

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

División Académica de Ciencias de la Salud



**“EFECTOS DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS SOBRE
MICROBIOTA INTESTINAL EN RATAS CON DIETA NORMAL O
DIETA ALTA EN GRASAS”**

**Tesis para obtener el Título de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

Presenta:

Meztli Ramos García

Directores:

**Dr. Jorge Luis Ble Castillo
Dra. Alma Delia Genis Mendoza**

Villahermosa, Tabasco.

Junio, 2023



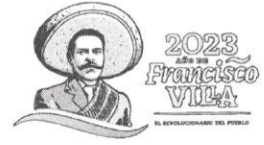
**UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División
Académica
de Ciencias de
la Salud

Jefatura
del Área de
Investigación



Villahermosa, Tabasco, 13 de junio de 2023

Of. No. 0531/DACS/JI

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

C. Meztli Ramos García

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Presente

Comunico a Usted, que autorizo la impresión de la tesis titulada **"EFECTOS DE EDULCORANTES NO NUTRITIVOS SOBRE MICROBIOTA INTESTINAL EN RATAS CON DIETA NORMAL O DIETA ALTA EN GRASAS"** con índice de similitud 6% y registro del proyecto No. **Jl-PG-157**; previamente revisada y aprobada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez, Dra. Viridiana Olvera Hernández, Dra. Crystell Guadalupe Guzmán Priego, Dr. Jorge Luis Blé Castillo y el Dr. Xavier Miguel Boldo León, Lo anterior para sustentar su trabajo recepcional del **Doctorado en Ciencias Biomédicas**, donde fungen como Directores de Tesis: el Dr. Jorge Luis Blé Castillo y la Dra. Alma Delia Genis Mendoza.

Atentamente

Dra. Mirian Carolina Martínez López
Directora



- C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo.- Director de tesis
- C.c.p.- Dra. Alma Delia Genis Mendoza.- Director de Tesis
- C.c.p.- Dra. Isela Esthery Juárez Rojop.- Sinodal
- C.c.p.- Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Carina Shianya Álvarez Villagómez.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Viridiana Olvera Hernández.- Sinodal
- C.c.p.- Dra. Crystell Guadalupe Guzmán priego.- 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/DC/CGME/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 **09:00** horas del día **06** del mes de **junio** de **2023** 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 MICROBIOTA INTESTINAL EN RATAS CON DIETA NORMAL O DIETA ALTA EN GRASAS"

Presentada por el alumno (a):

Ramos	García	Meztli
Apellido Paterno	Materno	Nombre (s)

Con Matricula

2	0	1	E	6	2	0	0	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

Doctor 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
Dra. Alma Delia Genis Mendoza
Directores de Tesis

Dr. Isela Esther Juárez Rojop

Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla

Dr. Carina Shianya Álvarez Villagómez

Dr. Viridiana Oivera Hernández

Dr. Crystell Guadalupe Guzmán Priego

Dr. Jorge Luis Ble Castillo

Dr. Xavier Miguel Bóldo León

Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 02 del mes de junio del año 2023, la que suscribe, Meztli Ramos García, alumna del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 201E62006 adscrita 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 microbiota intestinal en ratas con dieta normal o dieta alta en grasas”**, bajo la Dirección del Dr. Jorge Luis Ble Castillo y de la Dra. Alma Delia Genis Mendoza. Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31, la alumna 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. Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Meztli Ramos García

Nombre Completo y Firma



Sello



RECONOCIMIENTO

A la División Académica de Ciencias de la Salud (UJAT), por brindarme la oportunidad de formar parte del programa del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme el apoyo económico mediante el programa de Becas Nacionales (No. CVU: 888418) durante el periodo de realización del posgrado.

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), y en especial al Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas, por abrir las puertas de sus instalaciones para la realización de la estancia de investigación en el marco del Programa de Participación Estudiantil. Así mismo, a la Unidad de Secuenciación de este instituto, por el financiamiento proporcionado para el procesamiento de las muestras.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en especial al Laboratorio 11 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, por permitirme llevar a cabo la fase experimental de este proyecto, el cual fue apoyado en parte por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN213718.



DEDICATORIAS

A mis padres, Irene García y José Luis Ramos, por su apoyo incondicional, por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado. Son mi motivación, sin su amor esto no hubiera sido posible.

A mis hermanos, Isis y Elí Ramos García, por su paciencia durante este trayecto, soy tan afortunada de contar con su apoyo siempre.

Al Dr. Jorge L. Ble Castillo, quien ha sido un pilar fundamental en mi desarrollo profesional, quien me ha forjado como investigador. Gracias por sus valiosos consejos, orientación, confianza y amistad invaluable.

A Carlos García Vázquez, ampliamente por siempre estar ahí, impulsarme y creer en mi capacidad como profesional. El camino no ha sido sencillo, pero sin tu apoyo todo hubiera sido más complicado.



AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis: El Dr. Jorge L. Ble Castillo, quien, con su calidad humana y su extraordinaria experiencia científica, me ha permitido dar un gran paso muy importante en mi vida profesional; a la Dra. Alma D. Genis Mendoza por su paciencia y por darme la oportunidad de trabajar bajo su asesoría.

De manera muy especial, a Carlos García Vázquez, por haber sido mi compañero en este trayecto desde que inicié la maestría, por nunca dejarme sola, y porque gracias a su motivación, paciencia y apoyo fue posible. Tu amor, tu experiencia científica y tus consejos fueron parte crucial en mi vida. Nunca lo olvidaré.

Al Dr. Jaime Martínez Magaña, por proporcionarme las herramientas y compartirme sus conocimientos acerca de la metagenómica.

A los miembros de mi comité: Dra. Viridiana Olvera, Dra. Carina S. Alvarez y Dr. José D. Gandarilla, que me acompañaron a lo largo de este trayecto y quienes han aportado a mi formación.

A mi amigo Nato, por estar ahí siempre, en la distancia o en la cercanía, quién me apoyó muchísimo durante mis estancias en la Ciudad de México, por sus consejos y enseñanzas. Te adoro y valoro mucho tu amistad. A Carlos Aguilar Gamas, mi amigo y compañero desde la Licenciatura, quien me impulsó a la gran aventura de la Investigación en Ciencias Biomédicas.

A los biólogos, Graciela Jiménez y Cesar Sepúlveda del Laboratorio de Bioquímica de DACBIOL, así como a la Dra. Araceli Gutiérrez y a la Lic. Paola Mejía del INMEGEN, por su amable labor por ayudar y facilitar parte de la realización de esta investigación.

A la vida.



ÍNDICE

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	I
ABREVIATURAS	II
GLOSARIO	IV
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EDULCORANTES NO NUTRITIVOS (ENN)	1
1.2. MICROBIOTA INTESTINAL (MI)	4
1.2.1. DISTRIBUCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA MI	4
1.2.2. FUNCIONES GENERALES DE LA MI EN LA MODULACIÓN DEL METABOLISMO	10
1.2.2.1. MODULACIÓN DEL METABOLISMO MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC)	11
1.2.2.2. FUNCIÓN DE LA MI EN EL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS BILIARES	12
1.2.2.3. FUNCIÓN DE LA MI EN EL METABOLISMO DE LA COLINA	13
1.3. LA DIETA EN LA MODULACIÓN DE LA MI Y DISBIOSIS	13
1.4. EFECTOS DE LOS ENN SOBRE LA MI EN ROEDORES	17
1.5. EFECTOS DE LOS ENN SOBRE LA MI EN HUMANOS	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. OBJETIVO GENERAL	28
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1. INSTITUCIONES PARTICIPANTES	29
6.2. ANIMALES	29
6.3. EDULCORANTES	30
6.4. DISEÑO DE ESTUDIO	30
6.5. DIETAS	31



6.6. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA MI.....	32
6.6.1. EXTRACCIÓN DE ADN	32
6.6.2. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO Y LA INTEGRIDAD DEL ADN... 32	
6.6.3. SECUENCIACIÓN DEL GEN ARNr 16S	33
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
7. RESULTADOS	36
7.1. EFECTO DE LOS ENN SOBRE LA DIVERSIDAD DE LA MI	36
7.2. EFECTO DE LOS ENN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA MI.....	38
7.3. EFECTO DE LA DAG SOBRE LA DIVERSIDAD, LA COMPOSICIÓN Y LA RELACIÓN F/B DE LA MI.....	43
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	54
9.1. RECOMENDACIONES.....	54
10. PERSPECTIVAS	55
11. REFERENCIAS	56
ANEXOS.....	65
PUBLICACIONES	68



LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA	Pág.
1. PERMANOVA sobre la distancia de Bray-Curtis (permutaciones = 9999) para la β -diversidad de la MI entre tratamientos.....	38
2. Análisis de α -diversidad de la MI entre tratamientos con ENN en comparación con la glucosa.....	38
3. PERMANOVA sobre la distancia de Bray-Curtis (permutaciones = 9999) para la β -diversidad de la MI entre dietas.....	44

FIGURA	Pág.
1. Efecto de los ENN sobre la β -diversidad (índice de Bray-Curtis) de la MI en ratas.....	37
2. Efecto de los ENN sobre la α -diversidad (Índice de Shannon) de la MI en ratas.....	37
3. Distribución de los cuatro filos dominantes entre los tratamientos con ENN en ratas.....	39
4. Efecto de los ENN en la relación F/B en ratas.....	40
5. Efecto de los ENN sobre la composición de la MI a nivel de clase en ratas.....	41
6. Distribución de los principales géneros de la MI después del consumo de ENN en ratas.....	43
7. Efecto de la DAG sobre la diversidad (A, B), la composición a nivel de filo (C), la relación F/B (D) y clases más abundantes (E) de la MI.....	45



ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
DAG	Dieta alta en grasas
DHC	Dieta hipercalórica
DN	Dieta normal
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
ENN	Edulcorantes no nutritivos
GE	Glucósidos de esteviol
GLP-1	Glucagon-like peptide-1 (Péptido similar al glucagón tipo 1)
GPCR	G-protein coupled receptors (Receptores acoplados a proteína G)
IDA	Ingesta Diaria Admisible
IDF	International Diabetes Federation (Federación Internacional de Diabetes)
IG	Intolerancia a la glucosa
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)
LPS	Lipopolisacáridos
MI	Microbiota intestinal



OTU	Operational Taxonomic Unit (Unidad taxonómica operacional)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PYY	Péptido YY
REB A	Rebaudiósido A
TGI	Tracto gastrointestinal
U.S. FDA	US Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU)



GLOSARIO

Disbiosis intestinal

Alteración de la homeostasis de la MI, provocando cambios en su composición funcional y actividad metabólica, o cambios en su distribución local. Se caracteriza por presentar: 1) Pérdida de organismos beneficiosos, 2) Crecimiento excesivo de organismos potencialmente dañinos y 3) Pérdida de la diversidad bacteriana.

Diversidad alfa

Riqueza de especies de una comunidad. Refleja la heterogeneidad de la comunidad con base en el número de especies presentes y su abundancia relativa.

Diversidad beta

Mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras. Se puede medir de forma cuantitativa o cualitativa. En la primera se considera la abundancia de los microorganismos observados, mientras que en la segunda solo se tiene en cuenta la presencia o ausencia.

Edulcorantes no nutritivos

Sustancias que se caracterizan por presentar alta potencia en dulzura con mínimo o nulo aporte calórico.

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. Se caracteriza por la elevación de la respuesta glucémica 2 horas después de la ingesta de 75 g de glucosa (≥ 140 y < 199 mg/dL).

Microbioma

Contenido genómico colectivo de la microbiota que expresa 100 veces más genes que el hospedero humano y desempeña un papel esencial en la patogénesis de la enfermedad y la salud.

Microbiota intestinal

Complejo ecosistema de microorganismos que coexisten en relación simbiótica, comensal o mutualista con el hospedero a lo largo del tracto gastrointestinal.

Microbiota sana

Los principales indicadores para definirla son su riqueza (cantidad de microorganismos) y su biodiversidad (cantidad de especies).

OTU

Unidad de clasificación de grupos de organismos estrechamente relacionados.

Secuenciación de siguiente generación

Grupo de tecnologías diseñadas para secuenciar gran cantidad de segmentos de ADN de forma masiva y en paralelo, en menor cantidad de tiempo y a un menor costo por base.



RESUMEN

Introducción: En los últimos años se ha informado que el consumo prolongado de edulcorantes no nutritivos (ENN), como la sucralosa o el rebaudiósido A (reb A), induce alteraciones metabólicas a través de la modulación de la microbiota intestinal (MI). Sin embargo, hasta la fecha, las posibles alteraciones siguen siendo controversiales. **Objetivo:** Evaluar el efecto del consumo de sucralosa o reb A sobre MI en ratas con dieta normal (DN) o dieta alta en grasas (DAG). **Metodología:** Ratas Wistar macho (150-200 g) con DN o DAG se aleatorizaron para recibir sucralosa (SCL), reb A (REB), glucosa (GLU, control) o sacarosa (SAC, control). Los ENN se administraron en el agua en dosis equivalentes a la ingesta diaria aceptable (IDA) para humanos. Después de ocho semanas, las muestras fecales se analizaron mediante secuenciación del gen ARNr 16S. **Resultados:** La diversidad, la estructura, la composición de la MI a nivel de filo y la relación Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) no fueron modificados por los ENN. A nivel de clase, en ratas con DAG, REB disminuyó la abundancia de *Bacilli*. Así mismo, SCL y REB en combinación con la DN redujeron los géneros beneficiosos *Romboutsia* y *Lactobacillus*; REB con la DAG incrementó *Faecalibacterium* comparado con GLU. La DAG aumentó las proporciones de *Bacilli* y *Coriobacteriia*, a pesar de no observarse cambios en la relación F/B. **Conclusiones:** Aunque la relación F/B es utilizada ampliamente como un indicador de riesgo en los pacientes con obesidad o trastorno metabólico, el estudio de las modificaciones a nivel de clase, género y especie podría brindar una información más específica para la intervención clínica.

Palabras claves: Edulcorantes no nutritivos, sucralosa, rebaudiósido A, microbiota intestinal, dieta alta en grasas



ABSTRACT

Introduction: In recent years, it has been reported that the prolonged consumption of non-nutritive sweeteners (NNS), such as sucralose or rebaudioside A (reb A), induce metabolic derangements via gut microbiota (GM) modulation. However, to date, the possible alterations remain controversial. **Objective:** To evaluate the effect of consumption of sucralose or reb A on GM in rats with a normal diet (ND) or a high-fat diet (HFD). **Methodology:** Male Wistar rats (150-200 g) on a ND or a HFD were randomized to receive sucralose (SCL), reb A (REB), glucose (GLU, control), or sucrose (SUC, control). The NNS were administered in water at doses equivalent to the human acceptable daily intake (ADI). After eight weeks, fecal samples were analyzed by 16S ribosomal RNA gene sequencing. **Results:** Diversity, structure, composition of the GM at the phylum level and the Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) ratio were not modified by the NNS. At the class level, in HFD rats, REB decreased *Bacilli* abundance. Likewise, SCL and REB in combination with ND reduced the beneficial genera *Romboutsia* and *Lactobacillus*; REB with HFD increased *Faecalibacterium* compared to GLU. HFD increased the proportions of *Bacilli* and *Coriobacteriia*, despite not observing changes in the F/B ratio. **Conclusions:** Although the F/B ratio is widely used as a risk indicator in patients with obesity or metabolic disorders, the study of modifications at the class, genus, and species level could provide more specific information for clinical intervention.

Keywords: Non-nutritive sweeteners, gut microbiota, sucralose, rebaudioside A, high-fat diet



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Edulcorantes no nutritivos (ENN)

Los ENN son aditivos alimentarios que proveen alta potencia en dulzura con nulo o mínimo aporte energético (Burke y cols., 2015). Por su origen se clasifican en naturales (estevia) o artificiales como sucralosa, aspartame o acesulfame-k (ace-k) (Glendinning, 2018). Mundialmente, el consumo de ENN se ha incrementado. Se estima que el mayor crecimiento de ENN 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 ENN (11%) comparado con E.U.A (4%), Nueva Zelanda (1%) y Australia (<1%) (Dunford y cols., 2018).

La seguridad del consumo de los ENN, en términos de toxicidad, sobre la salud humana 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 y cols., 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). Actualmente, los ENN mayormente consumidos a nivel mundial y nacional son sucralosa y estevia (Fitch y cols., 2012; Martyn y cols., 2018).



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 TGI (85%) y es excretada sin modificaciones en las heces (Fitch y cols., 2012). La pequeña proporción de sucralosa que se absorbe es eliminada en la orina (menos del 15%) (Plaza-Díaz y cols., 2020). Aunque más del 85 % de la sucralosa ingerida entra en contacto con la microbiota colónica, el 94 % y el 99 % se pueden recuperar en las heces sin ningún cambio estructural (Conz y cols., 2023). La sucralosa existe en más de 4500 productos y representa el 62% del mercado global de ENN artificiales (Wang y cols., 2018).

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 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 de este ENN corresponde a 4 mg/kg/d (FDA, 2018). Los dos GE que se encuentran en mayor proporción en la hoja de estevia son el rebaudiósido A (reb A; 2-4% en peso seco) y el esteviósido (4-13% en peso seco) (Goyal y cols., 2010). La estructura molecular de todos los GE consiste en una molécula central de esteviol enlazada a diferentes residuos de azúcar, como el reb A o el esteviósido (Plaza-Díaz y cols., 2020). Cada GE pasa a través del TGI sin ser absorbido, es decir, no son hidrolizados en el TGI superior. El esteviol se absorbe y llega al hígado donde se conjuga con ácido glucurónico para facilitar la secreción (Plaza-Díaz y cols., 2020). Los residuos de azúcar unidos al esteviol son



metabolizados por la MI, por lo tanto, representan una fuente de energía para la microbiota y el hospedero (Lobach y cols., 2019). Por lo tanto, la estevia puede tener un breve punto de contacto con la MI. Sin embargo, queda por investigar si este contacto es suficiente para inducir cambios en la composición de la microbiota (Singh y cols., 2022). Particularmente, el reb A es convertido a aglicona de esteviol por bacterias del íleon o del colon que expresan β -glucosidasas y *Bacteroides* se identificaron como el grupo bacteriano más eficiente en la hidrólisis del reb A en esteviol (Wang y cols., 2022).

Los ENN se han propuesto como una estrategia para la reducción del peso corporal o de la glucemia en personas con sobrepeso, obesidad, intolerancia a la glucosa (IG) o diabetes. Sin embargo, los efectos de los diversos ENN naturales o artificiales sobre la salud humana son ampliamente debatidos (Laviada-Molina y cols., 2017). Mientras que estudios observacionales informan asociaciones positivas entre el consumo de ENN y el desarrollo de obesidad o diabetes (Chia y cols., 2018; Kuk y cols., 2016; Nettleton y cols., 2009), la mayoría de estudios clínicos han mostrado que el consumo crónico de ENN tiene efectos beneficiosos o no perjudiciales sobre la homeostasis de glucosa, apetito o peso corporal (Grotz y cols., 2003; Higgins y cols., 2018; Tate y cols., 2012). En contraste, otros estudios han reportado que el consumo de estos aditivos podría alterar la regulación de la glucosa o el balance energético (Feijó y cols., 2013; Romo-Romo y cols., 2018). Los posibles mecanismos que explican los efectos adversos de los ENN sobre el metabolismo incluyen la activación de los receptores de sabor dulce orales o extraorales (T1R2/T1R3), lo cual puede conducir a la alteración de las



concentraciones de hormonas intestinales o a la desregulación de los circuitos de recompensa cerebrales que participan en el control glucémico y el balance energético (Rother y cols., 2018). Recientemente, el interés se ha enfocado en el estudio de las alteraciones en la función y composición de la microbiota intestinal (MI) promovida por la ingesta de ENN mediante la modulación de procesos metabólicos que son esenciales para el organismo (Olivier-Van Stichelen y cols., 2019).

1.2. Microbiota intestinal (MI)

La MI es un complejo ecosistema de microorganismos que coexisten en relación simbiótica, comensal o mutualista con el hospedero en una amplia variedad de compartimentos situados a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) (Hakkak y cols., 2017). Cerca de 100 trillones de microorganismos albergan el TGI, y se estima que la microbiota es responsable de más del 98% de la actividad genética del hospedero (Grice y cols., 2012). Por esta razón, se ha asumido que la MI representa un sistema endocrino complementario para el hospedero, debido a que es capaz de producir o metabolizar gran cantidad de sustancias necesarias para el buen funcionamiento de órganos y sistemas (Pascale y cols., 2018).

1.2.1. Distribución y composición de la MI

La MI humana comprende una población compleja y dinámica de alrededor de $1 \times 10^{13-14}$ microorganismos, incluyendo aproximadamente de 500 a 1000 especies bacterianas diferentes (Li y cols., 2021). La composición total de la microbiota aún



es desconocida, sin embargo, los avances en las tecnologías moleculares modernas han permitido recientemente identificar y clasificar a los microorganismos presentes en el TGI. Las estimaciones sugieren que el conjunto de genes de la MI, denominado “microbioma intestinal”, consta alrededor de 3 millones de genes, es decir, es 150 veces más grande que el propio genoma humano (Qin y cols., 2010). Además, de las 1000 especies bacterianas identificadas, alrededor de 160 se encuentran presentes en el intestino de cualquier individuo (Lobach y cols., 2019).

La MI humana está dominada por cinco filos, donde *Firmicutes* (gram-positivos) y *Bacteroidetes* (gram-negativos) abarcan alrededor del 90% de las bacterias intestinales (Padhi y cols., 2022). Otros filos comunes incluyen *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Fusobacteria*, y un número limitado de especies pertenecientes al dominio Archaea (en su mayoría metanógenos) (Lobach y cols., 2019). Otros grupos bacterianos menos prevalentes se distribuyen entre *Cyanobacteria*, *Fusobacteria*, *Lentisphaerae*, *Spirochaetes* y *TM7*. El filo *Firmicutes* contiene géneros relevantes, incluidos *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* (varias cepas de las cuales son probióticos); y los productores de butirato *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Roseburia*. En *Bacteroidetes*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Xylanibacter* degradan una variedad de glucanos complejos. El filo *Actinobacteria* incluye *Collinsella* y *Bifidobacterium* (que contiene cepas probióticas). Las *proteobacterias* comunes son *Escherichia* (de la familia *Enterobacteriaceae*) y *Desulfovibrio* (que contiene bacterias reductoras de sulfato). *Verrucomicrobia* es un filo recientemente descubierto que incluye al género *Akkermansia*, un grupo especializado en la degradación del moco. Euryarchaeota



contiene predominantemente *Methanobrevibacter*, implicado en la metanogénesis intestinal (Tremaroli y cols., 2012).

La distribución de la MI es altamente variable a lo largo del TGI y depende de las diversas condiciones físicas, químicas o biológicas que caracterizan cada compartimento del tracto digestivo (Mowat y cols., 2014). La densidad bacteriana aumenta a medida que desciende por el TGI. Por ejemplo, el estómago alberga de 100–1000 bacterias por mL (10^2 – 10^3) y la densidad aumenta progresivamente en el duodeno ($<10^5$), yeyuno ($<10^5$), íleon (10^3 – 10^7) y colon (10^9 – 10^{12}). El estómago y el duodeno proximal son sitios del TGI con condiciones inhóspitas para la colonización bacteriana debido a que las secreciones ácidas destruyen la mayor parte de los microorganismos ingeridos. Las actividades motoras propulsivas del intestino delgado proximal, así como las secreciones biliares y pancreáticas dificultan también la colonización de esta sección del tracto digestivo. En contraste, el colon es el sitio que alberga la mayor diversidad de especies (Dieterich y cols., 2018). La mayor parte de la MI humana corresponde a especies estrictamente anaeróbicas que pertenecen a los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*. Otras bacterias intestinales con un porcentaje absoluto menor en el intestino (normalmente por debajo del 1%) pertenecen en su mayoría a los filos *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* o *Fusobacteria* (Sommer y cols., 2013). El colon está poblado mayormente por bacterias anaeróbicas, debido a la baja concentración de oxígeno, mientras que las especies bacterianas aeróbicas predominan en el intestino delgado superior (Mowat y cols., 2014).



En otro sentido, la alta variabilidad en la composición de la microbiota no solo es notable a través del TGI, sino también entre individuos. La presencia de bacterias en placenta, cavidad amniótica, cordón umbilical y meconio sugiere que la relación entre humanos y bacterias comienza en el útero (Li y cols., 2021). La microbiota intestinal humana se establece después del nacimiento, comienza como un ecosistema dinámico, dominado por *Bifidobacterium*, y se desarrolla intensamente durante los primeros 3 años de vida (Ottman y cols., 2012). El tipo de parto al nacer influye directamente en la comunidad bacteriana. Los individuos nacidos vía vaginal tienen una comunidad bacteriana diversa y saludable en el intestino a diferencia de los nacidos por cesárea. En los primeros años después del nacimiento, la MI de los infantes sufre cambios notables, influenciados principalmente por los patrones alimenticios (leche de fórmula, leche materna o alimentos sólidos). Por lo tanto, los cambios más notables en la composición de la MI tienen lugar en la infancia. Posteriormente, la estabilidad de la MI se mantiene a lo largo de la edad adulta del hospedero. Los filos más abundantes durante esta etapa de la vida en el intestino son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*. Con el deterioro de las funciones fisiológicas que ocurren durante el envejecimiento, la composición de la MI en las personas de edad avanzada se modifica notablemente. La microbiota en el intestino de adultos mayores generalmente se caracteriza por una abundancia reducida de algunos géneros beneficiosos como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y un aumento en microbios comensales proinflamatorios como *Enterobacteriaceae* y *Clostridia*. En general, la inter-individualidad y estabilidad de la MI se mantiene a lo largo de la edad adulta del



hospedero, produciéndose de nuevo modificaciones en las últimas etapas de la vida (Li y cols., 2021).

A pesar de las diferencias que ocurren a lo largo de la vida, cada individuo alberga un perfil bacteriano único. No obstante, diversos estudios comparativos han descubierto patrones que permiten diferenciar las poblaciones bacterianas en grupos denominados “enterotipos” dominados por *Bacteroides* (enterotipo tipo 1), *Prevotella* (enterotipo tipo 2) y *Ruminococcus* (enterotipo tipo 3). Los enterotipos han demostrado ser independientes de edad, sexo o nacionalidad (Arumugam y cols., 2011; Christensen y cols., 2018). Se sugiere que el establecimiento del ecosistema bacteriano en la vida temprana desempeña un papel fundamental en la composición microbiana en la edad adulta. Además de las características inherentes del individuo, existen otros factores ambientales involucrados en la determinación de la composición de la microbiota individual (Ottman y cols., 2012).

Similar a los humanos, el establecimiento de la MI en ratas ocurre durante el nacimiento y se desarrolla en el transcurso de su vida (Inoue y cols., 2003). Sin embargo, a diferencia de la MI en humanos, las ratas recién nacidas se encuentran más expuestas a las bacterias fecales y ambientales. Durante las primeras semanas después del nacimiento, *Escherichia Coli*, y los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* dominan en el intestino de las ratas, mientras que *Bacteroidaceae*, y *Lactobacilli* aparecen después del destete (Yajima y cols., 2001). Estudios previos informaron modificaciones importantes en la diversificación de la microbiota de ratas desde la lactancia hasta la madurez (Inoue y cols., 2003; Yajima y cols., 2001). Los primeros cambios observados se producen a los 21-22 días del nacimiento, y se



deben de manera simultánea al destete, a los cambios en la dieta y al descenso de los niveles de IgA materna. La segunda ola de cambios ocurre entre los días 24 y 27 después del nacimiento, probablemente atribuidos a la maduración morfológica e inmunológica del intestino (Yajima y cols., 2001). Una vez que finaliza el período formativo, el delicado equilibrio de la MI se ve perturbado continuamente por la dieta y otros factores ambientales (Čoklo y cols., 2020). Los mismos 4 filos bacterianos predominantes descritos en humanos (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*) se detectan en el contenido cecal o fecal de rata (Brooks y cols., 2003; Manichanh y cols., 2010), lo que sugiere que las ratas son un buen modelo para estudiar la influencia de la dieta en la MI. No obstante, debido que existen grandes diferencias en la MI de humanos y ratas a nivel de especie, se debe tener cautela al extrapolar los hallazgos del modelo de rata a humanos. Por ejemplo, a diferencia de los humanos (Joly y cols., 2010), las especies de *Lactobacillus* representan una proporción significativa de la microbiota de las ratas y pueden alcanzar del 10 al 15 % de las lecturas de secuencias totales (Ahmad y cols., 2020; Brooks y cols., 2003; Lecomte y cols., 2015). Un estudio integral reveló una comunidad más compleja de bacterias presentes en las heces de rata, en comparación con otros mamíferos. Los filos dominantes fueron *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, seguidos por *Spirochetes*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes* y *Actinobacteria*. La abundancia relativa a nivel de familia mostró que el perfil de la MI de las ratas fue distinto de otros sujetos evaluados, con *Prevotellaceae* como la familia más dominante. Además, se detectaron *Bacteroidaceae*, *Clostridiales*, *Ruminococcaceae*, *Helicobacteraceae*,



Paraprevotellaceae y otras familias menos abundantes. También se presentaron perfiles bacterianos únicos específicos de la especie a nivel de clase y orden. Sin embargo, los patrones generales de la abundancia de especies de la MI fueron similares (Nagpal y cols., 2018). Otro estudio realizado por Li y cols. destacó que los géneros *Lactobacillus* y *Turicibacter* fueron más abundantes en el TGI de la rata (Li y cols., 2017).

Dada la complejidad práctica y ética de realizar procedimientos de muestreo invasivos y la alta variación interindividual en la MI del humano, se han implementado diferentes modelos animales en la investigación biomédica, en parte, por la facilidad de su uso bajo condiciones controladas. A pesar de que la MI en ratas difiere mayormente a niveles taxonómicos más específicos, los modelos de roedores representan una importante herramienta para estudiar los mecanismos subyacentes de las enfermedades asociadas a la MI, ya que pueden utilizarse para reducir y controlar los parámetros que influyen en las fluctuaciones y cambios de la microbiota (Čoklo y cols., 2020).

1.2.2. Funciones generales de la MI en la modulación del metabolismo

Los avances recientes en la caracterización de la composición y función de la microbiota han revelado la importancia de las interacciones entre el metabolismo bacteriano y su influencia en el desarrollo del hospedero. La MI produce un repertorio de metabolitos extremadamente diverso a partir de la fermentación anaeróbica de componentes dietéticos exógenos no digeridos que llegan al colon,



así como compuestos endógenos generados por los microorganismos y el hospedero (Hooper y cols., 2002).

La actividad enzimática bacteriana actúa directamente sobre la fermentación de polisacáridos y el metabolismo de los ácidos biliares, o actúa en conjunto con el hospedero sobre el metabolismo de la colina (Tremaroli y cols., 2012). A continuación, se describen brevemente algunos de los mecanismos de la MI involucrados en la modulación del metabolismo del hospedero.

1.2.2.1. Modulación del metabolismo mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

La fermentación de la fibra dietética realizada por *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en el colon produce AGCC. Los AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato, influyen en el metabolismo del hospedero de múltiples maneras al actuar sobre los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) GPR41 y GPR43 (también conocidos como FFAR3 o FFAR2, respectivamente) y que son expresados por las células enteroendocrinas (Fan y cols., 2021; Tremaroli y cols., 2012).

El acetato y el butirato estimulan la liberación del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y del péptido YY (PYY) con efectos en el páncreas (biosíntesis de insulina inducida por GLP-1) y en el cerebro (saciedad inducida por PYY). El acetato puede aumentar el almacenamiento de grasa al inducir la secreción de grelina. El succinato derivado de bacterias impulsa la expresión de la proteína de desacoplamiento 1 (UCP1), aumentando la termogénesis en el tejido adiposo. Sin embargo, el succinato tiene propiedades proinflamatorias sobre los macrófagos activados por



lipopolisacáridos y, por lo tanto, puede contribuir a la inflamación del tejido adiposo y a la resistencia a la insulina. Por otra parte, los lipopolisacáridos (LPS) son compuestos proinflamatorios derivados de las membranas bacterianas Gram negativas que promueven la inflamación (Fan y cols., 2021; Flint y cols., 2012).

1.2.2.2. Función de la MI en el metabolismo de los ácidos biliares

Los ácidos biliares primarios se sintetizan en el hígado a partir del colesterol y son importantes para garantizar que el colesterol, las grasas de la dieta y las vitaminas liposolubles del intestino delgado sean solubles y absorbibles (Tremaroli y cols., 2012). La MI convierte los ácidos biliares primarios en diversos ácidos biliares secundarios. Los ácidos biliares ejercen sus funciones metabólicas uniéndose a receptores celulares tales como el receptor nuclear farnesoide X (FXR) y el TGR5, un receptor acoplado a proteína G. La señalización a través de estos receptores está implicada en el metabolismo de la glucosa. Mientras que el FXR bloquea, el TGR5 promueve el metabolismo de carbohidratos. El ácido quenodesoxicólico (primario), es un ligando de FXR altamente eficaz, mientras que los ácidos litocólico (LCA) y taurolitocólico (secundarios), son los dos ligandos-TGR5 endógenos más potentes. Estudios previos en roedores con obesidad han reportado que la señalización de TGR5 en las células L enteroendocrinas induce la secreción de GLP-1, lo que mejora la función hepática y aumenta la tolerancia a la glucosa. El LCA, un agonista de TGR5 de alta afinidad, estimula la termogénesis a través del oscurecimiento del tejido adiposo blanco y marrón (Fan y cols., 2021).



1.2.2.3. *Función de la MI en el metabolismo de la colina*

La colina es un componente importante de las membranas celulares y se obtiene principalmente de algunos alimentos, pero también puede ser sintetizada por el hospedero. La colina es importante para el metabolismo de los lípidos y la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad en el hígado (Henao-Mejía y cols., 2012). Las actividades enzimáticas bacterianas y del hospedero interactúan en la transformación de la colina en metilaminas tóxicas. La MI produce trimetilamina (TMA) al metabolizar la fosfatidilcolina y la L-carnitina de la dieta. La TMA es N-oxidada por la monooxigenasa que contiene flavina a N-óxido de trimetilamina (TMAO) en el hígado (Fan y cols., 2021). Estas modificaciones pueden disminuir los niveles de colina biodisponible y se sugiere que desencadenan la enfermedad del hígado graso no alcohólico en ratones (Dumas y cols., 2006). Una composición microbiana intestinal alterada y su capacidad para metabolizar la colina pueden tener un papel importante en la modulación de esta enfermedad, así como en la homeostasis de la glucosa. Además, los niveles plasmáticos de TMAO y sus metabolitos se correlacionan con enfermedades cardiovasculares (Tremaroli y cols., 2012).

1.3. La dieta en la modulación de la MI y disbiosis

La dieta es un factor determinante en la remodelación de la estructura y función de la comunidad bacteriana (Carmody y cols., 2019; Fan y cols., 2021).

La MI metabólicamente saludable es lograda principalmente por el consumo de dietas altas en fibra y bajas en grasas y proteínas animales. Los polisacáridos



no digeribles son metabolizados por la microbiota del intestino grueso y se fermentan para producir una variedad de compuestos y para estimular una capa espesa de moco intestinal e importantes funciones de barrera. La producción bacteriana de AGCC proporciona una fuente de energía adicional para los colonocitos y provoca una disminución del pH luminal. Los AGCC como acetato, butirato y propionato pueden unirse al GPCR-41 y GPCR-43, que se expresan en las células L enteroendocrinas, y posteriormente inducen la secreción de GLP-1 y PYY que contribuyen a aumentar el gasto energético, reducir la ingesta de alimentos y mejorar la homeostasis de la glucosa. El butirato es un activador del receptor y activado por el PPAR γ y un estimulador de la β -oxidación y el consumo de oxígeno en el intestino, lo que mantiene un entorno anaeróbico en la luz intestinal (Fan y cols., 2021). A lo largo de este trabajo, se han descrito diversos mecanismos por los cuales la MI y sus metabolitos interactúan con el hospedero. Todos estos efectos ocurren cuando la comunidad bacteriana se encuentra en equilibrio (eubiosis). Cualquier perturbación de la eubiosis, conocida como disbiosis, podría contribuir al desarrollo de diversas patologías (Clemente y cols., 2012).

Este desequilibrio se ha definido además como una alteración de la homeostasis de la MI, cambios en su composición funcional y actividades metabólicas, o cambios en su distribución local. En general, la disbiosis se puede clasificar en tres tipos diferentes: 1) Pérdida de organismos beneficiosos, 2) Crecimiento excesivo de organismos potencialmente dañinos y 3) Pérdida de la diversidad microbiana general. Se ha encontrado que estos tres tipos no son



mutuamente excluyentes y pueden ocurrir simultáneamente, que es el caso más frecuente (DeGruttola y cols., 2016).

La disbiosis intestinal inducida por la ingesta de dietas altas en grasas (DAG) animales y proteínas es capaz de provocar una mucosa permeable, inflamación intestinal y sistémica y disminución en la producción de AGCC, lo que conduce a que las células L secreten menos hormonas intestinales. En el proceso de fermentación, diversas peptidasas, proteasas y endopeptidasas bacterianas escinden las proteínas complejas para liberar aminoácidos libres y péptidos cortos que luego se fermentan. Cabe señalar que la disbiosis intestinal a menudo se asocia con un tiempo de tránsito colónico prolongado, lo que da como resultado un cambio en el metabolismo del colon que a su vez conduce a un aumento de la proteólisis bacteriana. Como resultado del aumento de la fermentación de proteínas, de ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA; 2-metil butirato, isobutirato e isovalerato), de trimetilamina, y de ácidos orgánicos, se producen gases (H_2S , H_2 y CO_2), fenoles, aminas, indoles y amoníaco, lo que provoca un aumento del pH luminal. En conjunto, dichos cambios en el entorno bacteriano y sus metabolitos provocan una fuga de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluidos los LPS, que aumentan en el torrente sanguíneo y desencadenan inflamación sistémica de bajo grado y resistencia a la insulina (Fan y cols., 2021).

Investigaciones recientes se han centrado en la influencia del consumo de las DAG sobre la composición de la MI. Por ejemplo, se ha informado que la DAG promueve la disminución de *Bacteroidetes* y el aumento de *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Zhang y cols., 2012). Específicamente, se informó que el



crecimiento del porcentaje de grasa corporal se asoció negativamente con la abundancia de *Akkermansia* (filo *Verrucomicrobia*) pero se asoció positivamente con las abundancias relativas de *Lactococcus* del filo *Firmicutes* y con los géneros *Allobaculum* (filo *Bacteroidetes*) (Parks y cols., 2013). En general, las características propuestas de una microbiota obesa incluyen una mayor proporción de la relación Firmicutes:Bacteroidetes (F:B), reducción en la diversidad microbiana y alteraciones en familias o especies bacterianas específicas (Dalby y cols., 2017; Ley y cols., 2006; Turnbaugh y cols., 2009). El consumo de la combinación de DAG y dietas altas en sacarosa, promueve cambios similares a nivel de filo (Murphy y cols., 2015; Parks y cols., 2013). Carmody y cols. (2015) utilizó más de 200 cepas de ratones para determinar si las variaciones en la MI eran impulsadas principalmente por la genética del huésped o por factores dietéticos. Sus hallazgos indicaron que una DAG y sacarosa alteró de manera reproducible la MI a pesar de las diferencias en el genotipo del huésped. Más específicamente, la MI exhibió una dosis-respuesta lineal a las perturbaciones dietéticas, tomando un promedio de 3.5 días para que cada grupo bacteriano que responde a la dieta se restableciera. Sin embargo, los cambios dietéticos repetidos demostraron que la mayoría de los cambios en el microbioma son reversibles, mientras que la abundancia de bacterias específicas depende del consumo previo.

En general, las dietas occidentalizadas, caracterizadas por el consumo excesivo de grasas saturadas, azúcares o en combinación, y un bajo consumo de fibra, puede afectar directamente a la composición y funcionalidad de la MI, contribuyendo a la disfunción metabólica (Murphy y cols., 2015; Zhang y cols.,



2012). En contraste, otros trabajos encontraron que la DAG aumentó la diversidad de la MI y los AGCC, lo que provocó un aumento en el metabolismo energético en ratones. Un análisis posterior reveló que estos cambios fueron causados por el diferente contenido de fibra en estas dos dietas (Wang y cols., 2020). Otras investigaciones han señalado que las DAG inducen modificaciones en la composición de la MI y fermentación cecal debido al tipo de dieta y no a la obesidad o IG en ratones (Dalby y cols., 2017).

Una de las principales alteraciones en la dieta durante las últimas décadas ha sido el consumo de alimentos procesados, que a menudo contienen aditivos naturales o producidos sintéticamente, tales como los ENN. Estos aditivos suelen ser considerados seguros por los diversos reguladores de alimentos a nivel mundial y nacional. Sin embargo, un creciente cuerpo de evidencia asocia su consumo con efectos adversos en el ecosistema bacteriano intestinal mediante la alteración en la producción de ácidos grasos de cadena corta, daño en la integridad de la barrera intestinal, neuroinflamación o resistencia a la insulina (García y cols., 2022). A su vez, pueden promover la endotoxemia, ya sea a través de la translocación de bacterias gramnegativas a la circulación o al alterar la permeabilidad de la barrera intestinal y, finalmente, el desarrollo de trastornos metabólicos, un fenómeno denominado endotoxemia metabólica (Zmora y cols., 2019).

1.4. Efectos de los ENN sobre la MI en roedores



La mayor parte de los estudios crónicos en roedores, donde se administraron los ENN mezclados mayormente en el agua de beber, reportaron efectos perjudiciales sobre la MI.

En un estudio realizado por Suez y cols. (2014), 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) durante 11 semanas produjo diferentes grados de IG comparados con agua, glucosa (50 g/kg PC/d) o sacarosa (33 g/kg PC/d) en ratones C57BL/6 delgados u obesos. El efecto fue mayor con la sacarina, por lo que fue el ENN que se empleó como referencia para los posteriores experimentos. En este mismo estudio, 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 (Suez y cols., 2014). En otro estudio, evaluaron el consumo de aspartame a bajas dosis (5-7 mg/kg PC/d) durante 8 semanas sobre la MI en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dieta estándar o DAG. 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 (Palmas y cols., 2014). La administración de 37.4 mg/kg/d de ace-k durante 4 semanas indujo alteraciones en la composición de la MI, aumento de peso corporal e incremento en la expresión de genes bacterianos relacionados con el metabolismo energético en ratones CD-1 sanos (Bian y cols., 2017a). La ingesta diaria de sucralosa pura (14.2



mg/kg PC/d), pero no de ace-k (12.9 mg/kg PC/d), por 8 semanas afectó las proporciones de *Clostridium XIVa* y el metabolismo de los ácidos biliares del colesterol en ratones C57Bl/6J. En otro estudio, evaluaron el consumo de sucralosa administrada a dosis equivalentes a la IDA (5 mg/kg PC/d) durante 6 semanas en ratones C57BL/6J delgados. Los géneros bacterianos no mostraron diferencias significativas en la abundancia al inicio, pero fueron significativamente diferentes después de tres y/o 6 meses de tratamiento; lo que indicó que la sucralosa interrumpió la dinámica de desarrollo de las bacterias intestinales. Estos cambios en la composición de la microbiota, se relacionaron con el aumento en la expresión de genes relacionados con la síntesis de LPS, los cuales están involucrados en mecanismos proinflamatorios hepáticos (Bian y cols., 2017b). Otro estudio encontró que la sucralosa ejerció efectos bacteriostáticos de manera dependiente de la dosis en ratones alimentados con dieta estándar, y observaron un efecto sinérgico sobre *Firmicutes* cuando se proporcionó sucralosa en combinación con una DAG (Wang y cols., 2018). La suplementación de Splenda (sucralosa + maltodextrina) en el agua de beber durante 6 semanas promovió disbiosis intestinal con el crecimiento excesivo de *Proteobacteria* y *E. coli* en ratones SAMP y AKR propensos a ileítis mediada por la enfermedad de Crohn. También ocurrió incremento de la mieloperoxidasa proinflamatoria solamente en ratones con la enfermedad de Crohn. Los autores concluyeron que el consumo de alimentos que contienen sucralosa/maltodextrina podría exacerbar la reactividad intestinal solo en personas con predisposición proinflamatoria (Rodríguez-Palacios y cols., 2018). La exposición pre- y postnatal a sucralosa o ace-k en ratones C57Bl6 disminuyó la abundancia de



Akkermansia muciniphila, bacteria intestinal asociada con funciones anti-inflamatorias (Olivier-Van Stichelen y cols., 2019). Interesantemente, una dosis baja (0.0003 mg/mL) de sucralosa durante 16 semanas aumentó las proporciones de *Tenacibaculum*, *Ruegeria*, *Staphylococcus* y *Allobaculum* en yeyuno, íleon y colon en ratones C57BL/6J (Zheng y cols., 2022).

Por otro lado, 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; y el reb A, como uno de sus componentes más estudiados hasta la fecha. Algunos estudios han informado que la estevia ejerce efectos beneficiosos sobre la salud de la MI, mientras que otros reportes han señalado lo contrario *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, el reb A impactó negativamente y de manera selectiva en colonias de *E. Coli* HB101 (Wang y cols., 2018). En otro trabajo, el reb A (2–3 mg/kg PC/d) durante 9 semanas *per se* alteró la composición de la MI y redujo la expresión de genes en el núcleo accumbens en ratas Sprague-Dawley delgadas. En este mismo trabajo, la combinación de reb A + probióticos, incrementó la abundancia de *Akkermansia muciniphila*. Así mismo, aumentó las concentraciones de acetato y valerato; y restauró la expresión de genes en el núcleo accumbens (Nettleton y cols., 2019). Por otra parte, la suplementación con estevia durante 10 semanas no evitó los cambios inducidos por una DAG en la tolerancia a la glucosa o la MI en ratones obesos C57BL/6 J (Becker y cols., 2020). Otras investigaciones, han examinado los efectos de la estevia sobre la MI durante el embarazo y la lactancia en ratas Wistar o Sprague-Dawley alimentadas con dieta normal o alta en grasas. Los resultados de estos estudios sugieren que las madres alimentadas con estevia durante la



gestación y la lactancia programa la salud de la descendencia a través de múltiples mecanismos (de la Garza y cols., 2022; Nettleton y cols., 2020; Wang y cols., 2022).

1.5. Efectos de los ENN sobre la MI en humanos

Actualmente, las posibles modificaciones de la MI, mediadas por edulcorantes específicos en adultos son motivo de preocupación. Sin embargo, existen pocos estudios clínicos sobre este tema.

Suez y cols. en 2014 examinaron la relación entre el consumo a largo plazo de ENN (basado en un cuestionario de frecuencia de alimentos validado) y diversos parámetros clínicos en datos recopilados de 381 individuos no diabéticos. Encontraron correlaciones positivas significativas entre el consumo de ENN y varios parámetros clínicos relacionados con el síndrome metabólico. En esta cohorte, caracterizaron la MI de 172 individuos seleccionados al azar. Encontraron correlaciones positivas entre el consumo de los ENN y modificaciones en *Enterobacteriaceae*, *Deltaproteobacteria* y *Actinobacteria*. Posteriormente, para determinar la causalidad de estos resultados, estudiaron el efecto de la sacarina sobre el control de la glucemia en siete sujetos sanos que normalmente no consumían alimentos que contenían ENN. Cuatro de los siete sujetos desarrollaron IG después de recibir 5 mg/kg dividido en 3 dosis diarias durante una semana. La IG encontrada en este estudio 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 ENN induce IG por



alteración de la MI. Thomson y cols., en el 2019 evaluó el efecto antes y después del consumo de sucralosa a corto plazo sobre el control glucémico y la MI en adultos sanos. Este estudio concluyó que el consumo de altas dosis de sucralosa (75% de la IDA) administrada en cápsulas durante 7 días no alteró el control glucémico, la resistencia a la insulina o la MI en comparación con el placebo (Thomson y cols., 2019). Otra publicación reciente examinó por 14 días la ingesta de bebidas con sucralosa (20% IDA = 0.136 g) (10 sobres) o aspartame (14% IDA = 0.425 g) (10.5 sobres) administrados de forma pura en el agua de beber y a dosis que reflejan el consumo de ENN habitual. Ninguno de los ENN evaluados causó cambios significativos en la composición de la MI o la producción de AGCC en adultos jóvenes sanos (Ahmad y cols., 2020).

A nuestro conocimiento, existe un déficit de estudios clínicos aleatorizados con respecto a los efectos de la ingestión de estevia, particularmente de reb A, sobre la composición o función de la MI. Sus efectos beneficiosos en la salud metabólica sólo se han reportado en modelos *in vitro* o animales (Kasti y cols., 2022). La mayoría de los resultados han mostrado que la estevia posee acción antihiper glucémica, efectos antioxidantes en el tejido adiposo y la pared vascular, y otros estudios reportaron reducción en los niveles de insulina postprandial y el apetito (Anton y cols., 2010; Rojas y cols., 2018).

Una revisión realizada en el 2019 sobre estudios experimentales y ensayos clínicos concluyó que solo sucralosa y sacarina provocaron modificaciones en la MI. La ingestión de sacarina en humanos mostró alteraciones en vías metabólicas vinculadas a la tolerancia a la glucosa y la disbiosis en humanos (Ruiz-Ojeda y cols.,



2019). Otra revisión realizada en ese mismo año reportó que el consumo de diversos ENN en humanos no induce modificaciones adversas en la MI cuando éstos son administrados a dosis ajustadas al consumo habitual (Lobach y cols., 2019). Es importante destacar que en estos trabajos solamente se incluyeron revisiones narrativas de la evidencia reciente hasta ese año; por lo tanto, se requieren revisiones sistemáticas y metaanálisis que proporcionen un mejor nivel de evidencia.

A pesar de la diversidad de trabajos que han reportado alteraciones en la MI después del consumo crónico de ENN artificiales, otros hallazgos sugieren que estos aditivos tienen efectos mínimos o nulos sobre la MI en modelos animales o humanos (Ahmad y cols., 2020; Falcon y cols., 2020). Además, resulta evidente que todavía no se han realizado ensayos clínicos sobre el impacto de la estevia en la composición o función de la MI. En este sentido, es importante desarrollar estudios en modelos animales que examinen los efectos de este ENN natural.



2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mundialmente, el consumo de ENN se incrementó en la población en general. En 2018, México mostró la más alta proporción de productos alimenticios que contienen ENN (11%), comparado con E.U.A (4%), Nueva Zelanda (1%) y Australia (<1%). Este incremento se debe principalmente a que estos sustitutos de azúcar se incorporaron en una amplia variedad de alimentos y bebidas, debido al aumento en la preferencia por las opciones dietéticas, bajas en calorías o light que surgieron a causa de la epidemia de diabetes.

Considerando la prevalencia actual de las alteraciones en el estado de salud, los ENN se propusieron como una estrategia para el control del peso corporal o de la glucemia por su característica de proveer mínimas o nulas calorías al organismo. A pesar de lo anterior, los efectos de los diversos ENN naturales o artificiales sobre la salud son ampliamente debatidos. Recientemente, diversas investigaciones en roedores reportaron que la ingesta de sucralosa a largo plazo induce alteraciones metabólicas a través de la modulación en la función y composición de la MI. Por el contrario, otros estudios en humanos no identifican efectos nocivos de la sucralosa sobre la MI cuando se administra en dosis ajustadas al consumo humano. No está claro si la sucralosa, particularmente en dosis bajas, puede modular la microbiota en comparación con los edulcorantes nutritivos. Por otro lado, el reb A es el ENN natural de mayor consumo en los últimos años. No obstante, sus efectos sobre la MI han sido escasamente evaluados.



Aunque diversos estudios han explorado el impacto de la sucralosa sobre la MI, aún no existe un consenso sobre las consecuencias de su consumo; además, los efectos del reb A y la influencia de la composición de macronutrientes en la dieta han sido poco estudiados.

Por lo anterior, surgió la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son los efectos del consumo de sucralosa o reb A sobre la MI en ratas alimentadas con dieta normal o dieta alta en grasas?

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



3. JUSTIFICACIÓN

Los ENN, como la sucralosa y la estevia, se introdujeron como una alternativa a la sacarosa por proporcionar un sabor dulce sin las calorías adicionales. La sucralosa se adiciona en más de 4500 productos y representa el 62% del mercado global de ENN artificiales. Recientemente, se informó sobre la relación del consumo de sucralosa con el desarrollo de alteraciones metabólicas a través de modificaciones en la MI, sin embargo, la evidencia no es concluyente. Por otro lado, el reb A, un glucósido derivado de la estevia ha ganado gran popularidad en los últimos años. No obstante, sus efectos sobre la MI han sido escasamente evaluados. Por otro lado, el contenido de grasa en la dieta podría influir en la dinámica de las comunidades bacterianas del TGI. Por lo tanto, es relevante explorar la respuesta de la MI después de la exposición a los ENN y la influencia de la DAG en los efectos de los edulcorantes. En un contexto de salud pública, los hallazgos podrían ser importantes para orientar las recomendaciones sobre el consumo de productos que contengan ENN artificiales o naturales, particularmente en poblaciones con estilo de vida occidentalizado.



4. HIPÓTESIS

El consumo de sucralosa o reb A induce modificaciones en la MI en ratas alimentadas con dieta normal o dieta alta en grasas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar los efectos del consumo de sucralosa o reb A sobre la MI en ratas con DN o DAG.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar los efectos del consumo de sucralosa o reb A sobre la diversidad de la MI.
2. Determinar los efectos del consumo de sucralosa o reb A sobre la composición de la MI.
3. Examinar la relación F/B en los diferentes grupos tratados con los ENN.
4. Analizar el efecto de la DAG sobre la diversidad, la composición y la relación F/B de la MI.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Instituciones participantes

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de Enfermedades Metabólicas de la División Académica de Ciencias de la Salud (DACs) de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) en colaboración con las siguientes instituciones:

- Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).
- Laboratorio 11 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

6.2. Animales

Ratas Wistar macho de 150 a 200 g (6 a 8 semanas de edad) fueron proporcionadas por 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 h - 19:00 h). Los cuidados y la experimentación animal se realizaron de acuerdo con la norma oficial mexicana, NOM - 062 – ZOO – 1999 y a los lineamientos realizados por el comité de investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la UNAM. El



protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de la División Académica de Ciencias de la Salud de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (002/CIP/DACS).

6.3. Edulcorantes

En este estudio se emplearon los siguientes edulcorantes: sucralosa comercial de Sweeny® plus (1.3 % de sucralosa, 98.7 % de glucosa), reb A puro de Anhui Minmetals, Hefei, China (98 % de pureza), glucosa de Roquette corporation® (pureza \geq 91%) y sacarosa de Zulka® (pureza \geq 98%).

6.4. Diseño de estudio

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos para recibir dieta normal (DN) ($n = 32$) o dieta hipercalórica (DHC) ($n = 32$) durante 8 semanas. Posteriormente, los animales se subdividieron en seis grupos para recibir sucralosa (SCL) (5 mg/kg de peso corporal (PC)/d), reb A (REB) (4 mg/kg PC/d), glucosa (GLU) o sacarosa (SAC) ($n = 8$ /grupo) durante 8 semanas. Las dosis de sucralosa y reb A fueron equivalentes a la IDA establecida por la FDA. La glucosa se introdujo como un control primario para controlar el alto contenido de glucosa en los sobres del edulcorante comercial. Las concentraciones de glucosa se ajustaron al 4% en los grupos de ENN. La sacarosa sirvió como comparador secundario. Todos los edulcorantes se diluyeron en el agua de beber. Las mediciones del consumo de alimentos y líquidos se realizaron diariamente; la ingesta de energía se calculó semanalmente; mientras que el PC se determinó dos veces por semana utilizando



una balanza electrónica de precisión (Precision BJ 2200C). Al final de la intervención de ocho semanas, los animales no mostraron cambios en la evolución del peso corporal semanal, la ganancia de peso total y la ingesta de energía entre los tratamientos con los ENN en ratas con DN O DAG. Una descripción detallada de los resultados metabólicos presentados en el estudio original se reportan en Ramos-García y cols. (2021). Al final de la intervención de 8 semanas, se aisló cada animal para la recolección de muestras fecales frescas por duplicado en tubos estériles. Todas las muestras se almacenaron inmediatamente a -80°C para su posterior análisis.

En este estudio secundario, se seleccionaron los grupos de sucralosa y reb A debido a su amplio consumo popular. Además, el reb A 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., 2009).

6.5. Dietas

La DN consistió en alimento estándar LabDiet Rodent® 5001 (28.67 % de proteína, 57.94 % de carbohidratos, 13.38 % de grasa) con densidad energética de 3.36 kcal/g y agua pura. La dieta alta en grasas (DAG) consistió en alimento estándar molido homogenizado con manteca de cerdo (26.7% hidratos de carbono, 13.2% proteínas y 60.0% grasas, 4.6 kcal/g de energía). Todos los animales tuvieron acceso *ad libitum* a alimentos y líquidos durante el período experimental.



6.6. Determinación taxonómica de la MI

6.6.1. Extracción de ADN

Las muestras fecales almacenadas a -80°C se descongelaron y se realizó la extracción del ADN total bacteriano de las muestras seleccionadas usando el mini kit QIAamp® Fast DNA Stool (QIAGEN, Hilden, GE) (Cat. No. 51604) con algunas modificaciones. El protocolo que se usó para este propósito se describe brevemente: 1) Colocar 250 mg de heces en un tubo de microcentrífuga y agregar 1 mL de tampón InhibitEX a cada muestra; 2) Centrifugar las muestras a máxima velocidad (1 min), retirar el sobrenadante y colocar en un tubo nuevo de recolección; 3) Tomar 600 μl de sobrenadante, colocar en un tubo de microcentrífuga nuevo que contendrá 25 μl de proteinasa K y adicionar 600 μl de tampón AL (vortéxear); 4) Incubar las muestras a 70°C por 10 min y Añadir 600 μl de etanol (96–100%) al lisado (vórtexear); 5) Tomar 600 μl del lisado, colocar en una columna de centrifugado (centrifugar) y desechar el tubo que contiene el filtrado (repetir este paso mínimo 3 veces); 6) Añadir 500 μl de AW1 (centrifugar), luego 500 μl de AW2 (centrifugar), y colocar el lisado en un nuevo tubo de recolección en cada ocasión; 7) El ADN se aisló mediante purificación en columna y finalmente se recolectaron 100 μl de tampón de elución (ATE) (ANEXO 1).

6.6.2. Evaluación del rendimiento y la integridad del ADN

La pureza y la concentración del ADN purificado se determinó mediante las relaciones de absorbancia en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-2000; Thermo



Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Todas las muestras se cuantificaron por duplicado y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis. La calidad del ADN fecal se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 V durante 30 min. Las lecturas se realizaron en un transiluminador (Equipar, S.A. de C.V.) a 254 nm.

6.6.3. Secuenciación del gen ARNr 16S

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando el servicio genómico de la unidad de alta tecnología del INMEGEN (Cd. de México, México), el cual se basa en el protocolo de Illumina, que implica un enfoque de PCR de dos pasos que genera bibliotecas de amplicones listas para agrupar. En la primera reacción de PCR, la región de ADN diana se amplifica utilizando cebadores específicos flanqueados por colas. Estas colas permiten una segunda reacción de PCR para agregar secuencias e índices del adaptador de Illumina a muestras múltiples (Cruaud y cols., 2017). Se prepararon bibliotecas multiplexadas de acuerdo con el protocolo de la plataforma Illumina MiSeq con un enfoque en las regiones hipervariables V3-V4 del ARNr 16S utilizando los siguientes primers :

515F 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'
806R 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

Para cada muestra, se usaron 5 ng/ μL de ADN purificado, 5 μL de primer reverse (1 μM), 5 μL de cebador reverse (1 μM), 12.5 μL de 2X Platinum SuperFi PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) y 10 μL de agua



grado PCR para un volumen total de 25 μ L para la reacción de PCR inicial. La reacción de PCR se realizó en un termociclador de 96 pocillos GeneAmp 9700 de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE) de acuerdo con los siguientes parámetros: pre-desnaturalización (98 °C por 3 min), seguido de 25 ciclos de amplificación: desnaturalización (98 °C por 30 seg), alineamiento (55 °C por 30 seg), elongación (72 °C por 30 seg) y un paso final de elongación (72 °C por 5 min). Los amplicones se generaron, limpiaron, indexaron y secuenciaron de acuerdo con el Protocolo de preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica Illumina MiSeq 16S con algunas modificaciones (Illumina, 2013).

Posteriormente, se añadieron los adaptadores de secuenciación de Illumina y los códigos de barras de doble índice a los amplicones generados mediante el kit Nextera™ XT Index (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Se generaron lecturas emparejadas de 2 × 250 (kit MiSeq V2, 500 ciclos). Los archivos FastQ se demultiplexaron y se filtraron por calidad utilizando el software Trimmomatic v. 0.36 (Bolger y cols., 2014). Posteriormente, las secuencias corregidas se alinearon y se usaron para asignar la taxonomía microbiana usando los paquetes Dada2 y Deblur. Los extremos de cada lectura se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Las secuencias con una similitud $\geq 97\%$ se asignaron a la misma OTU (Silva v. 138). Se estimó α -diversidad y β -diversidad mediante los índices de diversidad de Shannon y Bray-Curtis, respectivamente. Los datos de componentes principales de las distancias de disimilitud de Bray-Curtis se visualizaron mediante el software Emperor.



6.7. Análisis estadístico

Los datos se procesaron usando el Software Graphpad Prism v. 7.0 (San Diego, CA, EE. UU.) y QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) v. 1.9.1 (San Diego, CA, EE. UU.). La normalidad de la distribución de los valores para cada variable se evaluó con la prueba de D'Agostino-Pearson. Para una distribución normal se presentaron los datos como media \pm error estándar de la media (EEM) o desviación estándar (DE). En caso de distribuciones no paramétricas, se presentaron como mediana (percentil 25 y percentil 75). Las diferencias en la α -diversidad (índice de Shannon) entre los diferentes tratamientos se comparó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó el análisis de varianza multivariante permutacional (PERMANOVA) con la disimilitud de Bray-Curtis y el análisis de componentes principales (PCoA) para analizar la β -diversidad. La diferencia en la abundancia relativa media de los taxones bacterianos y la relación F/B entre los edulcorantes se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con comparaciones múltiples o la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Tukey o Dunns, respectivamente. La proporción de Firmicutes/Bacteroidetes (relación F/B) se calculó dividiendo la abundancia relativa de *Firmicutes* por la de *Bacteroidetes*. Se utilizó la prueba *t* de Student de dos colas o de Mann Whitney para analizar las diferencias entre las dietas. Se consideraron estadísticamente significativos aquellos valores de $p < 0.05$.



7. RESULTADOS

7.1. Efecto de los ENN sobre la diversidad de la MI

El análisis de componentes principales (PCoA) de las distancias de Bray-Curtis mostró que SCL o REB no alteraron la β -diversidad en ratas con DN o DAG. En las ratas con DN, el consumo de SAC y en aquellas que recibieron DAG y SCL mostraron una tendencia a agruparse separadamente del tratamiento con GLU, sin embargo, el ajuste de p no respalda estas diferencias (PERMANOVA, $p = 0.02$ y $q = 0.16$). La variación en el conjunto de datos se explica por dos componentes principales, con una variación acumulada del 25.29 %. (FIGURA 1A, B, TABLA 1).

No se encontraron diferencias significativas en la α -diversidad (índice de Shannon) a nivel de OTU entre tratamientos en DN o DAG ($p > 0.05$) (FIGURA 2A, B, TABLA 2).

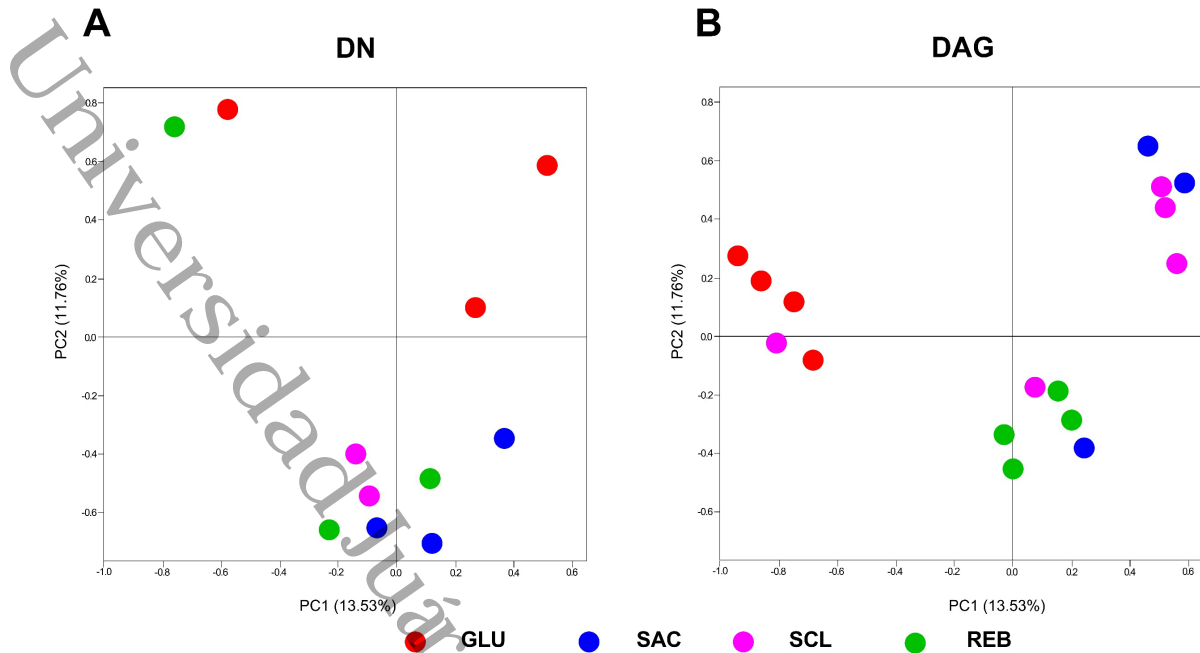


FIGURA 1. Efecto de los ENN sobre la β -diversidad (índice de Bray-Curtis) de la MI en ratas. Análisis de componentes principales (PCoA) para examinar las distancias filogenéticas entre tratamientos. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; REB, reb A, SCL, sucralosa.

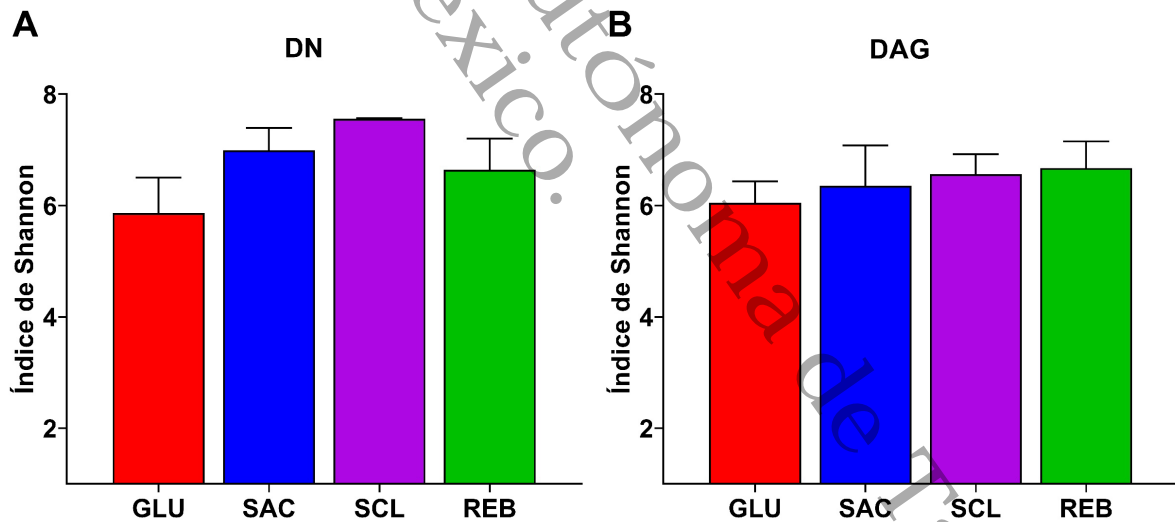


FIGURA 2. Efecto de los ENN sobre la α -diversidad (Índice de Shannon) de la MI en ratas. Los datos se basaron en función de la riqueza de las OTU's y se presentan como media \pm EEM. El análisis se realizó utilizando ANOVA de una vía con comparaciones múltiples y la prueba post hoc de Tukey. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.



TABLA 1. PERMANOVA sobre la distancia de Bray-Curtis (permutaciones = 9999) para la β -diversidad de la MI entre tratamientos.

Comparaciones	DN				DAG			
	<i>n</i>	<i>Pseudo-F</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>n</i>	<i>Pseudo-F</i>	<i>p</i>	<i>q</i>
GLU vs SAC	7	2.74	0.02	0.16	7	1.37	0.18	0.27
GLU vs SCL	5	1.81	0.19	0.27	9	1.90	0.02	0.16
GLU vs REB	7	1.18	0.24	0.29	8	1.57	0.06	0.17

* $p < 0.05$. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasa; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A; *Pseudo-F*, Valor F por permutación.

TABLA 2. Análisis de α -diversidad de la MI entre tratamientos con ENN en comparación con la glucosa.

Comparaciones	DN			DAG		
	<i>n</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>n</i>	<i>p</i>	<i>q</i>
GLU vs SAC	4	0.15	0.70	3	0.48	0.74
GLU vs SCL	2	0.08	0.70	5	0.22	0.71
GLU vs REB	4	0.47	0.74	4	0.24	0.71

Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las diferencias en la α -diversidad entre los tratamientos en ratas con DN o DAG. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.

7.2. Efecto de los ENN sobre la composición de la MI

La FIGURA 3 muestra la distribución de los cuatro filos dominantes entre tratamientos en los grupos con DN y DAG. Los filos dominantes en todos los tratamientos en ambos grupos fueron *Firmicutes* (DN: 67.44 % \pm 5.06 %; DAG: 75.59 % \pm 4.72 %) y *Bacteroidetes* (DN: 31.49 % \pm 5.07 %; DAG: 19.26 % \pm 4.60%), con una menor proporción de *Actinobacteria* (DN: 0.38% \pm 0.06%; DAG: 1.38% \pm 0.40%) y *Proteobacteria* (DN: 0.105% \pm 0.04%; DAG: 0.47% \pm 0.21%).

En ratas con DN, SAC (52.08 % \pm 9.40 %, $p = 0.02$) disminuyó *Firmicutes* y aumentó *Bacteroidetes* (47.05% \pm 9.59%, $p = 0.02$) en relación con GLU (90.16% \pm 4.40%) (FIGURA 3A). En ratas con DAG, no se detectaron modificaciones *Firmicutes* y *Bacteroidetes* ($p > 0.05$). Con la DAG, se observó la presencia de



Actinobacteria y Proteobacteria en proporciones menores, pero sin alcanzar significancia estadística (FIGURA 3B).

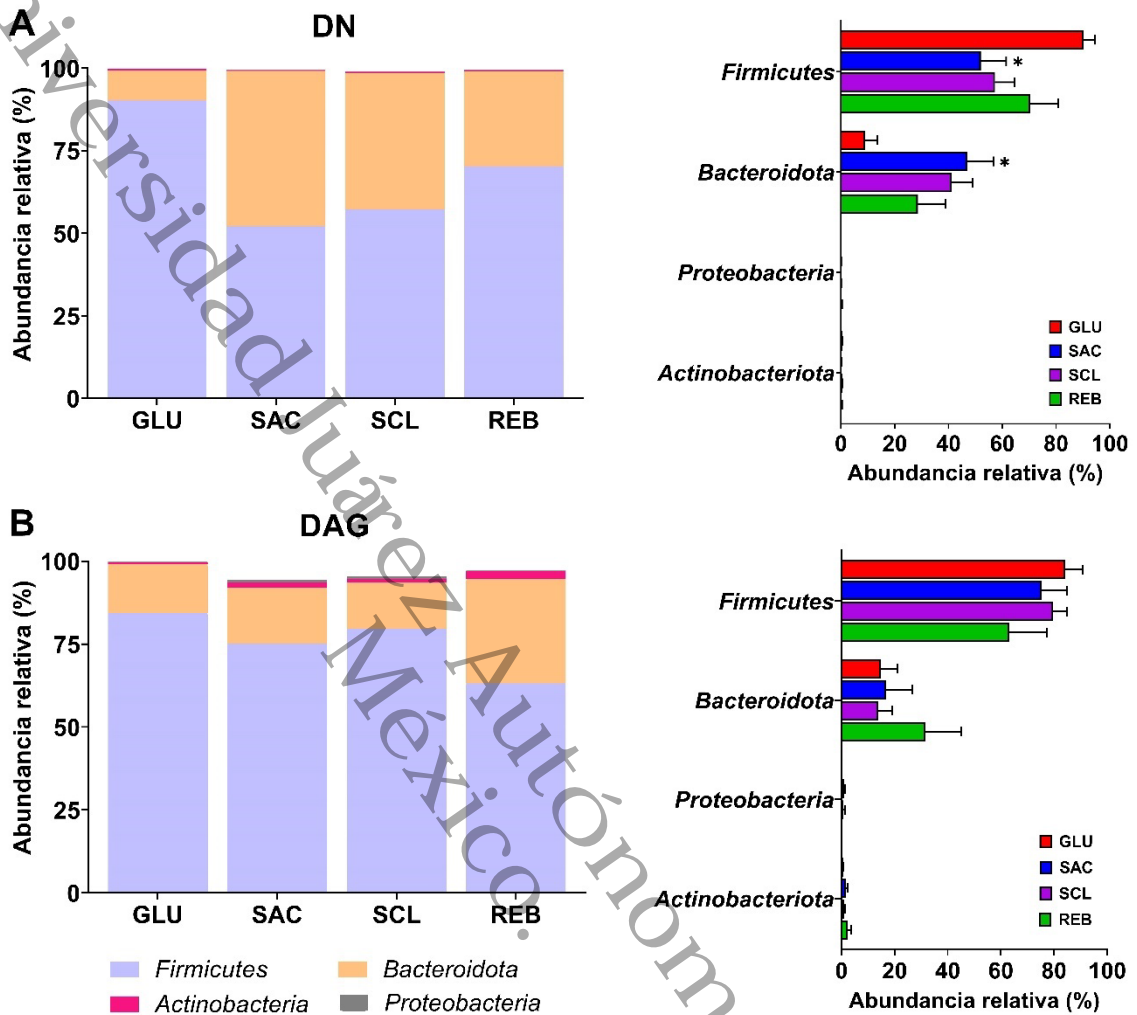


FIGURA 3. Distribución de los cuatro filos dominantes entre los tratamientos con ENN en ratas. Los datos se expresan como abundancia relativa (%) y se presentan como media \pm EEM. El análisis se realizó utilizando ANOVA de una vía con comparaciones múltiples o Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Tukey o Dunns. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.

Un aumento en la relación F/B se correlaciona con el desarrollo de alteraciones metabólicas, particularmente obesidad (Becker y cols., 2020). En ratas con DN, solamente la SAC mostró una reducción significativa en la relación F/B [0.88 (0.54, 3.77)] en comparación con GLU [17.52 (5.17, 94.87)] ($p = 0.038$)



(FIGURA 4A). En los animales que recibieron la DAG no se observaron diferencias significativas entre los ENN (FIGURA 7B) y tampoco entre las dietas ($p > 0.05$) (FIGURA 4C).

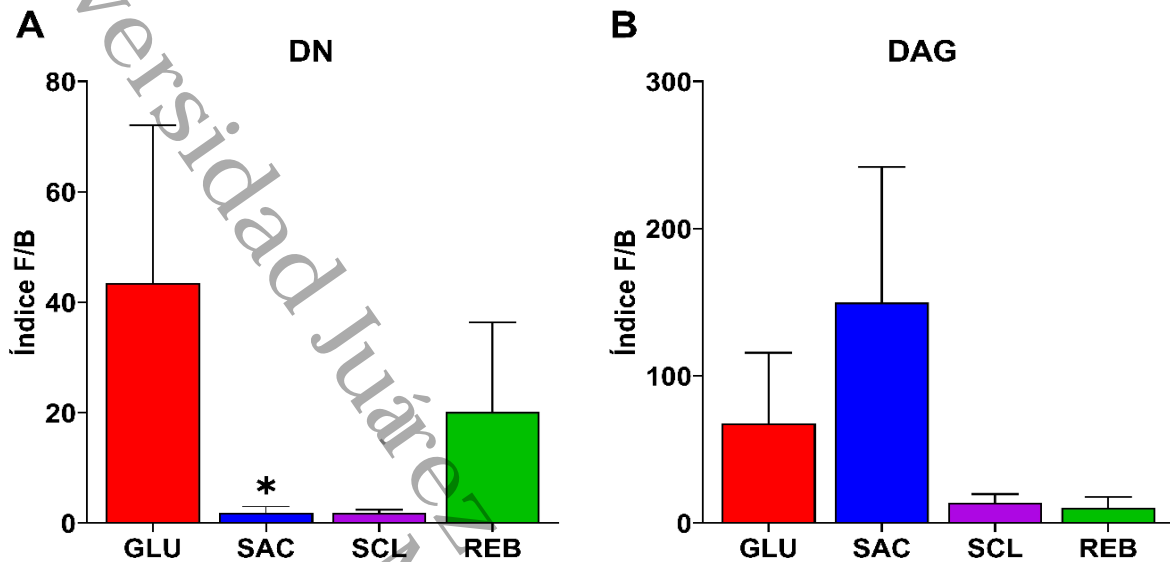


FIGURA 4. Efecto de los ENN en la relación F/B en ratas. Los datos se expresan como abundancia relativa (%). El análisis se realizó utilizando ANOVA de una vía o Kruskal Wallis con la prueba post hoc de Tukey o Dunns, respectivamente. * $p < 0.05$ vs GLU. DN: dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.

La FIGURA 5 muestra la distribución de la MI a nivel de clase en los diferentes tratamientos con ENN en ratas con DN y DAG. En ratas con DN, el consumo de SAC ($47.05\% \pm 9.59\%$, $p = 0.024$) aumentó la abundancia de *Bacteroidia* en comparación con GLU ($9.09\% \pm 4.34$) (FIGURA 5A). En ratas con DAG, REB ($16.45\% \pm 7.11\%$, $p = 0.003$) disminuyó la proporción de *Bacilli* en comparación con GLU ($63.72\% \pm 10.74\%$) (FIGURA 5B). No se identificaron cambios significativos con el consumo de los ENN en otras clases bacterianas ($p > 0.05$).

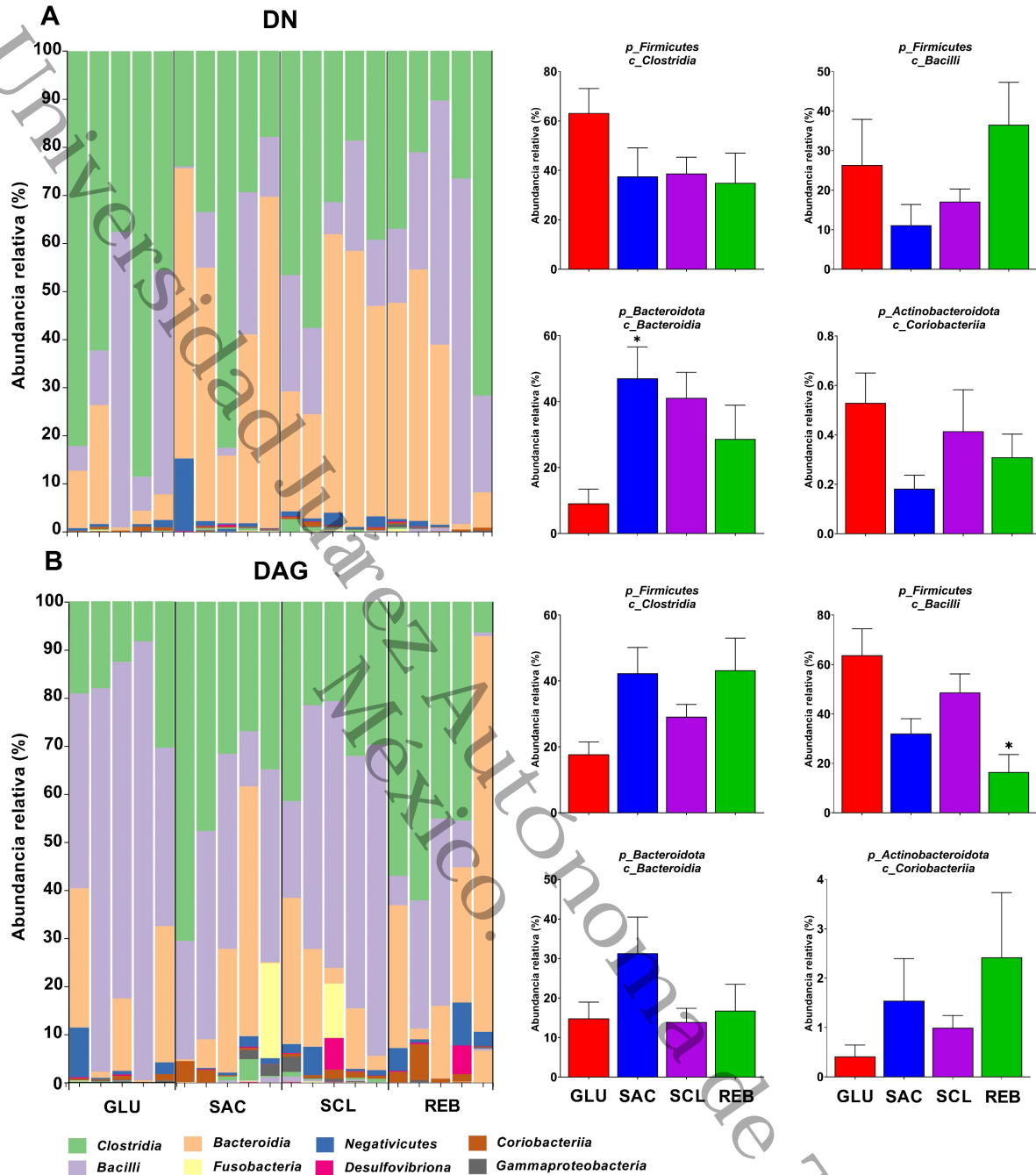


FIGURA 5. Efecto de los ENN sobre la composición de la MI a nivel de clase en ratas. Los datos se expresan como abundancia relativa (%) y se presentan como media \pm EEM. Los datos se analizaron usando ANOVA de una vía con comparaciones múltiples con la prueba post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ vs. GLU, ** $p < 0.05$ vs. SUC. $n = 5$ muestras por grupo. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.



La FIGURA 6 muestra la distribución de la MI a nivel de género en los diferentes tratamientos con ENN en ratas con DN o DAG. Los géneros principales se encontraron en los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Actinobacteria*. En ratas con DN, SCL ($3.60\% \pm 1.41\%$), REB ($3.71\% \pm 1.61\%$) y SAC ($1.78\% \pm 1.29\%$) redujeron la abundancia relativa del género beneficioso *Romboutsia* (filo: *Firmicutes*; Familia: *Peptostreptococcaceae*) comparado con GLU ($21.40\% \pm 8.23\%$, $p < 0.05$) (FIGURA 6A). En ratas con DAG, SCL ($42.67\% \pm 6.98\%$) y REB ($6.85\% \pm 6.67\%$) disminuyeron *Lactobacillus* (filo: *Firmicutes*; Familia: *Lactobacillaceae*) respecto a GLU ($59.69\% \pm 11.51\%$). Se observó que el REB ($11.53\% \pm 4.22\%$) incrementó *Faecalibacterium* (filo: *Firmicutes*; Familia: *Ruminococcaceae*) comparado con SAC ($1.99\% \pm 0.68\%$, $p < 0.01$) (FIGURA 6B). En otros géneros, no observamos significancia estadística.

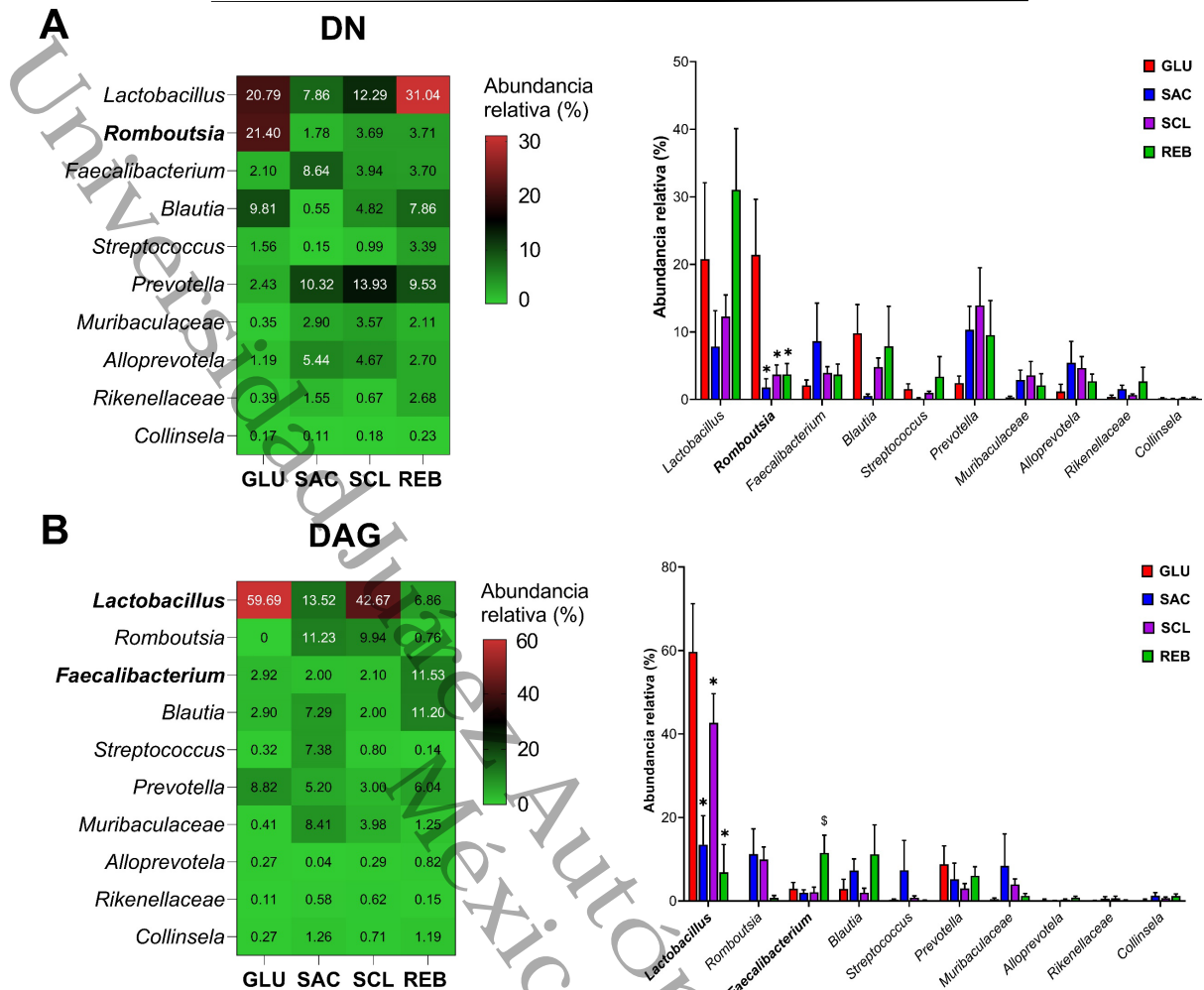


FIGURA 6. Distribución de los principales géneros de la MI después del consumo de ENN en ratas. Los datos se expresan como media \pm EEM. Los datos se analizaron usando PCoA o ANOVA de una vía con comparaciones múltiples con la prueba post hoc de Tukey. * $p < 0.05$ vs. GLU, \$ $p < 0.05$ SAC. $n = 5$ muestras por grupo. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.

7.3. Efecto de la DAG sobre la diversidad, la composición y la relación F/B de la MI

Se evaluó el efecto de la DAG sobre la MI independientemente del tipo de edulcorante. En la FIGURA 7 se muestran los efectos de la DAG sobre la diversidad, la composición y la relación F/B de la MI. Con el consumo de la DAG, no se



identificaron efectos significativos en la β -diversidad (TABLA 3, FIGURA 7A), en la α -diversidad (índice de Shannon, FIGURA 7B), en la composición a nivel de filo (FIGURA 7C) o en el índice F/B ($p > 0.05$) (FIGURA 7D). A nivel de clase, la DAG aumentó las proporciones de *Bacilli* [40.30% (21.24, 74.54)] ($p = 0.03$) y *Coriobacteria* [0.62% (0.24, 1.80)] ($p = 0.02$) en relación con la DN [16.68% (8.14, 28.29); 0.29% (0.15, 0.50), respectivamente] (FIGURA 7E). Se observó una potencial disminución de *Clostridia*, sin embargo, no se encontró significancia estadística. Por otro lado, a nivel de género, la DAG no indujo modificaciones significativas sobre *Lactobacillus*, *Romboutsia* y *Faecalibacterium* ($p > 0.05$) (datos no mostrados).

TABLA 3. PERMANOVA sobre la distancia de Bray-Curtis (permutaciones = 9999) para la β -diversidad de la MI entre dietas.

Comparaciones	<i>n</i>	Pseudo-F	<i>p</i>	<i>q</i>
DN + GLU vs DAG + GLU	7	1.12	0.18	0.27
DN + SAC vs DAG + SAC	7	1.94	0.05	0.17
DN + SCL vs DAG + SCL	7	1.50	0.12	0.23
DN + REB vs DAG + REB	8	1.44	0.11	0.23

* $p < 0.05$. DN, dieta normal; DAG, dieta alta en grasa; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A; Pseudo-F, Valor F por permutación.

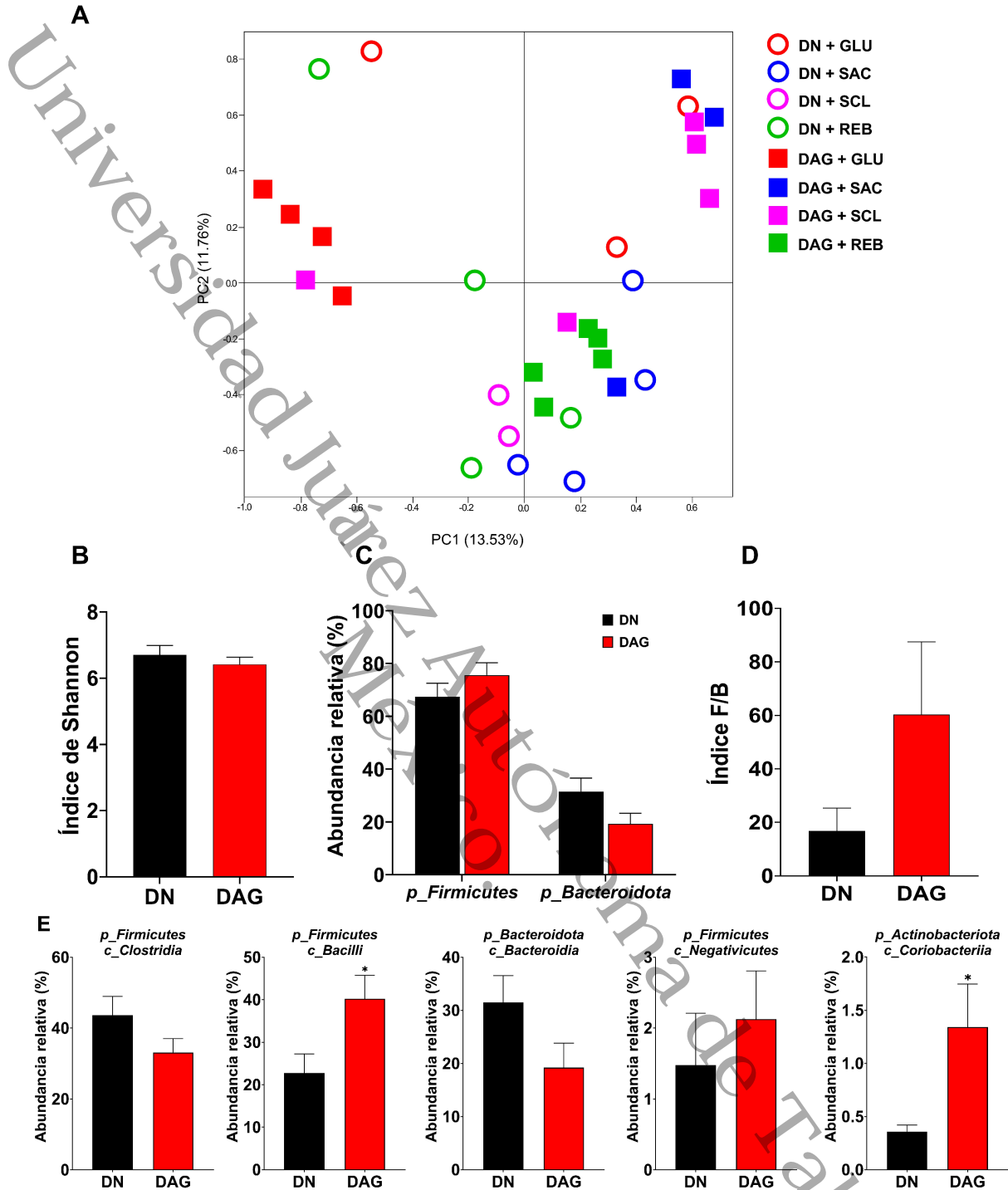


FIGURA 7. Efecto de la DAG sobre la diversidad (A, B), la composición a nivel de filo (C), la relación F/B (D) y clases más abundantes (E) de la MI. Los datos se expresan como abundancia relativa (%) y se presentan como media \pm EEM o mediana (p25, p70). El análisis se realizó con la prueba *t* de Student no pareada o de Mann-Whitney. **p* < 0.05. DN: dieta normal; DAG, dieta alta en grasas; GLU, glucosa; SAC, sacarosa; SCL, sucralosa; REB, reb A.



8. DISCUSIÓN

El presente estudio encontró que el consumo de sucralosa o reb A en dosis equivalentes a la IDA durante 8 semanas no modificó la diversidad y la composición de la MI a nivel de filo y clase, sin embargo, indujo una reducción en las proporciones de *Romboutsia* y *Lactobacillus*, que son géneros que se han asociado con efectos benéficos. Por otra parte, la DAG provocó efectos en la microbiota que podrían asociarse a disbiosis intestinal, independientemente del edulcorante.

Se conoce que la MI es un elemento clave en la regulación del metabolismo (de Vos y cols., 2022), sin embargo, hasta la fecha no existe una comprensión clara de lo que constituye una MI sana. La composición de la microbiota es única de cada individuo, debido en parte a la diversidad en cada nivel taxonómico y a las variaciones en la tasa de crecimiento bacteriano. Estudios recientes identificaron especies bacterianas particulares asociadas con una microbiota sana. Las especies bacterianas que residen dentro de la capa mucosa del colon pueden influir en el mantenimiento de la homeostasis celular del hospedero o en la activación de mecanismos inflamatorios (Carding y cols., 2015). En general, una alta diversidad de taxones y riqueza de genes bacterianos caracterizan a las comunidades bacterianas intestinales sanas (Fan y cols., 2021). De esta manera, la disbiosis intestinal está relacionada con la disminución de la diversidad bacteriana, la pérdida de microbiota beneficiosa o el crecimiento excesivo de bacterias dañinas (Hrncir, 2022).



Las modificaciones en la MI se pueden lograr rápidamente mediante cambios en los macronutrientes que se ingieren en la dieta. Estas modificaciones en la MI pueden alterar la barrera intestinal, desencadenar respuestas inflamatorias e influir en el metabolismo, como sucede con la ingesta de DAG o dietas altas en carbohidratos simples (Hrncir, 2022; Schulz y cols., 2014). Una de las principales modificaciones en la dieta durante las últimas décadas es el aumento del consumo de alimentos procesados, que frecuentemente contienen aditivos naturales o producidos sintéticamente, entre ellos los ENN.

El impacto del consumo de ENN sobre la MI tomó relevancia desde la publicación de un estudio realizado por Suez y cols. (2014). Ellos mostraron que el consumo de sucralosa (1666 mg/kg/d, 100x la IDA), sacarina (3333 mg/kg/d, 650x la IDA) o aspartame (1333 mg/kg/d, 30x la IDA) por 11 semanas indujo IG en roedores y humanos. La mayor respuesta glucémica se observó después del consumo de sacarina en roedores y también se reprodujo en 4 de 7 sujetos sanos después de recibir 5 mg/kg/d de este ENN durante una semana. El desarrollo de la IG fue atribuida a los cambios en la MI causada por el desbalance en la proporción de ciertos taxones bacterianos, incluidos el aumento de *Bacteroides* y la disminución de *Clostridiales*. Suez y cols. integraron por primera vez la evaluación del impacto de los ENN sobre el metabolismo glucémico y su relación con los cambios en la MI (Suez y cols., 2014).

En la presente investigación encontramos que el consumo de sucralosa o reb A no indujo modificaciones en la α - y β -diversidad de la microbiota en ratas con DN o DAG. Nuestros resultados concuerdan con un experimento previo en el cual la



sucralosa no modificó la α -diversidad de la MI en ratones jóvenes que consumieron una DN o una DAG (Wang y cols., 2018). En otros trabajos se encontraron resultados similares que respaldan la ausencia de efectos de la sucralosa (0.43 mg o 0.62 mg) y el reb A (0.5 mg/mL o 5.0 mg/mL) sobre la diversidad microbiana, particularmente cuando son administrados en dosis por debajo de la IDA (Li y cols., 2014; Zhang y cols., 2021). En contraparte, otras investigaciones en modelos animales o humanos con sobrepeso y obesidad encontraron una disbiosis caracterizada por una diversidad reducida (Castaner y cols., 2018; Turnbaugh y cols., 2006). Las diferencias en los resultados probablemente se deban en gran medida a las variaciones en el diseño experimental como diferencias en la duración de la intervención, la dosis utilizada o el tipo de edulcorante administrado.

Los cambios en los diferentes niveles taxonómicos de la MI, a menudo se asocian con impactos funcionales en el hospedero. *Firmicutes* y *Bacteroidetes* tienen una relación significativa con el metabolismo del hospedero. *Firmicutes* puede ser más efectivo en la extracción de energía de los alimentos; mientras que *Bacteroidetes* participa en la degradación de glucanos (Tang y cols., 2022). Estudios previos encontraron una reducción de *Bacteroidetes* y un aumento de *Firmicutes* en humanos y modelos animales de obesidad (Schwiertz y cols., 2010). Particularmente, se reportó que la sucralosa puede causar disbiosis de bacterias intestinales en ratas (Abou-Donia y cols., 2008) y desregulación metabólica en ratones (Suez y cols., 2014). Nuestros resultados mostraron que, a nivel de filo, el perfil taxonómico fue dominado por *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en la DN y la DAG, con la presencia de *Actinobacteria* y *Proteobacteria* en proporciones menores en la



DAG. En nuestros resultados no se presentaron cambios en la abundancia total de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* con la DAG. Estudios previos mostraron que la DAG puede conducir a una mayor proporción de *Firmicutes* y una disminución de *Bacteroidetes* (Liu y cols., 2017; Turnbaugh y cols., 2008), lo que contrasta con nuestro resultado. Sin embargo, los cambios en la abundancia y diversidad de la MI mediados por la DAG permanecen controversiales. Numerosos estudios demuestran que la DAG incrementa *Firmicutes* y disminuye *Bacteroidetes* (Crawford y cols., 2019; He y cols., 2018; Murphy y cols., 2015). Aunque otro estudio mostró que las DAG ingeridas a corto plazo conducen a una disminución de los niveles de *Firmicutes* en humanos (David y cols., 2014).

Por otra parte, la relación F/B ha sido ampliamente utilizada como marcador de obesidad (Magne y cols., 2020). A pesar de lo anterior, en esta investigación no detectamos diferencias en la relación F/B entre los tratamientos con ENN y entre las dietas, de manera similar a otros estudios, los cuales examinaron esta relación en animales que recibieron DN o DAG (Magne y cols., 2020). Otros reportaron que la relación F/B se incrementa con el consumo de DAG, pero decrece la diversidad bacteriana (Turnbaugh y cols., 2008). Sin embargo, aunque no se presentaron efectos significativos en la relación F/B, el régimen de DAG provocó alteraciones en la MI a nivel de clase, incrementando la proporción de *Bacilli*, independientemente del ENN. Un trabajo previo reportó resultados similares de *Bacilli* después de solo una semana de intervención con DAG, pero su proporción disminuyó luego de 4 semanas en ratones (Tang y cols., 2022). La ausencia de efectos significativos de



los ENN y de la DAG en la relación F/B podría explicarse principalmente por el aumento que observamos en *Bacilli* y la potencial disminución de *Clostridia*.

Previamente, nuestro grupo de trabajo identificó que diversos ENN, incluyendo sucralosa y reb A, no causaron efectos sobre la ingesta energética, el peso corporal y la glucemia posprandial en ratas sanas o con respuesta glucémica alterada inducida por la DAG (Ramos-García y cols., 2021). Sin embargo, es importante destacar que el aumento de *Bacilli* podría estar asociado con la respuesta glucémica alterada en estos animales. En general, el consumo excesivo de grasas y carbohidratos en las dietas occidentales se relaciona con alteraciones en el microbioma que contribuyen a los procesos inflamatorios y a la resistencia a la insulina inducida por la obesidad (Guimarães y cols., 2020; Xu y cols., 2003). En esta línea, se reportó que cada tipo de grasa ingerida en la DAG puede inducir diferentes modificaciones en la composición de la MI (Singh y cols., 2022). Además, se ha propuesto que ciertos grupos bacterianos presentan la capacidad de metabolizar lípidos, lo que podría resultar en un mecanismo principal para los cambios en la MI (Machate y cols., 2020; Netto Candido y cols., 2018).

A nivel de clase, solamente el consumo de sacarosa aumentó la abundancia de *Bacteroidia* en ratas con DN. La mayoría de los estudios documentan que las dietas altas en carbohidratos promueven cambios en la composición de la MI, particularmente, disminuyendo *Bacteroidetes* y aumentando *Firmicutes* (Satokari, 2020). Sin embargo, los efectos de la sacarosa en la disminución de *Bacteroidetes* es controversial (Cani y cols., 2008; Daniel y cols., 2014; Singh y cols., 2017). Mientras tanto, la exposición a reb A disminuyó la abundancia de *Bacilli* en ratas



con DAG, lo que podría considerarse beneficioso debido a que el aumento de esta clase se asocia con alteraciones en el metabolismo (Tang y cols., 2020).

De manera importante, sucralosa o reb A indujeron una disminución del género *Romboutsia* en ratas con DN. Estas bacterias pueden utilizar carbohidratos, fermentar diversos aminoácidos y modular el metabolismo de los lípidos (Gerritsen y cols., 2019). De igual manera, reb A y sucralosa disminuyeron *Lactobacillus* en ratas con DAG. Previamente se ha informado que ambos géneros están asociados con funciones benéficas participando en la regulación del metabolismo de los lípidos y el mantenimiento de la función de la barrera epitelial intestinal (Zhu y cols., 2022). Nuestros resultados concuerdan con otras investigaciones donde los glucósidos de estevia mostraron una influencia inhibitoria sobre *Lactobacilli* (Gardana y cols., 2003) o incluso reb A inhibió *in vitro* el crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus* (Deniña y cols., 2014).

Trabajos recientes destacan la importancia de evaluar los efectos de las DAG en combinación con los ENN, para comprender la influencia de las diferencias en las proporciones de macronutrientes sobre el estado metabólico (Nettleton y cols., 2019). En este trabajo incluimos un análisis del efecto de la DAG sobre la microbiota. La DAG aumentó las proporciones de *Bacilli* y *Coriobacteriia*, lo que podría asociarse con disbiosis intestinal. Es bien conocido que el alto contenido de grasas en la dieta modula la composición de la MI. Por ejemplo, los modelos murinos alimentados con DAG presentaron menor proporción de *Bacteroidetes* y mayor proporción de *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Hildebrandt y cols., 2009; Tremaroli y cols., 2012; Woting y cols., 2016).



En general, en este estudio encontramos que cuando se adicionaron los ENN a la bebida en cantidades equivalentes a la IDA, no provocaron alteraciones sobre la diversidad y la composición de la microbiota a nivel de filo y clase, sin embargo, se observó una reducción en géneros considerados beneficiosos. Estos resultados contrastan con la ausencia de efectos de los ENN sobre la respuesta glucémica, el peso corporal o la ingesta energética que se reportó en nuestra investigación previa (Ramos-García y cols., 2021). Sin embargo, consideramos que las reducciones en estos géneros beneficiosos podrían dar lugar a mayores alteraciones metabólicas si se incrementaran los periodos de tratamiento o las dosis administradas. En relación con las dosis, trabajos previos han observado alteraciones mayores cuando se han administrado dosis muy elevadas de ENN. Por ejemplo, acesulfame k y aspartame, administrados a 2.5 o 30 veces la IDA, respectivamente, promovieron alteraciones en la MI (Bian y cols., 2017a; Suez y cols., 2014); mientras que no se encontraron alteraciones cuando se respetó la IDA de sacarina, aspartame o sucralosa (Falcon y cols., 2020; Palmnas y cols., 2014; Uebanso y cols., 2017).

Pocos estudios han investigado los efectos de la suplementación crónica de la sucralosa o reb A sobre la MI en modelos animales con DAG. Sumado a esto, los resultados son inconsistentes debido a la gran variabilidad en los diseños experimentales de cada estudio. Una de las principales problemáticas observadas en estos trabajos ha sido el uso de dosis demasiado elevadas que no corresponden a lo que un humano podría ingerir de manera habitual. Este tipo de intervenciones, aunque inducen modificaciones muy pronunciadas, no son compatibles con el consumo que habitualmente tiene una persona en la vida diaria. Otra característica,



es que la mayoría de los autores escasamente han comparado los efectos de los ENN en modelos con DAG o DN. Por lo que son deseables estudios futuros que evalúen el impacto del consumo de aditivos/ingredientes alimentarios sobre la microbiota en modelos animales que incluyan las diferentes dietas consumidas por la población. También es importante mencionar que los mismos 4 filos bacterianos predominantes descritos en humanos (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*) se detectan en el contenido cecal o fecal de rata, lo que sugiere que las ratas son un buen modelo para estudiar la influencia de la dieta en la MI. No obstante, debido a diferencias potenciales en la composición de la MI de humanos y ratas a nivel de especie, se debe ser cuidadoso al extrapolar los hallazgos del modelo de rata a humanos.

Las fortalezas del presente trabajo son las siguientes: se incluyó un modelo de IG inducido por DAG en ratas, el cual podría reflejar el régimen nutricional de la dieta occidental (Ramos-García y cols., 2021). Incluimos el uso de un ENN natural y uno artificial; la administración de dosis equivalentes a la IDA; y la inclusión de glucosa y sacarosa como controles. El uso de la secuenciación del gen ARNr 16S constituye un método confiable para estudiar la diversidad y la composición de la microbiota. El diseño de este trabajo se basó en el resultado primario, que consistió en la respuesta de glucosa posprandial a una prueba de tolerancia oral a la glucosa. El análisis de la MI fue un resultado secundario exploratorio, como se informó previamente. Por otra parte, entre las posibles limitaciones del presente trabajo se encuentra el no incluir los datos de la microbiota basal, ni evaluar los mecanismos por los cuales la dieta influye en los cambios sobre la MI.



9. CONCLUSIONES

- Se demostró que la sucralosa o el reb A, cuando se consumen a las dosis recomendadas, no provocaron alteraciones en la diversidad y la composición de la MI a nivel de filo y clase, sin embargo, indujeron una reducción en las proporciones de *Romboutsia* y *Lactobacillus*, que son géneros que se han asociado con efectos benéficos en la salud.
- La DAG indujo un incremento en los niveles de *Bacilli* y *Coriobacteriia*, a pesar de no observarse cambios en la relación F/B, sugiriendo una potencial disbiosis intestinal relacionada con grupos bacterianos específicos.
- Aunque la relación F/B es utilizada ampliamente como un indicador de riesgo en los pacientes con obesidad o trastorno metabólico, el estudio de las modificaciones a nivel de clase, género y especie podría brindar una información más específica para la intervención clínica.

9.1. Recomendaciones

- Incluir las mediciones basales de la MI para comparar los cambios en la diversidad y composición antes y después de las intervenciones.
- Incluir determinaciones de AGCC y marcadores proinflamatorios como LPS, TNF- α o IL-6 para identificar vías metabólicas relacionadas con las modificaciones en la MI.
- Se deben evaluar los efectos de los ENN, con dosis que no excedan la IDA, sobre la MI y el metabolismo en humanos.



10. PERSPECTIVAS

- Emplear herramientas como la metaproteómica, la metabolómica y la transcriptómica para obtener una comprensión de los mecanismos, metabolitos y expresión de genes o proteínas implicados en la interacción entre el consumo de los ENN y la MI.
- Gran parte de la atención se ha centrado en el análisis de la microbiota fecal, sin embargo, muchas funciones metabólicas también ocurren a nivel del intestino delgado. El muestreo en diferentes secciones del TGI podría contribuir al entendimiento del papel de la microbiota en la fisiología y las interacciones metabólicas entre especies.



11. REFERENCIAS

- Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., Abdel-Rahman, A. A., McLendon, R. E., y Schiffman, S. S. (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome P-450 in male rats. *J Toxicol Environ Health*, 71(21), 1415-1429.
- Ahmad, S. Y., Friel, J., y Mackay, D. (2020). The effects of non-nutritive artificial sweeteners, aspartame and sucralose, on the gut microbiome in healthy adults: secondary outcomes of a randomized double-blinded crossover clinical trial. *Nutrients*, 12(11), 3408.
- Anton, S. D., Martin, C. K., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W. T., Geiselman, P., y cols. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1), 37-43.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., y cols. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Becker, S. L., Chiang, E., Plantinga, A., Carey, H. V., Suen, G., y Swoap, S. J. (2020). Effect of stevia on the gut microbiota and glucose tolerance in a murine model of diet-induced obesity. *FEMS Microbiol Ecol*, 96(6).
- Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., y Lu, K. (2017a). The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS One*, 12(6).
- Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., y Lu, K. (2017b). Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Front Physiol*, 8, 487.
- Bolger, A. M., Lohse, M., y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Brooks, S. P., McAllister, M., Sandoz, M., y Kalmokoff, M. L. (2003). Culture-independent phylogenetic analysis of the faecal flora of the rat. *Can J Microbiol*, 49(10), 589-601.
- Burke, M. V., y Small, D. M. (2015). Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiol Behav*, 152(Pt B), 381-388.
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., y cols. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 57(6), 1470-1481.
- Carding, S., Verbeke, K., Vipond, D. T., Corfe, B. M., y Owen, L. J. (2015). Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*, 26, 26191.
- Carmody, R. N., Bisanz, J. E., Bowen, B. P., Maurice, C. F., Lyalina, S., Louie, K. B., y cols. (2019). Cooking shapes the structure and function of the gut microbiome. *Nat Microbiol*, 4(12), 2052-2063.
- Carmody, R. N., Gerber, G. K., Luevano, J. M., Jr., Gatti, D. M., Somes, L., Svenson, K. L., y cols. (2015). Diet dominates host genotype in shaping the murine gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 17(1), 72-84.



- Castaner, O., Goday, A., Park, Y.-M., Lee, S.-H., Magkos, F., Shioh, S.-A. T. E., y cols. (2018). The gut microbiome profile in obesity: a systematic review. *Int J Endocrinol*, 2018, 9.
- Chia, C. W., Shardell, M., Gravenstein, K. S., Carlson, O. D., Simonsick, E. M., Ferrucci, L., y cols. (2018). Regular low-calorie sweetener consumption is associated with increased secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide. *Diabetes Obes Metab*, 20(9), 2282-2285.
- Christensen, L., Roager, H. M., Astrup, A., y Hjorth, M. F. (2018). Microbial enterotypes in personalized nutrition and obesity management. *Am J Clin Nutr*, 108(4), 645-651.
- Clemente, Jose C., Ursell, Luke K., Parfrey, Laura W., y Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6), 1258-1270.
- Čoklo, M., Maslov, D. R., y Kraljević Pavelić, S. (2020). Modulation of gut microbiota in healthy rats after exposure to nutritional supplements. *Gut Microbes*, 12(1), 1-28.
- Conz, A., Salmona, M., y Diomedea, L. (2023). Effect of non-nutritive sweeteners on the gut microbiota. *Nutrients*, 15(8), 1869.
- Crawford, M., Whisner, C., Al-Nakkash, L., y Sweazea, K. L. (2019). Six-week high-fat diet alters the gut microbiome and promotes cecal inflammation, endotoxin production, and simple steatosis without obesity in male rats. *Lipids*, 54(2-3), 119-131.
- Cruaud, P., Rasplus, J.-Y., Rodriguez, L. J., y Cruaud, A. (2017). High-throughput sequencing of multiple amplicons for barcoding and integrative taxonomy. *Scientific Reports*, 7(1), 41948.
- Dalby, M. J., Ross, A. W., Walker, A. W., y Morgan, P. J. (2017). Dietary uncoupling of gut microbiota and energy harvesting from obesity and glucose tolerance in mice. *Cell Rep*, 21(6), 1521-1533.
- Daniel, H., Gholami, A. M., Berry, D., Desmarchelier, C., Hahne, H., Loh, G., y cols. (2014). High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *Isme j*, 8(2), 295-308.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., y cols. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563.
- de la Garza, A. L., Romero-Delgado, B., Martínez-Tamez, A. M., Cárdenas-Tueme, M., Camacho-Zamora, B. D., Matta-Yee-Chig, D., y cols. (2022). Maternal sweeteners intake modulates gut microbiota and exacerbates learning and memory processes in adult male offspring. *Front Pediatr*, 9.
- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., y Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71(5), 1020-1032.
- DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., y Mizoguchi, E. (2016). Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis*, 22(5), 1137-1150.
- Deniņa, I., Semjonovs, P., Fomina, A., Treimane, R., y Linde, R. (2014). The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *LAM*, 58(3), 278-284.



- Dieterich, W., Schink, M., y Zopf, Y. (2018). Microbiota in the gastrointestinal tract. *Med Sci (Basel)*, 6(4).
- Dumas, M. E., Barton, R. H., Toye, A., Cloarec, O., Blancher, C., Rothwell, A., y cols. (2006). Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(33), 12511-12516.
- Dunford, E., Taillie, L., Miles, D., Eyles, H., Tolentino-Mayo, L., y Ng, S. (2018). Non-nutritive sweeteners in the packaged food supply—an assessment across 4 countries. *Nutrients*, 10(2), 257.
- Falcon, T., Foletto, K. C., Siebert, M., Pinto, D. E., Andrades, M., y Bertoluci, M. C. (2020). Metabarcoding reveals that a non-nutritive sweetener and sucrose yield similar gut microbiota patterns in Wistar rats. *Genet Mol Biol*, 43(1), e20190028.
- Fan, Y., y Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat Rev Microbiol*, 19(1), 55-71.
- FDA. (2018). *Additional information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the United States*. Retrieved Accessed Jun 10, 2022 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., y cols. (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., y 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.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., y Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(10), 577-589.
- Garcia, K., Ferreira, G., Reis, F., y Viana, S. (2022). Impact of dietary sugars on gut microbiota and metabolic health. *Diabetology*, 3(4), 549-560.
- Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., y Pietta, P. (2003). Metabolism of stevioside and rebaudioside a from stevia rebaudiana extracts by human microflora. *J Agric Food Chem*, 51(22), 6618–6622.
- Gerritsen, J., Hornung, B., Ritari, J., Paulin, L., Rijkers, G. T., Schaap, P. J., y cols. (2019). A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. *bioRxiv*, 845511.
- 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.
- Goyal, S. K., Samsher, y Goyal, R. K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*, 61(1), 1-10.
- Grice, E. A., y Segre, J. A. (2012). The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 13, 151-170.
- Grotz, V. L., Henry, R. R., McGill, J. B., Prince, M. J., Shamon, H., Trout, J. R., y cols. (2003). Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc*, 103(12), 1607-1612.



- Guimarães, V. H. D., Lelis, D. F., Oliveira, L. P., Borém, L. M. A., Guimarães, F. A. D., Farias, L. C., y cols. (2020). Comparative study of dietary fat: Lard and sugar as a better obesity and metabolic syndrome mice model. *Arch Physiol Biochem*, 1-11.
- Hakkak, R., Korourian, S., Foley, S. L., y Erickson, B. D. (2017). Assessment of gut microbiota populations in lean and obese Zucker rats. *PLoS One*, 12(7), e0181451.
- He, C., Cheng, D., Peng, C., Li, Y., Zhu, Y., y Lu, N. (2018). High-fat diet induces dysbiosis of gastric microbiota prior to gut microbiota in association with metabolic disorders in mice. *Front Microbiol*, 9, 639.
- Henao-Mejía, J., Elinav, E., Jin, C., Hao, L., Mehal, W. Z., Strowig, T., y cols. (2012). Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature*, 482(7384), 179-185.
- Higgins, K. A., Considine, R. V., y 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. *J Nutr*, 148(4), 650-657.
- Hildebrandt, M. A., Hoffmann, C., Sherrill-Mix, S. A., Keilbaugh, S. A., Hamady, M., Chen, Y. Y., y cols. (2009). High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), 1716-1724. e1711-1712.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., y Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 22, 283-307.
- Hrcir, T. (2022). Gut microbiota dysbiosis: triggers, consequences, diagnostic and therapeutic options. *Microorganisms*, 10(3), 578.
- Illumina. (2013). *16S metagenomic sequencing library preparation*. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- Inoue, R., y Ushida, K. (2003). Development of the intestinal microbiota in rats and its possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine. *FEMS Microbiol Ecol*, 45(2), 147-153.
- Joly, F., Mayeur, C., Bruneau, A., Noordine, M. L., Meylheuc, T., Langella, P., y cols. (2010). Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie*, 92(7), 753-761.
- Kasti, A. N., Nikolaki, M. D., Synodinou, K. D., Katsas, K. N., Petsis, K., Lambrinou, S., y cols. (2022). The effects of stevia consumption on gut bacteria: friend or foe? *Microorganisms*, 10(4).
- Kim, Y., Keogh, J. B., y Clifton, P. M. (2019). Non-nutritive sweeteners and glycaemic control. *Curr Atheroscler Rep*, 21(12), 49.
- Kuk, J. L., y Brown, R. E. (2016). Aspartame intake is associated with greater glucose intolerance in individuals with obesity. *Appl Physiol Nutr Metab*, 41(7), 795-798.
- Laviada-Molina, H., y Molina-Segui, F. (2017). Posición de la sociedad mexicana de nutrición y endocrinología sobre los edulcorantes no calóricos. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr*, 4, 24-41.



- Lecomte, V., Kaakoush, N. O., Maloney, C. A., Raipuria, M., Huinao, K. D., Mitchell, H. M., y cols. (2015). Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. *PLoS One*, 10(5), e0126931.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., y Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, 1022.
- Li, D., Chen, H., Mao, B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z., y cols. (2017). Microbial biogeography and core microbiota of the rat digestive tract. *Scientific Reports*, 7(1), 45840.
- Li, H., Ni, J., y Qing, H. (2021). Gut microbiota: critical controller and intervention target in brain aging and cognitive impairment. *Front Aging Neurosci*, 13.
- Li, S., Chen, T., Dong, S., Xiong, Y., Wei, H., y Xu, F. (2014). The effects of rebaudioside A on microbial diversity in mouse intestine. *Food Sci Technol Res*, 20(2), 459–467.
- Liu, R., Hong, J., Xu, X., Feng, Q., Zhang, D., Gu, Y., y cols. (2017). Gut microbiome and serum metabolome alterations in obesity and after weight-loss intervention. *Nature Medicine*, 23(7), 859-868.
- Lobach, A. R., Roberts, A., y Rowland, I. R. (2019). Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food Chem Toxicol*, 124, 385–399.
- Machate, D. J., Figueiredo, P. S., Marcelino, G., Guimarães, R. C. A., Hiane, P. A., Bogo, D., y cols. (2020). Fatty acid diets: regulation of gut microbiota composition and obesity and its related metabolic dysbiosis. *Int J Mol Sci*, 21(11).
- Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pessoa, S., Navarrete, P., y cols. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes ratio: a relevant marker of gut dysbiosis in obese patients? *Nutrients*, 12(5).
- Manichanh, C., Reeder, J., Gibert, P., Varela, E., Llopis, M., Antolin, M., y cols. (2010). Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake. *Genome Res*, 20(10), 1411-1419.
- Martyn, D., Darch, M., Roberts, A., Lee, H. Y., Yaqiong Tian, T., Kaburagi, N., y cols. (2018). Low-/no-calorie sweeteners: a review of global intakes. *Nutrients*, 10(3).
- Mowat, A. M., y Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14(10), 667-685.
- Murphy, E. A., Velazquez, K. T., y Herbert, K. M. (2015). Influence of high-fat diet on gut microbiota: a driving force for chronic disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 18(5), 515-520.
- Nagpal, R., Wang, S., Solberg Woods, L. C., Seshie, O., Chung, S. T., Shively, C. A., y cols. (2018). Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces. *Front Microbiol*, 9, 2897.
- Nettleton, J. A., Lutsey, P. L., Wang, Y., Lima, J. A., Michos, E. D., y Jacobs, D. R., Jr. (2009). Diet soda intake and risk of incident metabolic syndrome and type 2 diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*, 32(4), 688-694.



- Nettleton, J. E., Cho, N. A., Klancic, T., Nicolucci, A. C., Shearer, J., Borgland, S. L., y cols. (2020). Maternal low-dose aspartame and stevia consumption with an obesogenic diet alters metabolism, gut microbiota and mesolimbic reward system in rat dams and their offspring. *Gut*, 69(10), 1807-1817.
- Nettleton, J. E., Klancic, T., Schick, A., Choo, A. C., Shearer, J., Borgland, S. L., y cols. (2019). Low-dose stevia (rebaudioside A) consumption perturbs gut microbiota and the mesolimbic dopamine reward system. *Nutrients*, 11(6), 1248.
- Netto Candido, T. L., Bressan, J., y Alfenas, R. C. G. (2018). Dysbiosis and metabolic endotoxemia induced by high-fat diet. *Nutr Hosp*, 35(6), 1432–1440.
- Olivier-Van Stichelen, S., Rother, K. I., y Hanover, J. A. (2019). Maternal exposure to non-nutritive sweeteners impacts progeny's metabolism and microbiome. *Front Microbiol*, 10(1360).
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W., y Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front Cell Infect Microbiol*, 2.
- Padhi, P., Worth, C., Zenitsky, G., Jin, H., Sambamurti, K., Anantharam, V., y cols. (2022). Mechanistic insights into gut microbiome dysbiosis-mediated neuroimmune dysregulation and protein mis-folding and clearance in the pathogenesis of chronic neurodegenerative disorders. *Front Neurosci*, 16.
- Palmnas, M. S. A., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., y cols. (2014). Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS One*, 9(10), e109841.
- Parks, B. W., Nam, E., Org, E., Kostem, E., Norheim, F., Hui, S. T., y cols. (2013). Genetic control of obesity and gut microbiota composition in response to high-fat, high-sucrose diet in mice. *Cell Metab*, 17(1), 141-152.
- Pascale, A., Marchesi, N., Marelli, C., Coppola, A., Luzi, L., Govoni, S., y cols. (2018). Microbiota and metabolic diseases. *Endocrine*, 61(3), 357-371.
- Plaza-Díaz, J., Pastor-Villaescusa, B., Rueda-Robles, A., Abadia-Molina, F., y Ruiz-Ojeda, F. J. (2020). Plausible biological interactions of low- and non-calorie sweeteners with the intestinal microbiota: an update of recent studies. *Nutrients*, 12(4), 1153.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., y cols. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59.
- Ramos-García, M., Ble-Castillo, J. L., García-Vázquez, C., Tovilla-Zárate, C. A., Juárez-Rojop, I. E., Olvera-Hernández, V., y cols. (2021). Effects of non-nutritive sweeteners on energy intake, body weight and postprandial glycemia in healthy and with altered glycemic response rats. *Foods*, 10(5), 958.
- Rodríguez-Palacios, A., Harding, A., Menghini, P., Himmelman, C., Retuerto, M., Nickerson, K. P., y cols. (2018). The artificial sweetener splenda promotes gut proteobacteria, dysbiosis, and myeloperoxidase reactivity in crohn's disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis*, 24(5), 1005-1020.



- Rojas, E., Bermúdez, V., Motlaghzadeh, Y., Mathew, J., Fidilio, E., Faria, J., y cols. (2018). Stevia rebaudiana Bertoni and its effects in human disease: emphasizing its role in inflammation, atherosclerosis and metabolic syndrome. *Curr Nutr Rep*.
- Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C., Brito-Córdova, G., Gomez-Diaz, R., y Valdes, P. (2018). Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 108, 485-491.
- Romo-Romo, A., Almeda-Valdés, P., Brito-Córdova, G. X., y Gómez-Pérez, F. J. (2017). Prevalence of non-nutritive sweeteners consumption in a population of patients with diabetes in Mexico. *Gac Med Mex*, 153(1), 61-74.
- Rosales-Gomez, C. A., Martinez-Carrillo, B. E., Resendiz-Albor, A. A., Ramirez-Duran, N., Valdes-Ramos, R., Mondragon-Velasquez, T., y cols. (2018). Chronic consumption of sweeteners and its effect on glycaemia, cytokines, hormones, and lymphocytes of GALT in CD1 mice. *Biomed Res Int*, 2018, 1345282, Article 1345282.
- Rother, K. I., Conway, E. M., y Sylvestsky, A. C. (2018). How non-nutritive sweeteners influence hormones and health. *Trends Endocrinol Metab*, 29(7), 455-467.
- Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M. J., y Gil, A. (2019). Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trials. *Adv Nutr*, 10, S31-s48.
- Satokari, R. (2020). High intake of sugar and the balance between pro- and anti-inflammatory gut bacteria. *Nutrients*, 12(5).
- Schulz, M. D., Atay, Ç., Heringer, J., Romrig, F. K., Schwitalla, S., Aydin, B., y cols. (2014). High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity. *Nature*, 514(7523), 508-512.
- Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., y cols. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 18(1), 190-195.
- Singh, G., McBain, A. J., McLaughlin, J. T., y Stamataki, N. S. (2022). Consumption of the non-nutritive sweetener stevia for 12 weeks does not alter the composition of the gut microbiota. *bioRxiv*, 2022.2011.2017.516749.
- Singh, R. K., Chang, H.-W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K., y cols. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 15(1), 73.
- Sommer, F., y Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 11(4), 227-238.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., y cols. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514, 181-186.
- Tang, W., Meng, Z., Li, N., Liu, Y., Li, L., Chen, D., y cols. (2020). Roles of gut microbiota in the regulation of hippocampal plasticity, inflammation, and hippocampus-dependent behaviors. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 611014.
- Tang, W., Pan, L., Cheng, J., Wang, X., Zheng, L., Wang, S., y cols. (2022). High-fat-diet-induced gut microbiome changes in mice. *Stress and Brain*, 2(1-2), 17-30.



- Tate, D. F., Turner-McGrievy, G., Lyons, E., Stevens, J., Erickson, K., Polzien, K., y cols. (2012). Replacing caloric beverages with water or diet beverages for weight loss in adults: main results of the Choose Healthy Options Consciously Everyday (CHOICE) randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr*, 95(3), 555-563.
- Thomson, P., Santibañez, R., Aguirre, C., Galgani, J. E., y Garrido, D. (2019). Short-term impact of sucralose consumption on the metabolic response and gut microbiome of healthy adults. *Br J Nutr*, 1–7.
- Tremaroli, V., y Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242–249.
- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., y Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe*, 3(4), 213-223.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., y Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444, 1027.
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., y Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*, 1(6), 6ra14.
- Uebanso, T., Ohnishi, A., Kitayama, R., Yoshimoto, A., Nakahashi, M., Shimohata, T., y cols. (2017). Effects of low-dose non-caloric sweetener consumption on gut microbiota in mice. *Nutrients*, 9(6).
- USDA. (2012). *Sugar and sweeteners outlook: November 2021*. <https://www.ers.usda.gov/publications/pub-details/?pubid=102583>
- Wang, B., Kong, Q., Li, X., Zhao, J., Zhang, H., Chen, W., y cols. (2020). A high-fat diet increases gut microbiota biodiversity and energy expenditure due to nutrient difference. *Nutrients*, 12(10), 3197.
- Wang, Q.-P., Browman, D., Herzog, H., y Neely, G. G. (2018). Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS One*, 13(7).
- Wang, W., Nettleton, J. E., Gänzle, M. G., y Reimer, R. A. (2022). A metagenomics investigation of intergenerational effects of non-nutritive sweeteners on gut microbiome. *Front Nutr*, 8, 795848.
- Woting, A., y Blaut, M. (2016). The intestinal microbiota in metabolic disease. *Nutrients*, 8(4), 202.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., y cols. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112(12), 1821-1830.
- Yajima, M., Nakayama, M., Hatano, S., Yamazaki, K., Aoyama, Y., Yajima, T., y cols. (2001). Bacterial translocation in neonatal rats: the relation between intestinal flora, translocated bacteria, and influence of milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 33(5), 592-601.
- Zhang, C., Zhang, M., Pang, X., Zhao, Y., Wang, L., y Zhao, L. (2012). Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. *Isme j*, 6(10), 1848-1857.



- Zhang, M., Chen, J., Yang, M., Qian, C., Liu, Y., Qi, Y., y cols. (2021). Low doses of sucralose alter fecal microbiota in high-fat diet-induced obese rats. *Front Nutr*, 8.
- Zheng, Z., Xiao, Y., Ma, L., Lyu, W., Peng, H., Wang, X., y cols. (2022). Low dose of sucralose alter gut microbiome in mice. *Front Nutr*, 9.
- Zhu, Q., Zhu, Y., Liu, Y., Tao, Y., Lin, Y., Lai, S., y cols. (2022). Moderation of gut microbiota and bile acid metabolism by chlorogenic acid improves high-fructose-induced salt-sensitive hypertension in mice. *Food Funct*, 13(13), 6987-6999.
- Zmora, N., Suez, J., y Elinav, E. (2019). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(1), 35–56.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



ANEXOS

Anexo 1: Protocolo para la extracción de ADN

QIAamp® Fast DNA Stool Mini kit QIAGEN (Hilden, GE)

Cat. No. 51604

Puntos importantes antes de comenzar:

- Preparar un baño maría a 70°C para su uso en el paso 7.
- Disolver cualquier precipitado en el Buffer AL y el Buffer InhibitEX incubando a 37-70°C.
- Añadir etanol a los concentrados Buffer AW1 y Buffer AW2.
- Mezclar todos los buffers antes de usar.

Procedimiento:

1. Pesar 180–220 mg de heces en un tubo de microcentrífuga de 2 ml (no incluido) y colocar el tubo en hielo.
2. Agregar 1 ml de buffer InhibitEX a cada muestra de heces. Agitar en el vórtex continuamente durante 1 minuto o hasta que la muestra de heces esté completamente homogeneizada.
3. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 1 minuto para sedimentar las partículas de materia fecal.

NOTA: No transferir ningún material sólido. Si las partículas aún son visibles en el sobrenadante, vuelva a centrifugar.



4. Pipetear 25 μ l de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (no incluido).
5. Pipetear 600 μ l de sobrenadante del paso 3 en el tubo de microcentrífuga de 2 ml que contiene proteinasa K.
6. Añadir 600 μ l de buffer AL y agitar en el vórtex durante 15 s.

NOTA: No agregar proteinasa K directamente al Buffer AL. Es fundamental que la muestra y el tampón AL sea mezclado a fondo para formar una solución homogénea

7. Incubar a 70 ° C durante 10 min.
8. Añadir 600 μ l de etanol (96–100%) al lisado y mezclar con vórtex.

NOTA: Centrifugar brevemente para eliminar las gotas del interior de la tapa del tubo (opcional).

9. Pipetear con cuidado 600 μ l de lisado del paso 8 a la columna de centrifugación QIAamp.

NOTA: Cerrar la tapa y centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y desechar el tubo que contiene el filtrado.

10. Repetir el paso 9 hasta que se haya cargado todo el lisado en la columna (3X aproximadamente debe realizarse este paso).

NOTA: Cerrar cada columna de centrifugado para evitar la formación de aerosoles durante la centrifugación. Si el lisado no ha pasado completamente a través de la columna después de la centrifugación, vuelva a centrifugar hasta que la columna de centrifugación QIAamp esté vacía.



11. Abrir con cuidado la columna de centrifugado QIAamp y añadir 500 µl de buffer AW1.

NOTA: Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min. Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.

12. Abrir con cuidado la columna de centrifugado QIAamp y añadir 500 µl de buffer AW2. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 min. Deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.

13. Colocar la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recolección nuevo de 2 ml (no incluido) y desechar el tubo de recolección antiguo con el filtrado. Centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.

NOTA: Este paso ayuda a eliminar la posibilidad de un posible arrastre de Buffer AW2.

14. Transferir la columna de centrifugación QIAamp a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml etiquetado (no incluido) y pipetear 100 µl de buffer ATE directamente sobre la membrana QIAamp en dos partes (50/50 µL por separado). Incubar durante 1 min a temperatura ambiente, luego centrifugar a máxima velocidad durante 1 min para eluir el ADN (Este paso repetirlo en cada ocasión).

NOTA: Si el rendimiento se va a cuantificar por absorbancia UV, poner en blanco el dispositivo de medición con Tampón ATE para evitar resultados falsos. Almacenar el eluido a -20°C .








PUBLICACIONES

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Article

Effects of Non-Nutritive Sweeteners on Energy Intake, Body Weight and Postprandial Glycemia in Healthy and with Altered Glycemic Response Rats

Meztli Ramos-García¹, Jorge Luis Ble-Castillo^{1,*} , Carlos García-Vázquez¹ , Carlos Alfonso Tovilla-Zárate² , Isela Esther Juárez-Rojop¹, Viridiana Olvera-Hernández¹, Alma Delia Genis-Mendoza³, Rubén Córdova-Uscanga¹, Carlos Alfonso Álvarez-González⁴  and Juan Cuauhtémoc Díaz-Zagoya⁵ 

¹ Centro de Investigación, División Académica de Ciencias de la Salud (DACS), Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Villahermosa 86150, Mexico; meztli.garcia@hotmail.com (M.R.-G.); gbasescs@hotmail.com (C.G.-V.); iselajuarezrojop@hotmail.com (I.E.J.-R.); viryolvera11@gmail.com (V.O.-H.); cordova.1@live.com.mx (R.C.-U.)

² División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, UJAT, Comalcalco 86650, Mexico; alfonso_tovillaz@yahoo.com.mx

³ Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de Mexico 14610, Mexico; adgenis@inmegen.gob.mx

⁴ División Académica de Ciencias Biológicas (Dacbiol), UJAT, Villahermosa 86150, Mexico; alvarez_alfonso@hotmail.com

⁵ División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de Mexico (UNAM), Ciudad de Mexico 04360, Mexico; zagoya@unam.mx

* Correspondence: jblecastillo@hotmail.com; Tel.: +52-993-173-5353



Citation: Ramos-García, M.; Ble-Castillo, J.L.; García-Vázquez, C.; Tovilla-Zárate, C.A.; Juárez-Rojop, I.E.; Olvera-Hernández, V.; Genis-Mendoza, A.D.; Córdova-Uscanga, R.; Álvarez-González, C.A.; Díaz-Zagoya, J.C. Effects of Non-Nutritive Sweeteners on Energy Intake, Body Weight and Postprandial Glycemia in Healthy and with Altered Glycemic Response Rats. *Foods* **2021**, *10*, 958. <https://doi.org/10.3390/foods10050958>

Academic Editor: Nicolò Merendino

Received: 11 March 2021

Accepted: 23 April 2021

Published: 28 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of non-nutritive sweeteners (NNS) consumption on energy intake, body weight and postprandial glycemia in healthy and with altered glycemic response rats. Animals on normal diet (ND) or high-fat diet (HFD) were divided to receive NNS (sucralose, aspartame, stevia, rebaudioside A) or nutritive sweeteners (glucose, sucrose) for 8 weeks. The NNS were administered at doses equivalent to the human acceptable daily intake (ADI). A test using rapidly digestible starch was performed before and after treatments to estimate glycemic response. No effects of NNS consumption were observed on energy intake or body weight. Sucrose provoked an increased fluid consumption, however, energy intake, and weight gain were not altered. In ND, no effects of NNS on glycemic response were observed. In HFD, the glycemic response was increased after sucralose and stevia when only the final tolerance test was considered, however, after including the baseline test, these results were no longer significant compared to glucose. These findings provide further evidence suggesting that at the recommended doses, NNS do not alter feeding behavior, body weight or glycemic tolerance in healthy and with altered glycemic rats.

Keywords: appetite; aspartame; energy metabolism; stevia; sucralose; rebaudioside A

1. Introduction

The overconsumption of energy-dense foods, rich in sugar, has contributed to the rapid increase of metabolic disorders [1]. Non-nutritive sweeteners (NNS) are food additives with the advantage of providing high potency in sweetness but with few or no caloric content [2]. Worldwide NNS consumption has increased and Mexico exhibits a high proportion of nutritional products containing NNS [3]. The three most popular NNS are sucralose, aspartame and stevia; the first two being from synthetic origin (artificial) and the latter from natural sources [4,5].

Although NNS were developed to help control caloric intake, body weight, or glycemia concentrations in people with high risk for developing type 2 diabetes (T2DM) or already with diabetes [6], evidence has revealed that these additives may disturb glucose homeostasis and feeding behavior in animal models and humans [7]. Some of the proposed

mechanisms to explain how these additives can provoke these alterations include the degradation of the ability to induce reward response in the central nervous system compared to sugar-sweetened foods or beverages, the alteration of incretin and insulin secretion, the upregulation of pro-inflammatory and adipogenesis promoting pathways and the gut microbiota disturbance [8,9].

The results regarding the effects of NNS on caloric consumption and weight gain have been mixed. While some indicate NNS may be beneficial [10,11], others report body weight gain [12]. In this line, the effects of NNS on glycemic response are also controversial. Some studies have found harmful effects. Pepino et al. found that sucralose induced an increase in glycemic and insulin responses in people with obesity [13]. Suez et al. showed that NNS induced glucose intolerance in rodents and humans [14]. In a more recent study, Romo-Romo et al. showed that a moderate consumption of sucralose (15% of ADI) for only 14 days induced a reduction on insulin sensitivity in healthy subjects [15]. These studies are in contrast with others who have reported no effects. Higgins et al. found that high doses of aspartame for 12 weeks, did not affect glycemia and body weight in lean adults [16]. A different study showed that the consumption of carbonated beverages with aspartame and ace-k for 12 weeks had no effect on insulin sensitivity in non-diabetic subjects [17].

Animal models have been used to investigate NNS effects because of the advantages of better control in the administered doses and a shorter treatment period. It is known that many foods of daily use for humans have a high NNS content which makes difficult to regulate the amount ingested. In addition, a common limitation of previous studies is the use of high NNS doses; in some cases, far beyond the currently established FDA-approved acceptable daily intake (ADI) in humans which may reduce the relevance of their findings [18,19]. Here, we used NNS doses from natural and artificial sources adjusted by daily fluid and body weight to be equivalent to the ADI. Although these doses could seem low for animal models, we consider them to be adequate for mimicking real-life human conditions. For comparison, the FDA estimates the ADI equivalents to be 75 tabletop sweetener packets (TSP) or 18–19 cans (1 can = 12 oz, or 355 mL) of diet cola for aspartame, 23 TSP or 6 cans of diet cola for sucralose and 9 TSP for stevia [20,21], which typically surpass the daily ordinary consumption in the general population. Regarding the period of intervention, the 8 weeks of NNS treatment chosen for the animals in the present study correspond to approximately 4.7 years of life in humans [22].

On the other hand, the conclusions about the effects on glycemic response have been usually based only on outcomes from an oral glucose tolerance test (OGTT) performed at the end of the intervention period administering oral pure glucose to the animals. Here, the glycemic responses were evaluated by an oral starch tolerance test (OSTT) carried out both at the end and at the beginning of the experiment. This latter test was performed administering rapidly digestible starch which provides quick rises in postprandial glycemia and could offer lower variability compared to the OGTT [23,24]. The baseline tolerance test allowed us to determine whether the post-test adjusted for pre-test scores differed between treatments. We hypothesized that the chronic consumption of NNS at doses equivalent to ADI would lead to an increased energy intake, weight gain and impaired glucose tolerance in healthy and with altered glycemic response rats.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals

Adult male Wistar rats weighing 150–200 g (6 to 8 weeks old) were provided by the Faculty of Medicine of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) and housed in polycarbonate cages (four per cage) at controlled temperature (18 °C to 26 °C), ventilation cycles (12 to 15 air changes per hour), relative humidity (45% to 60%), and 12/12 h light/dark cycles (7:00 h to 19:00 h). The experimental procedures were managed according to the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999 and the guidelines established by the Research Committee for the Care and Use of Laboratory Animals of the UNAM. The study protocol was approved by the Investigation Committee of the Academic

Division of Health Sciences, Juarez Autonomous University of Tabasco (Approval No. 002/CIP/DACS).

2.2. Diets

Normal diet (ND) consisted in standardized LabDiet Rodent[®] 5001 chow (28.67% protein, 57.94% carbohydrate, 13.38% fat; 3.36 kcal/g), and pure water. High-fat diet (HFD) was daily prepared mixing standard diet with lard in pellets (4.6 kcal/g of energy, 26.7% carbohydrates, 13.2% proteins and 60.0% fat). High caloric diet (HCD) consisted of high-fat diet pellets (HFD) along with a 30% sucrose solution (1.2 kcal/mL). Previously to each study phase, animals underwent a one-week acclimation period receiving ND and pure water, except for the SUC30-treated rats which remained on 30% sucrose solution during the second acclimation period. All animals had access to food and fluid ad libitum during the experimental period.

2.3. Sweeteners

Commercially available sweeteners were used; sucralose from Sweeny[®] plus (1.3% sucralose, 98.7% glucose), aspartame from Selecto Brand[®] (4% aspartame, 96% glucose), and stevia from Selecto Brand[®] (3% stevia, 97% glucose). Rebaudioside A (reb A) was purchased from Anhui Minmetals, Hefei, China (98% purity). Glucose from Roquette corporation[®] ($\geq 91\%$ purity) and sucrose from Zulka[®] ($\geq 98\%$ purity) were used. They were dissolved in pure water and presented to rats at room temperature.

2.4. Study Design

2.4.1. Phase 1: Altered Glycemia Induction

One hundred and twelve male Wistar rats were divided into two dietary groups: one was given ND ($n = 48$) and the other one was supplied with HCD ($n = 64$) for 8 weeks (Figure 1). At the end of this period (day 56), an oral starch tolerance test (OSTT) was performed to all the animals to estimate the glycemic response.

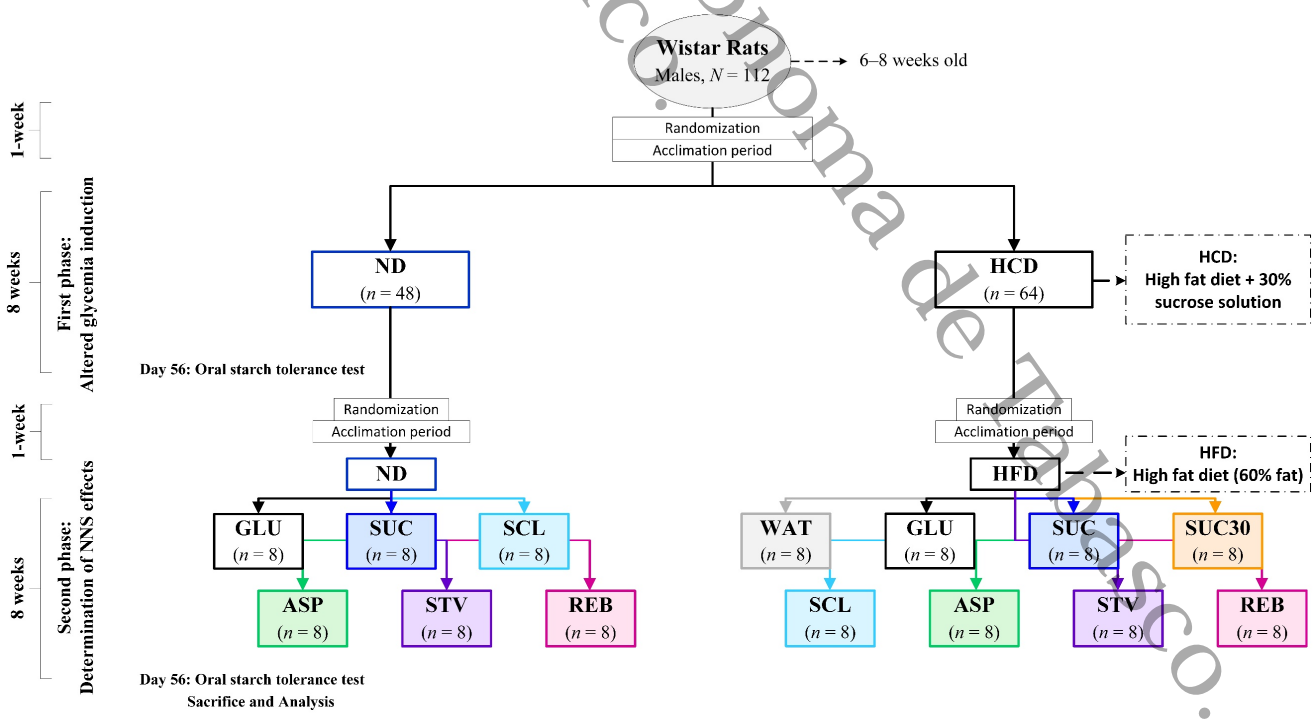


Figure 1. Schematic diagram of the experimental design.

2.4.2. Phase 2: Determination of NNS Effects

On day 58, animals were randomly assigned to receive the different NNS treatments (Figure 1). ND was subdivided into six groups ($n = 8$) to receive for 8 weeks: 4% glucose (GLU), 4% sucrose (SUC), sucralose (5 mg/kg body weight (BW)/d) (SCL), aspartame (50 mg/kg BW/d) (ASP), stevia (4 mg/kg BW/d) (STV), and reb A (4 mg/kg BW/d) (REB). The HFD-fed rats were subdivided into eight groups; in addition of GLU, SUC, SCL, ASP, STV and REB mentioned above for ND, two more groups were considered: 30% sucrose (SUC30) and pure water (WAT) for 8 weeks. All the NNS treatments were administered in drinking water.

The administered doses of commercial NNS were equivalent to the ADI [25]. The concentration was adjusted daily to provide the desired dose to each animal based on the average of daily fluid consumption per day and BW using an Excel fact sheet. For the majority of the experimental period, the required doses were reached, except for the first two weeks where a modest variation was observed (see Supplementary Material, Figure S1). To control the high glucose content in the commercial sweeteners, a 4% glucose solution (GLU) was introduced as a primary control group. Glucose concentrations were adjusted to 4% in all the NNS groups (SCL, ASP, STV, REB). The quantity of pure glucose added to each NNS solution was daily calculated using an Excel fact sheet according to the next formula: Added glucose in g = [(40 g of glucose) – (glucose contained in NNS expressed in g)] / 1 L of solution. This procedure allowed maintaining the same glucose concentration per mL despite changes in daily NNS consumption. The SUC, SUC30 and WAT groups served as secondary comparators. All animals were assigned to the different treatments by stratified randomization using a computer-based online random number generator (www.random.org, accessed on 5 February 2021) according to the baseline body weights.

2.5. Measurements of Food Consumption, Total Energy Intake and Body Weight

In both ND and HCD in the first phase or HFD-fed rats in the second phase, the control of food intake and fluid consumption was conducted daily by subtracting the remaining amount from the supplied one. All the drinking solutions were prepared daily throughout the study. Moreover, data from NNS fluid consumption were captured per day/cage and adjusted to the desired dose (1 ADI) per day, using an Excel fact sheet. The rats were weighed twice a week at the same time in the morning using an electronic precision balance (Precision BJ 2200C). Weekly energy intake was calculated by the sum of consumed calories from pellets and fluid per cage with four animals, adjusted by the total BW of the animals and expressed as kcal/week/100 g BW per group, as previously has been reported [26,27].

2.6. Oral Starch Tolerance Test (OSTT)

Before and after NNS treatments, OSTTs were performed in all the animals to estimate the glycemic response. After 12 h of fasting, rats received a dose of 3 g/kg BW of Amioca® (100% rapidly digestible starch; Ingredion, Mexico S.A. de C.V., Ags, Mexico) dissolved in 2 mL of water and administered by gavage. Blood samples were obtained via the tail vein puncture, before (time 0) and 30, 60, 90 and 120 min after starch administration for glucose determination using a FreeStyle Optium Neo glucometer from Abbott Laboratories.

2.7. Biochemical Measurements

At the end of the 8-week treatment period, animals were fasted overnight and anesthetized with a low dose of sodium pentobarbital (35 mg/kg/BW, i.p. PiSA®). Blood samples were collected via cardiac puncture through the chest wall. Serum was separated in duplicate and preserved at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further analysis. The determinations of glucose, triglycerides, cholesterol, and HDL-cholesterol were performed using the A25 Clinical Chemistry Autoanalyzer System (BioSystems® Reagents & Instruments S.A, Antioquia, Colombia). Plasma insulin levels were determined using a rat/mouse insulin ELISA kit from Millipore (EZRMI-13K, St. Louis, MO, USA) according to the instructions of the manufacturer. Insulin resistance was estimated according to the Homeostasis Model Assessment

(HOMA-IR) which was calculated by the product of the fasting concentrations of glucose (mg/dL) and insulin ($\mu\text{U}/\text{mL}$) divided by 405 [28].

2.8. Statistical Analysis

The D'Agostino-Pearson normality test was performed to assess if the data exhibited a Gaussian distribution. Data on body weight evolution, and total energy intake through time during the first phase were analyzed by two-way repeated measures (RM) ANOVA and Sidak's multiple comparisons test.

Weekly measures of fluid intake, food consumption, energy intake and body weight during the second phase (NNS treatments) were also analyzed by two-way RM ANOVA or mixed-effects model and Dunnett post hoc test, considering treatment as the between-group factor and time as the within-group factor. Data from total weight gain during NNS treatment were compared using a one-factor ANOVA and Dunnett's post hoc test. To estimate differences between treatments from the final OSTT curve a one-way ANOVA and a Dunnett's post hoc test was performed using the incremental glycemia area under curve (iAUC) values from glycemia changes from baseline (Δ glycemia). However, a posterior ANCOVA analysis was performed to investigate if the differences between treatments remained after controlling for the baseline glycemia iAUC values. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. Data were processed and analyzed using GraphPad Prism Software version 7.0 (San Diego, CA, USA) or IBM SPSS Statistics version 26.0 (Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Phase 1: Altered Glycemic Response Induction

All the animals presented similar body weight at the beginning of the treatment. The food intake was lower in the HCD group compared to the ND (50.77 ± 1.12 vs. 90.33 ± 1.55 g/kg BW/d, $p < 0.0001$). Similarly, the fluid intake was lower in the HCD group (98.95 ± 4.10 vs. 206.1 ± 7.42 mL/kg BW/d, $p < 0.0001$). Despite the lower consumption, HCD exhibited a higher total energy intake compared to the ND ($F = 7.902$, $p = 0.0102$ for treatment; $F = 1.168$, $p = 0.3211$ for time \times treatment interaction and $F = 31.25$, $p < 0.0001$ for time factor) (Figure 2A), yet the weekly body weight evolution in the HCD was lower than the ND ($F = 12.79$, $p = 0.0005$ for treatment, $F = 14.19$, $p < 0.0001$ for time \times treatment interaction and $F = 1154$, $p < 0.0001$ for time) (Figure 2B). At the end of week 8, the final body weight was lower in the HCD than in the ND (339.4 ± 6.806 g vs. 376.5 ± 5.712 g, $p < 0.001$). The glycemic response was higher after HCD than after ND ($F = 17.76$, $p < 0.0001$ for treatment factor; $F = 4.862$, $p < 0.0001$ for time \times treatment interaction and $F = 422.8$, $p < 0.0001$ for time factor) (Figure 2C).

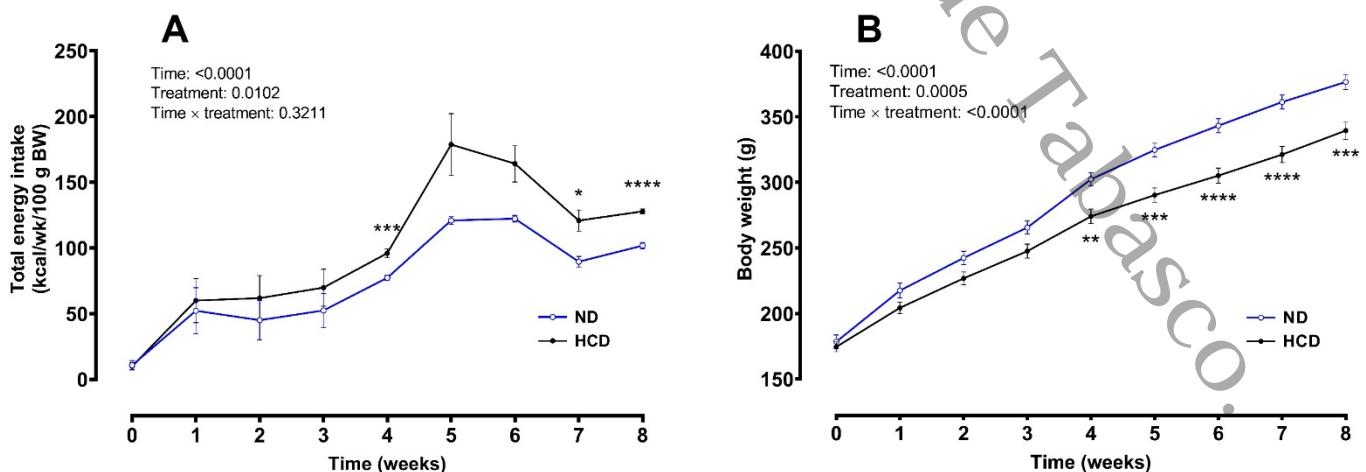


Figure 2. Cont.

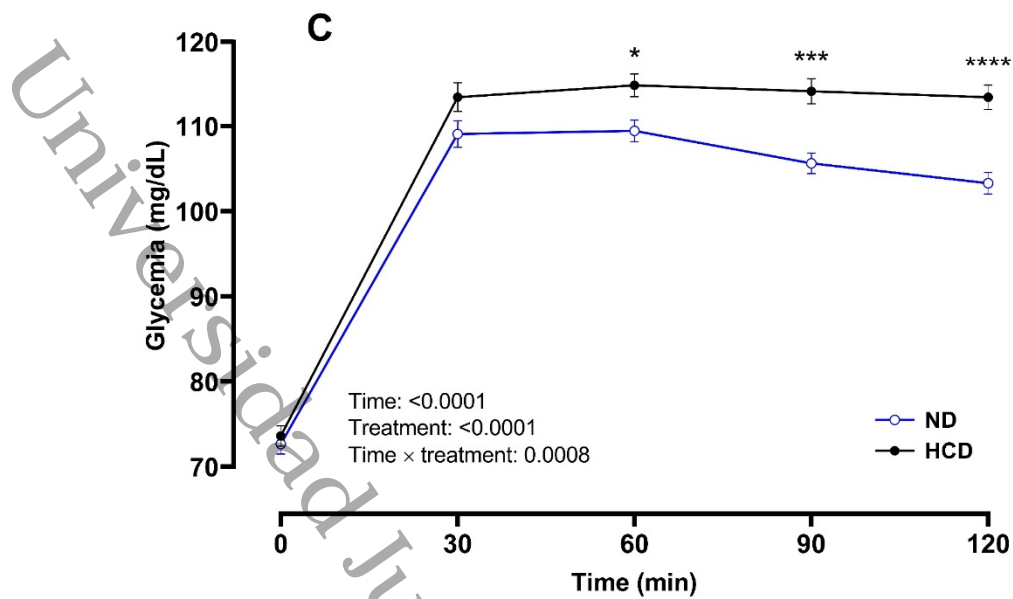


Figure 2. Total energy intake dynamics (A) and body weight evolution (B) over eight weeks on normal diet (ND) or high-caloric diet (HCD), and glycemic profiles (C) during an oral starch tolerance test (OSTT) at the end of the interventions (phase 1). Data are expressed as mean \pm SEM. ND ($n = 50$) and HCD ($n = 68$), Two-way RM ANOVA followed by Sidak’s post hoc test was used. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

3.2. Phase 2: Effects of NNS

3.2.1. Effects of NNS on Energy Intake and Body Weight

Data on energy intake from food analyzed by two-way RM ANOVA showed a significant difference in the interaction between time and treatments ($p = 0.0316$) and in the time effect ($p < 0.0001$) but only a trend in the treatment effect ($p = 0.0602$). These differences could be attributed to the lower food consumption in the SUC group in comparison with the other treatments (Figure 3A). The SUC group exhibited a temporal increased fluid consumption compared to the other groups. Analysis of data revealed significant treatment effect ($F = 7.076, p = 0.0168$), a significant interaction time \times treatment ($F = 3.760, p < 0.0001$) and time factor ($F = 161.7, p < 0.0001$) (Figure 3B). The effect of the treatments on the total energy intake was similar among groups ($F = 1.430, p = 0.3348$) and no significant interaction between time and treatment was observed ($F = 1.410, p = 0.1268$) (Figure 3C).

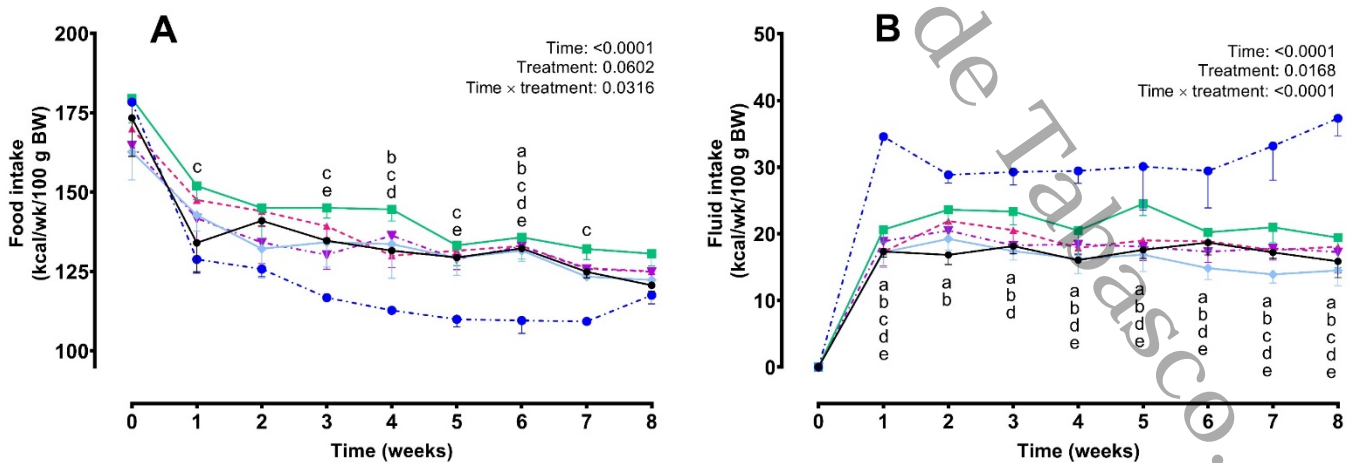


Figure 3. Cont.

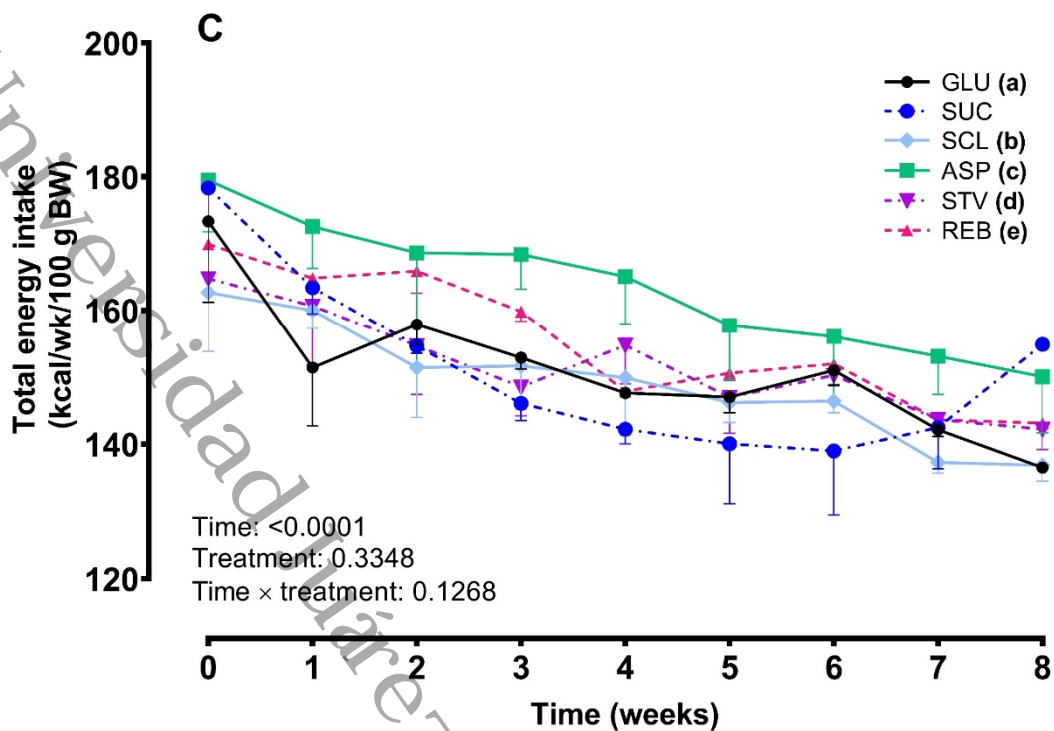


Figure 3. Effects of NNS on food intake (A), fluid intake (B) and total energy intake (C) in the ND-treated group throughout 8 weeks of treatment (phase 2). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n = 6\text{--}8$ animals per group). Two-way RM ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used. Different lowercase letters in each time point indicate significant differences between the sucrose group (SUC) and other groups: (a) GLU, glucose; (b) SCL, sucralose; (c) ASP, aspartame; (d) STV, stevia; (e) REB, reb A ($p < 0.05$).

In the HFD-fed rats, no differences were observed between NNS and GLU (control), moreover, in contrast with the ND results, no reduction of the weekly food intake was observed after SUC consumption. Data analysis showed no significant differences among treatments ($F = 0.3806$, $p = 0.8897$) or in the interaction time \times treatment ($F = 0.6175$, $p = 0.9665$) (Figure 4A). Regarding fluid intake, data analysis showed differences between treatments ($F = 132.1$, $p < 0.0001$, for treatment effect; $F = 3.713$, $p < 0.0001$ for the interaction time \times treatment). As expected, rats on SUC30 consumed higher calories from fluids than any other treatment ($p < 0.0001$) and the fluid in the WAT-treated group did not contribute any calories. In addition, similar to outcomes from the ND group, in the HFD, an increased fluid consumption was observed in the SUC group from the week 1 until week 8 when compared to the other groups (Figure 4B). On the other hand, the total weekly energy intake profile was not different among treatments (Figure 4C) ($F = 1.678$, $p = 0.2416$ for treatment; $F = 0.5768$, $p = 0.9815$ for the interaction time \times treatment).

In the ND-fed rats, there were no significant differences among groups in weekly body weight evolution throughout the NNS treatments ($F = 0.8079$, $p = 0.1446$ for treatment, $F = 0.8117$, $p = 0.7863$ for the interaction between time and treatment) (Figure 5A). None of the data on total weight gain showed differences among groups ($F = 0.5993$, $p = 0.7006$) (Figure 5B). Likewise, in HFD, treatments did not modify weight gain ($F = 0.5302$, $p = 0.8079$ for treatment; $F = 0.8666$, $p = 0.7409$ for the interaction between time and treatment) (Figure 5C). Moreover, no statistical significance was observed in the total weight gain among the groups on HFD ($F = 1.235$, $p = 0.3018$).

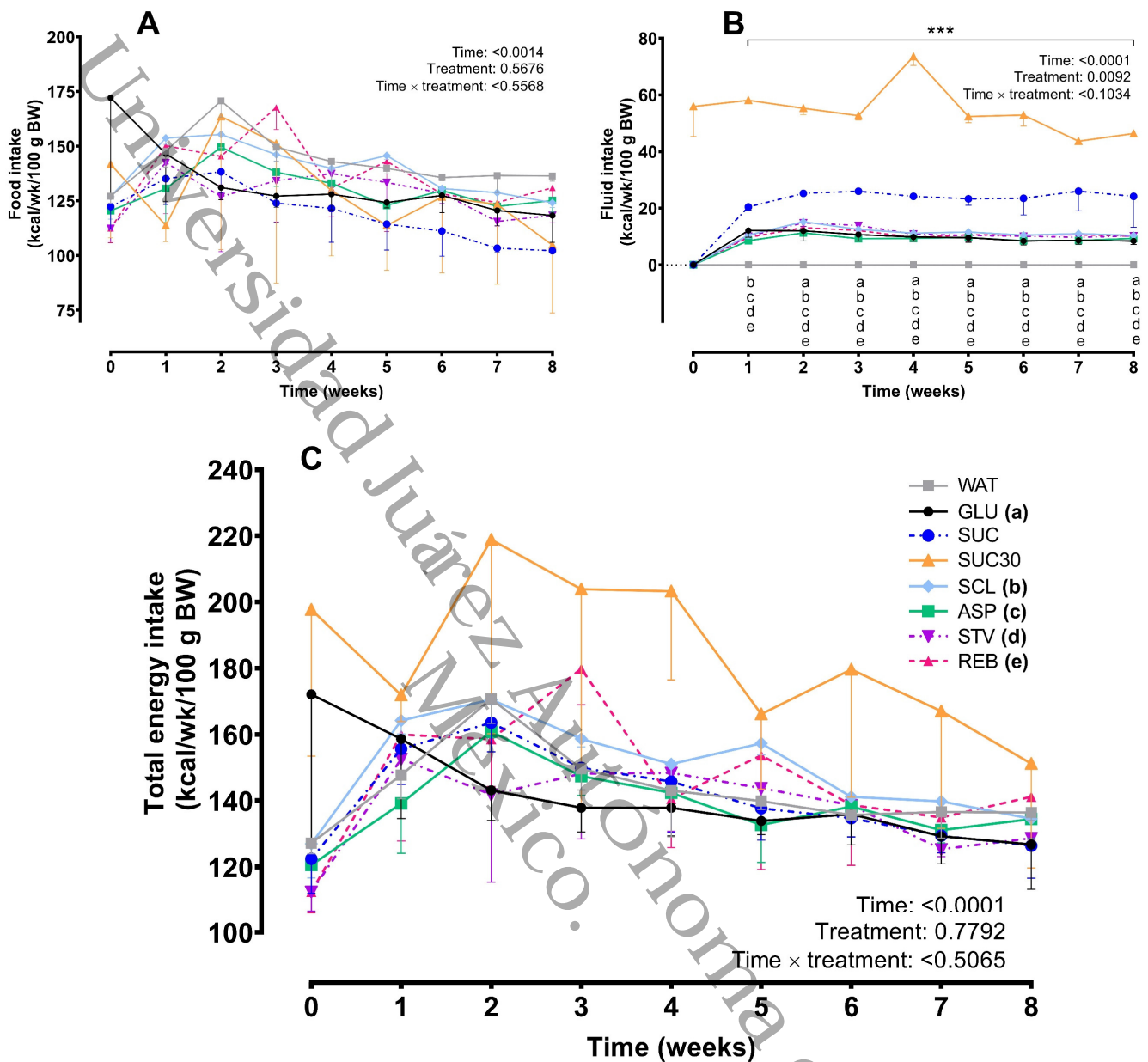


Figure 4. Effects of NNS on food intake (A), fluid intake (B), and total energy intake (C) in the HFD group throughout 8 weeks of treatment (phase 2). Data are expressed as mean ± SEM. (*n* = 6–8 animals per group). Two-way RM ANOVA followed by Tukey’s post hoc test was used. Asterisks indicate significant differences in the 30% sucrose-treated group (SUC30) vs. each other group at *** *p* < 0.0001. Different lowercase letters in each time point indicate significant differences in the sucrose group (SUC) vs. each other group: (a) GLU, glucose; (b) SCL, sucralose; (c) ASP, aspartame; (d) STV, stevia; (e) REB, reb A (*p* < 0.05). Fluid in the water-treated group (WAT) did not contribute calories.

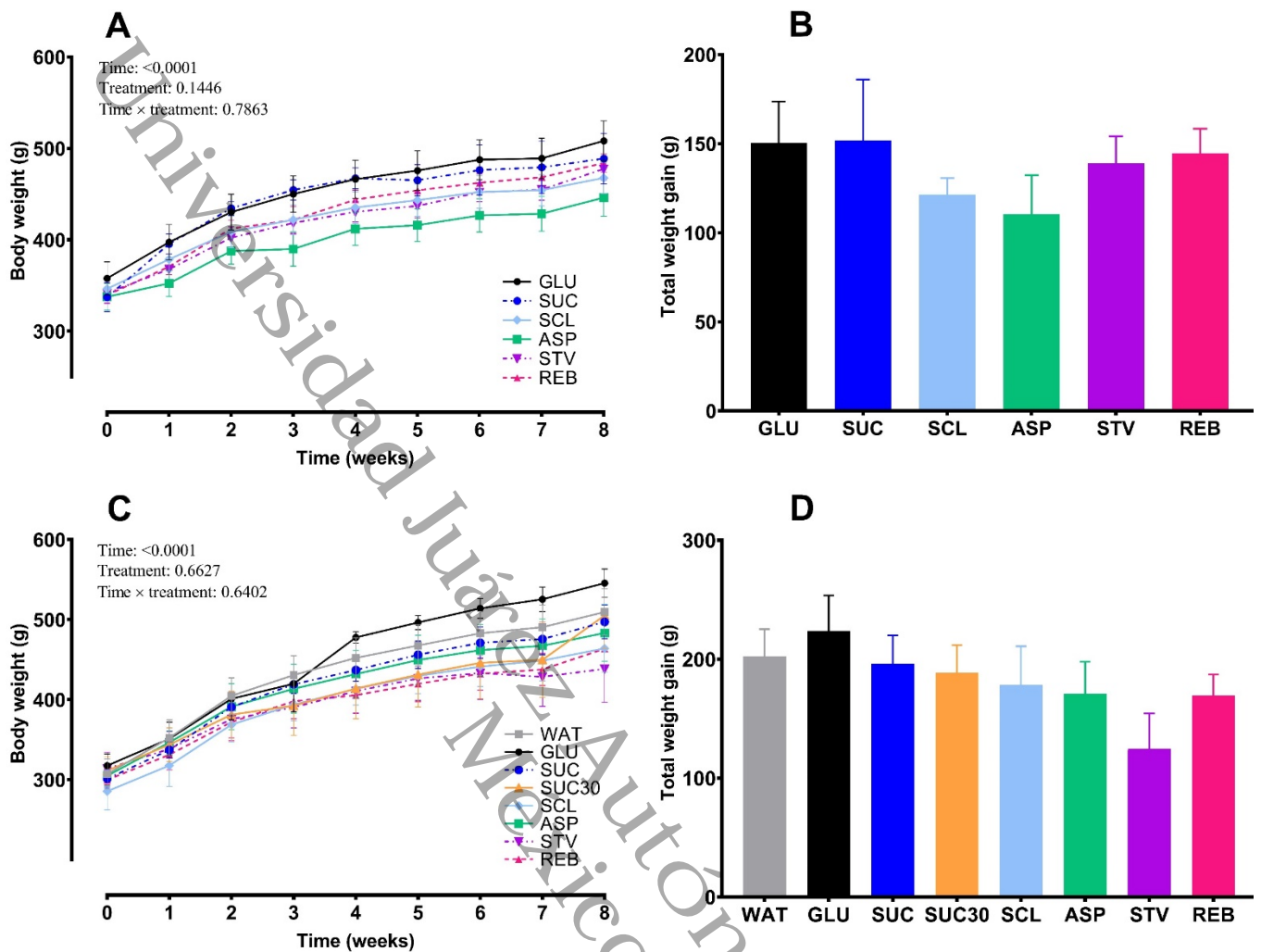


Figure 5. Effects of NNS on weekly body weight throughout 8 weeks of treatment and total weight gain in the ND group (A,B) and in the HFD group (C,D) (phase 2). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n = 6\text{--}8$ animals per group). No significant differences among groups were observed after ANOVA on body weight evolution or total weight gain in ND and HFD. WAT, water; GLU, glucose; SUC, sucrose; SUC30, 30% sucrose; SCL, sucralose; ASP, aspartame; STV, stevia; REB, reb A.

3.2.2. Effects of NNS on Glycemic Response

From the final OSTT data, the ND group showed no effects of NNS on glycemic profile, however, the SUC glycemia iAUC value was lower in comparison with GLU glycemia iAUC ($p = 0.001$) (Figure 6A,B) and this effect remained even after further testing using the ANCOVA analysis (Figure 7A). In the HFD group, SUC, SUC30, SCL and STV exhibited higher iAUC values respect to GLU ($p < 0.05$) (Figure 6C,D). However, when ANCOVA analysis was performed using the final glycemia AUC as the primary outcome, and the baseline glycemia AUC as a covariate, the NNS effects were removed, even though, SUC and SUC30 groups remained elevated compared to GLU ($p < 0.05$) (Figure 7B). The glycemic profiles before and after the interventions for each sweetener are provided in Supplementary Material, Figures S2 and S3.

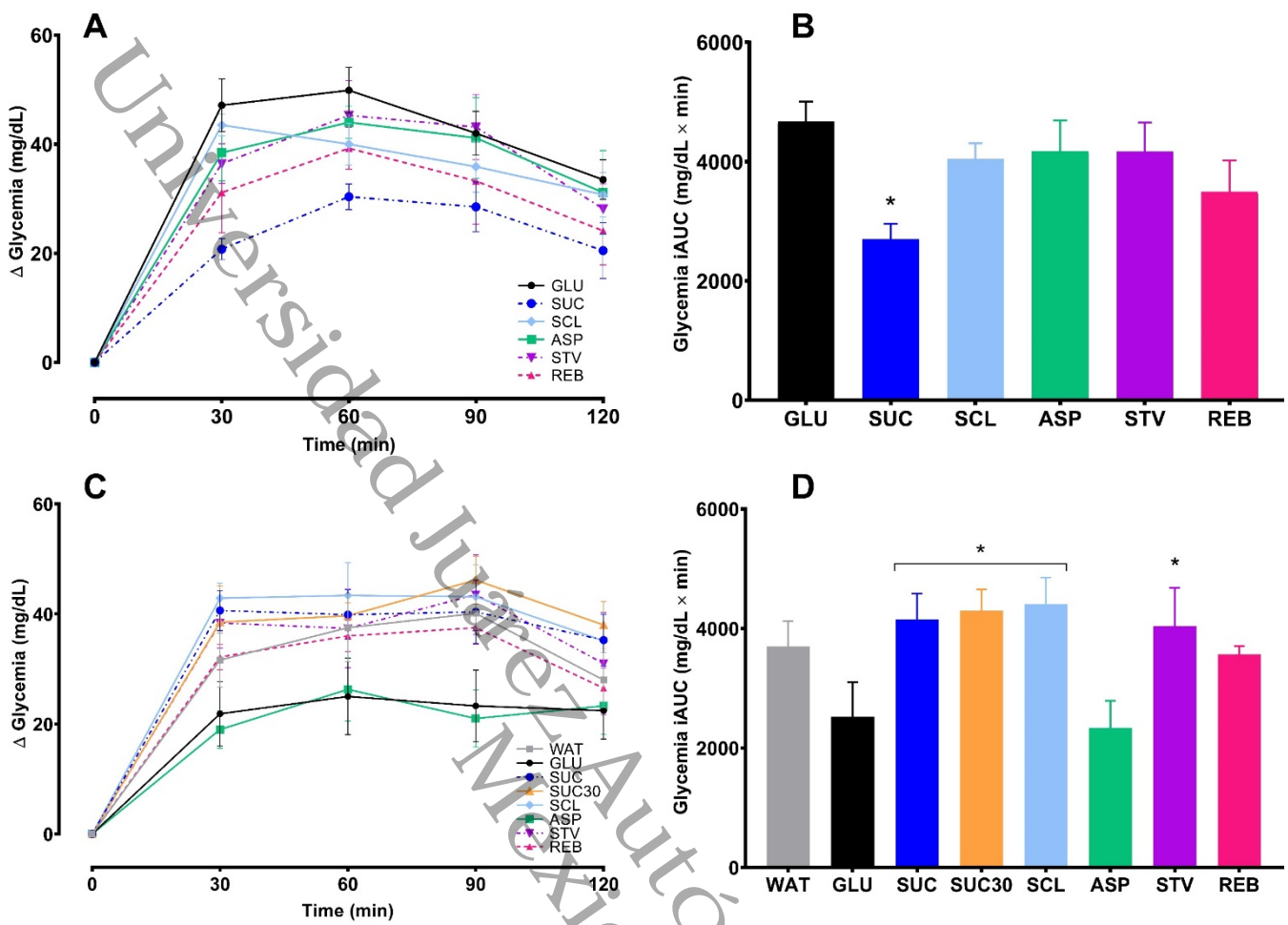


Figure 6. Effects of NNS on glycemic response expressed as change from baseline (Δ glycemia) and incremental area under curves (iAUC), during an oral starch tolerance test (OST) over 120 min performed after 12 h of fasting at the end of interventions in ND (A,B) and HFD-treated group (C,D). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n = 6-8$ per group). One-way ANOVA and Dunnett’s post hoc test showed a reduced glycemia iAUC in SUC respect to GLU in the ND group ($* p < 0.05$) and in HFD, an increased glycemia iAUC in SCL, STV, SUC and SUC30 compared to GLU ($* p < 0.05$). WAT, water; GLU, glucose; SUC, sucrose; SUC30, 30% sucrose; SCL, sucralose; ASP, aspartame; STV, stevia; REB, reb A.

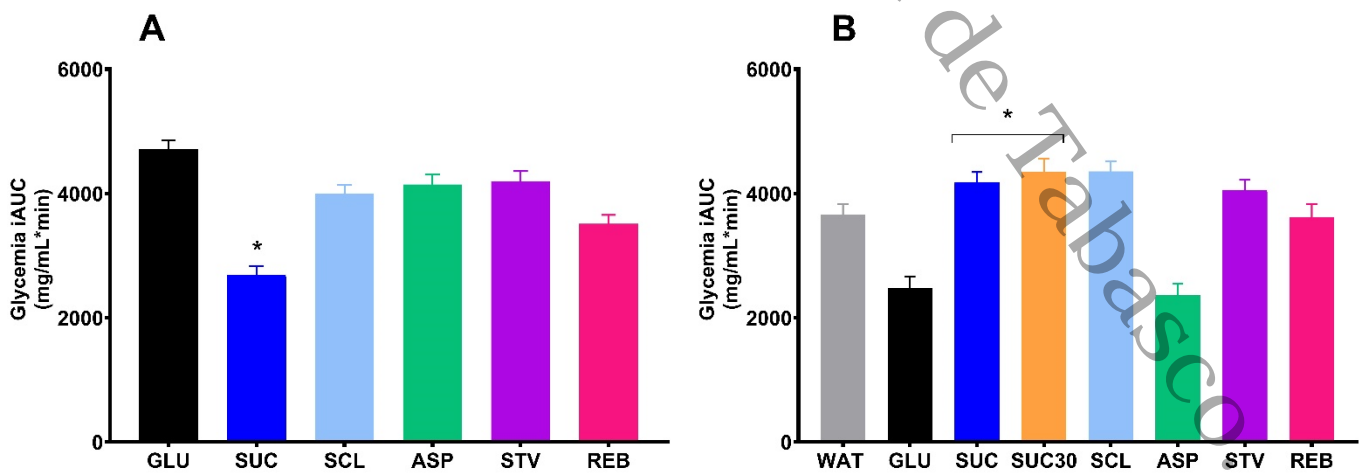


Figure 7. Effects of NNS on glycemia iAUC after the interventions adjusted by the baseline glycemia iAUC values in ND (A) and HFD-fed rats (B). Data are expressed as mean \pm SEM. ($n = 6-8$ per group). No significant differences of NNS were found in either group after ANCOVA analysis. In ND, SUC vs. GLU $* p < 0.05$. In HFD, SUC and SUC30 vs. GLU $* p < 0.05$. WAT, water; GLU, glucose; SUC, sucrose; SUC30, 30% sucrose; SCL, sucralose; ASP, aspartame; STV, stevia; REB, reb A.

3.2.3. Effects of NNS on Fasting Biochemical Parameters

In the ND-fed rats, no effects of SCL, STV or REB were observed on fasting glucose, cholesterol, HDL-cholesterol, insulin or HOMA-IR, only ASP treatment induced an increased total cholesterol level compared to GLU ($p = 0.0010$). Neither in the HFD-fed rats, these effects were observed, however, a significant increase in glucose concentration was observed after SUC30 treatment respect to GLU ($p = 0.0264$), and unexpectedly, the WAT group also showed a significant increase in glucose concentrations compared to GLU ($p = 0.0283$). The HOMA-IR was higher in the HFD group than DN, but not statistical significance was reached ($p = 0.14$). Data are shown in Supplementary Material, Table S1.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the chronic effects of moderate doses of sucralose, aspartame, stevia or reb A on energy intake, body weight and postprandial glycemia in healthy and with altered glycemic response rats. Findings from the first phase in HCD-treated rats showed a higher weekly energy intake dynamic, especially in the last 4 weeks compared to the ND group. However, the body weight evolution was lower than the ND group and was accompanied by an altered glycemic response after the 8-week treatment period.

Our findings agree with previous studies in which rats on HCD for a few weeks developed glucose intolerance independent of the obesity per se [29]. Some proposed explanatory mechanisms could be the modification in the early insulin response and the high rate of fatty acid oxidation. In fact, the hepatic insulin resistance can appear as early as 1 week after sucrose feeding, while muscle insulin resistance develops until week 2 [30]. The weight loss observed in HCD in respect to the ND group may be partially explained by the lower food consumption (constituted by 13.2% protein) observed in this study. This dietary deficiency can decrease muscle mass by increasing thermogenesis in adipose tissue [31], and induce an increased insulin resistance which is known to reduce muscle protein synthesis [32]. Our findings agree with previous studies where no weight gain has been observed after HCD [33,34].

In the second phase, NNS exposure showed no effects on energy intake from food, fluid and total energy intake in both ND and HFD-treated rats when compared to the control group (GLU), SUC, or WAT during the 8-week treatment period. However, the SUC provoked a reduction in food consumption that was accompanied by an increase in fluid intake in the ND group. These animals compensated for decreases in calories from food in such a way that the total energy intake evolution did not differ among groups. Similar findings have been observed previously and confirm the hypothesis that animals adjust for calories consumed on one occasion by reducing their caloric intake on subsequent opportunities to eat [35,36]. In the same way HFD-treated rats showed a similar increase in fluid intake dynamics after SUC and SUC30; however, in this case, no compensation for food intake was observed. This finding could be a consequence of the profound metabolic alterations induced by the unbalanced diet. Nevertheless, due to the high variability observed in the SUC30 data, and similarly to the ND-fed rats, differences in the total energy intake dynamics were not observed among groups.

In this study, no modifications were observed in body weight evolution or total weight gain after NNS compared to the control group (GLU), in both ND and HFD-fed rats. These results are consistent with those of Bissonnette et al. [37], who reported no effects of stevia and saccharin on weight gain after 6-week treatment period when compared to nonsweetened control. In contrast, Feijó et al. [38] reported that 0.4% aspartame or 0.3% saccharin provided as drinking water to Wistar rats increased BW unrelated to caloric intake when compared to 15% sucrose-fed rats. However, in the latter study, the high NNS doses were provided to healthy animals with restricted physical activity, five days a week for a longer period of 12 weeks. The administered dose was approximately 6.4 times greater than the ADI for aspartame, considering the informed fluid consumption (20 mL of yogurt/d) and the average BW (250 g) of the rats.

In this study, the glycemic responses evaluation was performed through an OSTT administering rapidly digestible starch instead of pure glucose, considering that this substance is not usually consumed by humans, while starch is the most important macronutrient found in everyday foods [24]. Moreover, rapidly digestible starch has been used by our group in previous studies providing quick rises in postprandial glycemia and functioning to analyze glycemic responses [24,39,40]. In this line, some studies have mentioned a lower variability when using starch products instead of pure glucose [34]. When analyzing the NNS effects based on the OSTT at the end of the study, no effects of NNS were observed in the ND-fed rats, and only a reduced glycemia iAUC was appreciated after sucrose. In contrast, in the HFD group, two NNS (SCL and STV) were shown to induce an increased glycemic response. Additionally, SUC and SUC30, also provoked a higher postprandial glycemia profile. These findings agree with other authors reporting an impaired glucose tolerance in rodents after NNS [14,26]. However, in these and other previous studies the statistical analysis only included the glycemia temporal changes from the final OGTT performed at the end of the intervention period without considering a baseline tolerance test data. Here, a baseline OSTT data (baseline glycemia iAUC) was included for adjusting the dependent variable (final glycemia iAUC) through an ANCOVA analysis. After this, no effects of NNS were observed in healthy or with altered glucose tolerance rats. Nevertheless, the differences between GLU and SUC in both groups remained. Our results are consistent with those of Glendinning et al. [41] who reported no effects of sucralose, saccharin or Ace K on glucose tolerance in mice exposed to treatments for 4 weeks. These authors designed a well-controlled study with various OGTTs performed throughout the experimental period and using an appropriate sample size, however, no other NNS types as aspartame or stevia were investigated, and only a standardized diet was administered. In contrast Suez et al. [14] informed that NNS exposure induced glucose intolerance in mice fed regular chow or high-fat diet, however the lack of baseline test could have influenced the results.

The effect of NNS on fasting biochemical parameters was not consistent. ASP induced an increased total cholesterol, but this was not observed in the animals fed an unbalanced diet (HFD). In fact, no effects of other NNS were observed on fasting glycemia, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, insulin or HOMA-IR.

In the present study, commercially available versions of sucralose, aspartame and stevia were used since these are the most common products consumed by the general population and more likely to provide a more accurate representation of the possible physiological effects on humans. Moreover, the administered doses were adjusted by daily fluid consumption and BW to be equivalent to the ADI.

This study has several strengths. Both natural and artificial NNS effects were investigated. Commercial forms of SCL, ASP and STV were used in order to simulate popular consumption. A rat model of diet-induced metabolic dysregulation was used expecting an exacerbation of the glucose intolerance status after NNS consumption. Realistic and moderate NNS doses were provided. Glucose and sucrose-treated rats or water-fed rats served as comparators. A suitable sample size was used. A baseline OSTT was included to discard intra-subjects' variability. However, some limitations are also present. For instance, not determining body fat composition or other biochemical parameters like leptin, GLP-1, or PYY which could have provided explanations to the metabolic changes related to the appetite control.

5. Conclusions

In summary, we have shown that aspartame, sucralose, stevia, and reb A administered at doses equivalent to ADI for 8 weeks did not cause modifications in caloric intake, weight gain, glycemic response or fasting biochemical parameters in healthy and with altered glycemic response rats. Moreover, the results did not differ between artificial and natural NNS. These findings provide further evidence suggesting that at the recommended doses, these substances do not alter feeding behavior, body weight or glycemic tolerance.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10050958/s1>, Figure S1: Variation in the NNS consumption throughout the 8 weeks of experimental period in ND (left) and HFD-fed rats (right) (phase 2), Figure S2: Glycemic profiles before and after the interventions in ND-fed rats (A–F) (phase 2), Figure S3: Glycemic profiles before and after the interventions in HFD-fed rats (A–H) (phase 2). Table S1: Effects of NNS on fasting biochemical parameters.

Author Contributions: Conceptualization, J.L.B.-C., J.C.D.-Z. and C.G.-V.; supervision, C.G.-V.; methodology, J.C.D.-Z. and M.R.-G.; data curation, J.L.B.-C. and M.R.-G.; formal analysis, C.A.Á.-G., C.A.T.-Z. and A.D.G.-M.; writing—original draft preparation, J.L.B.-C., M.R.-G. and C.G.-V.; writing—review and editing, V.O.-H., I.E.J.-R., C.A.Á.-G. and R.C.-U. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported in part by the PAPIIT IN213718. The sponsors were not involved in data collection, analysis and interpretation of data, writing of the article or in the decision to submit the manuscript for publication.

Institutional Review Board Statement: All the animal procedures (Approval No. 002/CIP/DACS) were approved by the Investigation Committee of the Academic Division of Health Sciences, Juarez Autonomous University of Tabasco according to the Official Mexican Standard NOM-062-ZOO-1999.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Lazzarino, G.P.; Acutain, M.F.; Canesini, G.; Andreoli, M.F.; Ramos, J.G. Cafeteria diet induces progressive changes in hypothalamic mechanisms involved in food intake control at different feeding periods in female rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2019**, *498*, 110542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Das, A.; Chakraborty, R. An introduction to sweeteners. In *Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications*; Mérillon, J.-M., Ramawat, K.G., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 1–13.
- Dunford, E.; Taillie, L.; Miles, D.; Eyles, H.; Tolentino-Mayo, L.; Ng, S. Non-nutritive sweeteners in the packaged food supply—an assessment across 4 countries. *Nutrients* **2018**, *10*, 257. [[CrossRef](#)]
- Martyn, D.; Darch, M.; Roberts, A.; Lee, H.Y.; Yaqiong Tian, T.; Kaburagi, N.; Belmar, P. Low-/no-calorie sweeteners: A review of global intakes. *Nutrients* **2018**, *10*, 357. [[CrossRef](#)]
- Romo-Romo, A.; Aguilar-Salinas, C.A.; Gómez-Díaz, R.; Brito-Córdova, G.X.; Gómez-Velasco, D.V.; López-Rocha, M.J.; Almeda-Valdes, P. Non-nutritive sweeteners: Evidence on their association with metabolic diseases and potential effects on glucose metabolism and appetite. *Rev. Investig. Clin.* **2017**, *69*, 129–138. [[CrossRef](#)]
- Laviada, H.; Molina Segui, F. Posición de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología sobre los edulcorantes no calóricos. *Rev. Mex. Endocrinol. Metab. Nutr.* **2017**, *4*, 24–41.
- Pearlman, M.; Obert, J.; Casey, L. The association between artificial sweeteners and obesity. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2017**, *19*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Olivier-Van Stichelen, S.; Rother, K.I.; Hanover, J.A. Maternal exposure to non-nutritive sweeteners impacts progeny's metabolism and microbiome. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
- Pepino, M.Y.; Bourne, C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2011**, *14*, 391–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fantino, M.; Fantino, A.; Matray, M.; Mistretta, F. Beverages containing low energy sweeteners do not differ from water in their effects on appetite, energy intake and food choices in healthy, non-obese French adults. *Appetite* **2018**, *125*, 557–565. [[CrossRef](#)]
- Ford, H.E.; Peters, V.; Martin, N.M.; Sleeth, M.L.; Ghatei, M.A.; Frost, G.S.; Bloom, S.R. Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2011**, *65*, 508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pinto, D.E.; Foletto, K.C.; Nunes, R.B.; Lago, P.D.; Bertoluci, M.C. Long-term intake of saccharin decreases post-absorptive energy expenditure at rest and is associated to greater weight gain relative to sucrose in wistar rats. *Nutr. Metab.* **2017**, *14*, 18. [[CrossRef](#)]
- Pepino, M.Y.; Tiemann, C.D.; Patterson, B.W.; Wice, B.M.; Klein, S. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 2530–2535. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Suez, J.; Korem, T.; Zeevi, D.; Zilberman-Schapira, G.; Thaiss, C.A.; Maza, O.; Israeli, D.; Zmora, N.; Gilad, S.; Weinberger, A.; et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* **2014**, *514*, 181–186. [[CrossRef](#)]
- Romo-Romo, A.; Aguilar-Salinas, C.A.; Brito-Córdova, G.X.; Gómez-Díaz, R.A.; Almeda-Valdes, P. Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *108*, 485–491. [[CrossRef](#)]
- Higgins, K.A.; Considine, R.V.; Mattes, R.D. Aspartame consumption for 12 weeks does not affect glycemia, appetite, or body weight of healthy, lean adults in a randomized controlled trial. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 650–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Bonnet, F.; Tavenard, A.; Esvan, M.; Laviolle, B.; Viltard, M.; Lepicard, E.M.; Lainé, F. Consumption of a carbonated beverage with high-intensity sweeteners has no effect on insulin sensitivity and secretion in nondiabetic adults. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1293–1299. [CrossRef] [PubMed]
18. Andrejić, B.M.; Mijatović, V.M.; Samojlik, I.N.; Horvat, O.J.; Čalasan, J.D.; Dolai, M.A. The influence of chronic intake of saccharin on rat hepatic and pancreatic function and morphology: Gender differences. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2013**, *13*, 94–99. [CrossRef] [PubMed]
19. Lobach, A.R.; Roberts, A.; Rowland, I.R. Assessing the in vivo data on low/no-calorie sweeteners and the gut microbiota. *Food. Chem. Toxicol.* **2019**, *124*, 385–399. [CrossRef]
20. Mattes, R.D.; Popkin, B.M. Nonnutritive sweetener consumption in humans: Effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
21. FDA. Additional Information about High-Intensity Sweeteners Permitted for Use in Food in the United States. Available online: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states> (accessed on 22 September 2019).
22. Sengupta, P. The laboratory rat: Relating its Age with human's. *Int. J. Prev. Med.* **2013**, *4*, 624–630.
23. Wolever, T.M.S.; Vuksan, V.; Palmason, C. Less variation of postprandial blood glucose after starchy test meals than oral glucose. *Nutr. Res.* **1996**, *16*, 899–905. [CrossRef]
24. Ble-Castillo, J.L.; Aparicio-Trapala, M.A.; Juárez-Rojop, I.E.; Torres-Lopez, J.E.; Mendez, J.D.; Aguilar-Mariscal, H.; Olvera-Hernández, V.; Palma-Cordova, L.C.; Diaz-Zagoya, J.C. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diet composition on metabolic control and insulin resistance in normal rats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2012**, *9*, 1663–1676. [CrossRef]
25. Mooradian, A.D.; Smith, M.; Tokuda, M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clin. Nutr. ESPEN* **2017**, *13*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
26. 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. Chronic consumption of sweeteners and its effect on glycaemia, cytokines, hormones, and lymphocytes of GALT in CD1 mice. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 1345282. [CrossRef] [PubMed]
27. Barrios-Correa, A.A.; Estrada, J.A.; Martel, C.; Olivier, M.; Lopez-Santiago, R.; Contreras, I. Chronic intake of commercial sweeteners induces changes in feeding behavior and signaling pathways related to the control of appetite in BALB/c mice. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 3628121. [CrossRef]
28. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412–419. [CrossRef] [PubMed]
29. la Fleur, S.E.; Luijendijk, M.C.M.; van Rozen, A.J.; Kalsbeek, A.; Adan, R.A.H. A free-choice high-fat high-sugar diet induces glucose intolerance and insulin unresponsiveness to a glucose load not explained by obesity. *Int. J. Obes.* **2010**, *35*, 595–604. [CrossRef] [PubMed]
30. Pagliassotti, M.J.; Prach, P.A.; Koppenhafer, T.A.; Pan, D.A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271*, R1319–R1326. [CrossRef]
31. Ceolín, P.; Franca, S.A.D.; Froelich, M.; Santos, M.P.D.; Pereira, M.P.; Queiroz, T.S.; Silva, F.H.S.D.; Lisboa, P.C.; Andrade, C.M.B.; Baviera, A.M.; et al. A low-protein, high carbohydrate diet induces increase in serum adiponectin and preserves glucose homeostasis in rats. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2019**, *91*, e20180452. [CrossRef]
32. Gatineau, E.; Savary-Auzeloux, I.; Migné, C.; Polakof, S.; Dardevet, D.; Mosoni, L. Chronic intake of sucrose accelerates sarcopenia in older male rats through alterations in insulin sensitivity and muscle protein synthesis. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 923–930. [CrossRef] [PubMed]
33. Burgeiro, A.; Cerqueira, M.G.; Varela-Rodriguez, B.M.; Nunes, S.; Neto, P.; Pereira, F.C.; Reis, F.; Carvalho, E. Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet. *Nutrients* **2017**, *9*, 638. [CrossRef]
34. Gomez-Crisostomo, N.P.; De la Cruz-Hernandez, E.N.; Mendez Mendez, E.R.; Hernandez-Landero, M.F.; Camacho Lievano, J.U.; Martinez-Abundis, E. 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. *Arch. Physiol. Biochem.* **2020**, *126*, 258–263. [CrossRef] [PubMed]
35. Mazlan, N.; Horgan, G.; Stubbs, R.J. Energy density and weight of food effect short-term caloric compensation in men. *Physiol. Behav.* **2006**, *87*, 679–686. [CrossRef]
36. Rowland, N.E.; Nasrallah, N.; Robertson, K.L. Accurate caloric compensation in rats for electively consumed ethanol-beer or ethanol-polycose mixtures. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2005**, *80*, 109–114. [CrossRef]
37. Bissonnette, D.J.; List, S.; Knoblich, P.; Hadley, M. The effect of nonnutritive sweeteners added to a liquid diet on volume and caloric intake and weight gain in rats. *Obesity* **2017**, *25*, 1556–1563. [CrossRef]
38. Feijó, F.d.M.; Ballard, C.R.; Foletto, K.C.; Batista, B.A.M.; Neves, A.M.; Ribeiro, M.F.M.; Bertoluci, M.C. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite* **2013**, *60*, 203–207. [CrossRef] [PubMed]
39. Garcia-Vazquez, C.; Ble-Castillo, J.L.; Arias-Cordova, Y.; Cordova-Uscanga, R.; Tovilla-Zarate, C.A.; Juarez-Rojop, I.E.; Olvera-Hernandez, V.; Alvarez-Villagomez, C.S.; Nolasco-Coleman, A.M.; Diaz-Zagoya, J.C. Effects of Resistant Starch Ingestion on Postprandial Lipemia and Subjective Appetite in Overweight or Obese Subjects. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 3827. [CrossRef] [PubMed]

40. Ble-Castillo, J.L.; Juárez-Rojop, I.E.; Tovilla-Zárate, C.A.; García-Vázquez, C.; Servin-Cruz, M.Z.; Rodríguez-Hernández, A.; Araiza-Saldaña, C.I.; Nolasco-Coleman, A.M.; Díaz-Zagoya, J.C. Acute consumption of resistant starch reduces food intake but has no effect on appetite ratings in healthy subjects. *Nutrients* **2017**, *9*, 696. [[CrossRef](#)]
41. Glendinning, J.I.; Hart, S.; Lee, H.; Maleh, J.; Ortiz, G.; Ryu, Y.S.; Sanchez, A.; Shelling, S.; Williams, N. Low-calorie sweeteners cause only limited metabolic effects in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2020**, *318*, R70–R80. [[CrossRef](#)]

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.