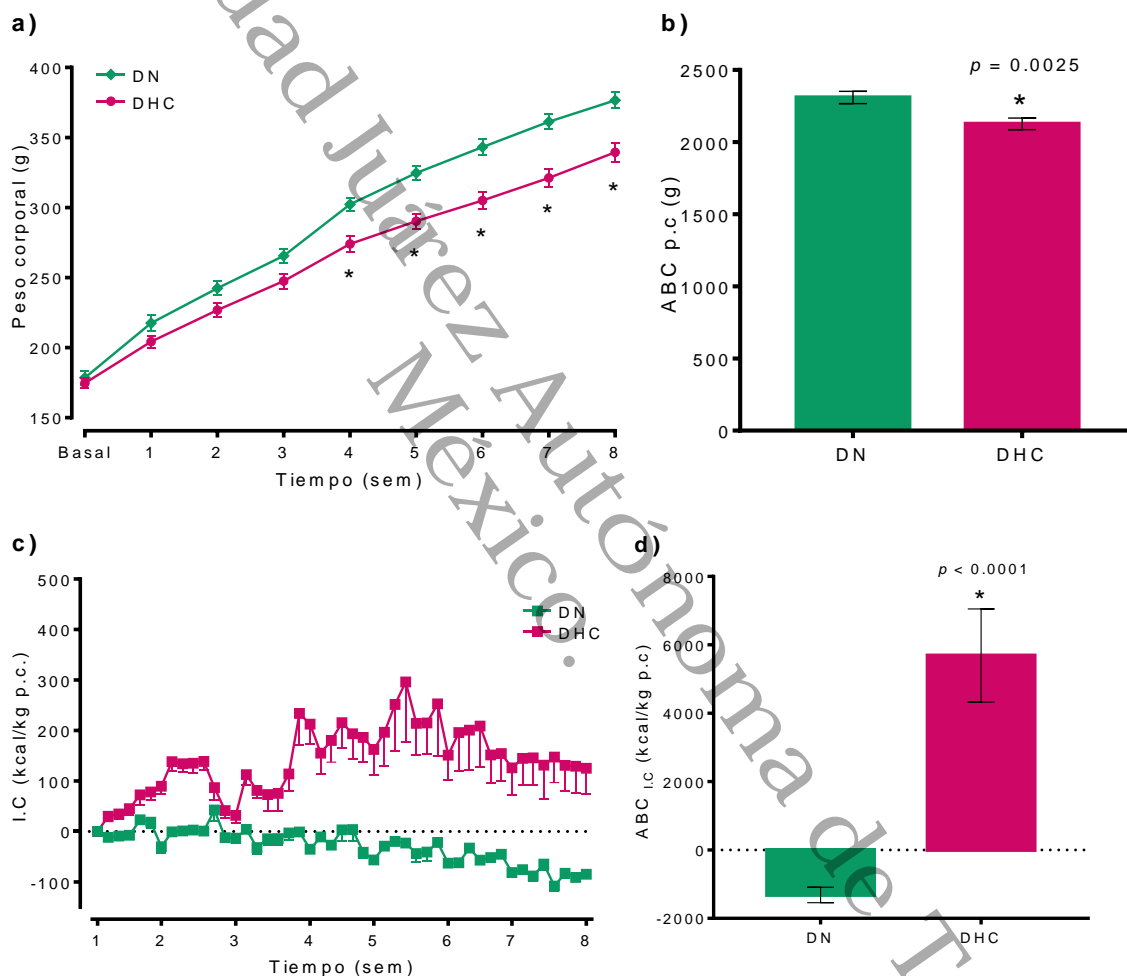
#### 7.1.1 Efecto de la DHC sobre el peso corporal y la ingesta calórica

Inicialmente, los pesos corporales en ambos grupos fueron similares (DN,  $178.48 \pm 5.14$ ,  $n = 45$  vs DHC,  $174.59 \pm 3.75$ ,  $n = 64$ ,  $p < 0.05$ ). En la Fig. 3a se muestran los resultados del ABC temporal de crecimiento. El ABC<sub>DHC</sub> mostró menor peso corporal respecto al ABC<sub>DN</sub> (DN,  $2309 \pm 42.3$  vs DHC,  $2126 \pm 40.13$ ,  $p = 0.0025$ ). Al final, la DHC mostró una reducción significativa en el peso corporal comparada con la DN (DN,  $376.52 \pm 5.72$  vs DHC  $339.42 \pm 6.80$ ,  $p < 0.05$ ).

Con el propósito de determinar la ingesta calórica, se determinó el consumo de alimento sólido (g/kg) y de líquidos (mL/kg). Los animales con DHC consumieron menos alimento que aquellos con DN (DHC,  $50.77 \pm 1.11$  vs DN,  $90.33 \pm 1.55$ ). En relación al consumo de líquidos, el grupo DHC consumió menos volumen de líquidos que el grupo DN (DHC,  $98.95 \pm 4.10$  vs DN,  $206.1 \pm 7.41$ ). En la Fig. 3c se muestran los resultados de la ingesta calórica a través del tiempo. A pesar de que el consumo



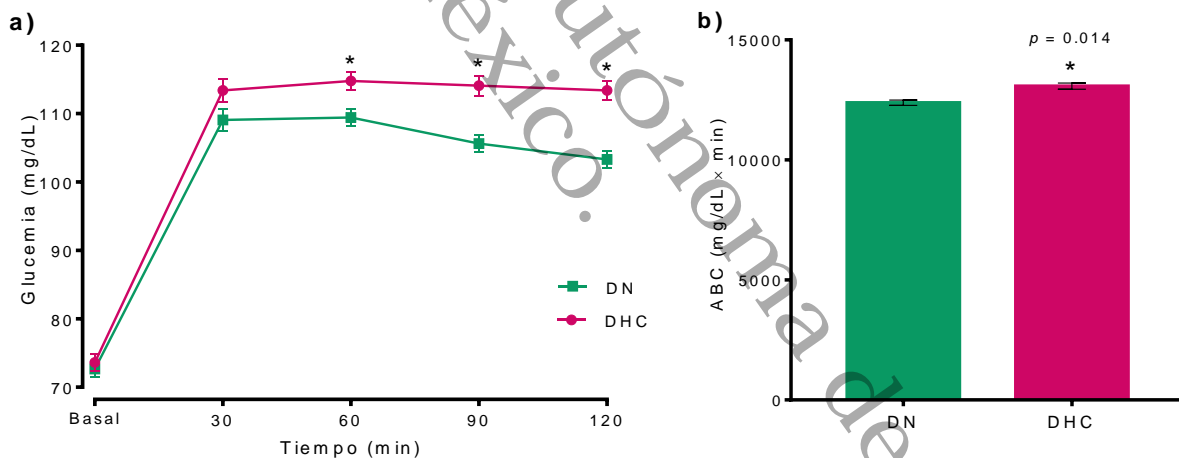
de líquidos y alimento fue mayor en el grupo DN, las ratas del grupo DHC consumieron significativamente mayor cantidad de calorías (DN,  $-29.49 \pm 4.94$  vs DHC,  $140.9 \pm 9.719$ ,  $p < 0.05$ ). El  $ABC_{DN}$  disminuyó la ingesta calórica en el tiempo respecto al  $ABC_{DHC}$  (DN,  $-1317 \pm 226.8$  vs DHC,  $5687 \pm 1362$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 3d).



**Figura 3. Efectos de la DHC sobre el peso corporal y la ingesta calórica durante la fase de inducción de IG. a)** Peso corporal. **b)**  $ABC_{p.c.}$ . **c)** Ingesta calórica. **d)**  $ABC_{i.c.}$ . Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. La curva de peso corporal se analizó mediante la *prueba múltiple de t* por el método FDR (Fate Discovery Rate). La curva de la I.C. y las ABC y se compararon mediante la prueba *t* de Student no pareada. Los valores con una  $*p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. DN, Dieta normal; DHC, Dieta hipercalórica; ABC, área bajo la curva, p.c, peso corporal; I.C, ingesta calórica.

### 7.1.2 Efecto de la DHC sobre la respuesta glucémica

Para determinar los efectos de la DHC sobre la respuesta glucémica se realizó una PTA al finalizar el periodo de inducción de 8 semanas. Como se puede observar en la Fig. 4a, los niveles de glucemia basales no difirieron entre los grupos de estudio (DN,  $72.65 \pm 1.19$  vs DHC,  $73.60 \pm 1.17$ ). Durante la prueba, la DHC alcanzó la mayor respuesta glucémica con un valor máximo a los 60 min y hasta los 120 min respecto a DN (DHC,  $114.77 \pm 1.35$  vs DN,  $109.42 \pm 1.27$ ,  $p < 0.05$ ). En la Fig. 4b, el  $ABC_{120 \text{ min}}$  mostró que la respuesta glucémica de DHC fue mayor con respecto a DN (DN,  $12379 \pm 110.9$ ; DHC,  $13072 \pm 128.7$ ,  $p = 0.014$ ).



**Figura 4. Efecto de la DHC sobre la respuesta glucémica postprandial durante una PTA realizada al final del periodo de inducción de IG. a) Respuesta glucémica, b)  $ABC_{120 \text{ min}}$ .** Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Se realizó ANOVA de dos factores con prueba *post hoc* de Sidak y las  $ABC_{120 \text{ min}}$  se compararon mediante una prueba de *t* de Student. Los valores con una \* $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. DN, Dieta normal; DHC, Dieta hipercalórica; ABC, área bajo la curva.

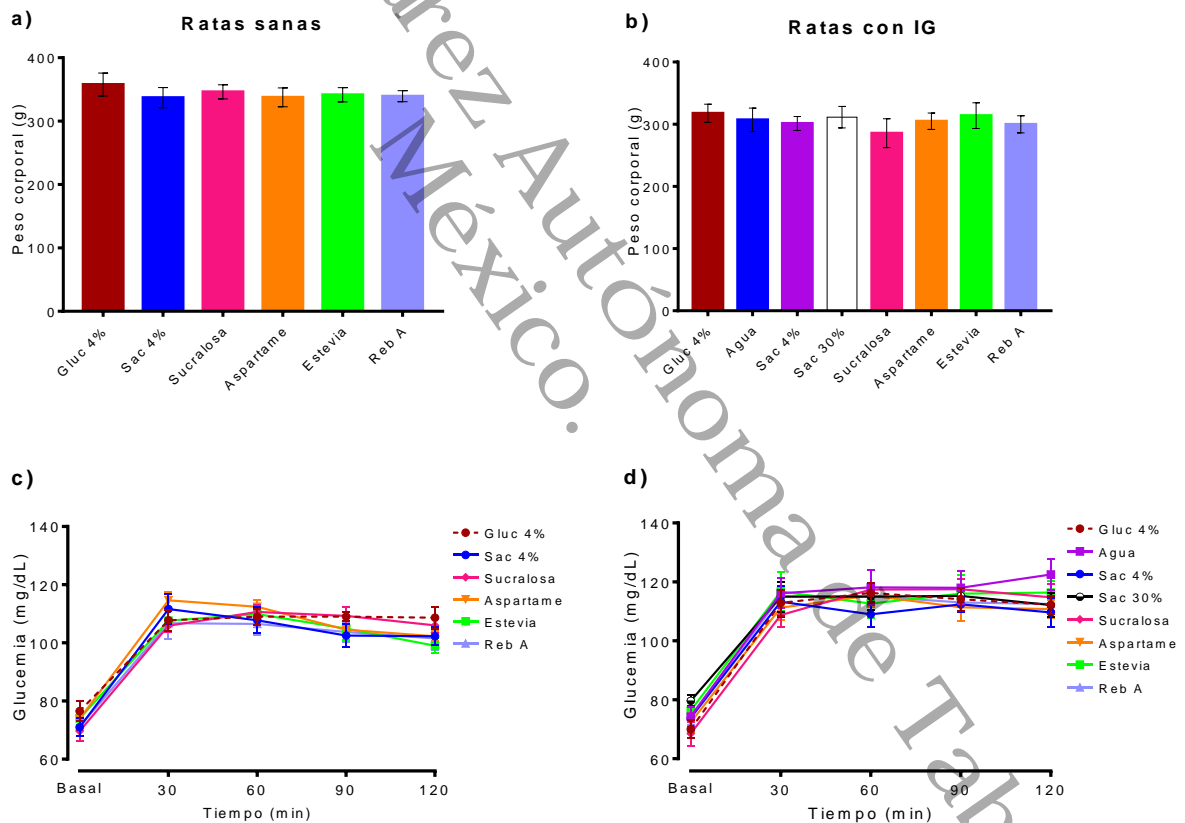




## 7.2 Evaluación del efecto de los edulcorantes

### 7.2.1 Asignación de tratamientos con ENNs

Antes de iniciar la fase de tratamientos, los animales se dividieron en grupos de 8 mediante aleatorización estratificada tomando en cuenta su peso corporal y la respuesta glucémica (Fig. 5). Los resultados muestran que no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos de animales en relación a su peso corporal ( $p > 0.05$ ) o a su respuesta glucémica ( $p > 0.05$ ).



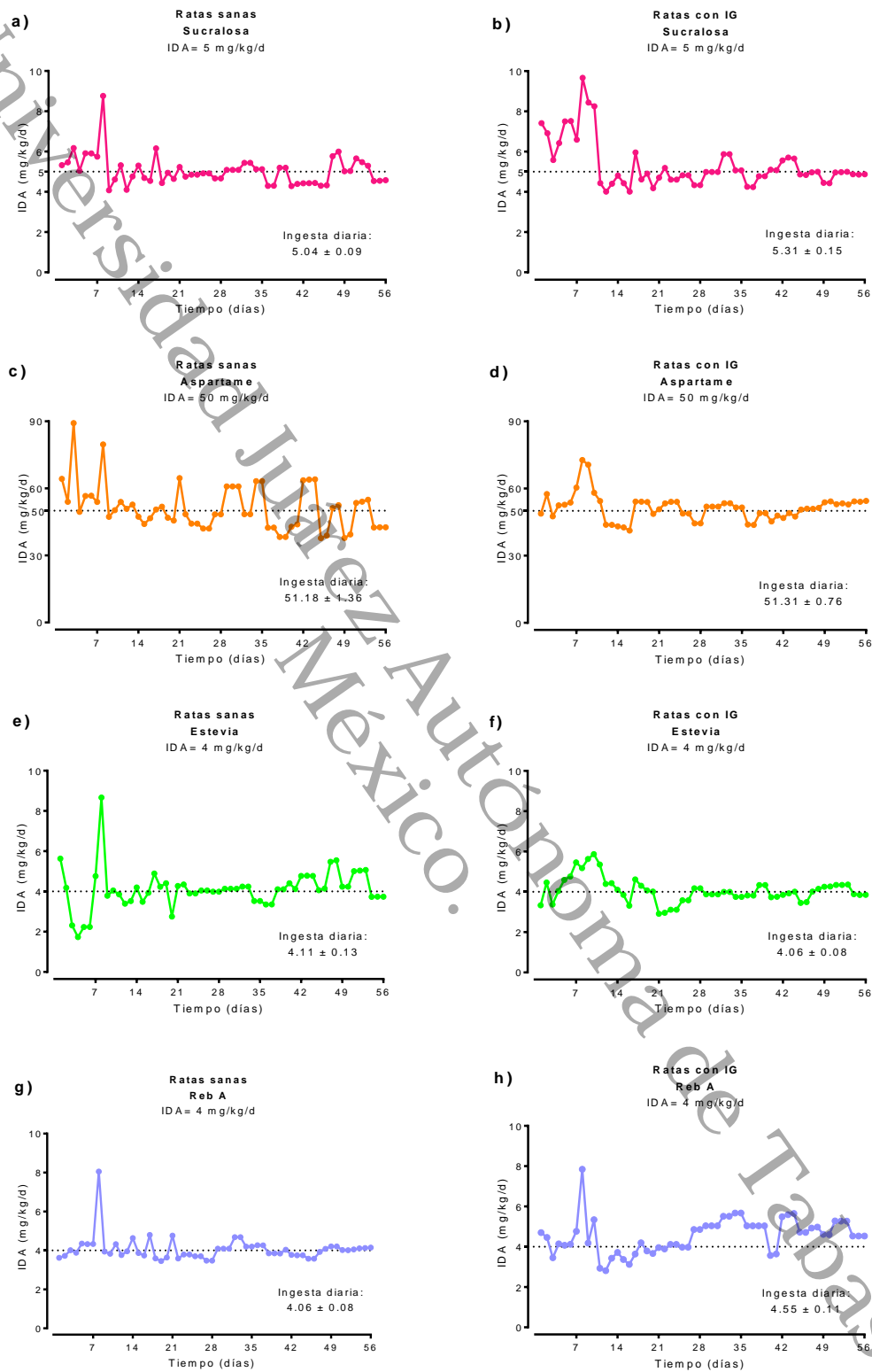
**Figura 5. Asignación aleatorizada de los tratamientos con base al peso corporal y la respuesta glucémica de los animales. a,b) Peso corporal c,d) Respuesta glucémica.** Los pesos se compararon mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Tukey. La respuesta glucémica se comparó mediante ANOVA de dos factores con prueba *post hoc* de Tukey;  $n = 8$  animales/tratamiento.



### **7.2.2 Ingesta diaria de los ENNs administrados**

Las variaciones en el consumo de líquidos se capturaron por día/caja. Esto se realizó para asegurar que los animales ingirieran la dosis deseada (1 IDA) por día. La Fig. 6 muestra que en las primeras semanas existió mayor variación, sin embargo, las dosis consumidas se fueron ajustando a los valores deseados a través del tiempo. Los valores promedio de la ingesta para cada uno de los ENNs y los valores de la IDA establecidos también se pueden apreciar para cada tratamiento.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

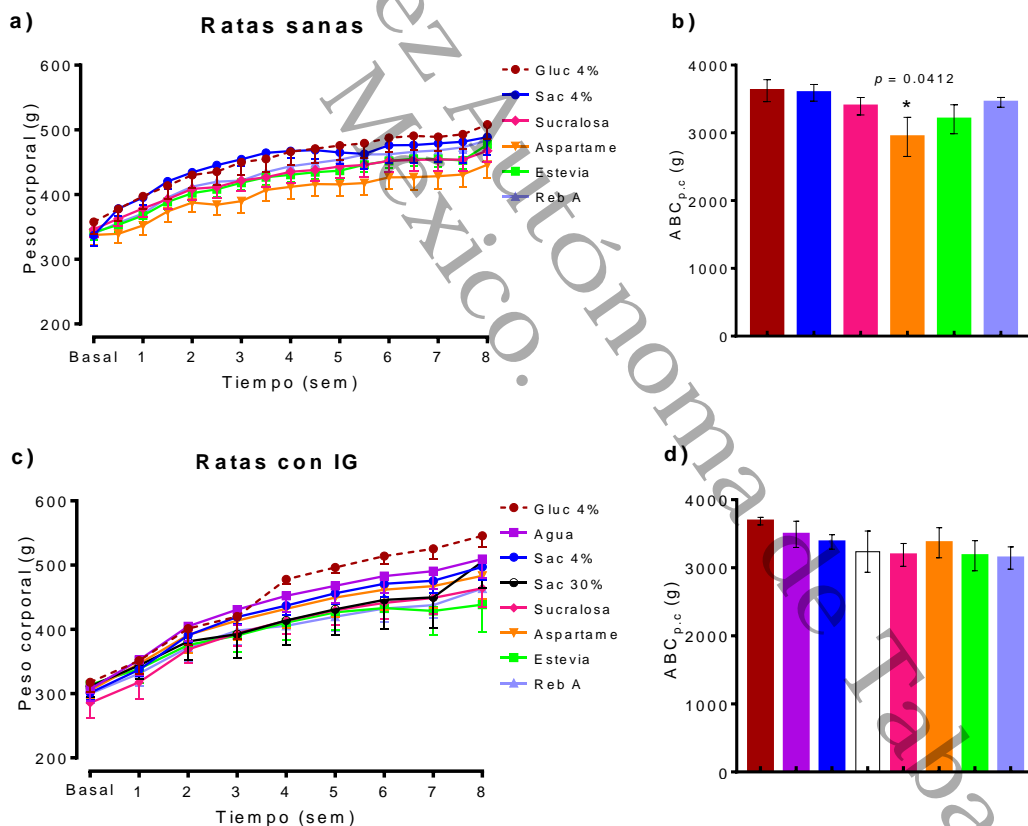


**Figura 6. Variación en el consumo de ENNs a través de las 8 semanas de tratamiento. a, c, e, g) ratas sanas; b, d, f, h) ratas con IG. Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. IDA, Ingesta diaria admisible;  $n = 8$  animales/tratamiento.**



### 7.2.3 Efecto de los ENNs sobre el peso corporal

En la Fig. 7 se muestra el curso temporal del efecto del consumo de ENNs sobre el peso corporal con su respectiva ABC. Como se puede observar en ratas sanas, el aspartame mostró menor incremento del peso corporal a través del tiempo respecto al control (asp,  $2940 \pm 288.5$  vs gluc 4%,  $3622 \pm 162.20$ ,  $p = 0.0412$ ). Aunque sucralosa y estevia mostraron una tendencia a disminuir el peso corporal, no alcanzaron significancia estadística. En ratas con IG, no se observaron diferencias significativas de ningún tratamiento respecto al control.

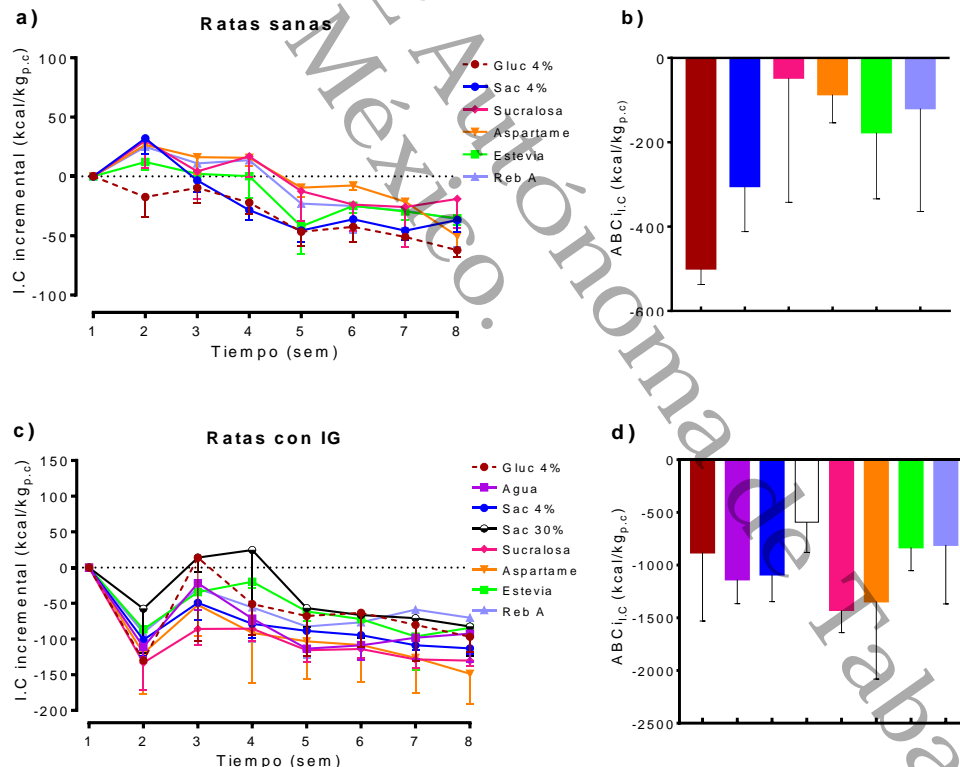


**Figura 7. Efecto de los ENNs sobre el curso temporal de los pesos corporales. a) ratas sanas, b) ABC<sub>p.c</sub> ratas sanas, c) ratas con IG, d) ABC<sub>p.c</sub> ratas con IG.** Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Los pesos se analizaron con la prueba de  $t$  múltiple y las ABC se compararon con ANOVA de un factor *post hoc* de Dunnet. Los valores con una  $*p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. ABC, área bajo la curva; p.c, peso corporal;  $n = 8$  animales/tratamiento.



### 7.2.4 Efecto de los ENNs sobre la ingesta calórica

Los resultados del efecto del consumo de ENNs sobre la ingesta calórica incremental se muestran en la Fig. 8. En ratas sanas se observó una tendencia de los ENNs a aumentar la ingesta calórica respecto al control. Sin embargo, no se encontró significancia estadística. En ratas con IG los resultados fueron inversos, los ENNs mostraron una tendencia a disminuir la ingesta calórica respecto al control. Las ABCi<sub>IDN-DAG</sub> no mostraron diferencias significativas. No obstante, se observó una tendencia de los animales a disminuir su consumo calórico con respecto al inicial en ambos modelos.



**Figura 8. Efecto de los ENNs sobre la ingesta calórica incremental.** a) ratas sanas, b) ABCi ratas sanas, c) ratas con IG, d) ABCi ratas con IG. Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Los cursos temporales incrementales de la ingesta calórica y el ABCi se compararon mediante ANOVA de un factor *post hoc* de Dunnet. I.C., Ingesta calórica; p.c, peso corporal; ABCi, área bajo la curva incremental;  $n = 8$  animales/tratamiento.



### **7.2.5 Efecto de los ENNs sobre la respuesta glucémica**

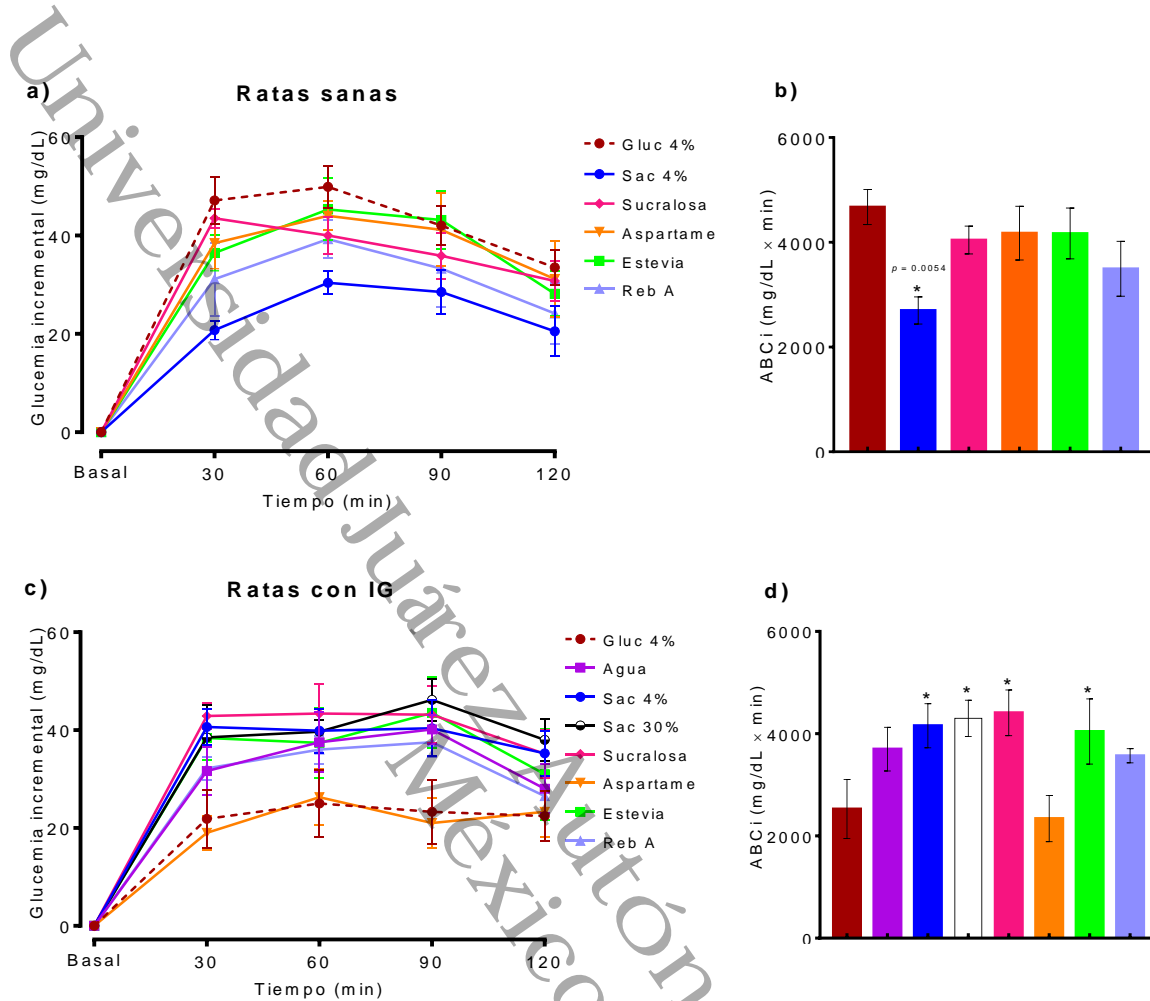
Es importante destacar que los resultados en estos experimentos corresponden al efecto crónico que los ENNs ejercieron a lo largo de las 8 semanas de administración. Al final de este periodo, se practicó una PTA después de un periodo de ayuno de 12 h. Se investigaron los efectos del tratamiento crónico sobre la respuesta glucémica comparada con un control (glucosa 4%).

#### *7.2.5.1 Resultados de las curvas de glucosa finales*

En las ratas sanas no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al control ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, en la Fig. 9a se puede observar que el control mostró el nivel más alto de respuesta glucémica, y contrario a lo esperado, los ENNs mostraron niveles menores de glucemia postprandial. El pico más alto que alcanzó la mayoría de los ENNs fue a los 60 min con una disminución glucémica gradual muy similar, solo la sucralosa mostró un pico máximo a los 30 min disminuyendo la glucemia progresivamente hasta los 120 min. La estevia y el aspartame mostraron los niveles más elevados de glucemia respecto a los demás ENNs. Además, el comportamiento de ambos fue muy similar. El reb A indujo menor respuesta glucémica que la estevia y el aspartame, mientras que la sucralosa a partir del minuto 60 fue similar a reb A. En la Fig. 9b, el ABCi mostró que, de todos los tratamientos, la sacarosa 4% ejerció significativamente la menor respuesta glucémica respecto al control ( $p = 0.0054$ ).



En ratas con IG, los ENNs se comportaron diferente y dos de ellos mostraron diferencias significativas. En la Fig. 9c se observa que el control indujo la menor respuesta glucémica, por debajo de sucralosa, estevia y reb A. En el curso temporal de las glucemias, no se encontraron diferencias significativas, pero se pudo observar que aspartame, mostró una repuesta similar a glucosa. La sacarosa 4% elevó los niveles de glucemia, alcanzando valores similares a los tratamientos con agua y sacarosa 30%, solo que ésta última alcanzó un pico pronunciado a los 90 min y a partir de este tiempo, la glucemia se mantuvo más elevada respecto a los demás tratamientos. La estevia elevó más la glucemia con un pico máximo a los 90 min y con cambios más pronunciados a lo largo del tiempo en comparación a reb A. En la Fig. 9d se muestra el ABCi del modelo de ratas con IG, la cual señala que sucralosa, estevia, sacarosa 4% y sacarosa 30% mostraron diferencias significativas respecto al control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9. Efecto de los ENNs sobre la respuesta glucémica postprandial.** Los ENNs se administraron durante 8 semanas, previos a la prueba de tolerancia al almidón. Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Los cursos temporales de glucemia y el ABCi se compararon mediante ANOVA de un factor *post hoc* de Dunnet. ABCi, área bajo la curva incremental;  $n = 8$  animales/tratamiento.

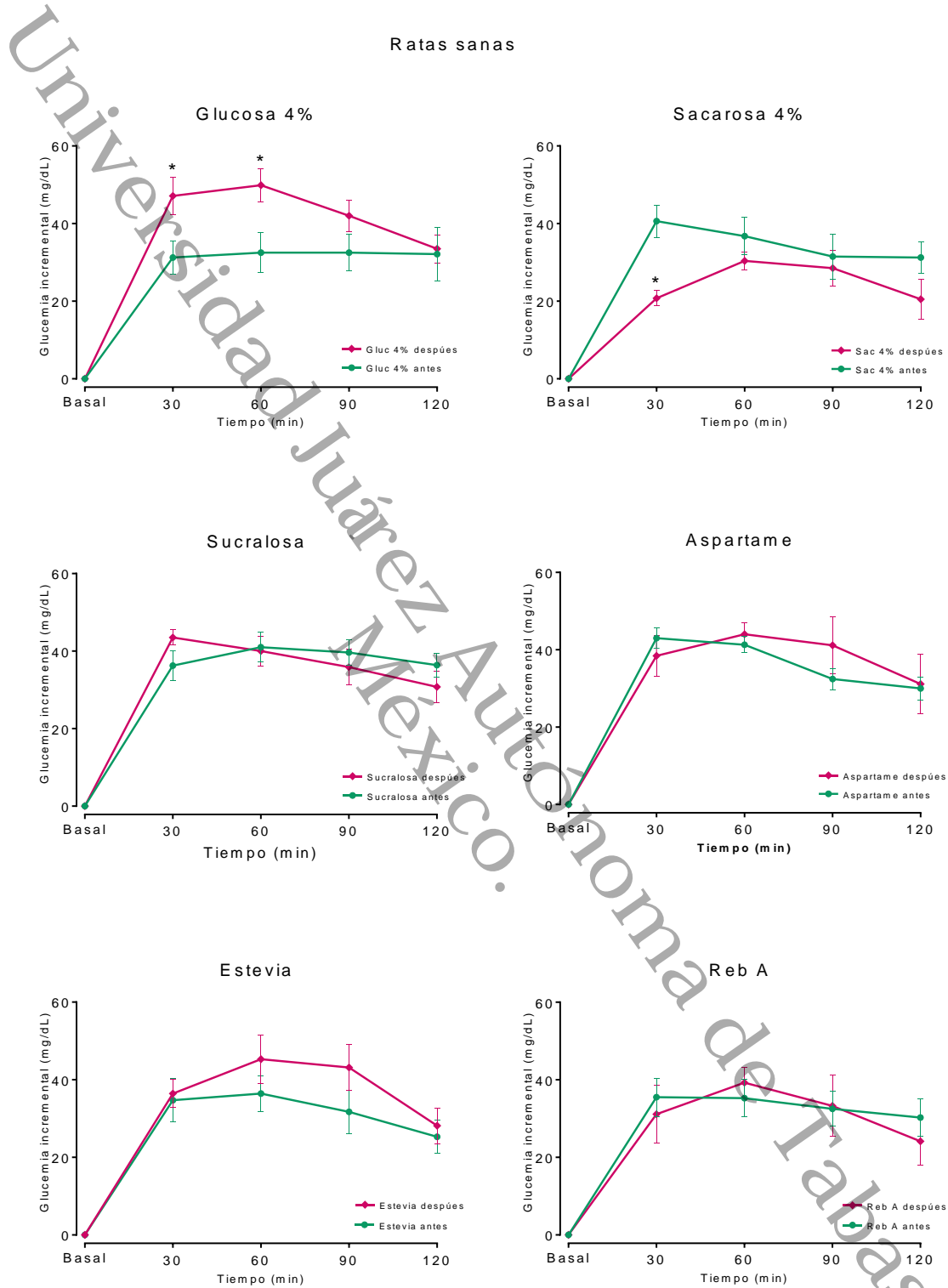




### 7.2.5.2 Resultados de las curvas de glucosa antes vs después de los tratamientos

Por otro lado, se comparó la respuesta glucémica postprandial antes vs después de la administración de los ENNs. Los resultados del modelo de ratas sanas se muestran en la Fig. 10. En éstas, se observó que el control aumentó significativamente en la respuesta glucémica después del tratamiento con glucosa al 4%. Ninguno de los otros tratamientos con ENNs elevó la respuesta glucémica postprandial en comparación con los valores antes del tratamiento y con relación a la respuesta observada en el control. En el grupo con sacarosa 4% disminuyeron los niveles de glucemia a los 30 min, sin embargo, a partir de los 60 min se alcanzaron niveles muy similares a los valores antes de iniciar el tratamiento.

Los resultados del modelo de ratas con IG se muestran en la Fig. 11. En éstas, los resultados del control con glucosa al 4% mostraron una disminución en la respuesta glucémica comparado con los valores observados en la curva antes del tratamiento con ENN. Estos resultados fueron contrarios a los observados en ratas sanas donde la glucosa indujo aumento de la respuesta glucémica. No se encontraron diferencias significativas antes vs después de sucralosa, estevia y reb A. El aspartame mostró un comportamiento muy similar al control con glucosa al 4% induciendo una reducción en la respuesta glucémica en relación a la respuesta antes de iniciar el tratamiento.



**Figura 10. Respuesta glucémica postprandial antes vs después de los tratamientos con los ENNs en ratas sanas.** Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Los cursos temporales de las glucemias se compararon mediante ANOVA de dos factores *post hoc* de Sidak. Los valores con una  $*p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.  $n = 8$  animales/tratamiento.



Ratas con IG

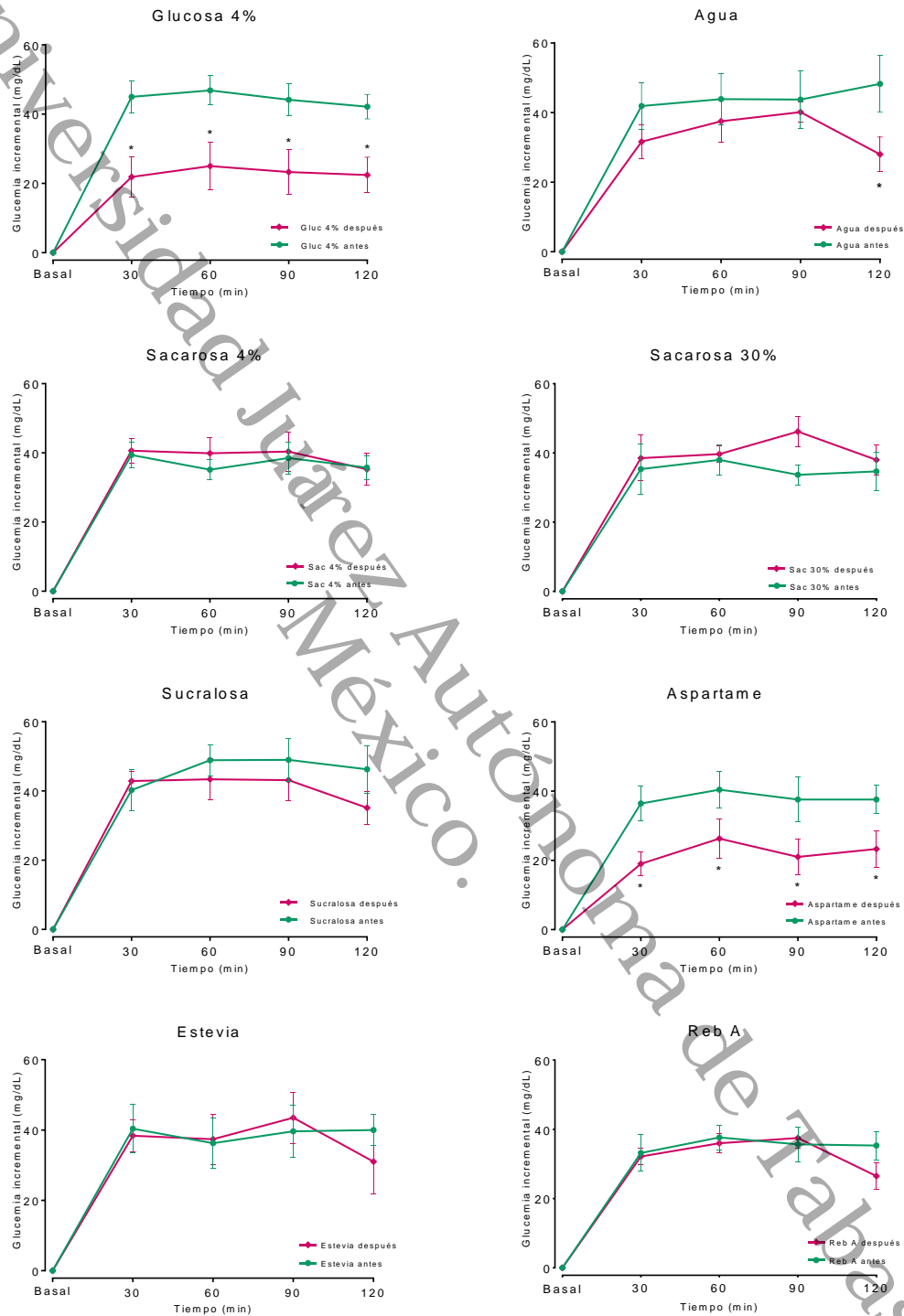


Figura 11. Respuesta glucémica postprandial antes vs después de los tratamientos con los ENNs en ratas con IG. Los datos se presentan como media  $\pm$  EEM. Los cursos temporales de glucemia se compararon mediante ANOVA de dos factores *post hoc* de Sidak. Los valores con una  $*p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.  $n = 8$  animales/tratamiento.



### **7.2.6 Efecto de los ENNs sobre diversos parámetros bioquímicos en ayuno**

Con relación a los efectos del consumo de ENNs sobre algunos metabolitos en ayuno, en ratas sanas ( $n = 46$ ) se pudo observar que el tratamiento con aspartame elevó los niveles de colesterol total respecto al control (asp,  $76.43 \pm 5.27$  vs gluc,  $51.38 \pm 4.90$ ,  $p = 0.0010$ ). Interesantemente, la estevia incrementó los niveles de triglicéridos en contraste al control (estevia,  $56.29 \pm 3.98$  vs gluc,  $38.63 \pm 3.02$ ,  $p = 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en los niveles de glucosa y HDL ( $p > 0.05$ ). En ratas con IG ( $n = 58$ ), como es de esperarse, la sac 30% aumentó los niveles de glucosa con respecto al control (sac 30%,  $166.50 \pm 11.80$  vs gluc,  $111.4 \pm 9.76$ ,  $p = 0.02$ ). En estos grupos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol total, triglicéridos y HDL ( $p > 0.05$ ).



## 8. DISCUSIÓN

El presente estudio demostró que la ingesta de sucralosa, aspartame, estevia o reb A durante 8 semanas no incrementó la respuesta glucémica postprandial en ratas sanas y con intolerancia a la glucosa.

### 8.1 Inducción de IG mediante DHC

En este estudio se desarrolló un modelo de IG mediante la administración de una DHC. Reportes previos han demostrado que el consumo de dietas con alto contenido en grasas y alto contenido en carbohidratos a libre elección conduce a la disfunción parcial de las células  $\beta$ -pancreáticas, lo que conlleva al desarrollo de IG en un corto periodo de tiempo (Diepenbroek y cols., 2017; la Fleur y cols., 2014; la Fleur y cols., 2010; Podell y cols., 2017). Este tipo de modelo es adecuado porque refleja las condiciones nutricionales de la dieta occidental mediante las cuales los individuos desarrollan alteraciones metabólicas que los predisponen a enfermedades crónicas como la diabetes (Zhou y cols., 2014).

Durante la primera fase del estudio se determinó qué efectos tuvieron las dietas sobre el peso corporal. Los resultados mostraron que la DHC indujo menor ganancia de peso corporal en las ratas después de 8 semanas de tratamiento respecto al grupo DN. Estos resultados difieren de los reportados por otros estudios en roedores, donde la DHC incrementó el peso corporal (Chen y cols., 2011; Zhou y cols., 2014).



A pesar de que los animales del grupo con DHC mostraron menor incremento en el peso corporal, fueron los que mantuvieron una mayor ingesta calórica con un menor consumo de alimento y líquidos en contraste con los resultados observados en el grupo DN. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores empleando el mismo tipo de dieta (Pinyo y cols., 2019; Yang y cols., 2012). El menor consumo de alimentos en los animales del grupo DHC puede explicarse parcialmente por la conocida respuesta compensatoria que los roedores mantienen ante la adición de alimentos con alta densidad energética, en especial de carbohidratos. Este tipo de dieta resulta en una mayor ingesta calórica, pero en una disminución en la calidad de los nutrimentos, como las proteínas. Lo que contribuye al desarrollo de los desórdenes metabólicos (Chen y cols., 2011; DiMeglio & Mattes, 2000).

Nuestros resultados son similares a un estudio realizado por Gómez-Crisóstomo y cols. (2018). Ellos encontraron que un grupo de ratas alimentadas con DHC ingirieron mayor cantidad de calorías y presentaron menor ganancia de peso. Su estudio sugiere que esto puede atribuirse al estado de malnutrición que los animales desarrollaron. En otras palabras, se ha propuesto que el exceso calórico provisto por la ingesta de la solución con sacarosa contribuye a la disminución del consumo de alimento, lo cual puede derivar en una menor ingesta de nutrimentos importantes, tales como proteínas, vitaminas y minerales (Chen y cols., 2011).

Otros estudios han revelado que aquellas ratas que consumen una proporción muy baja de proteínas en la dieta pueden desarrollar una disminución de la masa



muscular por incremento de la termogénesis en el tejido adiposo, lo que conduce a una menor ganancia de peso (Ceolín y cols., 2019; Murphy y cols., 2018). Esto concuerda con el tipo de dieta que consumieron nuestros animales durante las 8 semanas de inducción, la cual consistió de una dieta alta en grasas (60%), alta en carbohidratos (30% obtenido de la sacarosa) y baja en proteínas (13.24%).

Por otro lado, los resultados de la PTA que se empleó para confirmar la IG, revelaron que la DHC indujo niveles de glucemia postprandiales más elevados que aquellas ratas que solo consumieron la DN, como se esperaba. Aunque el nivel de glucosa máximo alcanzado en la PTA después de la DHC no sobrepasó los 114.77 mg/dL, se consideró suficiente para evaluar el efecto de los ENNs, debido a que representa un metabolismo alterado de glucosa sin alcanzar niveles representativos de diabetes.

## **8.2 Efectos de los edulcorantes**

### ***8.2.1 Efectos sobre el peso corporal y la ingesta calórica***

El presente estudio constituye una nueva contribución al conocimiento actual de los efectos de los ENNs sobre el balance energético y el metabolismo glucémico. Hasta la fecha, existe una gran controversia sobre el beneficio de estas sustancias como sustitutos del azúcar. A pesar de esto, podemos observar el empleo cada vez mayor de estos aditivos como componentes en una gran variedad de productos alimenticios en nuestro país. La mayor parte de los estudios sobre el consumo



crónico de ENNs han reportado efectos perjudiciales sobre el balance energético, el peso corporal y el metabolismo glucémico en modelos animales y en humanos.

Feijó y cols. (2013) mostraron que ratas suplementadas con yogurt (20 mL) adicionado con sacarina sódica (0.3%) o aspartame (0.4%) durante 12 semanas, incrementó el peso corporal, comparado a la suplementación con sacarosa (20%), aunque la ingesta total calórica fue similar entre los grupos. von Poser Toigo y cols. (2015) encontraron que el consumo de aspartame durante la gestación, predispone a la alteración de parámetros metabólicos y conduce a cambios en la conducta de la alimentación en la vida adulta en ratas. Bian y cols. (2017) señalaron que la administración de ace-k durante 4 semanas a una dosis de 37.4 mg/kg/d indujo aumento de peso corporal en ratones sanos. Rosales-Gomez y cols. (2018) encontraron que el consumo de una solución con sucralosa o estevia, empleando las mismas dosis (4.16 mg/L) de ambos edulcorantes, indujeron aumento del peso corporal y mostraron disminución del consumo de alimentos comparado a sacarosa (41.66 mg/mL) en ratones sanos. Los diferentes estudios han planteado que la actividad metabólica de los ENNs sobre la ingesta calórica, el apetito o el peso corporal puede ser mediada por: 1) Alteración de las concentraciones de hormonas intestinales (incretinas y grelina) mediante la activación de los receptores de sabor dulce (T1R2/T1R3) orales o extraorales, 2) Alteración de la capacidad de compensación de las calorías o, 3) Modificación de la MI que puede conducir a la sobre-regulación de vías proinflamatorias y promotoras de la adipogénesis (Rother y cols., 2018).





Los resultados obtenidos en este estudio, demostraron que el consumo de ENNs por 8 semanas no ejerció efectos significativos sobre el peso corporal y la ingesta calórica en ratas sanas y con IG. A pesar de esto, se pudo observar una tendencia de los ENNs a disminuir la ingesta calórica respecto a la inicial, sin embargo, esto no se tradujo en disminución del peso corporal. Nuestros resultados son consistentes con algunas investigaciones en roedores y en humanos que han señalado que el consumo de ENNs no induce efectos adversos sobre el peso corporal, la ingesta calórica o la saciedad (Anton y cols., 2010; Soto y cols., 2017; Uebanso y cols., 2017; Van Wymelbeke y cols., 2004). Otros estudios han mostrado que el consumo de ENNs es beneficioso para la pérdida de peso en personas con IG o diabetes (Peters y cols., 2014; Sorensen y cols., 2014). Otros estudios han mostrado una tasa de crecimiento del peso corporal más lenta o sin diferencias significativas con respecto al control (Mitsutomi y cols., 2014; Palmnäs y cols., 2014; Tovar y cols., 2017). Con base a los estudios previos, el consumo de ENNs no parece estimular mecanismos que aumenten el consumo calórico o el peso corporal.

### **8.2.2 Efectos sobre la respuesta glucémica**

El impacto del consumo de ENNs sobre la respuesta glucémica ha tomado mayor relevancia desde la publicación de un estudio realizado por Suez y cols. (2014). Ellos mostraron que el consumo de ENNs induce IG en roedores y humanos. Entre otros ENNs, la respuesta más alta se observó después del consumo de sacarina (3333 mg/kg/d) en roedores y también se reprodujo en 4 de 7 sujetos sanos después de recibir 5 mg/kg/d durante una semana. El desarrollo de la IG fue atribuida a los



cambios en la composición y función de la MI causada por el desbalance en la proporción de ciertos taxones bacterianos. Un estudio reciente mostró que el consumo de sucralosa (1.5%) en ratas bajo un régimen alimentario con DAG durante 16 semanas produjo efectos similares a la sacarosa (10%); la sucralosa mostró aumento de la expresión de receptores del sabor dulce (T1R2 y T1R3), que a su vez estimularon las concentraciones de GIP y GLP-1, lo que provocó hiperinsulinemia. Además, el tipo de dieta en combinación con la sucralosa alteró la vía de señalización de la insulina en el tejido adiposo, disminuyendo las concentraciones de GLUT-4, lo que resultó en hiperglucemia (Sánchez-Tapia y cols., 2019).

En el presente estudio los resultados del efecto del consumo de ENNs sobre la respuesta glucémica se presentaron de dos maneras: 1) El análisis de las curvas finales de glucosa; y 2) El análisis con la comparación de las curvas de glucosa antes vs después de los tratamientos. A nuestro conocimiento, la mayoría de los estudios en roedores que evalúan los efectos de los ENNs sobre el metabolismo glucémico solo han reportado los cambios temporales de la glucemia al final de los tratamientos, sin reportar las condiciones de la tolerancia a la glucosa al inicio del estudio. Sin embargo, el análisis de la respuesta glucémica basal proporciona información valiosa que permite esclarecer si los efectos encontrados se deben a los tratamientos administrados o a las características inherentes de los animales de estudio. Por esta razón, en este trabajo decidimos incluir estas determinaciones.



Los resultados de nuestro estudio demostraron que los ENNs evaluados no ejercieron efectos significativos sobre la respuesta glucémica en ratas sanas y con IG. Esta respuesta se observó cuando se comparó la respuesta glucémica antes vs después de los tratamientos. No obstante, el análisis estadístico basado solo en los resultados de las curvas finales podría conducir a la incompleta conclusión de que la sucralosa y la estevia si elevan la respuesta glucémica significativamente en las ratas con IG.

Nuestros hallazgos son consistentes con algunos de los estudios crónicos realizados previamente en roedores, en los cuales reportan que los ENNs no afectan el metabolismo glucémico. Por ejemplo, Mitsutomi y cols. (2014) mostraron que la ingesta de aspartame/eritritol (4%) durante 4 semanas disminuyó la hiperglucemia comparado a sacarosa en ratones con obesidad. Soto y cols. (2017) determinaron que después de 12 semanas el consumo de sucralosa (60 mM) no afectó la tolerancia a la glucosa en ratones alimentados con DHC. En otro estudio, hallaron que el consumo moderado de sucralosa o aspartame a dosis equivalentes a 1 IDA durante 6 semanas no presentó efectos adversos sobre la respuesta glucémica e insulinémica en un grupo de ratas sanas (Tovar y cols., 2017). Los resultados de este último estudio son similares a los nuestros, incluso cuando utilizamos ratas con IG además de ratas sanas.

Por otra parte, algunos estudios han reportado que el extracto acuoso de estevia ejerce efectos antihiperglucémicos en ratas diabéticas (Ahmad & Ahmad, 2018; Jeppesen y cols., 2003; Kujur y cols., 2010) y en humanos (Thomas J.E, 2010). Por



esta razón, dichos estudios han sugerido el consumo del extracto de estevia para el manejo de personas con diabetes. En nuestros resultados de las curvas antes vs después, demostramos que la estevia no modificó significativamente la respuesta glucémica en ambos modelos. En un estudio realizado en sujetos con diabetes que fueron suplementados con GE durante 3 meses, las concentraciones de glucosa en plasma no incrementaron (Timpe Behnen y cols., 2013). Por otra parte, se ha sugerido que el extracto de reb A, incrementa los niveles de insulina por la inhibición de los canales de potasio dependientes de ATP y la supresión de la secreción de glucagón por las células  $\alpha$ -pancreáticas (Abudula y cols., 2008), mientras que otros estudios en ratas sanas indicaron que bajas dosis de reb A (2-3 mg/kg/d) durante 12 semanas no alteró el metabolismo de la glucosa y el peso corporal (Nettleton y cols., 2019) o después de 8 semanas a dosis de 0.025 g/kg/d no mejoró el control glucémico ni la ingesta calórica (Dyrskog y cols., 2005). No obstante, los estudios que evalúan la estevia y el reb A aún no son consistentes. Además, es escasa la investigación acerca de sus efectos sobre el metabolismo glucémico bajo condiciones dietarias similares a las del humano. También hay que tomar en consideración que muchos de estos estudios se basan en el uso del extracto puro de estevia y no en versiones comerciales.

En los diversos estudios en roedores, la alteración de la respuesta glucémica se ha encontrado después de la carga de glucosa oral cuando los ENNs son administrados de forma oral a través del alimento sólido (Swithers y cols., 2012) o del agua de beber (Gul y cols., 2017; Palmnäs y cols., 2014; Suez y cols., 2014). No



obstante, cuando la carga de glucosa es suministrada mediante cánula sin tener contacto con los receptores del sabor dulce, se ha observado una respuesta glucémica normal a la carga de glucosa (Swithers y cols., 2012; Tovar y cols., 2017). En otro sentido, se ha hallado elevación de la glucemia postprandial en ratas alimentadas con DAG (Palmnäs y cols., 2014; Suez y cols., 2014) y en sujetos con obesidad (Pepino y cols., 2013) pero no en sujetos sanos (Ma y cols., 2010). La ausencia de efecto del consumo de los ENNs sobre la respuesta glucémica en ratas sanas es consistente con los resultados encontrados en nuestro estudio. Es decir, aunque no se encontraron diferencias significativas, las curvas finales mostraron una tendencia de los ENNs a elevar la glucemia con respecto al control solo en el grupo de ratas con IG, no en ratas sanas. Lo que sugiere que el régimen alimentario es un factor predisponente para la alteración de la glucemia al consumo de los ENNs. En relación a los efectos de los ENNs sobre los niveles de marcadores bioquímicos en ayunas, no se encontraron efectos en ambos grupos. Solo en ratas sanas, el aspartame elevó modestamente el colesterol e interesantemente, la estevia incrementó los triglicéridos.

La mayoría de los estudios que evalúan los efectos de los ENNs sobre la respuesta glucémica presentan limitaciones en cuanto a su diseño. Por ejemplo, la ausencia de un registro calórico, número de muestra reducido o la falta de un grupo control cuando se evalúan modelos con dieta alta en grasas o en ocasiones se emplean dosis demasiado elevadas que no corresponden a lo que un humano podría ingerir de manera habitual. Por dichas razones, las fortalezas del presente trabajo incluyen



los siguientes hechos: Se evaluó el efecto de los ENNs en dos condiciones fisiológicas distintas, se empleó un tamaño de muestra de 8 animales por tratamiento, lo que ayuda a disminuir el grado de variabilidad entre los animales. Se estudiaron los efectos de diferentes tipos de edulcorantes nutritivos (glucosa, sacarosa), no nutritivos artificiales (sucralosa, aspartame) y no nutritivos naturales (estevia, reb A). Se emplearon versiones comerciales, en vez de la sustancia pura, ya que estos productos representan la forma habitual en el que las personas los ingieren. Por otro lado, la mayoría de estudios han empleado dosis muy por encima del consumo recomendado para el humano. En el presente estudio se administraron dosis con base a la IDA para cada uno de los ENNs usados. Además, El presente estudio utilizó almidón en lugar de glucosa en la prueba de tolerancia. La razón de esta sustitución fue que una dosis tan alta de dextrosa (1-2 g/kg) no es habitualmente consumida por los humanos en una comida típica. El almidón es un carbohidrato dietético predominante y se encuentra ampliamente en numerosos alimentos cotidianos (Ble-Castillo y cols., 2012).

Entre las limitaciones de este trabajo podrían mencionarse las siguientes: la carencia de un control con agua en el modelo de ratas sanas; el periodo de tiempo de tratamiento fue solo de 8 semanas por lo que no podemos descartar que periodos mayores pudieran inducir alteraciones metabólicas; se emplearon solo animales machos, por lo que los resultados no se podrían extrapolar a las hembras; la dosis calculada para el reb A se realizó con base a la IDA que se emplea para estevia (4



mg/kg/d) y no de acuerdo con los “equivalentes de esteviol” lo cual incrementaría este valor a 12 mg/kg/d.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.



## 9. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el consumo de ENNs durante 8 semanas a dosis equivalentes a una IDA no incrementó la respuesta glucémica en ratas sanas y con IG.

Los ENNs no indujeron cambios sobre el peso corporal en ratas sanas y con IG. Tampoco modificaron la ingesta calórica, sin embargo, mostraron una tendencia a disminuir la ingesta calórica en ambos grupos, y mayormente en ratas con IG.

Los ENNs no modificaron los niveles en ayuno de glucosa, triglicéridos, colesterol y HDL en ratas sanas y con IG.

## 10. RECOMENDACIONES

Realizar estudios en animales de ambos sexos con un mayor periodo de tiempo de suplementación y considerar una edad menor en los animales.

Realizar estudios en humanos durante un periodo adecuado y empleando dosis que puedan ser representativas del consumo habitual.

Se requieren posteriores estudios en humanos para dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos potenciales de estas sustancias sobre el peso corporal, el apetito y la respuesta glucémica.





## 11. REFERENCIAS

- Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., Abdel-Rahman, A. A., McLendon, R. E., & Schiffman, S. S. (2008). Splenda Alters Gut Microflora and Increases Intestinal P-Glycoprotein and Cytochrome P-450 in Male Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(21), 1415-1429.
- Abudula, R., Matchkov, V. V., Jeppesen, P. B., Nilsson, H., Aalkjær, C., & Hermansen, K. (2008). Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K<sup>+</sup>-channels\*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10(11), 1074-1085.
- ADA. (2011). American Diabetes Association. Summary of revisions to the 2011 clinical practice recommendations.
- Ahmad, S. Y., Friel, J. K., & MacKay, D. S. (2019). The effect of the artificial sweeteners on glucose metabolism in healthy adults: a randomized double-blinded crossover clinical trial. *Appl Physiol Nutr Metab*.
- Ahmad, U., & Ahmad, R. S. (2018). Anti diabetic property of aqueous extract of Stevia rebaudiana Bertoni leaves in Streptozotocin-induced diabetes in albino rats. *BMC Complement Altern Med*, 18(1), 179.
- Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P., & Williamson, D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37-43.
- Ayob, M., Hazali, N., & Masri, M. (2014). Effect of Acute Stevia Consumption on Blood Glucose Response in Healthy Malay Young Adults. *Sains Malaysiana*, 43, 649-654.
- Barrios-Correa, A. A., Estrada, J., #xe9, A., Martel, C., Olivier, M., . . . #xfa. (2018). Chronic Intake of Commercial Sweeteners Induces Changes in Feeding Behavior and Signaling Pathways Related to the Control of Appetite in BALB/c Mice. *BioMed Research International*, 2018, 15.
- Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., & Lu, K. (2017). The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS One*, 12(6).
- Bissonnette, D. J., List, S., Knoblich, P., & Hadley, M. (2017). The Effect of Nonnutritive Sweeteners Added to a Liquid Diet on Volume and Caloric Intake and Weight Gain in Rats. *Obesity*, 25(9), 1556-1563.
- Ble-Castillo, J. L., Aparicio-Trapala, M. A., Juárez-Rojop, I. E., Torres-Lopez, J. E., Mendez, J. D., Aguilar-Mariscal, H., . . . Diaz-Zagoya, J. C. (2012). Differential Effects of High-Carbohydrate and High-Fat Diet Composition on Metabolic Control and Insulin Resistance in Normal Rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(5), 1663-1676.
- Bodinhm, C. L., Smith, L., Thomas, E. L., Bell, J. D., Swann, J. R., Costabile, A., . . . Robertson, M. D. (2014). Efficacy of increased resistant starch consumption in human type 2 diabetes. *Endocr Connect*, 3(2), 75-84.
- Bonnet, F., Tavenard, A., Esvan, M., Laviolle, B., Viltard, M., Lopicard, E. M., & Lainé, F. (2018). Consumption of a Carbonated Beverage with High-Intensity Sweeteners Has No Effect on Insulin Sensitivity and Secretion in Nondiabetic Adults. *The Journal of Nutrition*, 148(8), 1293-1299.
- Brown, A. W., Bohan Brown, M. M., Onken, K. L., & Beitz, D. C. (2011). Short-term consumption of sucralose, a nonnutritive sweetener, is similar to water with regard to select markers of hunger signaling and short-term glucose homeostasis in women. *Nutrition Research*, 31(12), 882-888.



- Brown, R. J., Walter, M., & Rother, K. I. (2012). Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. *Diabetes Care*, 35(5), 959-964.
- Bryant, C. E., Wasse, L. K., Astbury, N., Nandra, G., & McLaughlin, J. T. (2014). Non-nutritive sweeteners: no class effect on the glycaemic or appetite responses to ingested glucose. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 68, 629.
- Ceolín, P., Franca, S. A. D., Froelich, M., Santos, M. P. D., Pereira, M. P., Queiroz, T. S., . . . Kawashita, N. H. (2019). A low-protein, high carbohydrate diet induces increase in serum adiponectin and preserves glucose homeostasis in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91.
- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics*, 4(4), 303-306.
- Chen, G.-C., Huang, C.-Y., Chang, M.-Y., Chen, C.-H., Chen, S.-W., Huang, C.-j., & Chao, P.-M. (2011). Two unhealthy dietary habits featuring a high fat content and a sucrose-containing beverage intake, alone or in combination, on inducing metabolic syndrome in Wistar rats and C57BL/6J mice. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 60(2), 155-164.
- Chia, C. W., Shardell, M., Gravenstein, K. S., Carlson, O. D., Simonsick, E. M., Ferrucci, L., & Egan, J. M. (2018). Regular low-calorie sweetener consumption is associated with increased secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes Obes Metab*, 20(9), 2282-2285.
- Diepenbroek, C., Eggels, L., Ackermans, M. T., Fliers, E., Kalsbeek, A., Serlie, M. J., & Fleur, S. E. I. (2017). Differential effects of hypercaloric choice diets on insulin sensitivity in rats. 232(1), 49.
- DiMeglio, D. P., & Mattes, R. D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International Journal Of Obesity*, 24(6), 794-800.
- Dunford, E., Taillie, L., Miles, D., Eyles, H., Tolentino-Mayo, L., & Ng, S. (2018). Non-Nutritive Sweeteners in the Packaged Food Supply—An Assessment across 4 Countries. *Nutrients*, 10(2), 257.
- Dyrskog, S. E., Jeppesen, P. B., Chen, J., Christensen, L. P., & Hermansen, K. (2005). The diterpene glycoside, rebaudioside A, does not improve glycemic control or affect blood pressure after eight weeks treatment in the Goto-Kakizaki rat. *Rev Diabet Stud*, 2(2), 84-91.
- Farhat, G., Berset, V., & Moore, L. (2019). Effects of Stevia Extract on Postprandial Glucose Response, Satiety and Energy Intake: A Three-Arm Crossover Trial. *Nutrients*, 11(12).
- FDA. (2018). *US Food and Drug Administration: Additional information about High-Intensity Sweeteners Permitted for use in Food in the United States*. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>.
- Feijó, F. d. M., Ballard, C. R., Foletto, K. C., Batista, B. A. M., Neves, A. M., Ribeiro, M. F. M., & Bertoluci, M. C. (2013). Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*, 60, 203-207.
- Fitch, C., & Keim, K. S. (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Acad Nutr Diet*, 112(5), 739-758.
- Foletto, K. C., Melo Batista, B. A., Neves, A. M., de Matos Feijo, F., Ballard, C. R., Marques Ribeiro, M. F., & Bertoluci, M. C. (2016). Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*, 96, 604-610.



- Fowler, S. P., Williams, K., & Hazuda, H. P. (2015). Diet soda intake is associated with long-term increases in waist circumference in a biethnic cohort of older adults: the San Antonio Longitudinal Study of Aging. *J Am Geriatr Soc*, 63(4), 708-715.
- Fowler, S. P., Williams, K., Resendez, R. G., Hunt, K. J., Hazuda, H. P., & Stern, M. P. (2008). Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)*, 16(8), 1894-1900.
- Frankenfeld, C. L., Sikaroodi, M., Lamb, E., Shoemaker, S., & Gillevet, P. M. (2015). High-intensity sweetener consumption and gut microbiome content and predicted gene function in a cross-sectional study of adults in the United States. *Annals of Epidemiology*, 25(10), 736-742.e734.
- Gallagher, C., Keogh, J. B., Pedersen, E., & Clifton, P. M. (2016). Fructose acute effects on glucose, insulin, and triglyceride after a solid meal compared with sucralose and sucrose in a randomized crossover study. *Am J Clin Nutr*, 103(6), 1453-1457.
- García-Vázquez, C., Ble-Castillo, J. L., Arias-Cordova, Y., Cordova-Uscanga, R., Tovilla-Zarate, C. A., Juárez-Rojop, I. E., . . . Díaz-Zagoya, J. C. (2019). Effects of Resistant Starch Ingestion on Postprandial Lipemia and Subjective Appetite in Overweight or Obese Subjects. *Int J Environ Res Public Health*, 16(20).
- Glendinning, J. I. (2018). Oral Post-Oral Actions of Low-Calorie Sweeteners: A Tale of Contradictions and Controversies. *Obesity (Silver Spring)*, 26 Suppl 3, S9-s17.
- Gómez-Crisóstomo, N. P., De la Cruz-Hernández, E. N., Méndez Méndez, E. R., Hernández-Landero, M. F., Camacho Liévano, J. U., & Martínez-Abundis, E. (2018). Differential effect of high-fat, high-sucrose and combined high-fat/high-sucrose diets consumption on fat accumulation, serum leptin and cardiac hypertrophy in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-6.
- Goyal, S. K., Samsher, & Goyal, R. K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1), 1-10.
- Gregersen, S., Jeppesen, P. B., Holst, J. J., & Hermansen, K. (2004). Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 53(1), 73-76.
- Grotz, V. L., Pi-Sunyer, X., Porte, D., Roberts, A., & Richard Trout, J. (2017). A 12-week randomized clinical trial investigating the potential for sucralose to affect glucose homeostasis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 22-33.
- Guarino, M. P., Santos, A. I., Mota-Carmo, M., & Costa, P. F. (2013). Effects of Anaesthesia on Insulin Sensitivity and Metabolic Parameters in Wistar Rats. *In Vivo*, 27(1), 127-132.
- Gul, S. S., Hamilton, A. R., Munoz, A. R., Phupitakphol, T., Liu, W., Hyoju, S. K., . . . Hodin, R. A. (2017). Inhibition of the gut enzyme intestinal alkaline phosphatase may explain how aspartame promotes glucose intolerance and obesity in mice. *Appl Physiol Nutr Metab*, 42(1), 77-83.
- Higgins, K. A., Considine, R. V., & Mattes, R. D. (2018). Aspartame Consumption for 12 Weeks Does Not Affect Glycemia, Appetite, or Body Weight of Healthy, Lean Adults in a Randomized Controlled Trial. *The Journal of Nutrition*, 148(4), 650-657.
- Horwitz, D. L., McLane, M., & Kobe, P. (1988). Response to single dose of aspartame or saccharin by NIDDM patients. *Diabetes Care*, 11(3), 230-234.
- IDF. (2017). International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium.
- Jeppesen, P. B., Gregersen, S., Rolfsen, S. E. D., Jepsen, M., Colombo, M., Agger, A., . . . Hermansen, K. (2003). Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 52(3), 372-378.



- Kim, Y., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2019). Non-nutritive Sweeteners and Glycaemic Control. *Curr Atheroscler Rep*, 21(12), 49.
- Kreuch, D., Keating, D. J., Wu, T., Horowitz, M., Rayner, C. K., & Young, R. L. (2018). Gut Mechanisms Linking Intestinal Sweet Sensing to Glycemic Control. *Frontiers in endocrinology*, 9, 741-741.
- Kujur, R. S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H. N., Singh, K. K., Kumari, S., & Roy, B. K. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res*, 2(4), 258-263.
- Kuk, J. L., & Brown, R. E. (2016). Aspartame intake is associated with greater glucose intolerance in individuals with obesity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 41(7), 795-798.
- la Fleur, S., Luijendijk, M., van der Zwaal, E., Brans, M., & Adan, R. (2014). The snacking rat as model of human obesity: effects of a free-choice high-fat high-sugar diet on meal patterns. *International Journal Of Obesity*, 38, 643-649.
- la Fleur, S. E., Luijendijk, M. C. M., van Rozen, A. J., Kalsbeek, A., & Adan, R. A. H. (2010). A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *International Journal Of Obesity*, 35, 595.
- la Fleur, S. E., Vanderschuren, L. J. M. J., Luijendijk, M. C., Kloeze, B. M., Tiesjema, B., & Adan, R. A. H. (2007). A reciprocal interaction between food-motivated behavior and diet-induced obesity. *International Journal Of Obesity*, 31(8), 1286-1294.
- Laviada, H., & Molina Segui, F. (2017). *Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología sobre los edulcorantes no calóricos* (Vol. 2017).
- Lobach, A. R., Roberts, A., & Rowland, I. R. (2019). Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 385-399.
- Lohner, S., Toews, I., & Meerpohl, J. J. (2017). Health outcomes of non-nutritive sweeteners: analysis of the research landscape. *Nutrition Journal*, 16(1), 55.
- Ma, J., Chang, J., Checklin, H. L., Young, R. L., Jones, K. L., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2010). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. *Br J Nutr*, 104(6), 803-806.
- Maki, K. C., Curry, L. L., Reeves, M. S., Toth, P. D., McKenney, J. M., Farmer, M. V., . . . Tarka, S. M. (2008). Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7, Supplement), S47-S53.
- Masic, U., Harrold, J. A., Christiansen, P., Cuthbertson, D. J., Hardman, C. A., Robinson, E., & Halford, J. C. (2017). EffectS of non-nutritive sWeetened beverages on appetITe during aCtive weigHt loss (SWITCH): Protocol for a randomized, controlled trial assessing the effects of non-nutritive sweetened beverages compared to water during a 12-week weight loss period and a follow up weight maintenance period. *Contemp Clin Trials*, 53, 80-88.
- Mitsutomi, K., Masaki, T., Shimasaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Kakuma, T., & Shibata, H. (2014). Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism*, 63(1), 69-78.
- Murphy, M., Peters, K. Z., Denton, B. S., Lee, K. A., Chadchankar, H., & McCutcheon, J. E. (2018). Restriction of dietary protein leads to conditioned protein preference and elevated palatability of protein-containing food in rats. *Physiol Behav*, 184, 235-241.
- Nathan, D. M., Davidson, M. B., DeFronzo, R. A., Heine, R. J., Henry, R. R., Pratley, R., & Zinman, B. (2007). Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance. *Implications for care*, 30(3), 753-759.



- Nettleton, J. E., Klancic, T., Schick, A., Choo, A. C., Shearer, J., Borgland, S. L., . . . Reimer, R. A. (2019). Low-Dose Stevia (Rebaudioside A) Consumption Perturbs Gut Microbiota and the Mesolimbic Dopamine Reward System. *Nutrients*, 11(6), 1248.
- Nettleton, J. E., Reimer, R. A., & Shearer, J. (2016). Reshaping the gut microbiota: Impact of low calorie sweeteners and the link to insulin resistance? *Physiology & Behavior*, 164, 488-493.
- Olalde-Mendoza, L., & Moreno-Gonzalez, Y. E. (2013). [Modification of fasting blood glucose in adults with diabetes mellitus type 2 after regular soda and diet soda intake in the State of Queretaro, Mexico]. *Arch Latinoam Nutr*, 63(2), 142-147.
- Olivier-Van Stichelen, S., Rother, K. I., & Hanover, J. A. (2019). Maternal Exposure to Non-nutritive Sweeteners Impacts Progeny's Metabolism and Microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 10(1360).
- Packard, A. E. B., Ghosal, S., Herman, J. P., Woods, S. C., & Ulrich-Lai, Y. M. (2014). Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. *Psychoneuroendocrinology*, 47, 178-188.
- Palmnäs, M. S. A., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., . . . Shearer, J. (2014). Low-Dose Aspartame Consumption Differentially Affects Gut Microbiota-Host Metabolic Interactions in the Diet-Induced Obese Rat. *PLoS One*, 9(10), e109841.
- Pepino, M. Y. (2015). Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiology & Behavior*, 152, 450-455.
- Pepino, M. Y., Tiemann, C. D., Patterson, B. W., Wice, B. M., & Klein, S. (2013). Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care*, 36(9), 2530-2535.
- Peters, J. C., Wyatt, H. R., Foster, G. D., Pan, Z., Wojtanowski, A. C., Vander Veur, S. S., . . . Hill, J. O. (2014). The effects of water and non-nutritive sweetened beverages on weight loss during a 12-week weight loss treatment program. *Obesity (Silver Spring)*, 22(6), 1415-1421.
- Pinyo, J., Hira, T., & Hara, H. (2019). Continuous feeding of a combined high-fat and high-sucrose diet, rather than an individual high-fat or high-sucrose diet, rapidly enhances the glucagon-like peptide-1 secretory response to meal ingestion in diet-induced obese rats. *Nutrition*, 62, 122-130.
- Podell, B. K., Ackart, D. F., Richardson, M. A., DiLisio, J. E., Pulford, B., & Basaraba, R. J. (2017). A model of type 2 diabetes in the guinea pig using sequential diet-induced glucose intolerance and streptozotocin treatment. *Dis Model Mech*, 10(2), 151-162.
- Polyak, E., Gombos, K., Hajnal, B., Bonyar-Muller, K., Szabo, S., Gubicsko-Kisbenedek, A., . . . Ember, I. (2010). Effects of artificial sweeteners on body weight, food and drink intake. *Acta Physiol Hung*, 97(4), 401-407.
- PRNewswire. (2015). Global Food Sweetener market- Growth, Trends, Forecast for the period (2015-2020). Retrieved from <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-food-sweetener-market--growth-trends-forecast-for-the-period-2015-2020-300119302.html>
- Raben, A., Vasilaras, T. H., Møller, A. C., & Astrup, A. (2002). Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(4), 721-729.
- Rogers, P. J., Hogenkamp, P. S., de Graaf, C., Higgs, S., Lluch, A., Ness, A. R., . . . Mela, D. J. (2016). Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int J Obes (Lond)*, 40(3), 381-394.



- Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C., Brito-Córdova, G., gomez-diaz, R., & Valdes, P. (2018). Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 108, 485-491.
- Romo-Romo Alonso, A.-V. P., Brito-Córdova Griselda X. y Gómez-Pérez Francisco J. (2017). Prevalencia del consumo de edulcorantes no nutritivos (ENN) en una población de pacientes con diabetes en México. *PERMANYER GACETA MÉDICA DE MÉXICO*, 153:161-174.
- Rosales-Gomez, C. A., Martinez-Carrillo, B. E., Resendiz-Albor, A. A., Ramirez-Duran, N., Valdes-Ramos, R., Mondragon-Velasquez, T., & Escoto-Herrera, J. A. (2018). Chronic Consumption of Sweeteners and Its Effect on Glycaemia, Cytokines, Hormones, and Lymphocytes of GALT in CD1 Mice. *Biomed Res Int*, 2018, 1345282.
- Rother, K. I., Conway, E. M., & Sylvetsky, A. C. (2018). How Non-nutritive Sweeteners Influence Hormones and Health. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29(7), 455-467.
- Sánchez-Tapia, M., Martínez-Medina, J., Tovar, A. R., & Torres, N. (2019). Natural and Artificial Sweeteners and High Fat Diet Modify Differential Taste Receptors, Insulin, and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats. *Nutrients*, 11(4).
- Sano, Y., Ito, S., Yoneda, M., Nagasawa, K., Matsuura, N., Yamada, Y., . . . Nagata, K. (2016). Effects of various types of anesthesia on hemodynamics, cardiac function, and glucose and lipid metabolism in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 311(6), H1360-H1366.
- Solomi, L., Rees, G. A., & Redfern, K. M. (2019). The acute effects of the non-nutritive sweeteners aspartame and acesulfame-K in UK diet cola on glycaemic response. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(7), 894-900.
- Sorensen, L. B., Vasilaras, T. H., Astrup, A., & Raben, A. (2014). Sucrose compared with artificial sweeteners: a clinical intervention study of effects on energy intake, appetite, and energy expenditure after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr*, 100(1), 36-45.
- Soto, M., Chaumontet, C., Even, P., Azzout-Marniche, D., Tomé, D., & Fromentin, G. (2017). Metabolic effects of intermittent access to caloric or non-caloric sweetened solutions in mice fed a high-caloric diet. *Physiology & Behavior*, 175.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, C. A., Maza, O., . . . Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514, 181.
- Swithers, S. E., Baker, C. R., & Davidson, T. L. (2009). General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behav Neurosci*, 123(4), 772-780.
- Swithers, S. E., & Davidson, T. L. (2008). A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav Neurosci*, 122(1), 161-173.
- Swithers, S. E., Laboy, A. F., Clark, K., Cooper, S., & Davidson, T. L. (2012). Experience with the high-intensity sweetener saccharin impairs glucose homeostasis and GLP-1 release in rats. *Behav Brain Res*, 233(1), 1-14.
- Sylvetsky, A. C., Brown, R. J., Blau, J. E., Walter, M., & Rother, K. I. (2016). Hormonal responses to non-nutritive sweeteners in water and diet soda. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 71.
- Sylvetsky, A. C., & Rother, K. I. (2018). Nonnutritive Sweeteners in Weight Management and Chronic Disease: A Review. *Obesity (Silver Spring)*, 26(4), 635-640.



- Tey, S. L., Salleh, N. B., Henry, J., & Forde, C. G. (2016). Effects of aspartame, monk fruit, stevia and sucrose-sweetened beverages on postprandial glucose, insulin and energy intake. *International Journal Of Obesity*, 41, 450.
- Thomas J.E, M. J. G. (2010). Stevia: It's not just about calories. *The Open Obesity Journal*, 2:101-109.
- Timpe Behnen, E., Ferguson, M., & Carlson, A. (2013). Do Sugar Substitutes Have Any Impact on Glycemic Control in Patients with Diabetes? *Journal of Pharmacy Technology*, 29, 61-65.
- Tovar, A. P., Navalta, J. W., Kruskall, L. J., & Young, J. C. (2017). The effect of moderate consumption of non-nutritive sweeteners on glucose tolerance and body composition in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 42(11), 1225-1227.
- Uebanso, T., Ohnishi, A., Kitayama, R., Yoshimoto, A., Nakahashi, M., Shimohata, T., . . . Takahashi, A. (2017). Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice. *Nutrients*, 9(6).
- USDA. (2012). United States Department of Agriculture. Sugar and Sweeteners Outlook Retrieved from [https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/39349/32749\\_sssm290.pdf?v=0](https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/39349/32749_sssm290.pdf?v=0)
- Van Wymelbeke, V., Beridot-Therond, M. E., de La Gueronniere, V., & Fantino, M. (2004). Influence of repeated consumption of beverages containing sucrose or intense sweeteners on food intake. *Eur J Clin Nutr*, 58(1), 154-161.
- von Poser Toigo, E., Huffell, A. P., Mota, C. S., Bertolini, D., Pettenuzzo, L. F., & Dalmaz, C. (2015). Metabolic and feeding behavior alterations provoked by prenatal exposure to aspartame. *Appetite*, 87, 168-174.
- Wang, Q.-P., Browman, D., Herzog, H., & Neely, G. G. (2018). Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS One*, 13(7).
- WHO. (2016). *World Health Organization. Global report on diabetes*. Geneva, Switzerland.
- Wu, T., Zhao, B. R., Bound, M. J., Checklin, H. L., Bellon, M., Little, T. J., . . . Rayner, C. K. (2011). Effects of different sweet preloads on incretin hormone secretion, gastric emptying, and postprandial glycemia in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 95(1), 78-83.
- Yang, Z.-H., Miyahara, H., Takeo, J., & Katayama, M. (2012). Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 4(1), 32.
- Zhao, X., Yan, J., Chen, K., Song, L., Sun, B., & Wei, X. (2018). Effects of saccharin supplementation on body weight, sweet receptor mRNA expression and appetite signals regulation in post-weanling rats. *Peptides*, 107, 32-38.
- Zhou, X., Han, D., Xu, R., Li, S., Wu, H., Qu, C., . . . Zhao, Y. (2014). A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One*, 9(12).