



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL CONSUMO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA SATURADA
Y EDULCORANTES NATURALES Y ARTIFICIALES SOBRE LA MICROBIOTA
INTESTINAL Y LOS RECEPTORES DE DULZOR EN UN MODELO ANIMAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. SANCHEZ TAPIA MONICA TODD CURIE

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

DR. SAMUEL CANIZALEZ QUINTEROS

Instituto Nacional de Medicina Genómica, INMEGEN

DR. FRANCISCO JAVIER TORRES LOPEZ

Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas UMAE, CMN SXXI

Ciudad de México. Febrero, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DR. CEVALLOS GAOS MIGUEL ÁNGEL

VOCAL: DR. PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

VOCAL: DRA. DÍAZ VILLASEÑOR ANDREA SACHI

VOCAL: DR. GRANADOS ARREOLA JULIO

SECRETARIO: DR. SÁNCHEZ FLORES ALEJANDRO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN”. DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN.

TUTORA:

DRA. NIMBE TORRES Y TORRES, INCMNSZ

COMITÉ TUTOR:

DR. JAVIER TORRES LÓPEZ. CMN SXXI

DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS. INMEGEN

SUSTENTANTE: M EN C. SÁNCHEZ TAPIA MÓNICA TODD CURIE

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS.

A mi tutora la Dra. Nimbe Torres del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición por permitirme trabajar en este proyecto, por apoyarme, orientarme y creer en mí, porque además de ser una gran mentora es una gran mujer y ejemplo a seguir, pero sobre todo es una gran persona que me brindó siempre su apoyo, confianza y amistad, siempre estaré agradecida por ello.

Al Dr. Armando Tovar, jefe del Departamento de Fisiología de la Nutrición por permitirme formar parte de su equipo de trabajo estos años, por darme su confianza y por incluirme en varios proyectos que me permitieron crecer profesional y personalmente. Le agradezco sus enseñanzas y consejos.

Al los miembros de mi comité tutorial el Dr. Samuel Canizales y el Dr. Javier Torres por sus valiosas contribuciones a este trabajo de investigación y por haberme asesorado estos años, por estar en mis exámenes con la mejor disposición.

A los investigadores del departamento de Fisiología Omar, Adri, Martha, Vic, Edgar, Lilia, Gaby, Iván y Memo por su ayuda, observaciones y aportes en los seminarios. Por orientarme y siempre tener disposición para enseñarme.

A los integrantes del Departamento de Bioterio, en especial a la Dra. Mariela Contreras por su apoyo y dedicación y por brindarme su amistad, a Miguel el mejor técnico, a Bere que es super trabajadora y que nos apoyó en todo. Gracias por todo, por su tiempo, apoyo y amistad.

A los ingenieros de biomédicas por tener siempre en funcionamiento nuestros equipos, en especial al Ing Javier Pinto porque siempre estuvo presente y al pendiente de las emergencias.

Al Programa de Apoyo a Estudiantes de Posgrado (PAEP) por su apoyo para asistir a Boston a presentar el presente trabajo de investigación en el congreso internacional Nutrition 2018

A la Red de Apoyo a la RAI por permitirnos realizar técnicas de última generación. En especial a Rosa Rebollar por su paciencia, apoyo y amistad.

A la UNAM por brindarme un segundo hogar, por permitirme adquirir más conocimientos y habilidades, siempre seré hecha en CU.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mi madre Conchita Tapia, estoy orgullosa de ser tu hija, te amo, siempre has estado ahí para mí con tu apoyo y amor incondicional, eres la mejor madre, soy afortunada de haberte tenido, gracias por compartir conmigo esta vida y ser un ejemplo para mí.

A mi padre Guillermo Sánchez, por darme fortaleza y carácter. Por tus enseñanzas y consejos que siempre llevo conmigo. Gracias por compartirme esa sabiduría.

A mi hermano Guillermo Moshé Dayán, por todos esos momentos y experiencias compartidas, por tu cariño y amistad, eres el mejor hermano del mundo.

A Sandy y Ari por compartir tantos momentos conmigo, desde largas jornadas haciendo ciencia que nos encanta, juegos, salidas, conciertos, etc. Chicas les quiero mucho y me siento afortunada de haber compartido estos años con ustedes, son grandes científicas y personas. Espero sigamos teniendo al oportunidad de hacer cosas científicas y no tan científicas juntas

A Mire, Dany, Karen y Dianis por esas buenas charlas, retas y reuniones donde hablábamos de todo un poco desde cosas muy serias hasta las mejores lecciones y consejos de la vida.

A Jonathan por esos momentos divertidos dentro y fuera del laboratorio por las desveladas hablando de ciencia y por acompañarme a casa para cuidarme.

A Rodrigo por escucharme, cuestionarme y siempre darme ánimos.

A Javier por tu amistad incondicional, por la confianza y compañía que me diste y por sacarme de apuros de vez en cuando.

A las chicas del basket por hacerme sentir mas parte del hospital, Chivis, Alis, Ade, Elenita, Eblen, Ara, gracias por todos esos partidos que siempre me devolvían energía para seguir.

A Lula, Aline, Anabel y Tefy por esas tardes de microbiota team donde no sentía el tiempo, compartíamos el conocimiento y experiencia, y al mismo nos hacíamos amigos, espero seguir colaborando con ustedes.

A mis compañeros de laboratorio que están o estuvieron durante estos años, Alex, Augusto, Cyn, Paul, Dany, Hildita, Irma, Itzel, Jonathan, Joshua, Leo, Lili, Lucho, Maru, Miry, Pam, Pamelita, Rebe, Becky, Richard, Chio, Sarai, Sofis, Zuly, Tania, Sayra, Anita, Pris, Angie, Diana Valerio, Daniel, Uriel, Mariana, Tauqueer, Karla, Lupita, Adri Rosas, Ely, Niko, Vero, Gris, Doña Glo, Sra Bere y Don Alex gracias por todos los momentos compartidos, de todos y cada uno de ustedes aprendí algo.

Índice

| | |
|--|----|
| Resumen..... | 1 |
| Introducción | 2 |
| Marco teórico..... | 5 |
| A) Edulcorantes..... | 5 |
| B) Recepción del dulzor | 6 |
| C) Microbiota | 8 |
| D) Funciones de la microbiota intestinal | 13 |
| E) Microbiota y alteraciones metabólicas | 15 |
| Justificación..... | 18 |
| Hipótesis | 18 |
| Objetivos..... | 19 |
| Principal | 19 |
| Específicos..... | 19 |
| Metodología..... | 21 |
| A) Animales de experimentación | 21 |
| B) Determinación de la curva de crecimiento e ingesta de los animales de experimentación..... | 22 |
| C) Determinación de la composición corporal de ratas alimentadas con diferentes edulcorantes con y sin una dieta alta en grasa saturada | 22 |
| D) Determinación del gasto calórico y del coeficiente respiratorio | 22 |
| E) Determinación de la tolerancia a la glucosa | 23 |
| F) Determinación de parámetros bioquímicos | 24 |
| G) Evaluación de factores genéticos hepáticos involucrados en el metabolismo de lípidos: SREBP-1, FAS, PPAR- α y CPT-1 | 24 |
| H) Evaluación de factores involucrados en inflamación y secreción de incretinas..... | 25 |
| I) Análisis histológico del hígado y colon | 26 |
| J) Análisis de proteínas relacionadas con inflamación, señalización de insulina, receptores de ácidos grasos de cadena corta y de dulzor | 27 |
| K) Secuenciación por síntesis de la microbiota intestinal (16S rRNA) en la plataforma MiSeq de Illumina | 28 |
| L) Análisis del metagenoma por secuenciación shot-gun en muestras fecales de ratas que consumieron diferentes edulcorantes en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa saturada | 30 |
| M) Análisis estadístico | 31 |

| | |
|--|----|
| Resultados..... | 32 |
| I. Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar..... | 32 |
| II. Evaluación de la composición corporal de ratas alimentadas con diferentes edulcorantes con y sin una dieta alta en grasa saturada | 35 |
| III. Determinación del coeficiente respiratorio y el gasto calórico | 37 |
| IV. Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)..... | 39 |
| V. Cuantificación de parámetros bioquímicos en suero | 41 |
| VI. Determinación de incretinas, hormonas y endotoxemia metabólica..... | 43 |
| VII. Evaluación de la endotoxemia metabólica | 47 |
| VIII. Determinación de la abundancia de proteínas involucrados en la inflamación | 48 |
| IX. Caracterización de citocinas séricas | 50 |
| X. Determinación de genes involucrados en el metabolismo de lípidos | 52 |
| XI. Estudio de la morfología de los hígados de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes | 53 |
| XII. Estudio de la señalización de insulina en músculo esquelético de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes | 54 |
| XIII. Caracterización de las poblaciones bacterianas intestinales de ratas alimentadas con diferentes tipos de edulcorantes en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa saturada..... | 57 |
| XIV. Determinación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces, y de sus receptores GPR43 y GPR41 en el intestino | 62 |
| XV. Evaluación de los receptores de dulzor en lengua e intestino | 65 |
| XVI. Caracterización de diversos transportadores de glucosa intestinales | 68 |
| XVII. Evaluación de incretinas secretadas en el intestino | 70 |
| XVIII. Estudio de la morfología de intestinos de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes | 73 |
| XIX. Caracterización del microbioma intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o dieta alta en grasa y diferentes edulcorantes | 76 |
| Discusión..... | 80 |
| Conclusiones..... | 88 |
| Resumen gráfico..... | 91 |
| Bibliografía..... | 92 |

Resumen.

El consumo de grasas saturadas y de edulcorantes, juegan un papel importante en el desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. Uno de los mecanismos por los cuales puede suceder esto es a través de la modificación de la microbiota intestinal. Sin embargo, no se sabe si ésta se modifica de manera selectiva en función de las diferentes estructuras químicas de los edulcorantes calóricos y/o no calóricos consumidos, con o sin una dieta alta en grasa saturada. En el presente trabajo, se analizaron una amplia gama de variables fisiológicas y metabólicas del hospedero, así como la modificación de la microbiota intestinal por medio de metagenómica, para tratar de dilucidar el efecto de los diferentes edulcorantes en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa. Los hallazgos demuestran que el consumo de sacarosa aumenta de manera significativa la endotoxemia metabólica y la intolerancia a la glucosa; la sucralosa produjo un desequilibrio marcado de la microbiota intestinal, aumentando la abundancia relativa de *Bacteroides fragilis* lo cual está relacionado con el incremento de la permeabilidad intestinal, así como la elevación de los niveles séricos de citocinas proinflamatorias induciendo intolerancia a la glucosa. Por otro lado, el consumo de edulcorantes menos refinados de origen natural, presentaron efectos benéficos o no perjudiciales para la salud. Los glucósidos de steviol aumentaron la abundancia de *Akkermansia muciniphila*, la cual se asocia con la reducción de la grasa corporal y aumentó del gasto energético. El mascabado y la miel se relacionaron con la ausencia de endotoxemia metabólica, un aumento en la diversidad de genes bacterianos y la señalización funcional de la insulina. Por otra parte, la adición de grasa a la dieta aumentó la disbiosis intestinal, la concentración de leptina y la inflamación. Estos hallazgos indican que el tipo de edulcorante y una dieta alta en grasas modifican selectivamente la microbiota intestinal y con ello vías involucradas en el metabolismo y la inflamación, por lo que es importante considerar que ambos factores juegan un papel importante ya sea por sí solos o en combinación.

Introducción

El consumo de edulcorantes no calóricos (aspartame, sucralosa, sacarina) así como el consumo de azúcares refinados (sacarosa, fructosa) o edulcorantes calóricos (mascabado, miel, xilitol) han causado una gran controversia en los últimos años. Basado en diversos estudios epidemiológicos se han observado cambios importantes en los patrones de alimentación en los hogares de México. Se ha observado una disminución en el consumo de alimentos tradicionales, vegetales y frutas; con un incremento en azúcares refinados, grasas y refrescos. Durante la última década se observó un incremento sustancial en el número de productos que contienen edulcorantes y por consiguiente, el consumo de los mismos. En Estados Unidos salieron al mercado más de 6000 productos con edulcorantes entre 1999 y 2004. Por otro lado, el azúcar proporciona hidratos de carbono que se absorben rápidamente y al encontrarse en una gran cantidad de alimentos, da lugar a una ingesta de energía excesiva, ganancia de peso y síndrome metabólico. Por ello, las personas escogen los edulcorantes no calóricos sobre el azúcar, con la intención de perder o mantener el peso corporal. Interesantemente, los estudios epidemiológicos sugieren que los edulcorantes no calóricos no ayudan a la pérdida de peso. Estudios de cohorte prospectivos, correlacionan de manera positiva el uso de edulcorantes no calóricos y la ganancia de peso. Las bebidas dietéticas, de amplio consumo en la población, se han relacionado con un incremento de 0.16 Kcal/m² en el índice de masa corporal por cada porción de bebida consumida. Esto resulta relevante dado que los edulcorantes no aportan, o aportan una cantidad mínima de energía.

El mecanismo por el cual el sabor dulce es percibido, es útil para predecir la ingesta calórica que se altera al utilizar edulcorantes. El organismo prepara una respuesta en el tracto gastrointestinal para el procesamiento de los hidratos de carbono asociados al sabor dulce, que no se lleva a cabo con la ingesta de los edulcorantes. La consecuencia es la disociación de la dulzura de la ingesta energética. Experimentos en roedores, sugieren que el dar un edulcorante natural genera una respuesta que mantiene el consumo de energía constante, mientras que esto no ocurre con el

consumo de edulcorantes no calóricos que pueden ocasionar una ingesta energética compensatoria mayor asociada al bajo contenido calórico del edulcorante artificial. Otros estudios con edulcorantes no calóricos demostraron que estos influyen en la diferenciación de los adipocitos estimulando la adipogénesis y que este mecanismo es dependiente de la dosis utilizada. Los diferentes hidratos de carbono impactan de maneras diferentes el metabolismo de los lípidos. La fructosa incrementa la lipogénesis *de novo*, provoca dislipidemia, disminuye la sensibilidad a la insulina e incrementa la adiposidad visceral; interesantemente el consumo de glucosa provoca un incremento en la adiposidad subcutánea en roedores. Estas alteraciones fisiológicas contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas que impactan a millones de personas a nivel mundial como la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 que han alcanzado proporciones epidémicas. Estas patologías se encuentran asociadas a diversos factores de riesgo, por lo que, es fundamental realizar mayores estudios para comprender los diversos mecanismos de acción a nivel molecular y fisiológico de los diferentes edulcorantes sobre las alteraciones metabólicas generadas. Uno de los posibles mecanismos es la generación de una disbiosis de la microbiota intestinal. Actualmente se sabe que la microbiota es considerada como un nuevo órgano por su impacto sobre la salud. El tipo y la concentración de polisacáridos no digeribles pero fermentables, así como la presencia de algunos compuestos bioactivos modulan la proporción de bacterias, sin embargo, la presencia de azúcares o edulcorantes puede afectar la fermentación de los polisacáridos modificando los productos de fermentación como los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato).

Hace algunos años se publicó en la revista *Nature* que el consumo de edulcorantes artificiales, particularmente la sacarina producía un desequilibrio en la microbiota, denominado disbiosis, resultando en intolerancia a la glucosa (Suez et al., 2014). Los cambios observados en la microbiota intestinal de roedores incluyen un incremento en *Bacteroides vulgatus* y disminución de *Akkermansia muciniphila* cuyas modificaciones en las vías de obtención de energía están asociadas a obesidad, acumulación de lípidos y diabetes mellitus. Los autores asumen que la respuesta es similar para otros edulcorantes artificiales, y que provocan intolerancia a la glucosa, sin embargo, no

toman en cuenta la estructura química de cada edulcorante y además no lo demuestran, lo que sugiere que el efecto en la microbiota puede cambiar significativamente dependiendo de la estructura de cada edulcorante. Algunos edulcorantes naturales, como *Stevia rebaudiana*, se han asociado a algunos efectos benéficos como la actividad antioxidante y esto ha incrementado su uso en productos comerciales. Sin embargo, al analizar su efecto *in vitro* sobre la microbiota intestinal se demostró que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y se observa un pH más elevado que en los controles, indicando una posible modificación en el microambiente (Denina, Semjonovs, Fomina, Treimane, & Linde, 2014). Por lo que es necesario conocer el efecto *in vivo* de este edulcorante a largo plazo sobre la microbiota. Estudios previos en el laboratorio han demostrado que la inclusión de sacarosa en el agua de bebida más una dieta alta en grasa saturada incrementan la intolerancia a la glucosa así como anomalías en el metabolismo de lípidos en ratas que consumieron esta dieta por 7 meses además de generar una disbiosis en la microbiota intestinal, por lo que es necesario estudiar la relación que hay entre la microbiota intestinal y el consumo de edulcorantes.

Marco teórico.

A) Edulcorantes

Un sustituto de azúcar es un aditivo de alimentos que incrementa el efecto de sabor dulce, generalmente con menor aporte de energía. Algunos sustitutos de azúcar son calóricos y algunos son sintéticos. Los sintéticos se denominan edulcorantes no calóricos o edulcorantes artificiales (Carocho, Morales, & Ferreira, 2017).

Originalmente, los edulcorantes no calóricos fueron diseñados para limitar el consumo de azúcar en pacientes con diabetes. Posteriormente su uso aumentó debido al hecho de estar asociado con una figura más delgada y actualmente se ha asociado su consumo con la idea de no ganar peso (Rogers et al., 2016). Sin embargo, existen controversias sobre el uso de estos edulcorantes no calóricos (Hess, Myers, Swithers, & Hedrick, 2018).

Es importante para la industria de alimentos, para los profesionales de la salud y para el consumidor, el conocer los mecanismos de acción de los edulcorantes y cómo interactúan las moléculas que producen la sensación de dulzor con los receptores del sabor dulce, así como las respuestas fisiológicas que se desencadenan con las diferentes señales que se disparan en cascada al estimular estos receptores. Este conocimiento ayudará al desarrollo de nuevos edulcorantes, aplicables en nuevos alimentos bajos en calorías, aumentando el potencial de tener una población más sana (Grembecka, 2015; Hofmann & Tschop, 2009).

Actualmente se cuenta con siete edulcorantes no calóricos aprobados por la legislación de varios países como la sacarina, sucralosa, aspartame, acesulfame K, extracto de fruta *luo han guo*, neotame y Stevia (Swithers, 2015).

B) Recepción del dulce

Los mamíferos se inclinan por la preferencia del sabor dulce debido a que está relacionado a la presencia de hidratos de carbono que indican la disponibilidad de energía y nutrientes (Chandrashekar, Hoon, Ryba, & Zuker, 2006). El sabor se percibe por los receptores de la familia T1R, de los cuáles T1R1, T1R2 y T1R3 se ubican principalmente en las papilas gustativas. Las células en las papilas gustativas envían la información al sistema nervioso central que da la percepción del sabor. El sabor dulce se detecta por la combinación de T1R2+T1R3 (Figura 1). La unión de los edulcorantes a estos receptores permite la percepción del dulce (Fernstrom et al., 2012; Zhao et al., 2003).

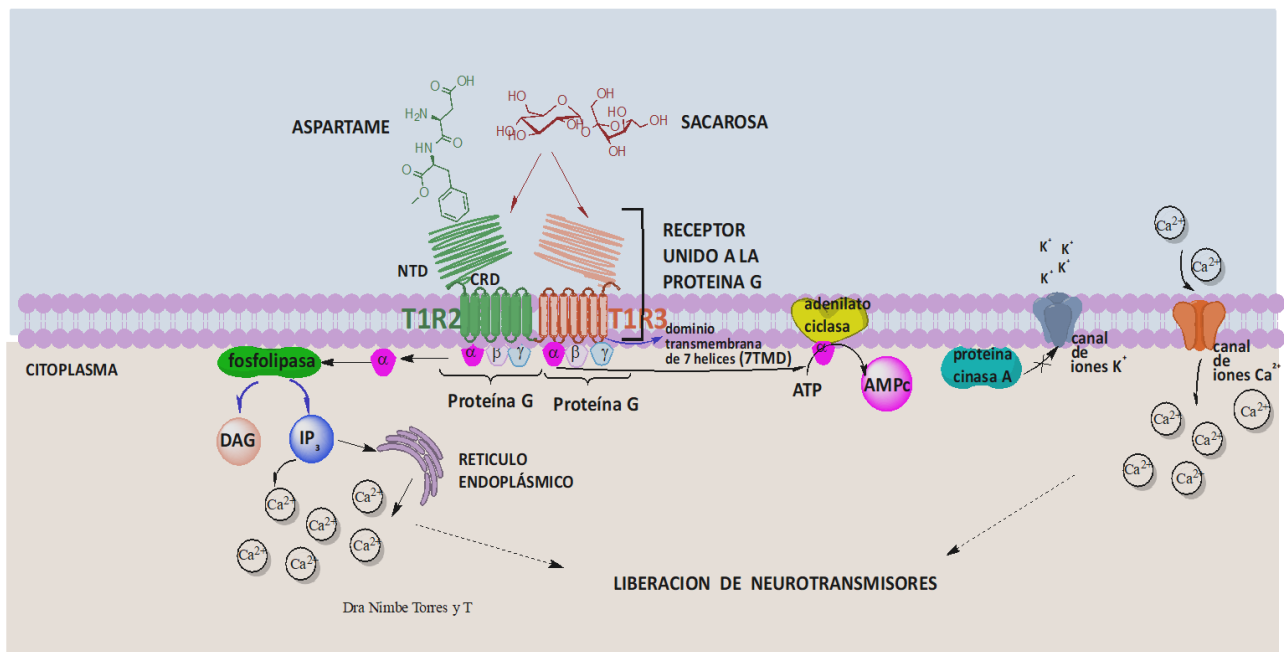


Figura 1. Mecanismo de acción de los receptores del dulce T1R2 y T1R3 linguales

Los receptores del dulce pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G, (GPCRs) de las células receptoras del gusto, teniendo una estructura de 7 asas transmembranales (Margolskee, 2002). Los T1R también se han encontrado en el intestino, el cerebro, el tejido adiposo, la vejiga y otros órganos. Su localización en

estos órganos sugiere muchas teorías, entre ellas la posibilidad de detectar diferentes nutrientes y mantener la homeostasis de los mismos. En el caso de los roedores, los receptores T1R2 y T1R3 que se expresan en el intestino, se proponen como los sensores de glucosa a nivel del tracto gastrointestinal (Kok et al., 2018).

Los T1R se expresan en células enteroendocrinas intestinales (Células L y K) y promueven la liberación de GLP-1 y GIP (Jang et al., 2007) de estas células o explantes duodenales (Kokrashvili, Mosinger, & Margolskee, 2009). Estos péptidos estimulan la síntesis de proteínas transportadoras de azúcares en los enterocitos, facilitando así la absorción de azúcares y finalmente su entrada en la circulación (Mace, Affleck, Patel, & Kellett, 2007). Estas incretinas, también actúan sobre el páncreas para la producción de insulina y reducir la secreción de glucagón, así como modular el vaciamiento gástrico, la motilidad intestinal y la ingesta de alimentos (Baggio & Drucker, 2007). Una de las funciones de los receptores del dulzor en las células enteroendocrinas intestinales puede ser la de detectar los azúcares cuando están presentes en el tubo digestivo, lo que facilita su paso a través de la luz intestinal hacia la circulación y, en última instancia, hacia las células del cuerpo que los utilizan para generar energía. Estas asociaciones entre el metabolismo energético y los receptores del dulzor en tejidos extraorales sugieren que son una parte importante de la homeostasis energética. Existe evidencia reciente donde se ha demostrado que ratones libres de gérmenes presentan una sobreexpresión del receptor T1R3 (Kochem, 2017), sin embargo, se desconoce si los edulcorantes calóricos o no calóricos modifican la microbiota y de ahí la expresión de los receptores del dulzor.

En conjunto, los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes artificiales, debido a su estructura diversa, pueden modificar de manera diferencial a la microbiota y de ahí generar diferentes alteraciones en el metabolismo de lípidos, así como en la expresión de los receptores del dulzor que modulan el metabolismo energético de la célula.

C) Microbiota

El tubo digestivo alberga un ecosistema bacteriano complejo, que cuenta con un número de microorganismos cercano a los 100 billones (10^{14}) que forman la microbiota intestinal. Esta microbiota intestinal ha evolucionado junto con el ser humano, adaptándose y conviviendo con él en una estrecha relación simbiótica (Hooper, Midtvedt, & Gordon, 2002). La microbiota ejerce funciones nutricionales, metabólicas y protectoras que la vuelven indispensable para el hospedero, mientras que este le entrega nutrientes y condiciones adecuadas para su crecimiento (Gordon, Dewey, Mills, & Medzhitov, 2012). La presencia de la microbiota intestinal, de hecho, impacta en la expresión de genes en la mucosa intestinal del hospedero: por ejemplo la colonización de ratones axénicos (sin microbiota) por *Bacteroides thetaiotaomicron* (un microorganismo común en la microbiota intestinal) induce la expresión de genes implicados tanto en la inmunidad del organismo y la regulación de la función intestinal de barrera como en la vascularización del epitelio y la digestión/absorción de nutrientes, principalmente *susA–susG* (Foley, Cockburn, & Koropatkin, 2016).

La microbiota no se distribuye de forma homogénea a lo largo del tracto digestivo; más de 99.9% se encuentra en el colon, con concentraciones que alcanzan los 10^9 a 10^{11} unidades formadoras de colonias por gramo (CFU/g) y con un fuerte predominio de anaerobios estrictos (Ley et al., 2005). El ciego y el colon ascendente son sede de procesos intensos de fermentación y sus poblaciones bacterianas están en continuo crecimiento, produciendo grandes cantidades de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que ocasionan un pH bajo (5,4 - 5,9), mientras que en el colon descendente estos procesos son menos intensos por lo cual la concentración de AGCC en su lumen es menor y el pH más alto (6.6 – 6.9) (Schwiertz et al., 2010). En la microbiota intestinal existe un equilibrio entre las poblaciones bacterianas dominantes y aquellas subdominantes presentes en menor cantidad. Cuando este equilibrio es adecuado, la microbiota actúa como una barrera que impide la multiplicación de patógenos y por ende el desarrollo de patologías gastrointestinales (Everard & Cani, 2013; Turnbaugh & Gordon, 2009).

La complejidad del ecosistema microbiano intestinal se ha estudiado y revisado extensamente durante estos últimos años. Se dispone de datos sólidos a favor de que en el tubo digestivo humano están representados cuatro Phylum bacterianos dominantes: *Firmicutes* (Grampositivos), *Bacteroidetes* (Gramnegativos), *Actinobacterias* (Grampositivas) y *Proteobacterias* (Gramnegativas) (Ussar et al., 2015). Los hongos y los *Archaea* pueden ser también residentes, pero comprenden menos del 1% de la población total, lo que ilustra que el ecosistema intestinal está dominado claramente por las bacterias, en particular las correspondientes a los Phylum *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, las cuales están distribuidas de diferente manera de acuerdo al estado de salud del individuo. Se ha calculado que existen en el intestino humano aproximadamente 1024 especies bacterianas (Turnbaugh et al., 2009).

La principal manifestación del mutualismo entre la microbiota intestinal y su hospedero es que la primera es capaz de extraer energía proveniente del almidón resistente y de los poli- y oligosacáridos que forman la mayoría de la fibra dietética soluble, haciéndola disponible para el hospedero y evitando de esta forma su pérdida en las deposiciones (Turnbaugh et al., 2006). *Bacillus thetaiotaomicron*, por ejemplo, puede expresar 175 hidrolasas distintas, lo que le otorga plasticidad para adaptarse tanto a los diversos polisacáridos de la dieta como a los endógenos presentes en el glicocalix y en las mucinas (Turnbaugh et al., 2006). La fermentación de estos sustratos libera agua, gases (CO_2 , H_2 , CH_4) y AGCC, principalmente acetato, propionato y butirato en una proporción aproximada de 60%, 20%, 20%, respectivamente, dependiendo de la naturaleza de la fibra. Estos AGCC se absorben y se oxidan, permitiendo una mayor obtención de energía. La importancia de este fenómeno la ilustran los ratones axénicos que, al carecer de microbiota intestinal, deben consumir 20 a 30% más de alimento que los animales convencionales que presentan microbiota para lograr crecimientos comparables (Morrison & Preston, 2016).

En el ser humano se estima que alrededor de 7 a 10% de las calorías absorbidas provienen diariamente de este proceso de extracción de energía por medio de la microbiota intestinal. Mientras que el butirato se metaboliza principalmente por los

colonocitos, el acetato y el propionato son absorbidos, alcanzando concentraciones de 300 a 450 μM en la sangre portal y de 50 y 100 μM en la sangre periférica. Una vez captado por el hígado, el acetato sirve de sustrato preferencial para la gluconeogénesis y la síntesis de colesterol y de los triglicéridos, mientras que el propionato inhibe la expresión génica de las enzimas hepáticas involucradas en esta lipogénesis *de novo* (Cummings, Pomare, Branch, Naylor, & Macfarlane, 1987; Tan et al., 2014). El reconocimiento del rescate colónico como una fuente regular y significativa de calorías para el organismo hace que en la actualidad las instancias responsables estén discutiendo la posibilidad de atribuir un cierto valor energético (2 Kcal/g) a la fibra soluble presente en alimento, lo cual se ha asociado con un incremento de aproximadamente 150kcal por día en una dieta de 2000kcal (Everard & Cani, 2013).

La obesidad puede definirse como un "balance de energía positivo", dando a entender que el consumo calórico total es mayor que el gasto total de energía durante un período relativamente largo de tiempo. Además, la dieta "obesogénica" suele ser rica en grasas y pobre en fibras dietéticas y de carbohidratos con un índice glucémico bajo (Apovian, 2016; Flores et al., 2010). El incremento de la prevalencia de obesidad durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos. La investigación está señalando actualmente a la microbiota intestinal como factor ambiental relacionado a la obesidad, ya que la microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético y al desarrollo de obesidad en el hospedero (Backhed et al., 2004). Las investigaciones revelan que cambios inadecuados de composición y/o actividad de la microbiota intestinal, están relacionados con diversas enfermedades del hospedero. Esta disbiosis caracteriza a las personas con sobrepeso o con obesidad o diabetes, inicialmente por un cambio en la relación Bacteroidetes/Firmicutes. Estas modificaciones cuantitativas de los *Phylum* microbianos podrían estar asociadas con las modificaciones de la expresión génica microbiana y por lo tanto con la modulación de las funciones metabólicas de la microbiota intestinal, generando obesidad y algunas enfermedades metabólicas relacionadas (DeWeerd, 2014; Everard & Cani, 2013).

El papel de la microbiota en el desarrollo de obesidad se comenzó a observar mediante su análisis en ratones obesos *ob/ob* (ratones con una mutación del gen de la leptina) los cuales revelaron que las concentraciones colónicas de Firmicutes aumentan más de 50% mientras que las de Bacteroidetes disminuyen correlativamente, comparado con los ratones de peso normal (Turnbaugh, Backhed, Fulton, & Gordon, 2008). A pesar de que las concentraciones de AGCC en el ciego de los ratones obesos son mayores que en los normopeso, la cantidad de energía excretada en sus heces es menor, indicando que el proceso de extracción y absorción de energía a partir de los alimentos es más eficiente en el animal obeso (Saad, Santos, & Prada, 2016). Esto se explica por el hecho que el número de genes dedicados a la hidrólisis de polisacáridos es mucho mayor en la comunidad bacteriana de los animales obesos que en la de los normopeso (Turnbaugh et al., 2006). Cabe destacar que los ratones axénicos normopesos que se inocularon con la microbiota intestinal de ratones obesos almacenan más grasa corporal y ganan más peso que aquellos animales inoculados con la flora de ratones normopeso. Esto nos indica que la mayor capacidad de extracción de energía y de almacenamiento de grasa es una característica transmisible en la cual participa la microbiota intestinal (Backhed et al., 2004).

Estudios realizados en los últimos años indican que la microbiota es un actor importante en la regulación del metabolismo energético del organismo. Además de su papel en el rescate colónico de energía, participa en el almacenamiento de grasa en los adipocitos. La microbiota intestinal de los sujetos obesos está alterada, comparada con aquella de los normopeso, lo que podría explicar su mayor eficiencia en la extracción de energía a partir de los alimentos (Baotherman, Zamzami, Taher, Abubaker, & Abu-Farha, 2016; Moreira, Texeira, Ferreira, Peluzio Mdo, & Alfenas Rde, 2012). El contenido en grasa de la dieta también es un factor que puede alterar la composición de la microbiota intestinal, a través del aumento de las concentraciones plasmáticas de LPS y el consiguiente desarrollo de un estado proinflamatorio que facilita la aparición de resistencia a la insulina, resultando en una endotoxemia metabólica (Guerville et al., 2017; Neves, Coelho, Couto, Leite-Moreira, & Roncon-Albuquerque, 2013). La mejor

comprensión de la composición y funcionamiento de la microbiota intestinal ha permitido el desarrollo de los conceptos de prebióticos y probióticos. Los prebióticos son principalmente hidratos de carbono no-digestibles (fibras dietéticas solubles) cuya fermentación en el colon estimula el crecimiento de microorganismos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*) benéficos para la salud del hospedero mientras que los probióticos son microorganismos inocuos que pueden sobrevivir su pasaje por el tracto gastrointestinal, donde ejercen funciones benéficas (Davani-Davari et al., 2019; O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Tanto los prebióticos como los probióticos pueden ser considerados como herramientas útiles para mantener el equilibrio armonioso de la microbiota intestinal a través del manejo de la dieta del individuo (Boesmans et al., 2018; Slavin, 2013). Se ha descrito que el consumo de prebióticos o de probióticos podría ayudar a mantener la homeostasis de la microbiota, previniendo las alteraciones anteriormente descritas y estimulando mecanismos implicados en la sensación de saciedad, por lo que es interesante conocer el efecto del consumo de los edulcorantes menos refinados sobre la composición de la microbiota intestinal en un modelo de obesidad inducido por el consumo de una dieta alta en grasa (Gardana, Simonetti, Canzi, Zanchi, & Pietta, 2003).

Teniendo en cuenta que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo con respecto a la aparición de diabetes de tipo 2, varios grupos han especulado con la idea de que la microbiota intestinal podría ejercer un impacto sobre la diabetes más allá de la manipulación del peso (Everard & Cani, 2013). Además, es importante considerar que la resistencia a la insulina es una patología concomitante con la obesidad y se correlaciona con inflamación crónica de baja intensidad. Basándose en datos experimentales sobre el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la obesidad, algunos autores han propuesto que la microbiota intestinal pudiera contribuir al inicio de la resistencia a la insulina y al estado inflamatorio del hospedero (Cani et al., 2007; Moreira et al., 2012).

D) Funciones de la microbiota intestinal

Se conoce como microbiota normal a todas aquellas especies de microorganismos que se encuentran en el intestino de individuos sanos y que poseen una o varias funciones que pueden ser benéficas para la salud del hospedero. Estas funciones se dividen en metabólicas, tróficas y de protección (Ley et al., 2005)

1. **Funciones metabólicas.** El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias energéticas en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el hospedero. La microbiota del intestino grueso juega un papel importante en los procesos digestivos del hospedero, generando energía a partir de los residuos alimentarios no absorbidos, de las células de descamación intestinal y de las secreciones a través de la fermentación de los hidratos de carbono y proteínas, así como de la absorción de los ácidos grasos de cadena corta y otros productos metabólicos, que son utilizados por el hospedero para suplir parte de su requerimiento de energía y por la microbiota para mantener su crecimiento y proliferación (Karlsson, Tremaroli, Nielsen, & Backhed, 2013). Esta función es tan importante que los roedores libres de gérmenes, para mantener su peso, necesitan ingerir 30% más de energía que los animales con microbiota, lo que prueba que las bacterias intestinales ayudan al hospedero a extraer el máximo valor energético de los alimentos. Se calcula que el epitelio colónico obtiene entre el 60 y el 70% de las necesidades energéticas, a través de la microbiota intestinal (Bhattarai & Kashyap, 2016).

La microbiota también contribuye a la homeostasis de los aminoácidos en el hospedero. En aquellos animales no rumiantes ni coprófagos la proteína microbiana no se utiliza en gran medida por el hospedero, sin embargo, una pequeña cantidad de los requerimientos de ciertos aminoácidos lo proporciona la síntesis bacteriana. Este hecho se observó al marcar aminoácidos con N₁₅ y encontrar que entre el 1 y 20% de la lisina y la treonina circulantes en estos animales derivó de las bacterias intestinales. También se ha descrito que algunas bifidobacterias marcadas con N₁₅ y administradas por vía bucal, al ser destruidas en el lumen, aproximadamente el 90% de las proteínas liberadas son absorbidas por el intestino y el 70% se retienen en el organismo. (Genton,

Cani, & Schrenzel, 2015) Los productos de la fermentación bacteriana han sido implicados en la motilidad, la circulación y la estimulación del flujo intestinal y visceral que modulan la maquinaria metabólica intrínseca de las células del hospedero, resultando en una absorción más eficiente del agua, calcio, magnesio y hierro. Además de su capacidad para metabolizar numerosos polisacáridos de plantas, también degradan una gran variedad de glicoconjugados derivados del hospedero (condroitín sulfato, mucina, hialuronato y heparina) (Hooper et al., 2001). Finalmente, los microorganismos colónicos también producen vitaminas por lo que los ratones libres de gérmenes necesitan suplementos de vitaminas K, B y folato, que son producidas por los *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* y *Fusobacterium* (Ingerslev, Theil, Hedemann, Laerke, & Bach Knudsen, 2014).

2. Funciones tróficas. Posiblemente el papel más importante de la microbiota intestinal sobre la fisiología colónica es su efecto trófico en el epitelio intestinal (Villanueva-Millan, Perez-Matute, & Oteo, 2015). La diferenciación de las células epiteliales está afectada en gran medida por la interacción con los microorganismos residentes y sus productos metabólicos, principalmente por los ácidos grasos de cadena corta (butirato, acetato y propionato) que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en el intestino humano. Además, el acetato lo utilizan los músculos esqueléticos y cardiaco para obtener energía y por los adipocitos para la lipogénesis (Backhed et al., 2004).

3. Funciones protectoras. Se conoce que la microbiota intestinal propia representa una barrera formidable para el establecimiento de poblaciones patógenas en el hospedero. A este fenómeno se le conoce como “interferencia bacteriana”, e incluye la producción de bacteriocinas, productos metabólicos y otras condiciones inhibitorias como disminución del pH y depleción de los nutrientes requeridos para la multiplicación de los patógenos. A todos estos mecanismos se les conoce como efecto mucoso de barrera (Frazier, DiBaise, & McClain, 2011; Ley et al., 2005)

E) Microbiota y alteraciones metabólicas

La mucosa intestinal ejerce funciones de inmunidad adaptativa ya que tiene la capacidad de responder a una infinidad de antígenos, pero también participa en la inmunidad innata que es el reconocimiento de determinados antígenos (Groschwitz & Hogan, 2009). Estos antígenos se han llamado patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) e incluyen lípidos, lipopolisacáridos (LPS) y lipoproteínas. Los PAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones. La interacción entre estos PAMPs y los receptores induce la producción de citocinas (Akira, Uematsu, & Takeuchi, 2006). Una de las familias más grandes de estos receptores son los receptores tipo Toll (TLRs). Las señales originadas por estos TLRs inducen la diferenciación celular y la producción de diversas citocinas (Medzhitov, Preston-Hurlburt, & Janeway, 1997).

El lipopolisacárido (LPS) es un componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y muestran una alta afinidad por unirse al receptor TLR-4. Otros PAMPs presentes en las bacterias Gram positivas como el peptidoglicano, tienen mayor afinidad al receptor TLR2 (Kawai & Akira, 2010). Por ello, la composición de la microbiota intestinal puede afectar la homeostasis del hospedero, generando una respuesta inflamatoria sistémica. Estudios previos han demostrado que ratones convencionales alimentados con una dieta alta en grasa saturada (HFD) tenían altos niveles de LPS circulante comparados con los alimentados con una dieta control, esta condición se asoció a procesos inflamatorios en el hígado y tejido adiposo, provocando desarrollo de hígado graso no alcohólico y resistencia a la insulina. A la elevación del LPS circulante se le denomina endotoxemia metabólica (Cani et al., 2007).

Por otro lado, es probable, que la microbiota intestinal sea indispensable para el desarrollo de la obesidad. Se ha comprobado que animales axénicos son resistentes para generar obesidad inducida por dietas altas en grasas, lo que indica que los alimentos ricos en calorías por sí solos, no son suficientes para inducir obesidad y resistencia a la insulina (Backhed, Manchester, Semenkovich, & Gordon, 2007). La obesidad inducida por el consumo de una dieta alta en grasas se caracteriza por una microbiota intestinal alterada, inflamación, alteración de la barrera del epitelio intestinal y endotoxemia metabólica, considerada un estado inflamatorio subclínico (Cani et al., 2008).

Durante la endotoxemia metabólica, el LPS presente en el lumen intestinal ingresa al sistema linfático y eventualmente llega a circulación a través de un transporte transcelular (Shao, Munford, Kitchens, & Varley, 2012). Existen dos mecanismos de absorción del LPS del intestino a circulación. El primero es el transporte facilitado por quilomicrones y el segundo es la fuga extracelular a través de las proteínas de unión estrecha del revestimiento epitelial (Ghoshal, Witta, Zhong, de Villiers, & Eckhardt, 2009; Guo et al., 2015). Estos mecanismos pueden funcionar en paralelo, y ambos son posibles enlaces entre el LPS y el desarrollo de enfermedades metabólicas. Además, se ha reportado que pacientes con síndrome metabólico muestran mayores niveles de LPS en suero comparados con sujetos sanos (Guevara-Cruz et al., 2019).

Un aumento en el LPS desencadena la producción de citocinas proinflamatorias cuando se une al complejo CD14/TLR4 en la superficie de células enteroendocrinas y del epitelio intestinal (Schumann, 1992; Wright, Ramos, Tobias, Ulevitch, & Mathison, 1990). En adición, la disbiosis de la microbiota intestinal por el consumo de una dieta alta en grasa u obesidad, puede inducir la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, así como la estimulación de TLR4 en el mismo. Además, los altos niveles plasmáticos de ácidos grasos libres también podrían estimular TLR4 (Rocha, Caldas, Oliveira, Bressan, & Hermsdorff, 2016).

Durante la obesidad, los adipocitos sufren una disfunción importante generando 2 procesos: hiperplasia e hipertrofia. Este último, conduce a un aumento de muerte celular de los adipocitos y con ello al reclutamiento de macrófagos para eliminar los restos celulares así como, una liberación de citocinas proinflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alpha e interleucina-6. Se ha demostrado que un aumento prolongado de TNF- α causa resistencia a la insulina al estimular las vías de JNK e IKK β -NF κ B que provocan un cambio en el residuo fosforilado de IRS1, fosforilando en Serina en lugar de tirosina (Chen, Chen, Wang, & Liang, 2015; Gao et al., 2002). causando una disminución en la activación de AKT, que da lugar a una disminución en la expresión o translocación de GLUT-4 (Rutkowski, Stern, & Scherer, 2015)

Existe evidencia de que algunas bacterias como *Faecalibacterium prausnitzii* correlacionan negativamente con marcadores inflamatorios, *F. prausnitzii* produce una proteína de 15 kDa llamada molécula antiinflamatoria microbiana (MAM), con propiedades antiinflamatorias. Esta proteína y/o péptidos derivados son capaces de inhibir la vía del factor nuclear NF κ B en las células intestinales (Quevrain et al., 2016). Por lo que un aumento en esta bacteria puede modular la inflamación sistémica y contribuir a la mejora de enfermedades como la diabetes (Medina-Vera et al., 2019)

Por lo anterior podemos decir que existen múltiples mecanismos metabólicos que asocian la microbiota con la obesidad y con sus trastornos relacionados, como la diabetes y el hígado graso, por lo que es interesante evaluar si otros factores como el uso de diferentes edulcorantes modifican la microbiota intestinal y esto se ve relacionado con inflamación de bajo grado y anomalías metabólicas como la resistencia a la insulina y la formación de hígado graso no alcohólico

Justificación

Los antecedentes sugieren que los diferentes edulcorantes calóricos y no calóricos debido a su estructura química diversa pueden modificar de manera diferencial a la microbiota, provocando cambios en el epitelio intestinal y un estado inflamatorio. Estos cambios pueden generar diferentes alteraciones en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, produciendo resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y una desregulación en la secreción de incretinas, propiciando así un incremento de la lipogénesis y posible desarrollo de esteatosis hepática. Por otro lado, al tener diferente estructura química pueden tener diferente afinidad hacia los receptores de dulzor y modificar su abundancia en tejidos extraorales, modulando el metabolismo energético de las células. Existe una gran confusión tanto para el consumidor como para el científico si los diferentes edulcorantes tienen un impacto benéfico o adverso sobre la salud. También existe confusión si todos generan un cambio similar sobre la microbiota intestinal. Además, no existe mucha información si los cambios en la microbiota se asocian con cambios en la expresión de los receptores del dulzor.

Hipótesis

Los edulcorantes no calóricos tendrán una menor diversidad de la microbiota intestinal, además de producir una disbiosis relacionada con un incremento de la intolerancia a la glucosa e inflamación. Los edulcorantes no calóricos propiciarán una mayor abundancia de los receptores de dulzor intestinales en comparación con los edulcorantes calóricos. Estas diferencias se verán en mayores dimensiones al combinar los edulcorantes con una dieta alta en grasa saturada.

Objetivos.

Principal

Determinar el efecto metabólico del consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos en combinación con una dieta alta en grasa saturada sobre parámetros bioquímicos y fisiológicos, así como la composición de la microbiota intestinal, la endotoxemia metabólica y la expresión de receptores de dulzor linguales e intestinales.

Específicos

1. Estudiar el efecto del consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos sobre la ingesta de alimento, ganancia de peso, composición corporal y gasto energético, en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada
2. Determinar el efecto del consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada, sobre la tolerancia a la glucosa.
3. Evaluar el efecto de los edulcorantes calóricos y no calóricos sobre parámetros bioquímicos séricos (glucosa, insulina, triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol total y colesterol LDL) en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada
4. Determinar la diferencia en proporción de principales phyla, géneros y especies de bacterias de la microbiota intestinal al final del tratamiento con edulcorantes calóricos y no calóricos en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada, así como su impacto en la producción de AGCC.
5. Conocer el efecto de los edulcorantes calóricos y no calóricos marcadores de inflamación en suero (LPS y TNF α) en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada

6. Evaluar el efecto sobre la abundancia de proteínas involucradas en la inflamación en intestinos de ratas que consumieron diferentes edulcorantes en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada
7. Analizar el efecto del consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada sobre los receptores del dulzor T1R2 y T1R3 linguales e intestinales
8. Evaluar el efecto de los edulcorantes en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada sobre la presencia de proteínas intestinales involucradas en el transporte de glucosa
9. Estudiar el efecto de los edulcorantes calóricos y no calóricos sobre la secreción de incretinas (GIP y GLP-1) en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada
10. Evaluar la abundancia de proteínas involucradas en la señalización de insulina (IRS y AKT) en musculo esquelético de ratas que consumieron diferentes edulcorantes en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada
11. Determinar el efecto del consumo de diferentes edulcorantes en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada sobre la expresión de genes lipogénicos y de oxidación de ácidos grasos en hígado
12. Estudiar el efecto a nivel histológico del consumo de diferente edulcorantes con y sin una dieta alta en grasa saturada, sobre el hígado y colon

Metodología.

A) Animales de experimentación

Se utilizaron 18 grupos con una n=6 por grupo, en total 108 ratas Wistar. Las dietas se prepararon en la planta piloto del departamento de tecnología de alimentos del INCMNSZ. Nueve grupos consumieron una dieta control (AIN-93) y 9 grupos una dieta alta en grasa (HFD). Los edulcorantes por probar fueron:

- | | | |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------|
| 1. Sacarosa (S) | 4. Mascabado (MAS) | 7. Glucósidos de steviol (GS) |
| 2. Glucosa (G) | 5. Miel de naranja (MI) | 8. Sucralosa (SU) |
| 3. Fructosa (F) | 6. Svetia® (STV) | 9. Agua |

Todos los edulcorantes se probaron al 10% en el agua de bebida, exceptuando GS al 2,5% y SU al 1,5%, debido a su alto poder edulcorante. El tratamiento fue administrado por un periodo de 120 días. En la tabla 1 se presenta la composición de las dietas utilizadas.

| TABLA 1. Composición de las dietas | | |
|------------------------------------|--------|---------|
| Dieta | AIN-93 | HFD |
| Ingrediente | % | % |
| Almidón | 39.749 | 23.903 |
| Caseína | 20 | 24 |
| Maltodextrina | 13.2 | 10.267 |
| Sacarosa | 10 | 7.778 |
| Aceite de soya | 7 | 7 |
| Celulosa | 5 | 5 |
| Mineral mix | 3.5 | 3.5 |
| Vitaminas mix | 1 | 1 |
| L-Cistina | 0.3 | 0.3 |
| Colina | 0.25 | 0.25 |
| TBHQ | 0.0013 | 0.00133 |
| Manteca | - | 17 |
| kcal/g | 3.8 | 4.8 |

B) Determinación de la curva de crecimiento e ingesta de los animales de experimentación

Se llevó a cabo un registro del crecimiento de los animales de experimentación. Para ello se registraron los pesos de los animales y de los comederos dos veces a la semana para obtener un promedio de los datos por tratamiento para realizar una curva de cambio en el peso corporal, así como de ingesta. Para determinar la ingesta calórica se pesaron los comederos de los animales y se midió el volumen de agua consumido, considerando la composición de la dieta y la energía por gramo que proporciona cada dieta

C) Determinación de la composición corporal de ratas alimentadas con diferentes edulcorantes con y sin una dieta alta en grasa saturada

Se determinó la composición corporal de todos los animales antes de recibir tratamiento (día 0) y a lo largo del estudio a los días 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 del estudio, mediante el uso de resonancia magnética cuantitativa utilizando el equipo ECHO-MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX) para rata. Esta metodología permitió obtener el contenido de grasa y masa magra de cada animal experimental, esta última correspondiente a músculo, huesos y tejidos de órganos (exceptuando el tejido adiposo)

D) Determinación del gasto calórico y del coeficiente respiratorio

Se realizó mediante el uso de una calorimetría indirecta con el equipo Oxymax-CLAMS Lab Animal Monitoring System (Columbus Instruments, Columbus, OH, EUA). Se colocaron a los animales en jaulas individuales cerradas herméticamente y conectadas a un sistema de flujo de aire. Después de un periodo de 12 h de aclimatación, se evaluaron en los diferentes grupos experimentales durante los periodos de ayuno y postprandio, el consumo de O₂

(VO₂, mL/kg/h) y la producción de CO₂ (VCO₂, mL/kg/h), dichos parámetros se midieron durante un lapso de 90 s, repitiendo la medición cada 22 min. El coeficiente respiratorio (RER) fue calculado como la relación entre el CO₂ producido respecto al O₂ consumido (Arch, Hislop, Wang, & Speakman, 2006).

$$RER = \frac{CO_{2\text{producido}}}{O_{2\text{consumido}}}$$

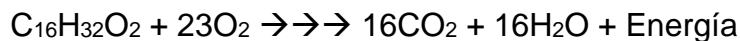
De este modo se puede determinar qué fuente de carbono se está oxidando

*Carbohidratos (glucosa)



$$RER = 6CO_2 / 6O_2 = 1.00$$

*Lípidos (ácido palmítico)



$$RER = 16CO_2 / 23O_2 = 0.70$$

*Proteínas

$$RER = 0.80$$

E) Determinación de la tolerancia a la glucosa

La determinación de la curva de tolerancia a la glucosa se realizó diez días antes de la eutanasia. Se mantuvieron a los animales en un ayuno durante las 8 horas previas al estudio. Se tomó una lectura basal haciendo una pequeña incisión en la punta de la cola de cada animal experimental para obtener una gota de sangre y leerla en el glucómetro FreeStyle Optium (Abbot Laboratories, AbbotPark, IL, EUA), el cual determina la glucosa mediante el uso de tiras reactivas al realizar la reacción de la glucosa oxidasa. Una vez obtenidos los niveles basales se realizó la administración vía intraperitoneal de una dosis de glucosa de 2g por kg de peso y se tomaron las lecturas de glucosa a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se determinó el área bajo la curva por el método del trapecioide.

F) Determinación de parámetros bioquímicos

Se tomó una muestra de sangre durante la eutanasia; para la obtención del suero. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos y se determinaron glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y HDL por métodos enzimáticos colorimétricos mediante el autoanalizador COBAS c111 de Roche®.

La insulina, el lipopolisacárido (LPS), adiponectina, leptina, GIP, GLP-1, TNF α e IL-10 se determinaron mediante ensayos de ELISA, el cual se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de manera tal que los conjugados tengan actividad tanto enzimática como inmunológica. Al estar uno de los componentes marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto será revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

G) Evaluación de factores genéticos hepáticos involucrados en el metabolismo de lípidos: SREBP-1, FAS, PPAR- α y CPT-1

Se cuantificó la expresión relativa de SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1), el cual es un factor transcripcional involucrado en la lipogénesis y también se evaluó su gen blanco FAS (fatty acid synthase). También se estudiaron genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos, como PPAR- α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) y CPT-1 (Carnitin Palmitoil Transferasa-1). Para ello se obtuvo RNA a de los hígados de las ratas, colocando aproximadamente 100 mg de tejido en un tubo para homogenizar en *tissue lyser* (QIAGEN) con 1 mL de Trizol y se agregó un balín de acero inoxidable, se mezcló e incubó por 5 min a temperatura ambiente el homogenizado, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para adicionar 200 μ L de cloroformo, se

vortexearon y se incubaron las muestras durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C y se transfirieron 600 µL de sobrenadante a un nuevo tubo, adicionándole 500 µL de isopropanol, se homogenizó e incubó las muestras por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante por inversión. Para lavar el producto se adicionó 1 mL de etanol frío al 75% y se vortexeó para despegar la pastilla, se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 4°C y se eliminó el etanol para repetir el lavado. Finalmente se dejó el tubo abierto por 20 min a temperatura ambiente para evaporar el etanol y se resuspendió el producto (RNA) en 200 µL de agua libre de nucleasas y se incubó por 5 min a 65 °C, se cuantificó mediante fluorometría (Qubit 3.0) y almacenó a -70°C. A partir de RNA ya cuantificado se obtuvo cDNA mediante el uso de un RT, finalmente para evaluar la expresión génica se realizó mediante qPCR, usando como genes estructurales ciclofilina y HPRT y una concentración de DNA de 40 ng por reacción, determinada mediante el uso de rangos dinámicos.

H) Evaluación de factores involucrados en inflamación y secreción de incretinas

Se cuantificó la expresión relativa de TLR4 (Toll-like receptor 4), un receptor involucrado en las cascadas de señalización proinflamatorias, GPR-43 (G protein-coupled receptor 43) que es el receptor de AGCC, particularmente acetato, GLP-1 (Glucagon-like peptide-1) y CCK (Cholecystokinin) que son incretinas. Para ello se obtuvo RNA a de los intestinos de las ratas de igual manera que en el apartado G, para la evaluación de la expresión génica se usó una concentración de cDNA de 80 ng por reacción, determinada mediante el uso de rangos dinámicos y como estructurales ciclofilina y actina.

I) Análisis histológico del hígado y colon

Se tomaron segmentos de hígado y colon y se fijaron en formol-fosfato, para después incluirlos en bloques de parafina, para ello las muestras se deshidrataron en baños sucesivos de soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico de la siguiente manera:

- 1) Alcohol etílico al 70%, 12 horas.
- 2) Alcohol etílico al 70%, 12 horas.
- 3) Alcohol etílico al 95%, 1 hora.
- 4) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1 hora.
- 5) Alcohol etílico al 100% (absoluto), 1.5 horas.

Una vez que las muestras se encontraban totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto, se procede a la diafanización ya que la parafina no es soluble en alcohol. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes. El procedimiento de diafanización se realizó de la siguiente manera:

- 1) Alcohol absoluto 50% - xilol 50%, 1 hora.
- 2) Xilol 100%, 1 hora.
- 3) Xilol 100%, 1 hora.

Para poder realizar los cortes, las muestras se incluyeron en parafina, para lo cual la parafina se disolvió usando una estufa y se colocaron en 3 recipientes, el primero recibió las muestras embebidas en xilol. El último de los recipientes contenía a las muestras antes del proceso de formación de los “bloques” de parafina. Los tiempos de este proceso fueron: primer baño 1.5 h, segundo baño 1 h y tercer baño 30 min. La inclusión de parafina se efectuó empleando moldes de metal, con orientación de las muestras adecuada, para facilitar los cortes. Para la inclusión, el molde elegido se llenó con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se tomó una pieza de tejido del tercer recipiente y se

colocó con la orientación deseada, se sumergió al interior del molde, una vez que la parafina empezó a solidificarse los moldes se enfriaron de inmediato para que la parafina se solidificara de manera homogénea. Una vez obtenidos los bloques de parafina, se realizaron cortes con un grosor de 4 micras para hígado y 3 micras para colon de manera seriada. Las secciones se extendieron y se recogieron al adherirse al portaobjetos. Sobre dichas laminillas se realizaron tinciones de Hematoxilina-eosina (HE), finalmente se montaron y observaron al microscopio (Leica DM750 Wetzlar, Alemania), los cortes se fotografiaron con una cámara digital (Leica DMC2900, Wetzlar, Alemania), y se procesaron con el software de imágenes Leica LAS Core V4.5.

J) Análisis de proteínas relacionadas con inflamación, señalización de insulina, receptores de ácidos grasos de cadena corta y de dulzor

Se extrajo la proteína total de muestras de lengua, hígado, diferentes secciones de intestino y músculo esquelético usando el *tissue lyser* y buffer RIPA, dichas proteínas, se cuantificaron mediante el ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y se almacenaron a -70 °C. Para el análisis de abundancia de proteína se usaron geles de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes y en cada pozo se cargaron 30 µg de proteína, se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquearon con BSA al 3% en TBS-tween durante 60 minutos a temperatura ambiente y se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente. Para revelar, al día siguiente después de lavarse e incubarse con el anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios usados fueron: anti-TLR4 (Santa Cruz, SC-293072) en una dilución 1:1000, anti-TLR2 (Santa Cruz, SC-10739) en una dilución 1:1000, anti-NFκB (Santa Cruz, SC-372,) diluido 1:1500, anti-occludina (abcam, AB167161) diluido 1:100,000, anti-GPR41 (LSBio, LS-C357088-100) diluido 1:1500, anti-GPR43 (Santa Cruz, SC-32906) diluido 1:500, anti-IRS1 (Millipore, 05-1085) diluido 1:750, anti-pIRS1 (S307) (Millipore, 05-1087) diluido 1:2500, anti-pIRS1 (Y896) (abcam, AB4873)

diluido 1:3500, anti-AKT (Santa Cruz, SC8312) diluido 1:3000, anti-pAKT (Santa Cruz, SC-7985-R,) diluido 1:5000, anti-GLP-1 (abcam, ab200474) diluido 1:2500, anti-GIP (abcam, ab25973) diluido 1:3000, anti-T1R2 (abcam, ab77346) diluido 1:1500 y anti T1R3 (santa cruz, sc-22458) diluido 1:1000. Las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios anti-conejo (abcam AB6721), anti-cabra (abcam, ab6789) o anti-ratón (abcam AB6789) conjugados con peroxidasa de rábano (1:20000). Se usó GAPDH (abcam, ab181602) (1:50000) para normalizar los datos. Las imágenes se tomaron con el ChemiDoc™ XRS y se analizaron con el software System Image Lab™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los ensayos se realizaron tres veces usando membranas independientes.

K) Secuenciación por síntesis de la microbiota intestinal (16S rRNA) en la plataforma MiSeq de Illumina

Se realizó una toma de muestra de heces fecales al final del estudio, de la cual se hizo una extracción de DNA mediante el QIAamp DNA Mini Kit Stool (QIAGEN, Cat. 51504), posteriormente se cuantificó mediante NanoDrop 2000, Qubit 3.0 y electroforesis capilar, para aplicar la técnica de secuenciación masiva en la plataforma MiSeq de Illumina. Dicha plataforma se basa en secuenciación por síntesis, para ello se generaron bibliotecas genómicas de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA, usando primers para dichas regiones que además contenían un adaptador overhang, propio de Illumina (F:5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' y R: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTACHVGGGTATCTAA TCC-3'). Los amplicones de las regiones V3 y V4 se generaron mediante reacciones de PCR con un volumen total de 25 µL, de los cuales 2.5 µL fueron de DNA genómico (a una concentración de 5 ng/µL en Tris 10 mM, pH 8.5), 12.5 µL de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 µL de cada primer (1µM). Esta mezcla se metió al termociclador y se corrió mediante el siguiente programa: desnaturalización 3 min a 95 °C, seguido de 25 ciclos

amplificación los cuales consistieron desnaturalización (30s a 95 °C), alineamiento (30s a 55 °C) y extensión (30s a 72 °C). La extensión final consistió en 5 min a 72 °C. Los amplicones fueron purificados mediante el uso de perlas magnéticas AMPure XP beads y se verificó su tamaño en una electroforesis capilar en el QIAxcelAdvanced System (QIAGEN, CA, USA), el tamaño aproximado es de 550 pb. Una vez pasado el control de calidad se procedió a indexar las muestras usando los adaptadores de Illumina Nextera XT Index Kit (v.2, Set A). Para este proceso se tomaran 5 µL del primer producto de PCR, 25 µL de High Fidelity DNA polymerase 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix y 5 µL de cada primer (Índice), teniendo un volumen total de 50 µL los cuales se mezclaron y se metieron de nuevo al termociclador, corriendo el siguiente programa 3 min a 95°C, seguido de 8 ciclos amplificación los cuales consistirán desnaturalización (30s a 95°C), alineamiento (30s a 55°C) y extensión (30s a 72°C). La extensión final consistió en 5 min a 72°C. Este producto se purificó y se evaluó su integridad como el anterior. Estos amplicones tuvieron un tamaño aproximado de 610 pb. Se determinaron las concentraciones de DNA de doble hebra con fluorimetría (fluorometer Qubit 3.0, high sensitive kit). La librería final se mezcló de manera equimolar y se secuenció en la plataforma de Illumina MiSeq (MiSeq Reagent Kit V.3, 600 cycles) siguiendo las instrucciones del proveedor, generando lecturas de 300 bases en cada dirección. Finalmente, los datos obtenidos, se analizarán usando QIIME v.1.9, las lecturas se asignaron a los niveles de phylum, clase, orden, familia y género, usando la comparación de las OTUs con QIIME con el método RDP. Respecto a las abundancias de OTUs, se calcularon incluyendo matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos.

L) Análisis del metagenoma por secuenciación shot-gun en muestras fecales de ratas que consumieron diferentes edulcorantes en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa saturada

Se recolectó una muestra fecal de todos los animales después de 120 días de tratamiento con diferentes edulcorantes. Las muestras fecales se congelaron a -80°C . La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el mini kit QIAamp DNA Stool (Qiagen, EE. UU.), De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se etiquetó el ADN genómico con el kit Nextera XT. Este paso utiliza el transposoma Nextera para marcar el ADNg, en un proceso que fragmenta y etiqueta el ADN con secuencias adaptadoras. Se usaron las perlas magnéticas Ampure XP para purificar las bibliotecas, y se evaluaron en Qiaxcel Advanced System (QIAGEN, CA, USA). La distribución del tamaño de las bibliotecas generadas fue de 250-1000 pb. Para el indexado de las bibliotecas se usaron los índices IDT Nextera de Illumina. La concentración de ADN bicatenario se midió utilizando el fluorómetro Qubit 3.0 con el kit de alta sensibilidad y las bibliotecas finales fueron normalizadas para poder secuenciarlas en la plataforma Illumina HiSeq2500 (HiSeq Rapid Cluster Kit v2) a una concentración final de 11 pM con una infección de Phix al 1%. Después de la secuenciación por síntesis en la plataforma HiSeq Illumina se ensamblaron las secuencias con IDBA-UD para obtener contigs con una longitud promedio aproximada de 700 pb. Se tomaron los genes de codificación de proteínas y se anotaron con PROKKA. Los genes se reportaron con una homología el 90% y longitud de alineamiento el 95% usando CD-hit. Se hizo un análisis de conglomerados teniendo una reducción al 64.4%. Se estudió la diversidad genética por tratamiento utilizando el índice de diversidad de Margalef corregido por FDR. Posteriormente se analizaron los metagenomas usando las tablas de recuento de genes normalizados y se compararon con una matriz de disimilitud binomial en Vegan para representarse en un PCoA. Finalmente se determinó la abundancia de genes diferenciales usando el algoritmo DESeq2 que ejecuta una prueba de Wald binomial negativa y encuentra una significancia estadística con el cambio en el registro de los

genes dividido por el error estándar. Se usó un análisis de 2 factores para comparar tipo de azúcar y presencia de grasa

M) Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism v7.0 utilizando ANOVA de dos vías, seguido de la prueba post-hoc Tukey. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media. Las diferencias entre las medias grupales se consideraron significativas con $p < 0.05$. Los valores atípicos se eliminaron según el método ROUT de detección de outliers.

Resultados.

I. Curva de crecimiento e ingesta de alimento en ratas Wistar

a) Curva de crecimiento de ratas Wistar que consumieron una dieta control

A continuación, se muestra la curva de crecimiento de los grupos alimentados con una dieta control, con un % de grasa como lo recomienda el AIN93 y 10% de cada edulcorante en el agua de bebida, exceptuando los glucósidos de steviol que sólo se le dio a una concentración de 2.5% y sucralosa que fue administrada al 1.5%. Estos tratamientos se administraron por un periodo de 120 días (Figura 2A). El grupo que consumió sacarosa es el que más ganó peso, siendo 32% mayor respecto al grupo con agua simple, seguido de los grupos que consumieron edulcorantes no calóricos siendo esta diferencia del 12.2% con el consumo de stevia y del 11.2% con el consumo de sucralosa, respecto al grupo control. Por otro lado, los grupos con monosacáridos (glucosa y fructosa) no tuvieron una diferencia significativa, siendo del 4.3% más al consumir glucosa y del 3% menos al consumir fructosa, respectivamente. Por otra parte, aquellos grupos que consumieron edulcorantes calóricos con menor refinación, es decir mascabado, miel y glucósidos de steviol tuvieron pesos similares, al grupo control (Figura 2A y C)

b) Curva de crecimiento de ratas Wistar que consumieron una HFD

Para evaluar el efecto de la combinación de una dieta alta en grasa saturada con diferentes edulcorantes en el agua de bebida, se les alimentó a estos grupos con una dieta modificada de la AIN93 con 17% de manteca de cerdo (HFD) y los edulcorantes antes mencionados en el agua de bebida y un grupo control con la HFD y agua simple. Como se puede observar en la Figura 2B, el grupo HFD+Sacarosa fue el que obtuvo un mayor peso corporal, seguido del grupo que consumió HFD+Stevia, siendo esta ganancia de peso 14.6% y 1.8% mayor que

el grupo que solo consumió una dieta alta en grasa saturada con agua simple. Cabe mencionar, que el grupo HFD sin adición del edulcorante tuvo un incremento en la ganancia de peso del 43.3% respecto al grupo control (AIN-93). Interesantemente, el resto de los edulcorantes en combinación con una HFD tuvieron ganancias de peso menores pero muy similares al grupo HFD+agua. Finalmente, en contraste con lo observado en los grupos con una dieta control, los grupos que consumieron la HFD en combinación con glucósidos de esteviol y sucralosa tuvieron una menor peso corporal que el resto de los edulcorantes siendo 14% y 14.1% menor respecto al grupo HFD+agua (Figura 2 B y C)

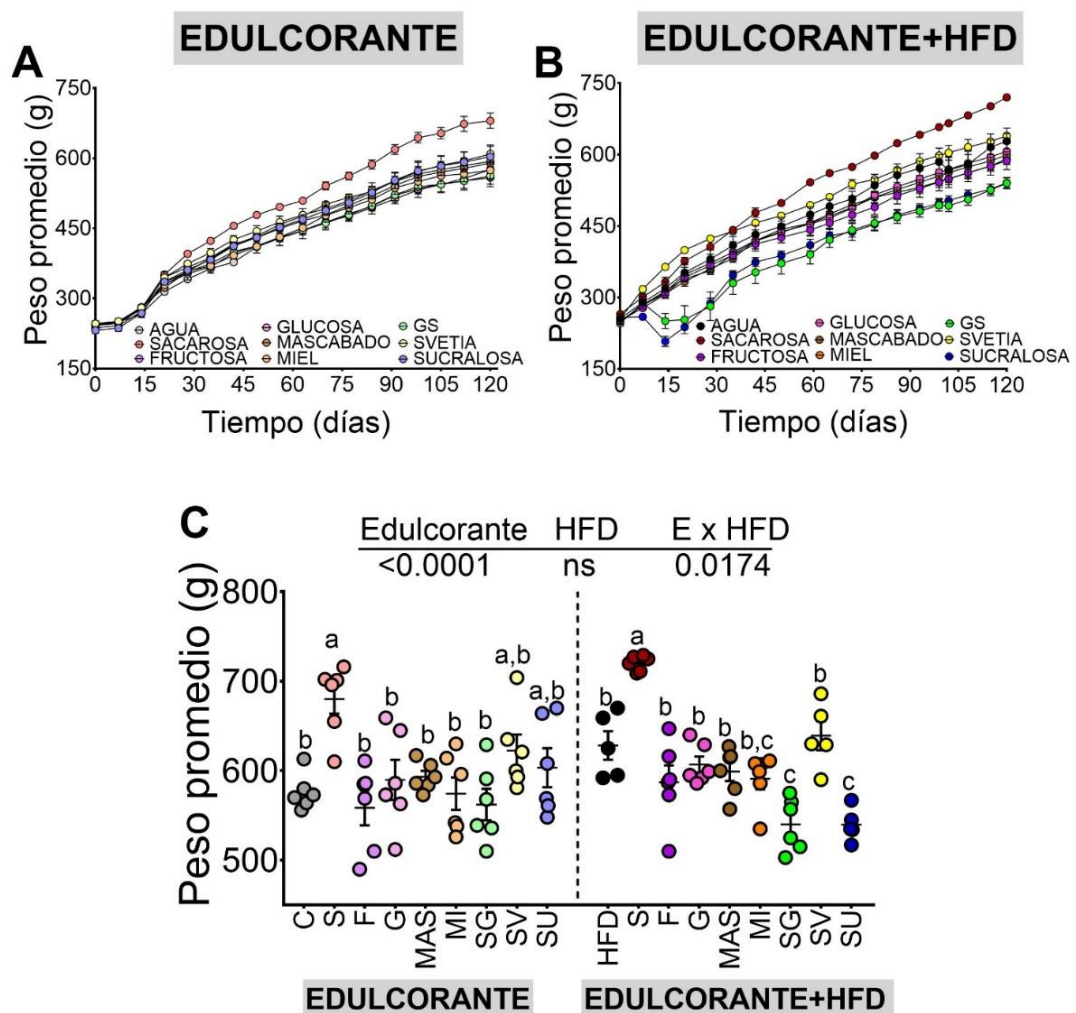


Figura 2. Determinación de la ganancia de peso. A) Ganancia de peso de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control. B) Ganancia de peso de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa. C) Peso final después de 120 días de en ratas Wistar macho alimentadas con edulcorantes en el agua de bebida con y sin una dieta alta en grasa. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c$, $p<0.05$

c) Ingesta calórica de ratas Wistar macho que consumieron diferentes edulcorantes en combinación con una dieta control o una HFD

Para determinar si la ingesta calórica tuvo un impacto sobre la ganancia de peso se monitoreo tanto la ingesta de alimento como el consumo de agua para así calcular la ingesta de energía total. Respecto a la ingesta de alimento se puede apreciar que los grupos alimentados con dieta control consumían una mayor cantidad de alimento, en particular, los grupos con edulcorantes no calóricos (Figura 3A).

Respecto a la ingesta de agua se observa que los grupos con edulcorantes calóricos consumían un mayor volumen de agua. También se observa que los grupos con una dieta control tuvieron un mayor consumo de agua con respecto a los grupos con una dieta HFD (Figura 3B).

Al hacer el calculo de la ingesta calórica total se puede apreciar no existe diferencia significativa entre grupos ni con dieta control ni con HFD exceptuando a los que consumieron glucósidos de esteviol y sucralosa ya que interesantemente ambos en combinación con una dieta control aumentaron su ingesta calórica respecto al resto de los edulcorantes y en caso de combinarse con una HFD se observo el patrón inverso (disminución de la ingesta calórica). Por lo que los cambios en peso en estos grupos en particular pueden deberse parcialmente a estas diferencias en la ingesta calórica (Figura 3C)

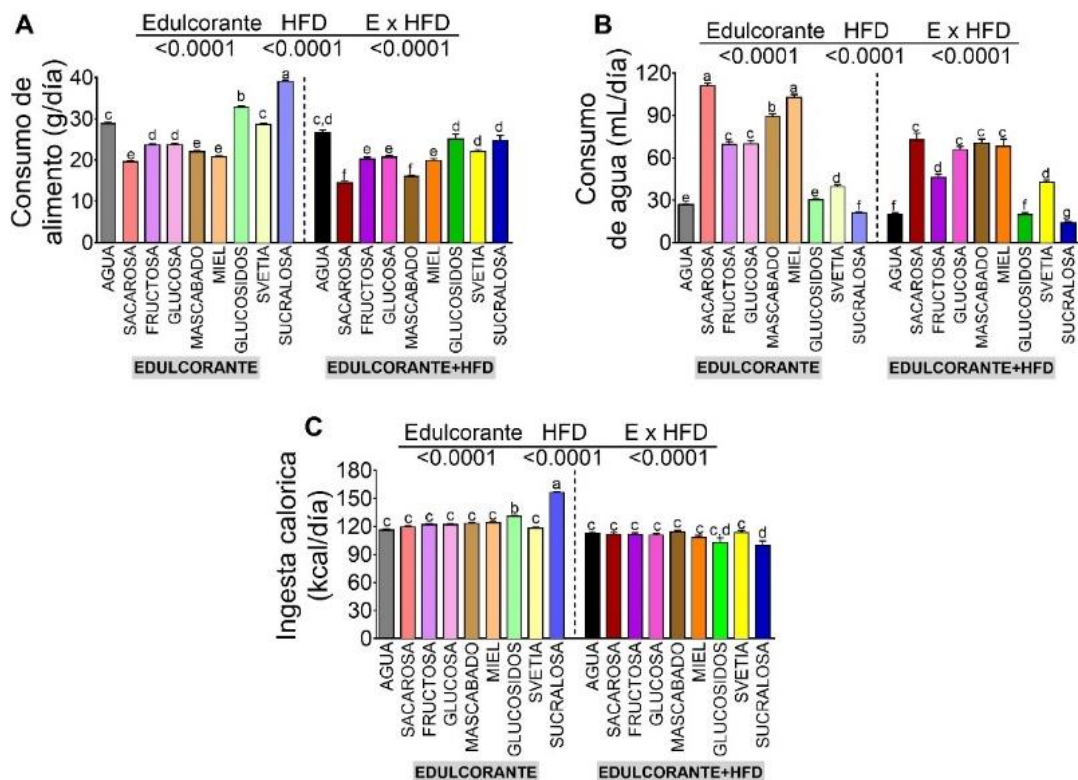


Figura 3. Determinación de la ingesta. A) Consumo de alimento de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control o una HFD en combinación con diferentes edulcorantes. B) Consumo de agua de ratas Wistar macho alimentadas con diferentes edulcorantes en el agua de bebida con y sin una dieta alta en grasa. C) Ingesta calórica de ratas alimentadas con una dieta control o una HFD en combinación con diferentes edulcorantes. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a > b > c > d$, $p < 0.05$

II. Evaluación de la composición corporal de ratas alimentadas con diferentes edulcorantes con y sin una dieta alta en grasa saturada

Como se puede observar en la Figura 4, respecto al uso de edulcorantes en ausencia de una dieta alta en grasa, los animales alimentados con sacarosa al final del estudio tenían 31% de grasa corporal seguidos de las alimentada con sucralosa con un 27.3% de grasa corporal, a diferencia de esto, los animales alimentados con glucosa o fructosa tenían 25 y 24% de grasa corporal, respectivamente. Curiosamente, los grupos con menor masa grasa fueron los que consumieron GS, miel y mascabado con 18.9%, 19.6% y 21%, respectivamente, mientras que el grupo C tenía 22% de grasa corporal (Figura 4A). Por otra parte, el grupo que perdió más

masa magra fue el grupo alimentado con sacarosa, en el que las ratas perdieron aproximadamente el 30.3% de masa magra, seguido por el grupo de sucralosa, con una pérdida del 24.8%. Los grupos que perdieron la menor cantidad de masa magra fueron glucósidos de steviol (13.6%), miel (14.2%) y mascabado (15%) (Figura 4B). Al combinar los edulcorantes con una HFD, el mayor porcentaje de grasa corporal se observó en el grupo alimentado con una dieta alta en grasas (HFD) en combinación con sacarosa siendo del 45.4%, seguido de los grupos alimentados solo con HFD con un 32.9% y HFD+fructosa 31.3%. Los grupos con el porcentaje más bajo de grasa corporal fueron HFD+sucralosa con 23.4% y HFD+ glucósidos de steviol con un 26.1% (Figura 4C). Finalmente, respecto a la masa magra los grupos con de mayor pérdida fueron los alimentados con HFD+sacarosa y HFD (Figura 4D).

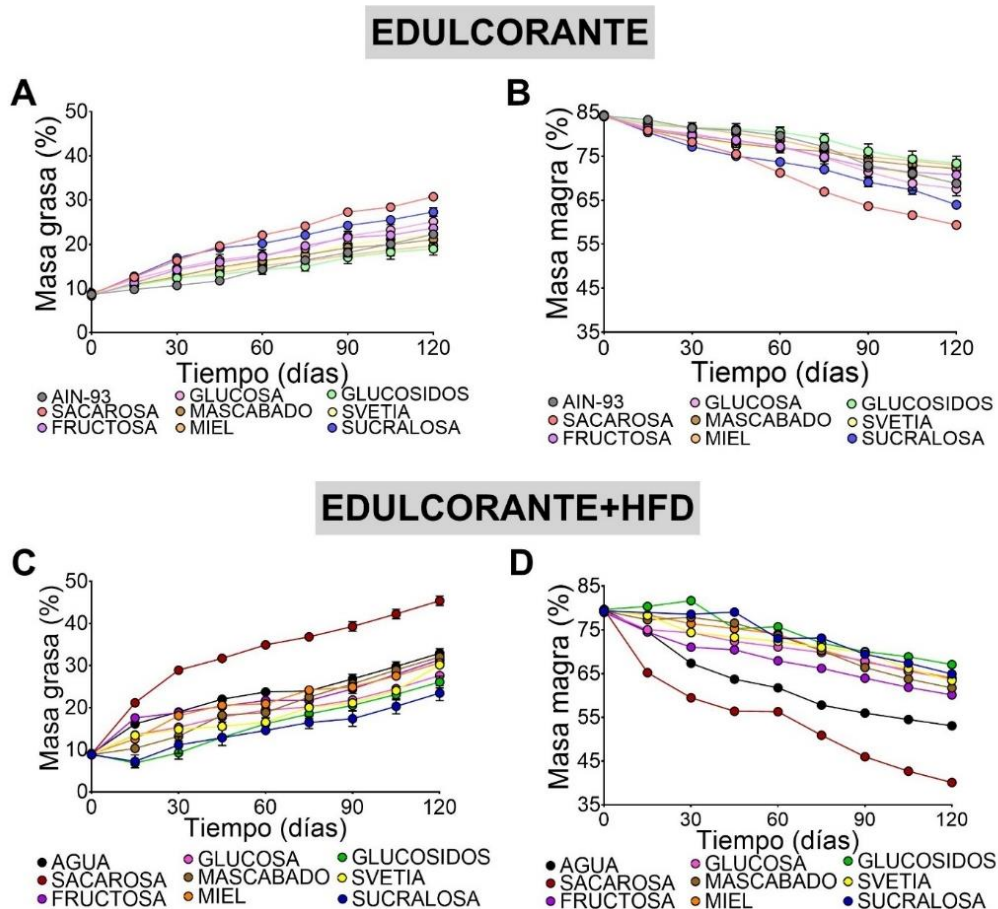


Figura 4. Determinación de la composición corporal. A) Masa grasa de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control. B) Masa grasa de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa. C) Masa magra de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control. D) Masa magra de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa. Los datos se presentan en promedio \pm EEM.

III. Determinación del coeficiente respiratorio y el gasto calórico

Dado que los cambios en la composición corporal se han asociado a cambios en el gasto calórico, se determinó el coeficiente de intercambio respiratorio (RER) de los grupos después del tratamiento (120 días) en la dieta por medio de calorimetría indirecta determinando el volumen de oxígeno. En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos para el RER y el volumen de oxígeno. En la Figura 5A y B se muestra dicho coeficiente en intervalos de 22 min, y el área sombreada representa la noche es decir cuando la ingesta de alimento es mayor en los roedores. En la Figura 5C y D se muestran los valores promedio tanto en periodo de ayuno (día) y postprandio (noche).

Respecto a los grupos con una dieta control, durante el periodo de ayuno todos tienen un RER cercano a 0.7 debido a que oxidan ácidos grasos, exceptuando el grupo alimentado con sucralosa que muestra un RER de 0.65, lo que podría representar un estado de cetosis. Durante la noche (postprandial) la mayoría de los grupos tienden a subir el RER alrededor de 1, exceptuando los alimentados con sveltia y sucralosa que presentan un metabolismo mixto (Figura 5A y C). En el caso de los grupos alimentados con una dieta alta en grasa, durante el ayuno todos muestran un RER aproximado a 0.7, mientras que en el postprandio los grupos con un RER cercano a 0.9 son los que están en combinación con miel, mascabado o glucósidos de esteviol, el resto muestra un metabolismo mixto y de manera notable el grupo con HFD y sacarosa tiene una inflexibilidad metabólica, es decir, no pueden cambiar tan rápidamente de sustrato a oxidar para la obtención de energía (Figura 5B y D). Finalmente, los grupos con una dieta control y que consumían mascabado, miel o glucósidos de esteviol mantienen el mismo gasto calórico que el grupo control, la adición de una HFD disminuyó el gasto calórico en todos los casos con mayor efecto en combinación con sacarosa o sucralosa (Figura 5E)

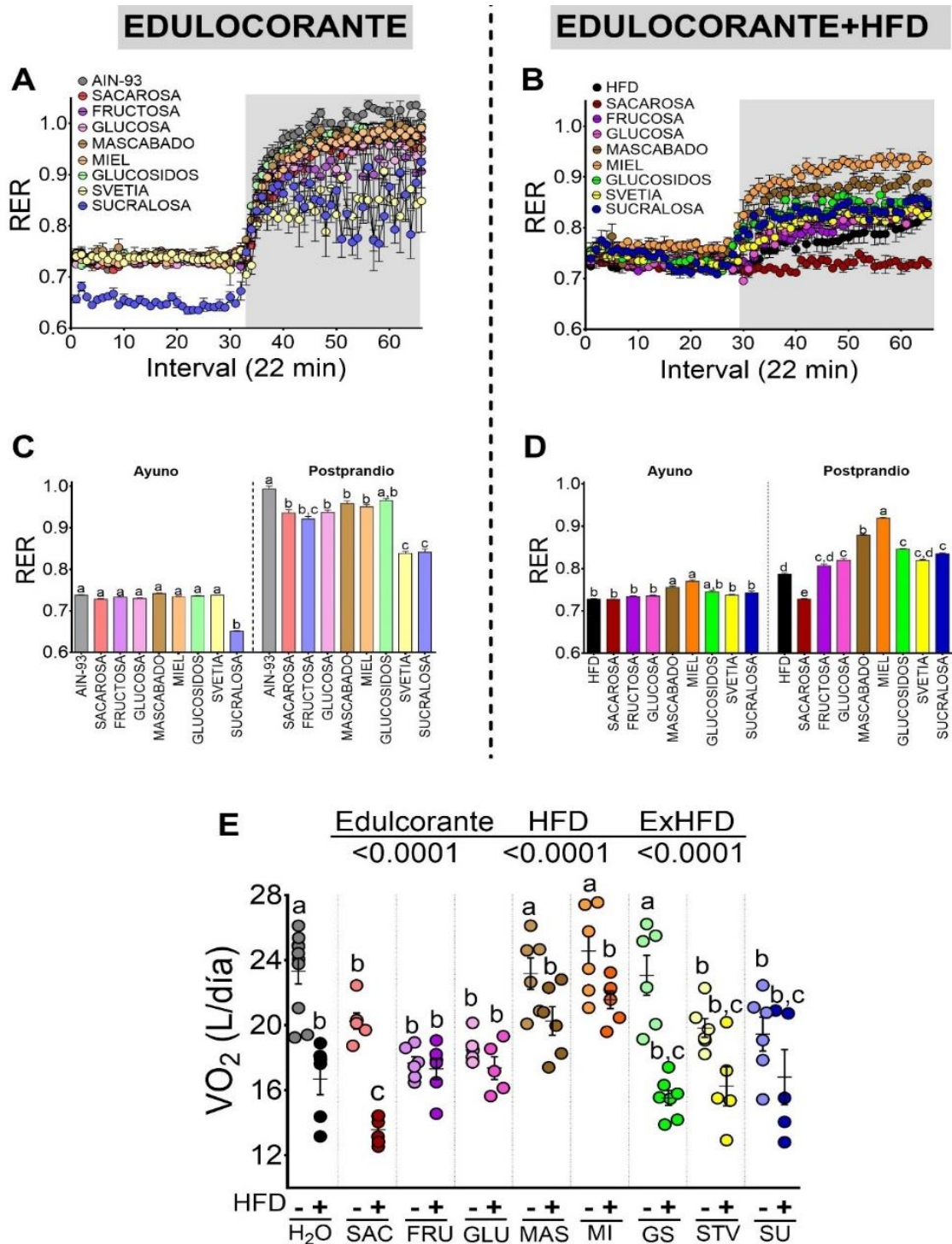


Figura 5. Determinación de coeficiente respiratorio y gasto calórico. A) Coeficiente respiratorio de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control. B) Coeficiente respiratorio de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa. C) RER promedio en ayuno y postprandio de los grupos con una dieta control. D) RER promedio en ayuno y postprandio de los grupos con una HFD. E) Gasto calórico de ratas alimentadas con edulcorantes en combinación con una dieta control o una HFD. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d$, $p<0.05$

IV. Curva de tolerancia a la glucosa (CTG)

Al realizarse la prueba de tolerancia a la glucosa se observó que el grupo control incrementó los niveles séricos de glucosa entre los 15 y 30 min después de la administración y disminuyeron de manera gradual hasta regresar a los niveles basales a los 120 min posteriores a la administración, este comportamiento fue similar en los grupos que consumieron una dieta control, a excepción de los que se les administro sacarosa o sucralosa (Figura 6A). En el caso de los grupos alimentados con una HFD también mostraron un mayor incremento en la glucosa sérica a los 30 y 60 minutos posteriores a la administración, pero sin poder retornar a los niveles basales aún después de un periodo de 2 horas, lo que sugiere una resistencia a la insulina, después de este periodo, los niveles de glucosa mas altos los mostraron los animales tratados con una HFD en combinación con sacarosa o sucralosa (Figura 6B).

Se determino el área bajo la curva (ABC) en todos los grupos por el método del trapezoide. Las mayores áreas bajo la curva fueron de los grupos HFD+sacarosa, HFD+sucralos y HFD+svetia siendo este incremento del 157%, 153% y 110% respectivamente en comparación con el grupo control (AIN93). Otro dato interesante es que la simple adición de grasa a la dieta genero un incremento en el área bajo la curva de un 47.8% respecto al grupo AIN-93. Los edulcorantes que en combinación tuvieron un mayor impacto en el ABC fueron sacarosa y sucralosa ya que en combinación con una dieta control mostraron un incremento del 112% y 89% del ABC respecto al grupo control. Finalmente, los grupos alimentados con una dieta control en combinación con glucósidos de steviol, mascabado y miel, mostraron una ligera (11%-13%) disminución del área bajo la curva respecto al grupo AIN-93. (Figura 6C)

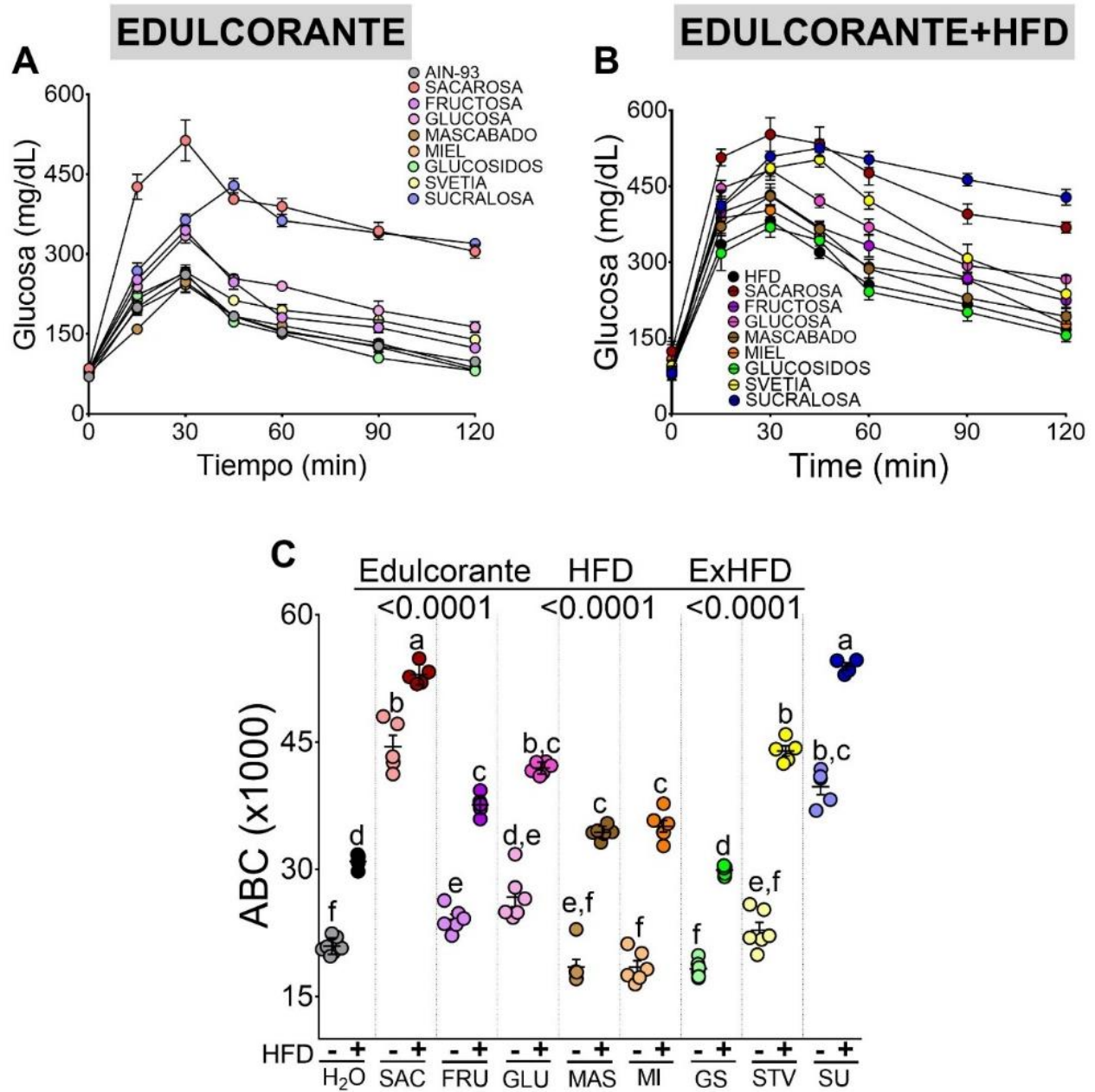


Figura 6. Determinación de la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal. A) Curva de tolerancia a la glucosa de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta control. B) Curva de tolerancia a la glucosa de ratas Wistar macho alimentadas con una dieta alta en grasa. C) Área bajo la curva de la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal de ratas alimentadas con edulcorantes en combinación con una dieta control o una HFD. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

V. Cuantificación de parámetros bioquímicos en suero

Se determinaron los parámetros bioquímicos en ayuno de glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y ácidos grasos libres, después del tratamiento (dieta control o dieta alta en grasa) con o sin edulcorantes en el agua de bebida. Respecto a la glucosa, todos los grupos muestran valores dentro del rango considerado normal en ratas Wistar (85-132 mg/dL), exceptuando a los que consumieron sacarosa, glucosa, sveltia o sucralosa, ya sea en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa, lo que sugiere que estos edulcorantes promueven el incremento de los niveles basales de glucosa independientemente de la dieta, aunque se observa una sinergia al consumir una dieta alta en grasa. El único edulcorante que mostro un incremento de la glucosa en combinación con una HFD pero no con una dieta control fueron los glucósidos de esteviol (Figura 7).

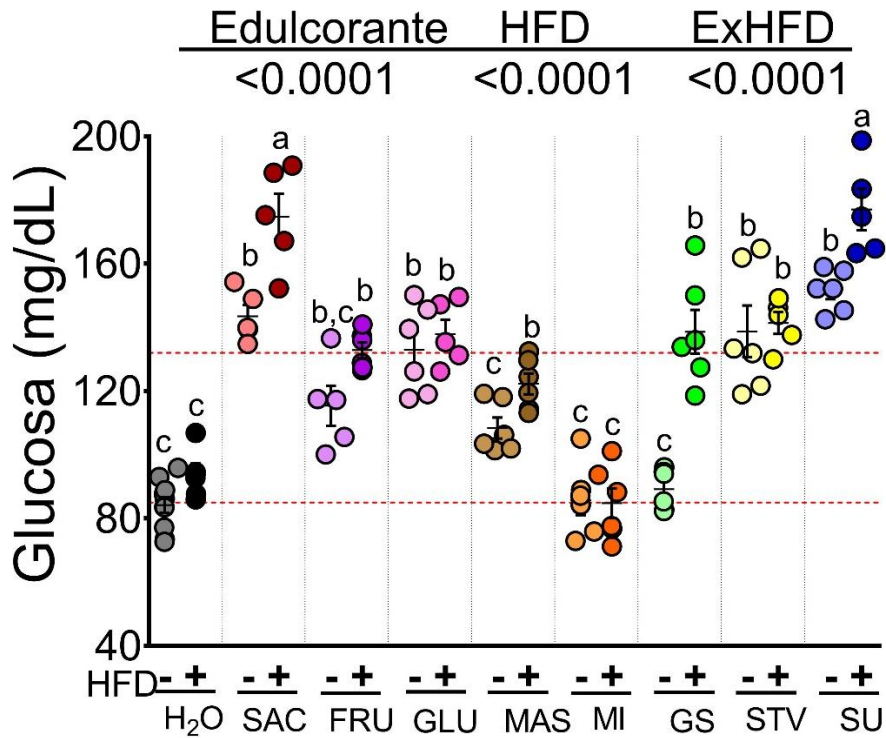


Figura 7. Determinación de la glucosa sérica en ayuno de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c$, $p<0.05$

Respecto a los lípidos séricos, en el caso de los triglicéridos, se observa que al consumir una dieta control, los grupos con sacarosa y sucralosa aumentan los valores séricos, viéndose pronunciado con la adición de una dieta alta en grasa saturada. Por otro lado, aunque en los grupos con dieta control los grupos con GS, mascabado o miel mantienen niveles de lípidos similares al control, al adicionar la HFD, el grupo con glucósidos de esteviol pierde este efecto incrementando de manera significativa los lípidos séricos (Figura 8A). En el caso del colesterol, se observa un patrón similar, aunque los grupos con sucralosa no salen del rango normal (Figura 8B).

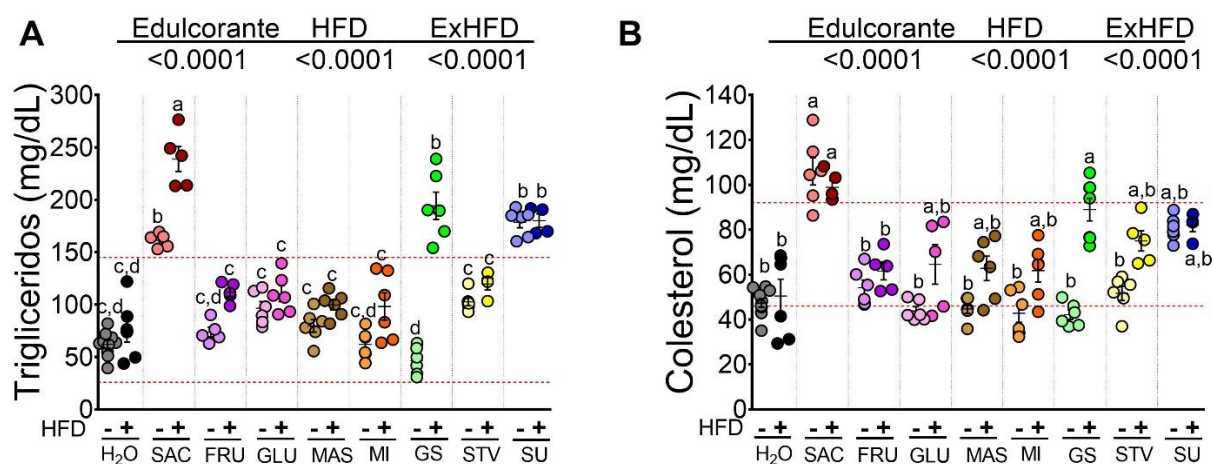


Figura 8. Determinación de lípidos en sueros de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida A) Triglicéridos en ayuno. B) Colesterol total en ayuno. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d$, $p<0.05$

Por otro lado, al evaluar el colesterol LDL que es responsable de incrementar el riesgo de alteraciones cardiovasculares, se observa que las ratas que consumieron sucralosa, aún en ausencia de una HFD, muestran un incremento significativo de este de 3 veces respecto al grupo control y de 4.5 veces al combinarla con una HFD (Figura 9A). Al evaluar los ácidos grasos libres, podemos observar que estos se ven incrementados con el consumo de sucralosa con o sin una HFD y con sacarosa cuando esta se combina con una dieta alta en grasa (Figura 9B).

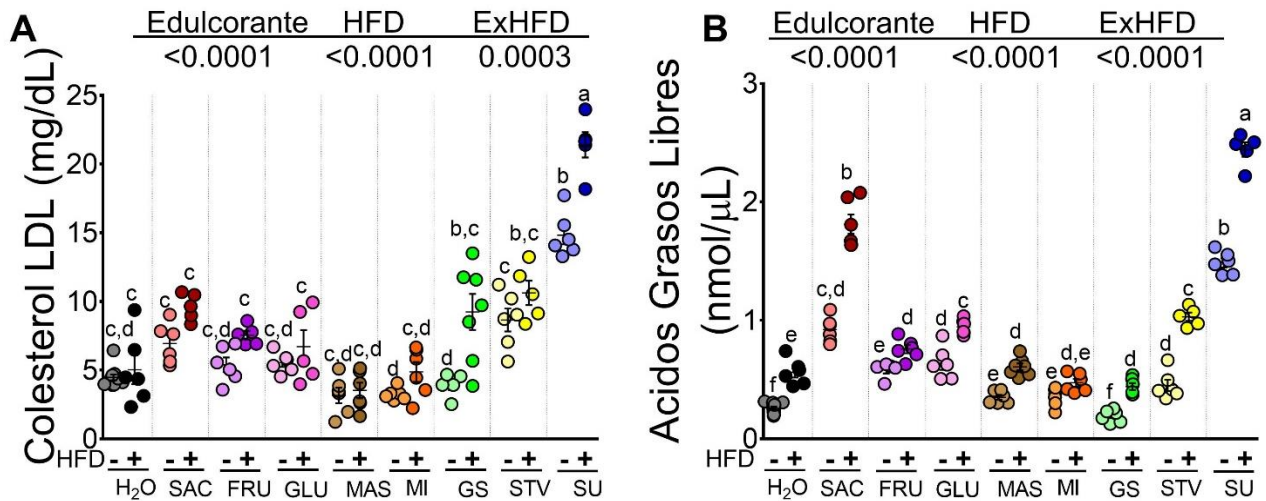


Figura 9. Determinación del colesterol LDL y ácidos grasos libres en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. A) Colesterol LDL en ayuno. B) Ácidos grasos libres en ayuno. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

VI. Determinación de incretinas, hormonas y endotoxemia metabólica

La sucralosa y la sacarosa fueron los principales estimuladores del polipéptido insulotrópico dependiente de glucosa (GIP) y el péptido semejante al glucagón tipo 1 (GLP-1). Los edulcorantes con menor grado de refinación (glucósidos de esteviol, miel y mascabado) mostraron niveles similares al control de estas incretinas. La presencia de una dieta con alto contenido de grasa mostró un efecto aditivo en la concentración de GIP y GLP-1 circulante, indicando que no sólo el tipo de edulcorante sino la presencia de una HFD juega un papel importante en la regulación de los niveles de incretinas circulantes (Figura 10), esto es importante ya que ambas moléculas son los principales responsables de la secreción de insulina, posterior a la ingesta de nutrientes. Esto podría estar relacionado, parcialmente, con un cambio en los receptores de dulzor en el intestino, lo cual promueve la síntesis y secreción de estas moléculas.

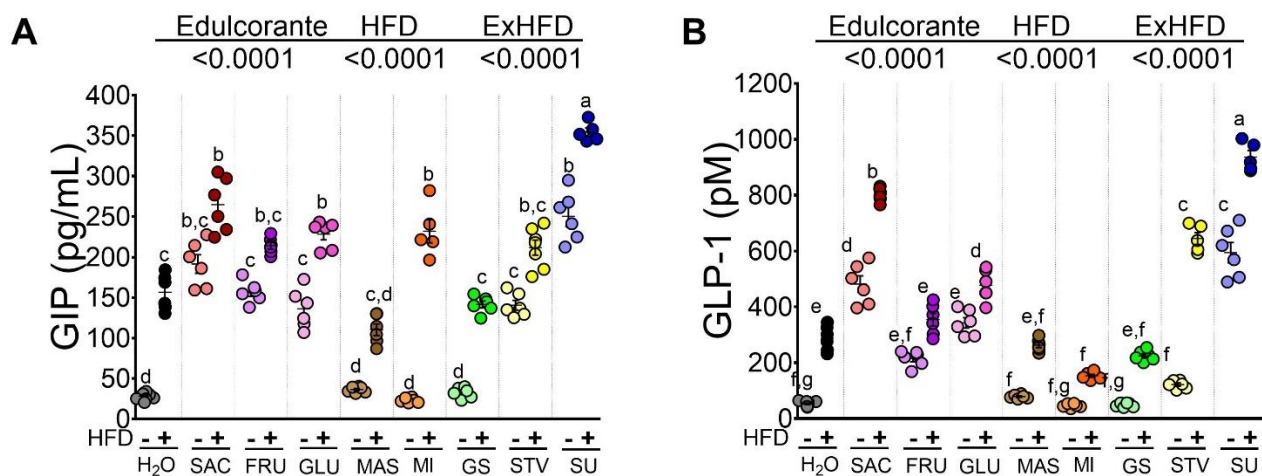


Figura 10. Determinación de incretinas en ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. A) Polipéptido insulotrópico dependiente de glucosa en ayuno. B) Péptido semejante al glucagón tipo 1 en ayuno. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f>g$, $p<0.05$

Por otro lado, estas incretinas están estrechamente relacionadas con la secreción de insulina, por lo cual se evaluaron los niveles de la misma en suero. En la Figura 11 se puede observar que las ratas que consumieron sacarosa incrementaron 19.8 veces la concentración sérica de insulina, aunque este incremento fue mayor en el grupo con sucralosa, que tuvo un incremento de 25.8 veces respecto al grupo control, esto se exacerbó con la adición de una dieta alta en grasa, teniendo concentraciones 27 y 44 veces incrementadas respecto al control. En general, los grupos con una HFD tuvieron un incremento en la secreción de insulina, siendo medianamente atenuado este incremento con el consumo de miel. Ya que sólo fue de 1.5 veces más respecto al control. Estos resultados sugieren que posiblemente los valores de glucosa se mantienen en un rango normal a expensas de una hiperinsulinemia, por lo que podría existir una resistencia parcial a la insulina en órganos periféricos.

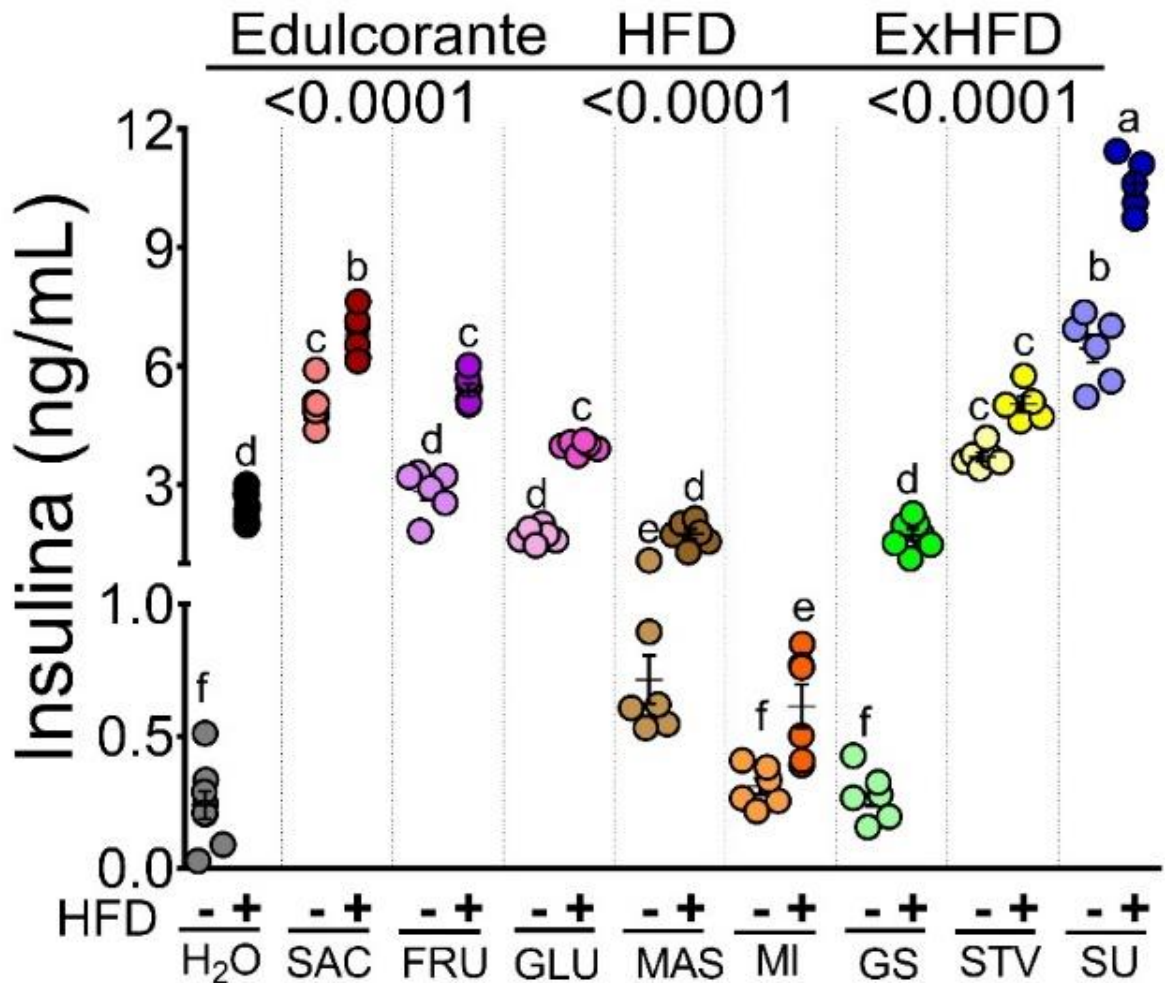


Figura 11. Determinación de insulina en ayuno de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

La homeostasis de la glucosa está regulada no solo por la insulina, sino también por la leptina. Ambas hormonas actúan centralmente, regulando la ingesta de alimentos y la adiposidad. La leptina es una adipocina que se ha demostrado que aumenta en relación con el incremento de masa grasa. Curiosamente, aunque las ratas alimentadas con sucralosa, sacarosa o sveltia tenían un porcentaje de grasa corporal similar, las alimentadas con sucralosa desarrollaron una mayor hiperleptinemia (Figura 12), lo cual, en parte, podría estar regulando la mayor

ingesta de alimento (Figura 3), estos resultados sugieren que existen otros posibles mecanismos que están involucrados en la generación de resistencia a la leptina.

La presencia de una HFD aumenta significativamente la concentración de leptina en suero en todos los grupos, mientras que los grupos alimentados con edulcorantes poco refinados mostraron la concentración más baja de leptina en suero y el incremento al añadir la HFD fue más tenue (Figura 12)

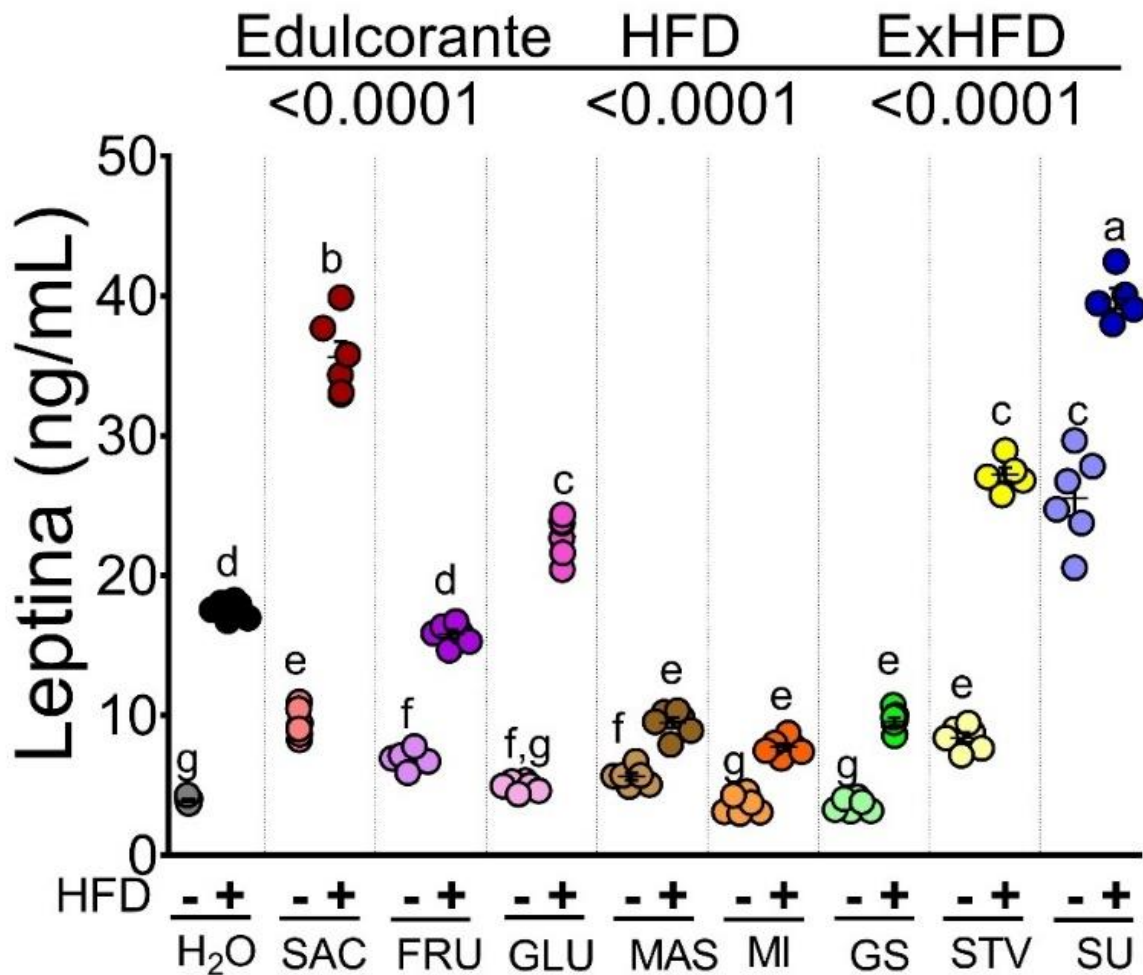


Figura 12. Determinación de leptina sérica en ayuno de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

VII. Evaluación de la endotoxemia metabólica

Estudios anteriores han demostrado que el consumo de un HFD aumenta los niveles de LPS en suero, esta condición se denomina endotoxemia metabólica y se ha asociado con una mayor permeabilidad intestinal y un mayor riesgo de desarrollar resistencia a la insulina, obesidad y diabetes. Curiosamente, los resultados mostraron que la concentración de LPS en suero aumentó no solo por la presencia de una HFD sino dependiendo del edulcorante (Figura 13). Respecto a los grupos alimentados con una dieta control, los que consumieron sacarosa mostraron un aumento significativo del LPS sérico de 257 veces con respecto al grupo de control, mientras que, con sucralosa, fructosa y svertia este aumento fue de 80, 68 y 60 veces, respectivamente. Sin embargo, los grupos con glucosa, glucósidos de steviol, mascabado y miel tuvieron valores de LPS similares a los del grupo control (AIN-93). El consumo de un HFD por si sola, aumentó el LPS sérico 64 veces respecto al grupo AIN. La combinación de HFD+sacarosa aumentó el LPS sérico 574 veces, lo que indica que el edulcorante tiene una contribución significativa al desarrollo de endotoxemia metabólica. Los edulcorantes como la fructosa, la svertia y la sucralosa también contribuyeron a un aumento significativo de la endotoxemia metabólica, aunque no tan alto como la sacarosa. La glucosa, los glucósidos de esteviol y el mascabado contribuyen moderadamente a aumentar la concentración de LPS. Para la mayoría de los edulcorantes, la adición de un HFD aumentó proporcionalmente el LPS sérico en un rango de 1 a 2,7 veces. Inesperadamente, el grupo alimentado con HFD+miel no desarrolló endotoxemia metabólica (Figura13).

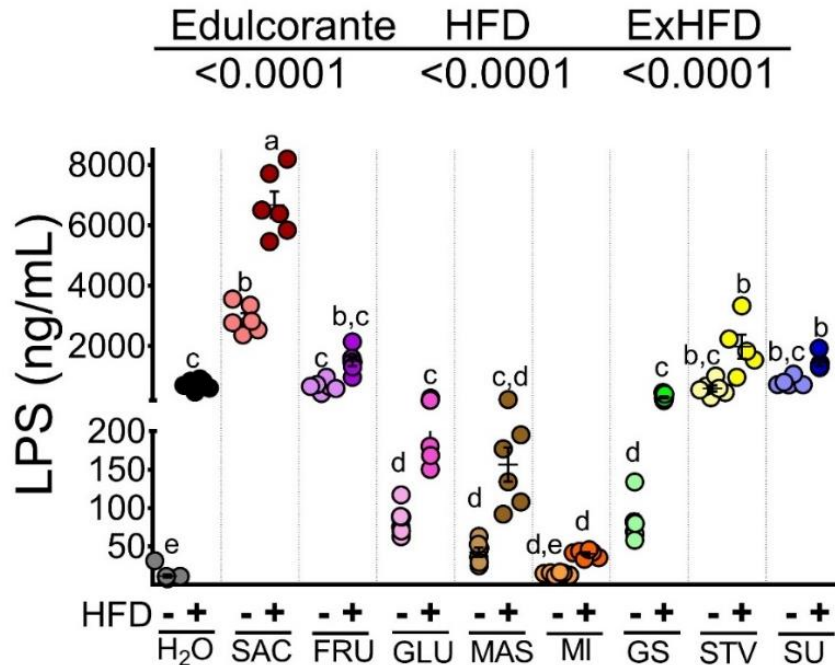


Figura 13. Determinación de LPS en ayuno en suero de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, a>b>c>d>e, p<0.05

VIII. Determinación de la abundancia de proteínas involucrados en la inflamación

Los TLR son una familia de receptores de reconocimiento de patrones que juegan un papel crítico en el sistema inmune innato al activar las vías de señalización proinflamatoria. LPS se une a TLR-4, que a su vez desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación de la vía NF- κ B y la transcripción de muchos genes proinflamatorios. Los valores fisiológicos de LPS no indujeron TLR4 mientras que las altas concentraciones de LPS producidas por el consumo de sacarosa, sucralosa y stevia indujeron la abundancia de TLR4 y TLR2 en el yeyuno, íleon y colon. El aumento de la abundancia de estos receptores a su vez aumentó la abundancia de NF κ B principalmente en el colon. En el caso de TLR2 que es un receptor de señalización para el peptidoglicano y ácido lipoteicoico (LTA) se observó que el consumo de sacarosa, sucralosa y stevia, aumentó significativamente la abundancia de TLR2 en el íleon y el colon.

Por el contrario, el consumo de miel, mascabado y glucósidos de esteviol, activan en mucho menor medida estos receptores y a NFκB (Figura 16). Esto podría estar involucrado en un cambio en el perfil de inmunoglobulinas y citocinas séricas

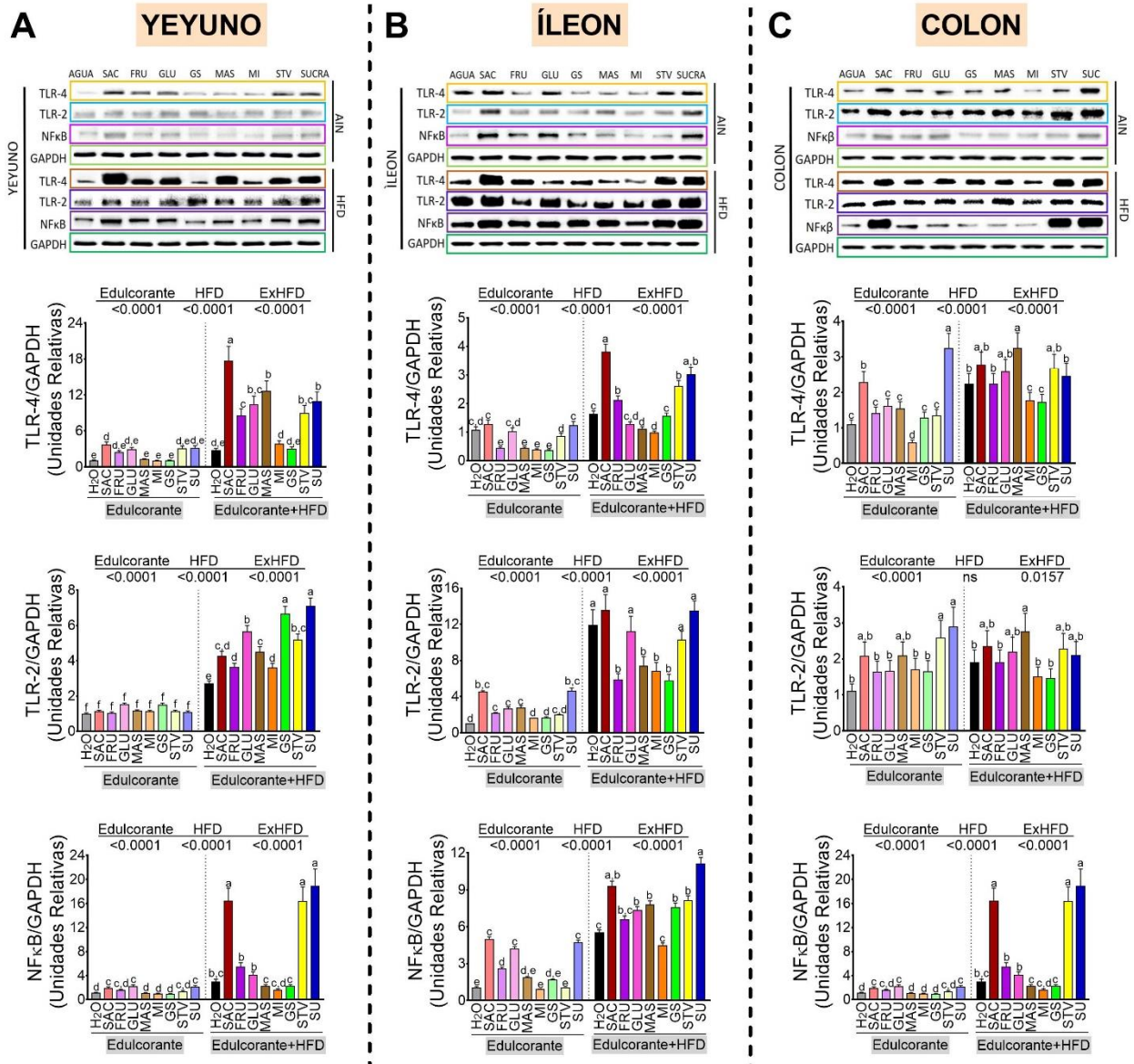


Figura 14. Determinación de la abundancia de TLR4, TLR2 y NFκB en diferentes porciones del intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. A) Abundancia de TLR-4, TLR-2 y NFκB en yeyuno de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) A) Abundancia de TLR-4, TLR-2 y NFκB en íleon de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. C) A) Abundancia de TLR-4, TLR-2 y NFκB en colon de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. Los datos se presentan en promedio ± EEM, a>b>c>d>e, p<0.05

IX. Caracterización de citocinas séricas

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria, la cual durante la obesidad disminuye. En este estudio se observó que IL-10 disminuye a con sacarosa o sucralosa, mientras que el consumo de miel, glucósidos de steviol o mascabado mantuvieron unas concentraciones adecuadas de esta interleucina. Al proporcionar una HFD esta interleucina disminuye, sin embargo, en combinación con edulcorantes complejos esta disminución se atenúa considerablemente (Figura 15). Este patrón es inverso en el caso de citocinas proinflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ (Figura 16). Esto puede estar relacionado con el desarrollo de endotoxemia metabólica, por ello se evaluó la inmunoglobulina secretora A (sIgA). sIgA neutraliza al LPS en células epiteliales, previniendo la translocación de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inducida por la presencia de LPS. Como se puede observar en al figura 17 la sIgA muestra un patrón similar a la IL-10, viéndose incrementada con las dietas en combinación con miel, y disminuida en particular con sacarosa y sucralosa, siendo más notorio con la adición de una HFD. El consumo a largo plazo de miel inhibió la producción de citocinas proinflamatorias, particularmente $\text{TNF}\alpha$, indujo la producción de IL-10, mientras que el consumo de sucralosa redujo significativamente la sIgA en un 76.2% e IL-10 en un 99.5%, lo que indica que el consumo de miel puede ayudar a mantener la barrera intestinal.

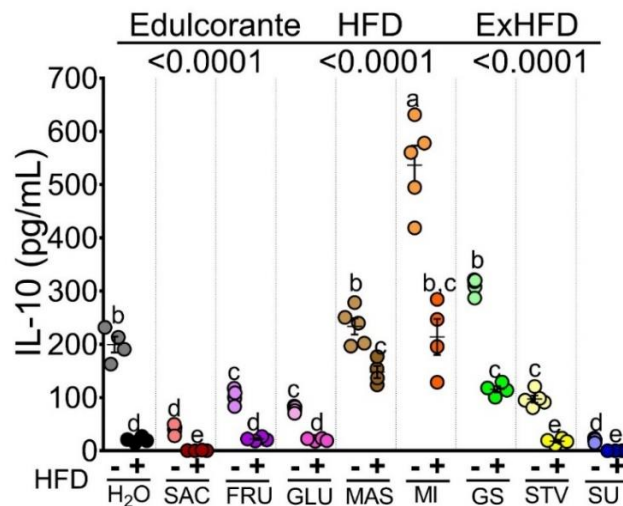


Figura 15. Determinación de IL-10 en ayuno en suero de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

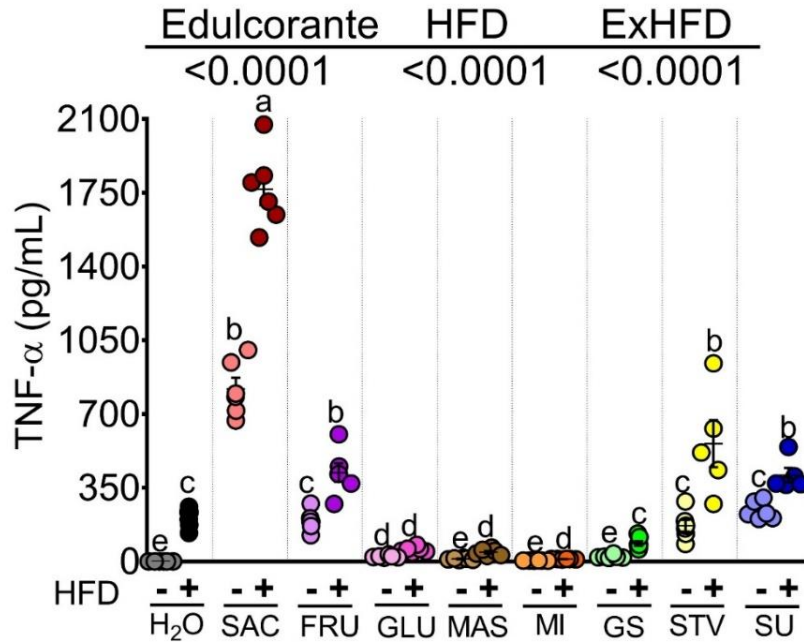


Figura 16. Determinación de TNF- α en ayuno en suero de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

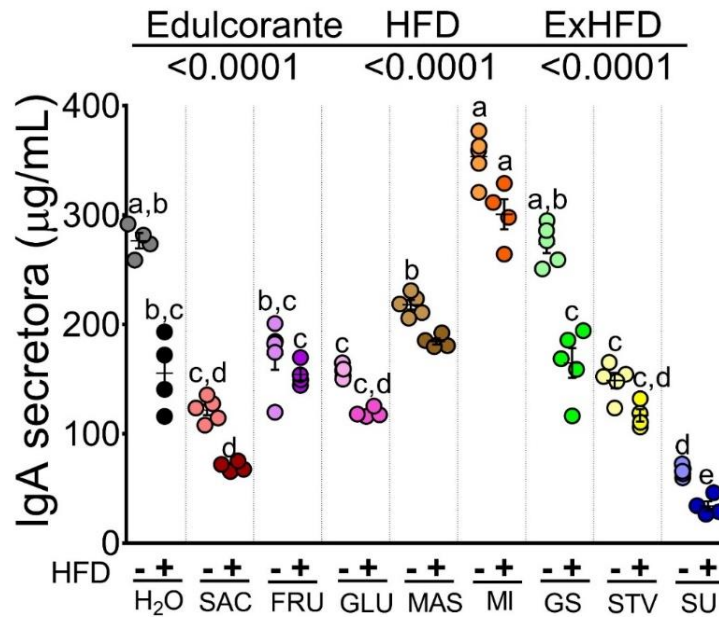


Figura 17. Determinación de IgA secretora en ayuno en suero de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

X. Determinación de genes involucrados en el metabolismo de lípidos

Al consumir una dieta alta en grasa, se observa un claro incremento de estos factores involucrados en la lipogénesis. Cabe mencionar, que en combinación con una dieta control los únicos edulcorantes que aumentaron la expresión de estos genes fueron sacarosa, sveltia y sucralosa (Figura 18)

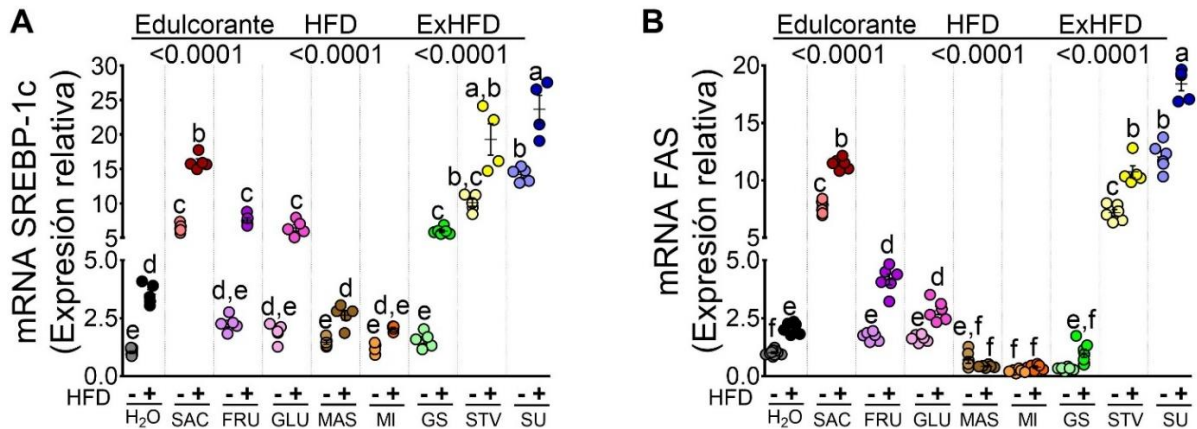


Figura 18 Determinación de la expresión de genes lipogénicos en hígado de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

Por otro lado, la expresión de PPAR- α , involucrado en la oxidación de ácidos grasos, se ve reprimió en los grupos que consumieron una dieta alta en grasa, sin embargo, los animales alimentados con miel y una dieta alta en grasa es similar al grupo control. Algo interesante fue que el consumo de sucralosa aumentó la expresión génica de PPAR α en un 99% y CPT-1 en un 88% (Figura 19), lo cual podría explicar el aumento de ácidos grasos libres y un menor porcentaje de grasa corporal

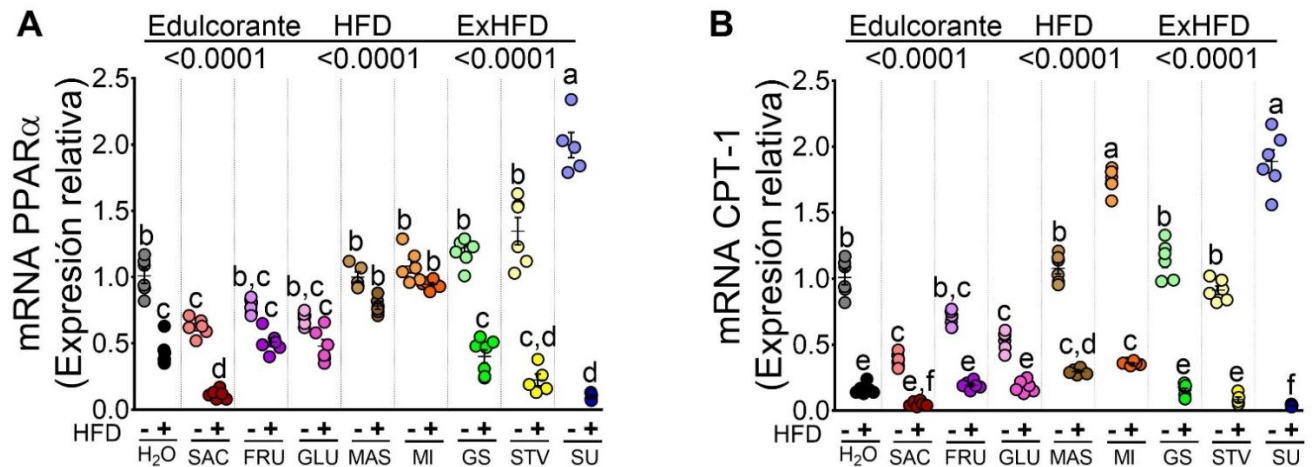


Figura 19. Determinación de la expresión de genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos en hígado de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control o una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

XI. Estudio de la morfología de los hígados de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes

Se realizaron cortes de hígado con un grosor de 4 micras y tinciones de hematoxilina-eosina. A continuación, se muestran los resultados obtenidos

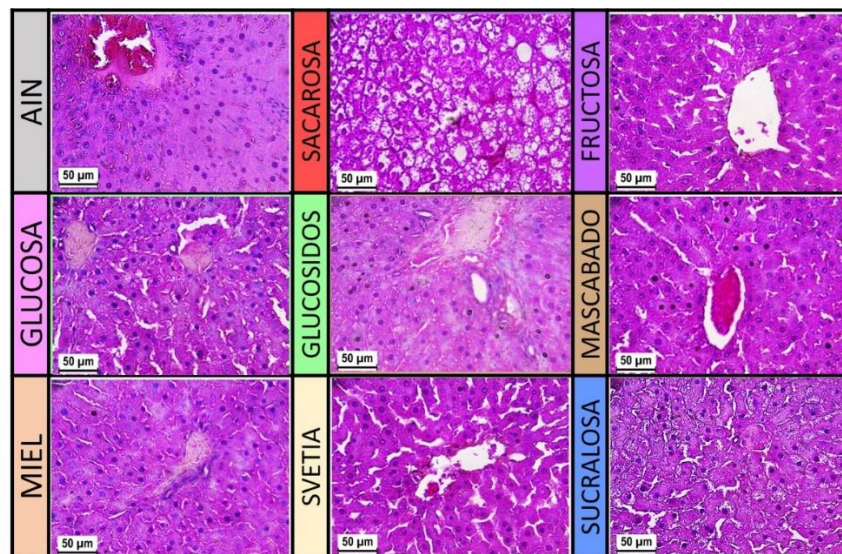


Figura 20. Estudio histológico de hígado de ratas de ratas Wistar, alimentadas con una dieta de control y edulcorantes en el agua de bebida.

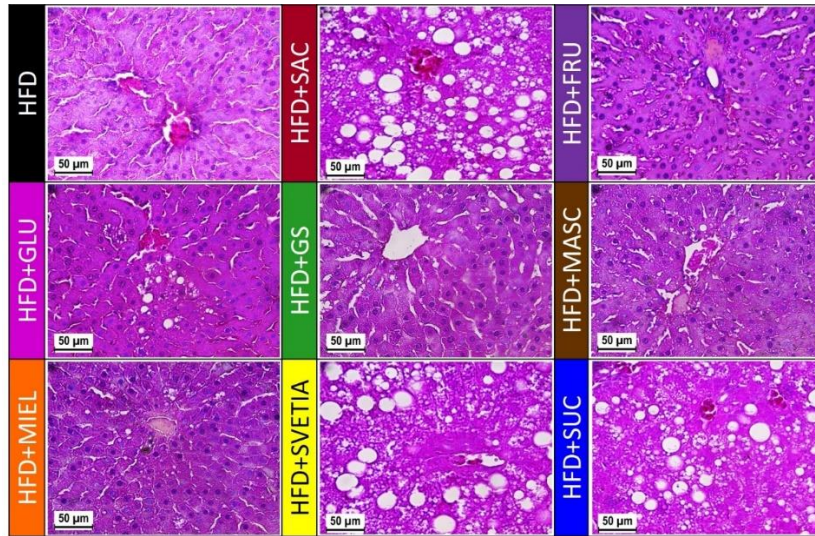


Figura 20. Estudio histológico de hígado de ratas Wistar, alimentadas con una dieta alta en grasa y edulcorantes en el agua de bebida.

XII. Estudio de la señalización de insulina en músculo esquelético de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes

La insulina es una hormona liberada por las células beta pancreáticas en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y de lípidos. Cuando la insulina se une a su receptor, éste desencadena múltiples vías de señalización que median sus acciones biológicas. La incapacidad de las células blanco de responder a la insulina, debido presumiblemente a defectos en su señalización, estado conocido como resistencia a la insulina. De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa inducido por la insulina en adipocitos y músculo esquelético, un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático.

A nivel molecular, los mecanismos por los que se genera la resistencia a la insulina pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro. Sin embargo, la resistencia a la insulina es la consecuencia de una señalización deficiente de la insulina causada por mutaciones o modificaciones posttraduccionales del IR o de moléculas efectoras río abajo del mismo. En algunos casos la resistencia a la insulina se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, pero más a menudo se atribuye a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde la funcionalidad de su receptor hasta la actividad de proteínas localizadas río abajo del mismo y que desempeñan funciones importantes en la señalización de la insulina. Entre las alteraciones más comunes se encuentran la disminución en el número de receptores y de su actividad de cinasa; un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de proteínas clave como el receptor y su sustrato; la disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt, y defectos en la expresión y función del transportador GLUT4. De estas alteraciones el aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr a nivel del IR y de IRS, ha sido considerado como uno de los mecanismos clave en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Un aumento en el estado de fosforilación de ambas proteínas puede alterar su asociación a otras proteínas, bloquear sitios de fosforilación en Tyr, disminuir su activación e inducir su degradación.

La importancia de un aumento en el estado de fosforilación en residuos de Ser/Thr de las proteínas IRS también se ha documentado en estudios clínicos, en donde se ha demostrado que, en hígado, músculo y tejido adiposo de pacientes obesos, la expresión de las proteínas IRS-1 se ve disminuida considerablemente y este aumento en la degradación de IRS puede estar dado por un aumento en la fosforilación de IRS en residuos de Ser/Thr. Varios agentes y condiciones metabólicas se han implicado como inductores de la resistencia a la insulina. Los más comunes son los ácidos grasos libres y sus metabolitos; el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y otras citocinas; hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagón y la angiotensina II, así como hormonas secretadas por el tejido adiposo

como la resistina. De esta forma parece que la resistencia a la insulina es consecuencia de la acción de una multitud de diferentes inductores.

En la Figura 21, se observa el efecto de los diversos edulcorantes en combinación con una dieta control o una dieta alta en grasa saturada sobre la vía de señalización de insulina, la cual se disminuye notablemente con el consumo de una dieta alta en grasa, así como con el uso de sacarosa, sveltia y sucralosa, posiblemente en parte mediada por citocinas proinflamatorias como TNF- α . Esto además aumentó la fosforilación de IRS en la serina 307 en el músculo, lo que indica resistencia a la insulina, lo que se tradujo en intolerancia a la glucosa en los grupos con sacarosa y sucralosa. Los grupos que consumieron edulcorantes complejos (glucósidos de esteviol, mascabado y miel) muestran una vía de señalización similar al grupo control y niveles normales de insulina.

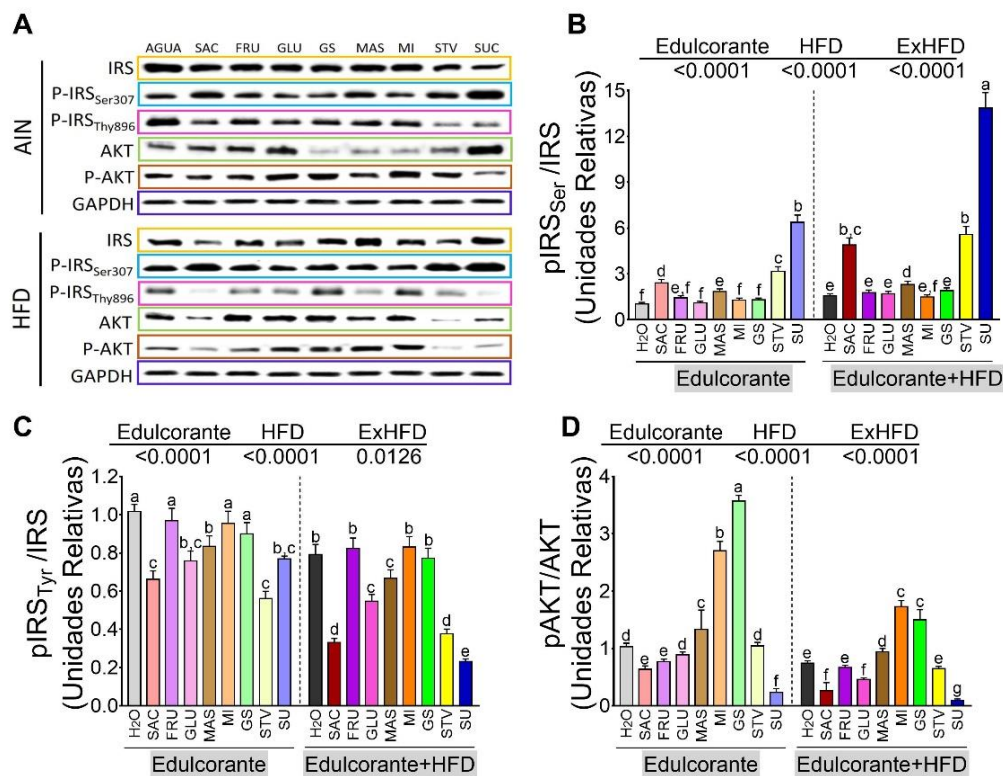


Figura 21. Señalización de insulina en músculo esquelético de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

XIII. Caracterización de las poblaciones bacterianas intestinales de ratas alimentadas con diferentes tipos de edulcorantes en presencia o ausencia de una dieta alta en grasa saturada

De la secuenciación por síntesis en la plataforma MiSeq Illumina se obtuvieron 5,906,496 secuencias ($40,756 \pm 9,541$ secuencias por muestra) con una longitud media de 459 ± 1 pb. Las lecturas se asignaron a las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) *de novo* con la paquetería de QIIME V.1.9. De esta manera, usando la comparación de las OTUs con QIIME contra la base de datos Greengenes, el 99.8% de las lecturas se asignaron al nivel de Phylum, 99.8% a clase, 99.4% a orden, 92.3% a familia, el 80.16% a género y 39.21% a especie. Respecto a las abundancias de OTUs, que se calcularon, incluyen matrices de abundancia en diferentes niveles taxonómicos. Para comparar las diferentes muestras, se hizo el corte en 18,975 lecturas basándose en el mínimo de la suma de las abundancias de los taxones en RV.3.0.1. La diversidad alfa sirve para estimar la riqueza de especies y para ello se determinó el índice Shannon, el cual sugiere que existe una menor alfa diversidad en las ratas que consumieron edulcorantes no calóricos, respecto a las que consumieron edulcorantes calóricos. Este índice fue aún menor en los animales que consumieron una dieta alta en grasa en combinación con edulcorantes no calóricos mientras que los grupos alimentados con miel, mascabado o sacarosa, aun en combinación con una HFD, presentan una mayor diversidad (Figura 22). Para el análisis de la composición de la microbiota, basado por secuenciación del gen ribosomal 16S rRNA, se hizo un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en las distancias UniFrac. Este análisis mostró que el consumo de una dieta alta en grasa saturada impacta aproximadamente en un 30% en la composición de la microbiota intestinal (PC1), mientras que el consumo de diversos edulcorantes cambia la composición de la microbiota en un 18% aproximadamente (PC2), respecto a los animales que se alimentaron con una dieta control, representando en su conjunto el 50% de la variación de la misma (Figura 23).

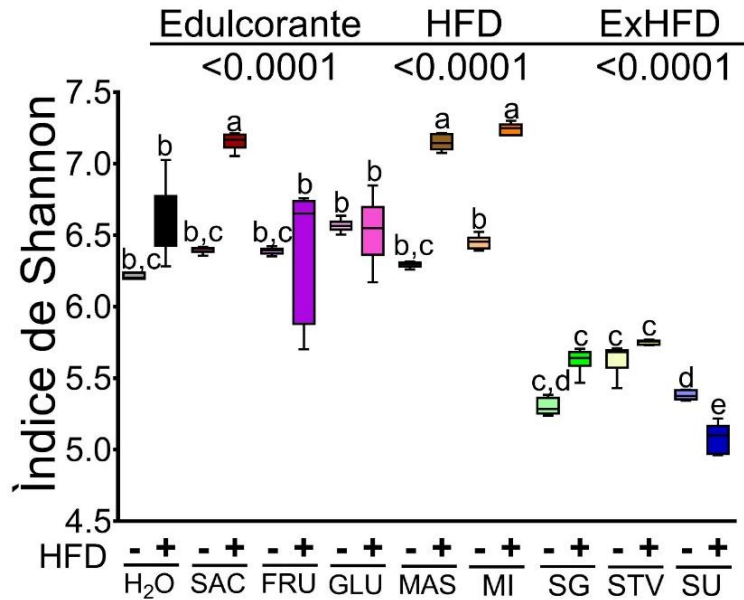


Figura 22. Determinación de la alfa diversidad mediante el índice Shannon de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. Los datos se presentan en rango de mínimo y máximo, a>b>c>d>e, p<0.05

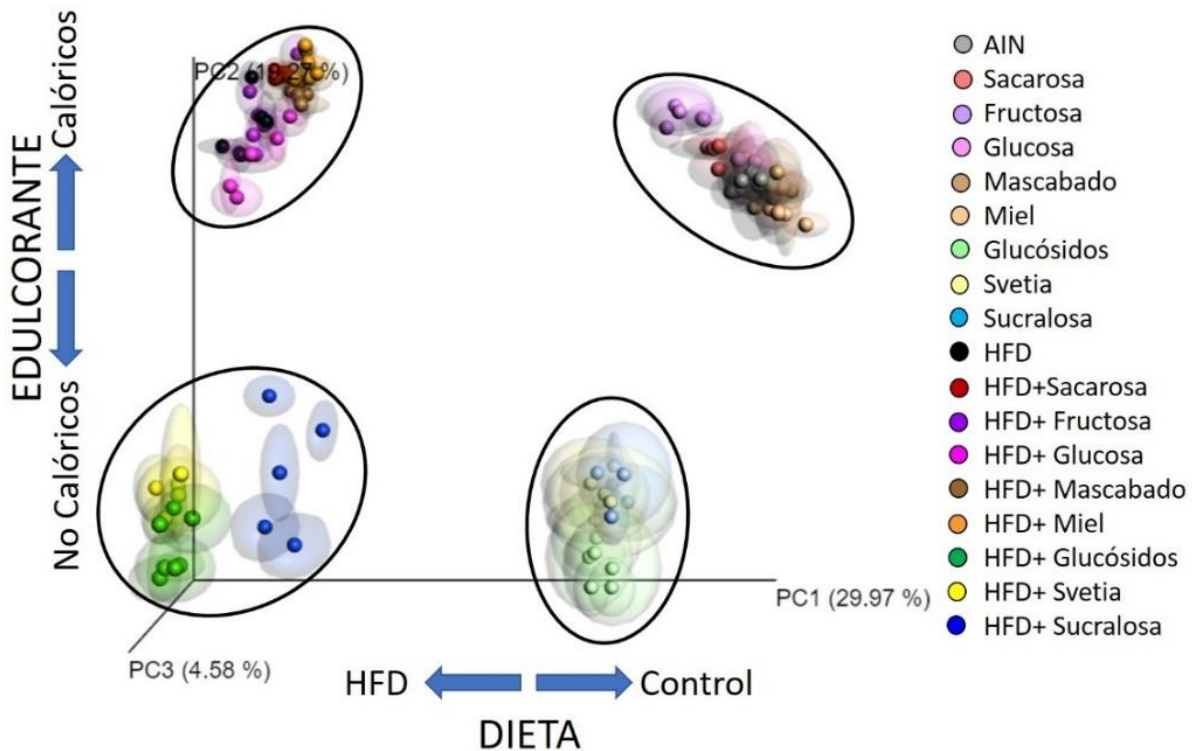


Figura 23. Determinación de la beta diversidad unweighted, mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes.

A nivel de Phylum, todos los grupos mostraron una relación de Bacteroidetes/Firmicutes muy similar, exceptuando dos grupos (AIN-93+glucosidos de esteviol y HFD+Sucralosa) el grupo que consumió una HFD en combinación con sucralosa, mostrando un incremento significativo de Bacteroidetes. En contraste, el grupo que consumió glucósidos de esteviol con una dieta control mostró una disminución significativa del Phylum de Bacteroidetes y un incremento muy notorio del Phylum de Verrucomicrobia (Figura 24). Otro hallazgo importante, es que, al combinar los edulcorantes con una dieta alta en grasa, hubo un aumento en el Phylum Firmicutes, lo cual se ha asociado a diversas enfermedades como la obesidad (Baothman et al., 2016).

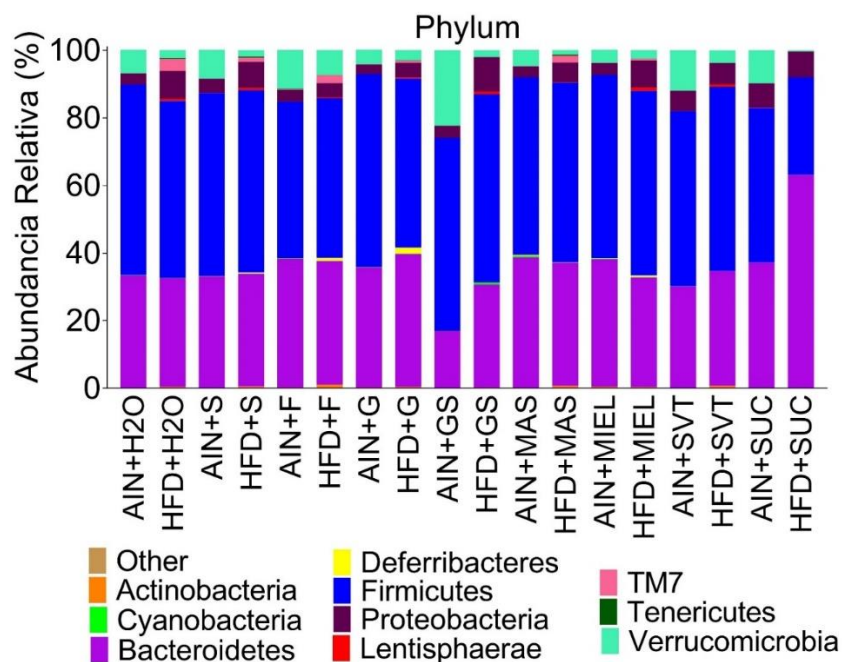


Figura 24. Determinación de los Phylum mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes.

A nivel de género, los OTUs más desregulados en el grupo alimentado con sucralosa fueron *Parabacteroides* y *Allobaculum* mientras que en el grupo alimentado con sacarosa fue el género de *Turicibacter*, esto nos indica, que, aunque se tenga anomalías metabólicas similares, no necesariamente este

está asociado a los mismos cambios en la microbiota intestinal. Por otro lado, los géneros que se incrementan después del consumo de miel fueron *Bifidobacterium* y *Butyricicoccus*, los cuales están asociados con beneficios para la salud intestinal (Boesmans et al., 2018; O'Callaghan & van Sinderen, 2016). Con respecto al grupo con glucósidos de steviol, los géneros más aumentados fueron *Akkermansia*, *Holdemania*, *Allobaculum*, *Faecalibacterium*, *Clostridium* y *Rothia* (Figura 25).

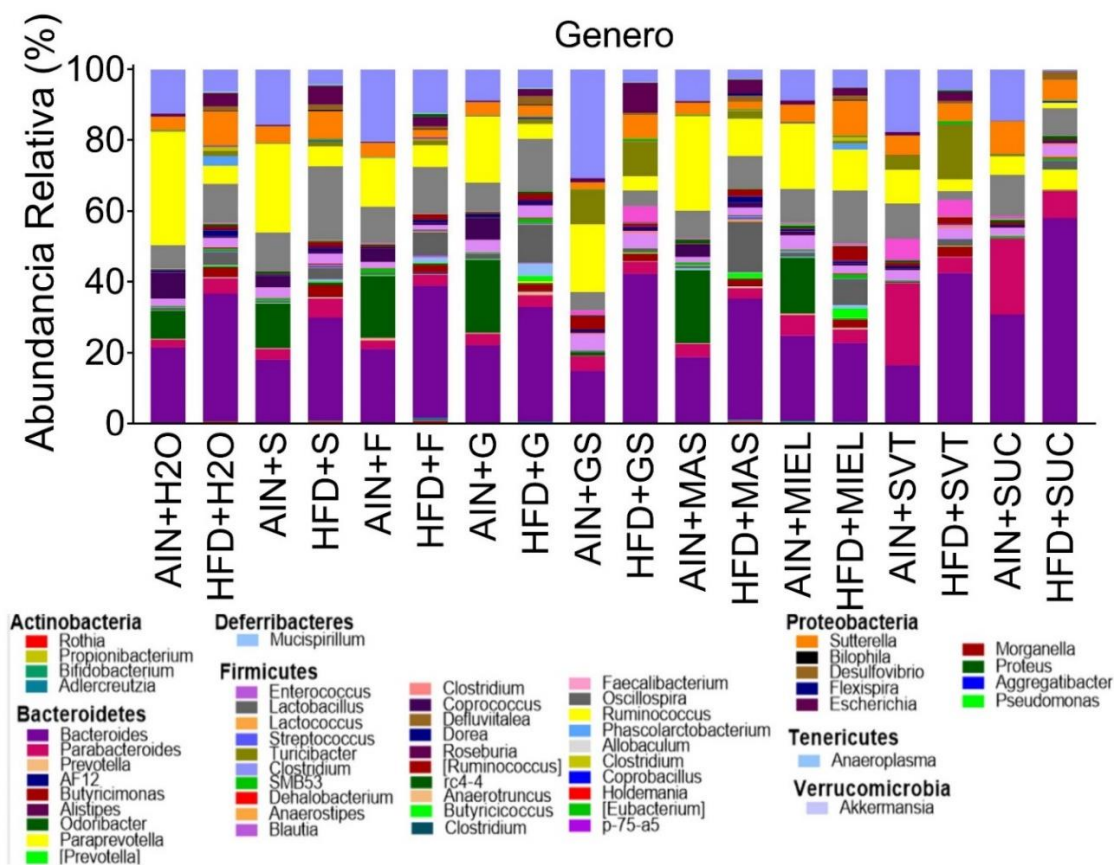


Figura 25. Determinación de los géneros mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes.

A pesar de que los grupos alimentados con sacarosa y sucralosa generaron anomalías metabólicas similares a nivel de especie, el grupo alimentado con sacarosa no tuvo cambios tan drásticos, mientras que el grupo alimentado con sucralosa, en comparación con el grupo control, exhibió un aumento del

95% en la abundancia de *Bacteroides fragilis*. En el caso del grupo con glucósidos de esteviol , *Akkermansia muciniphila* fue la especie con mayor abundancia. Cabe resaltar que esta bacteria se ha asociado con una reducción de la disrupción de la barrera intestinal. Por otro lado, la adición de grasa a la dieta disminuyó significativamente la abundancia de *A. muciniphila*, *R. flavefaciens* y *B. fragilis* mientras que hubo un aumento la abundancia de *E. coli*, *C. difficile*, *L. reuteri*, *P. distasonis* y *B. uniformis*. Estos cambios ocurrieron en diferentes proporciones dependiendo del edulcorante utilizado, observando los cambios más notorios en los grupos alimentados con un HFD y sacarosa o sucralosa en los cuales la abundancia de *C. saccharogumia* se redujo significativamente. Además, el consumo de un HFD y edulcorantes no calóricos redujo la abundancia de *R. flavefaciens*. Finalmente, los grupos alimentados con HFD, exceptuando el grupo HFD+Sucralosa, disminuyeron significativamente la abundancia de *B. fragilis* (Figura 26)

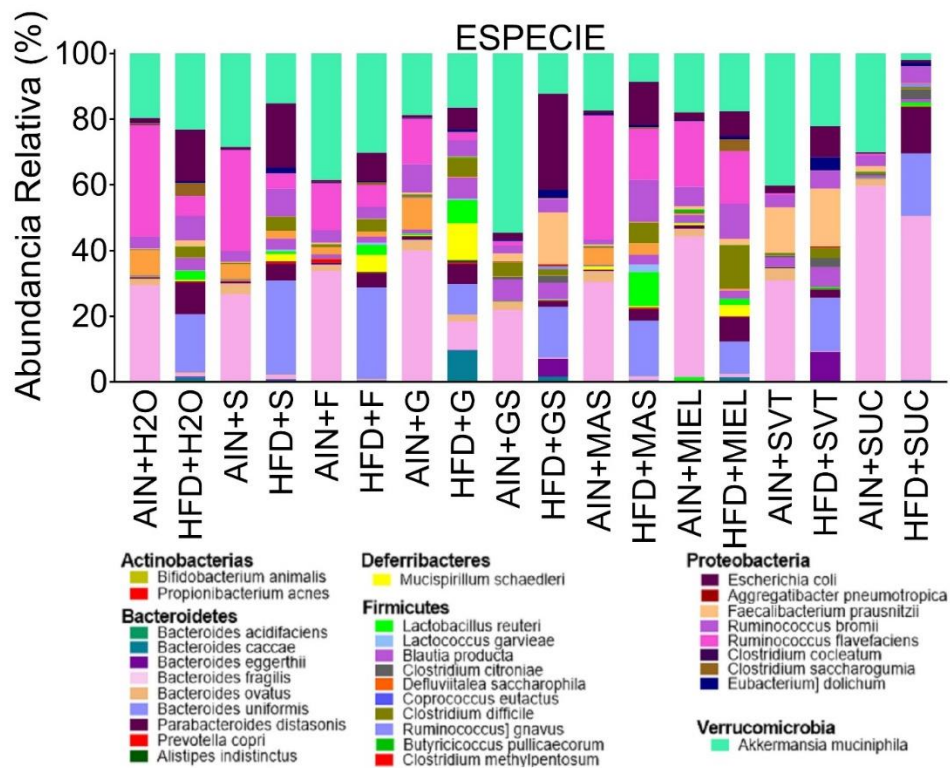


Figura 26. Determinación de las especies mediante secuenciación masiva (MiSeq) de la microbiota intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes.

XIV. Determinación de los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en heces, y de sus receptores GPR43 y GPR41 en el intestino

Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se producen cuando la fibra alimentaria soluble y el almidón resistente son fermentados por los microorganismos intestinales. Los AGCC son un subgrupo de los ácidos grasos con cadenas carbonadas de menos de seis carbonos, los más abundantes y de mayor importancia son acetato, propionato y butirato. A través de estos, el hospedero puede obtener una mayor cantidad de energía, para ello deben unirse a sus receptores (FFAR) 2 y 3, o GPR43 y GPR41, respectivamente. FFAR2 tiene una mayor preferencia por ácidos grasos de 2 y 3 carbonos como acetato y propionato, mientras que FFAR3 tiene una especificidad más alta por 3-5 ácidos grasos de carbono, notablemente butirato. El consumo de edulcorantes específicos puede producir un patrón diferente en la producción de AGCC, esto podría tener un efecto al activar GPR41 y GPR43 en diferente medida y finalmente entrar en la circulación sistémica y activar varios procesos metabólicos e inflamatorios. En la Figura 25 se muestra la presencia de estos ácidos grasos de cadena corta en heces, determinados por cromatografía de gases, mientras que en la Figura 26 se muestran sus receptores evaluados en el intestino.

En los resultados se observa que el grupo con sacarosa, seguidos de sucralosa y sveltia produjo la concentración más alta de AGCC totales, principalmente acetato, mientras que los productores más bajos de AGCC fueron los que consumieron miel, mascabado o glucósidos de steviol. Este patrón es similar en los grupos con HFD, se incrementan las concentraciones de las AGCC más pronunciadamente (Figura 27). En este sentido, el consumo de un HFD aumentó la concentración total de AGCC en un 78% con respecto al grupo de control. Algo que llama la atención es que los grupos con mayor concentración

de AGCC, aumentó de manera significativa la abundancia de GPR43, esto podría estar modulando en parte la secreción de insulina; por otro lado, los monosacáridos y los edulcorantes más complejos indujeron preferentemente la abundancia de GPR41 (Figura 28).

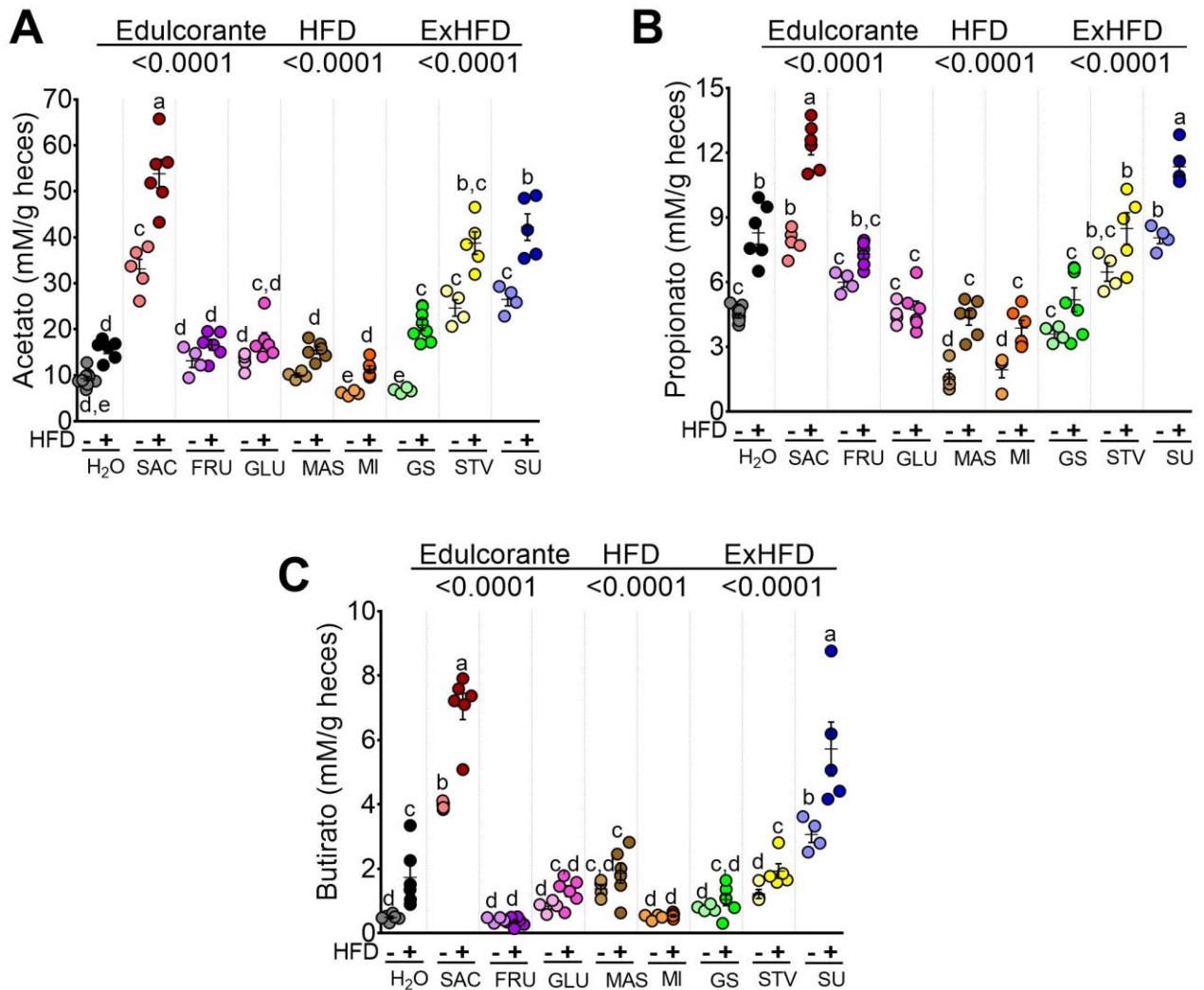


Figura 27. Determinación de los AGCC en heces de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d$, $p<0.05$

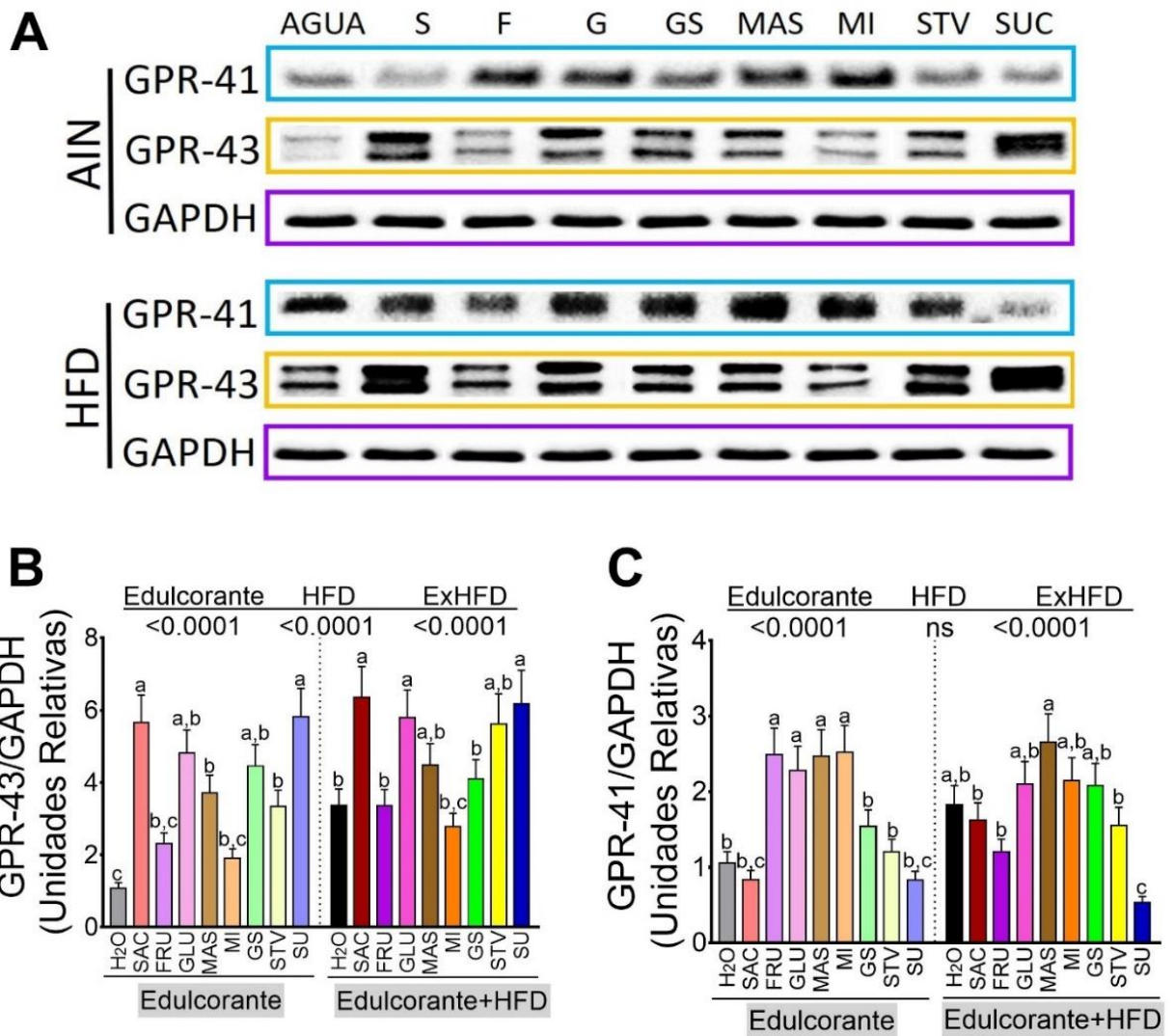


Figura 28. Determinación de los receptores de los AGCC en el intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. A) Imágenes representativas de abundancia de GPR41 y GPR43 en intestinos de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) Abundancia relativa de GPR-43 C) Abundancia relativa de GPR41. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c$, $p<0.05$

XV. Evaluación de los receptores de dulzor en lengua e intestino

En la actualidad existe una amplia variedad de edulcorantes, a percepción gustativa del sabor dulce de estos compuestos se lleva a cabo por un heterodímero de 2 subunidades proteicas, T1R2 (receptor gustativo tipo 1, miembro 2) y T1R3 (receptor gustativo tipo 1, miembro 3), los cuales son codificados por los genes TAS1R2 y TAS1R3, localizados en el cromosoma 1. T1R2 es el componente específico de la percepción del sabor dulce, ya que T1R3 a su vez está involucrado en la percepción del sabor umami. Éstos, T1R2 y T1R3 se expresan en el paladar y en las células gustativas de las papilas circunvaladas y foliadas de la lengua, sin embargo, T1R2 se ha detectado en otros tejidos clave para la regulación metabólica y la homeostasis energética, tales como el tracto gastrointestinal, el páncreas e hipotálamo, por lo cual se le ha considerado un receptor implicado en la ingesta de alimentos. En este estudio se evaluó la presencia de estos receptores tanto en lengua (Figura 27) como en intestino (Figura 28). En la lengua, T1R2 fue inducido por el consumo de GS seguido de G, S, MAS, MI, STV y finalmente sucralosa, curiosamente, la presencia de un alto contenido de grasa en la dieta redujo en mayor medida la abundancia de T1R2. Por otro lado, el consumo de sacarosa incrementó la abundancia de T1R3 respecto a T1R2. En este caso, T1R3 fue estimulado por sacarosa, fructosa, mascabado, sucralosa y glucósidos, este receptor (T1R3) también se redujo por la presencia de una dieta alta en grasa saturada a excepción de los grupos en combinación con glucosa y GS (Figura 29).

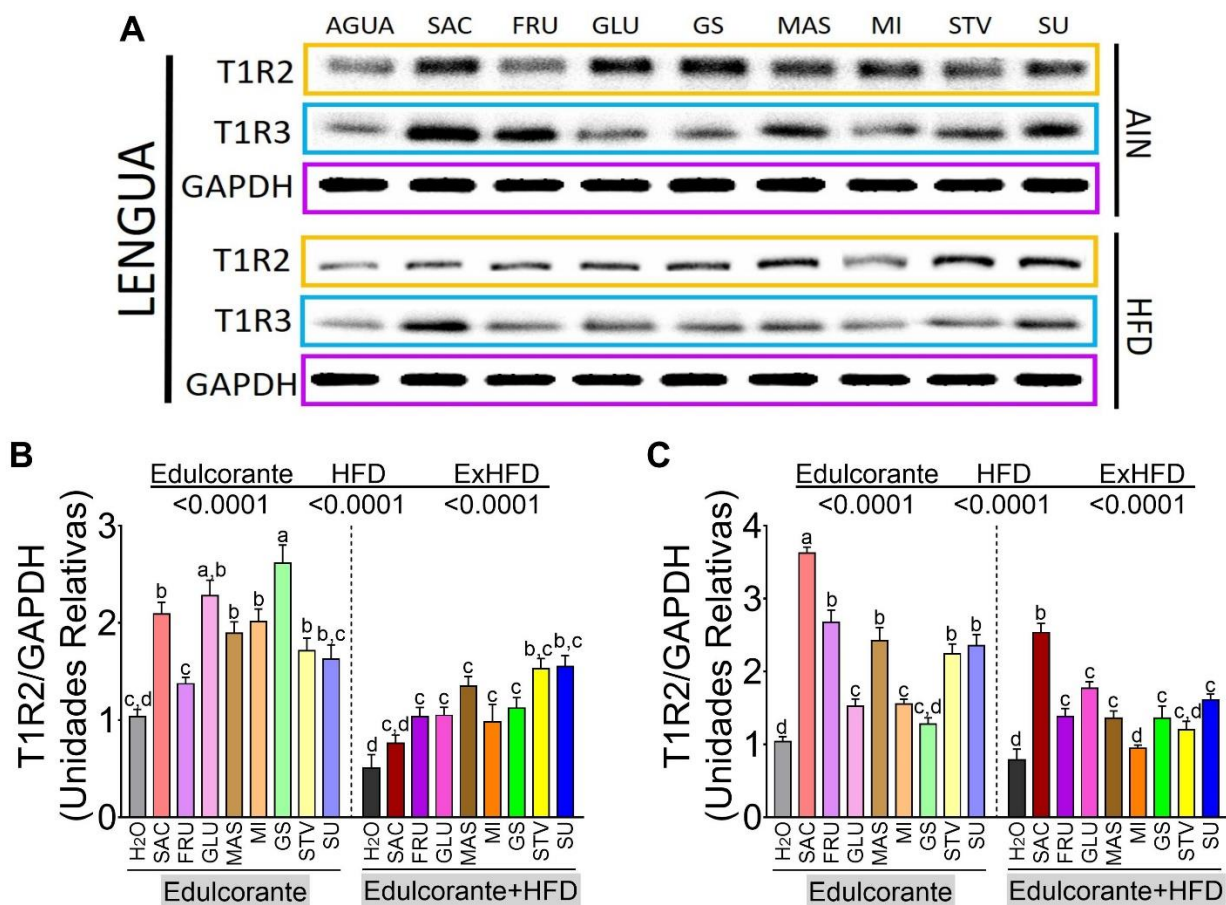


Figura 29. Determinación de los receptores de dulzor en lengua de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. A) Imágenes representativas de abundancia de T1R2 y T1R3 en lenguas de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) Abundancia relativa de T1R2 C) Abundancia relativa de T1R3. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d$, $p<0.05$

Estudios previos han demostrado que tras la activación de estos receptores en células enteroendocrinas tiene 2 efectos: 1) Absorber mayor cantidad de glucosa vía SGLT-1 (Laffitte, Neiers, & Briand, 2014; Swartz, Duca, de Wouters, Sakar, & Covasa, 2012) y 2) liberar una mayor cantidad de incretinas (Lee et al., 2017); por lo que la expresión de una mayor cantidad de estos puede afectar los transportadores de glucosa, así como en las incretinas en el intestino. En este modelo experimental, la abundancia de T1R2 en el intestino delgado y el colon siguió un patrón similar donde la sucralosa y los glucósidos de

esteviol estimularon la abundancia de T1R2 en mayor medida que el resto de los edulcorantes, mientras que la miel y el mascabado mostró una menor abundancia. En contraste con lo observado en la lengua, T1R2 y T1R3 fueron estimulados por la presencia de una dieta alta en grasa, tanto en el intestino delgado y principalmente en el colon.

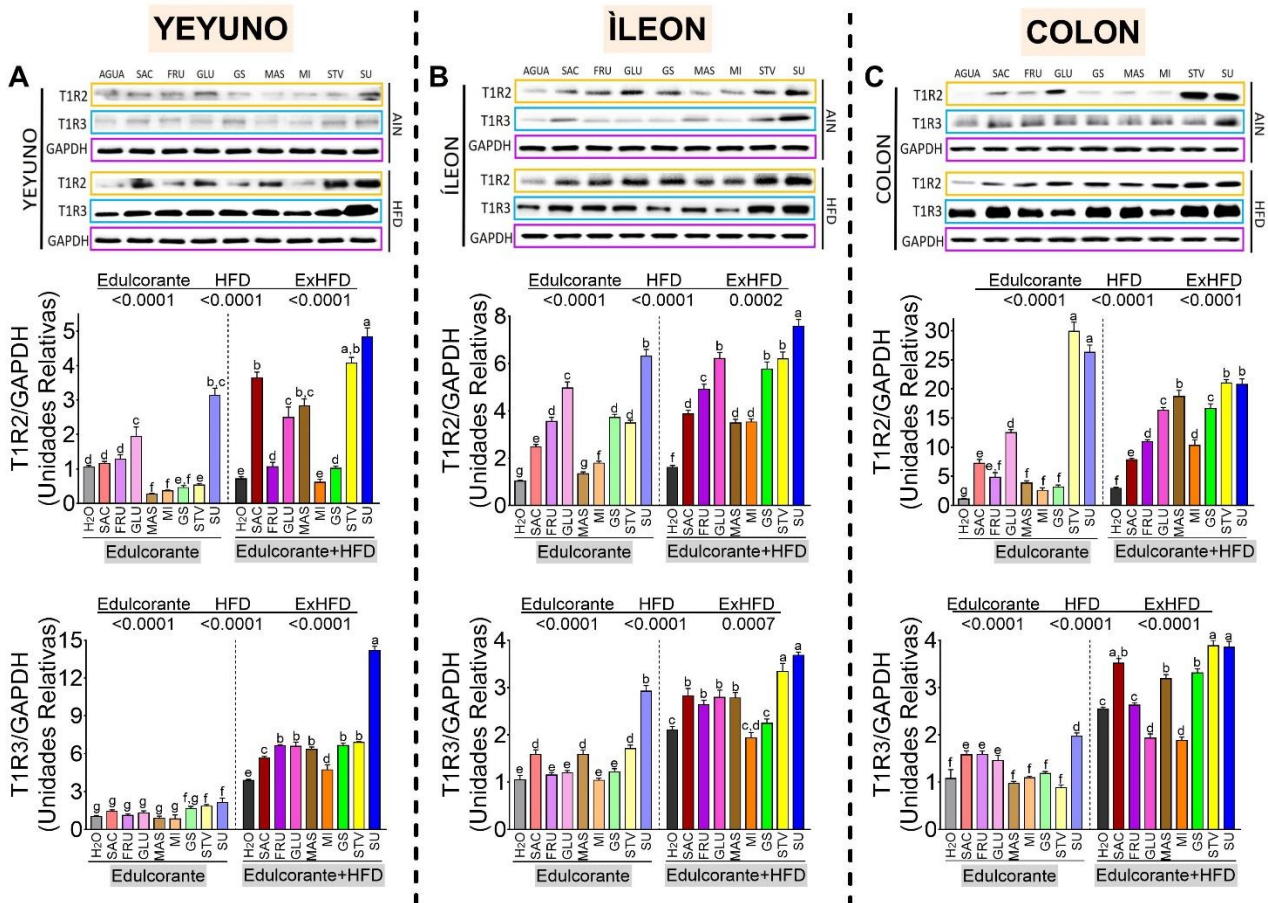


Figura 30. Determinación de los receptores de dulzor en diferentes porciones de intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. A) Abundancia de T1R2 y T1R3 en yeyuno de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida B) Abundancia de T1R2 y T1R3 en íleon de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. C) Abundancia de T1R2 y T1R3 en colon de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f>g$, $p<0.05$

XVI. Caracterización de diversos transportadores de glucosa intestinales

Las proteínas de transporte sodio-glucosa, también llamadas cotransportadores sodio-glucosa o SGLT por su nombre en inglés (*sodium-glucose linked transporter*), son una familia de transportadores de glucosa que se encuentran en la mucosa intestinal (SGLT1) y en las células del túbulo proximal de las nefronas en el riñón (SGLT2). Este transportador se encarga de absorber la glucosa del lumen hacia el enterocito y como se observa en la Figura 31 este transportador se ve incrementado en el intestino con el consumo de una dieta alta en grasa o bien el consumo de cualquier edulcorante, a excepción de glucósidos de steviol, siendo más pronunciado este aumento con los monosacáridos.

Por otro lado, el transportador GLUT-2 en el intestino, permite el paso de la glucosa de los enterocitos hacia circulación, mediante transporte pasivo simple, interesantemente, como se aprecia en la Figura 31 hay un incremento de este transportador en el intestino con la adición de grasa a la dieta, y en particular con el consumo de sacarosa, glucosa y sucralosa en el caso de la dieta control, y de estos edulcorantes, así como de mascabado y sveltia en el caso de la dieta alta en grasa saturada.

Finalmente, GLUT-5 se encuentra en el intestino delgado del lado arterial de la célula epitelial, y actúa conjuntamente con el cotransportador SGLT-1 para el transporte de monosacáridos a los enterocitos, su afinidad es mucho mayor por la fructosa, por lo cual como se puede apreciar en la Figura 31, se encuentra aumentado en los animales que consumieron dicho monosacárido, así como en aquellos que consumieron azúcares poco refinados

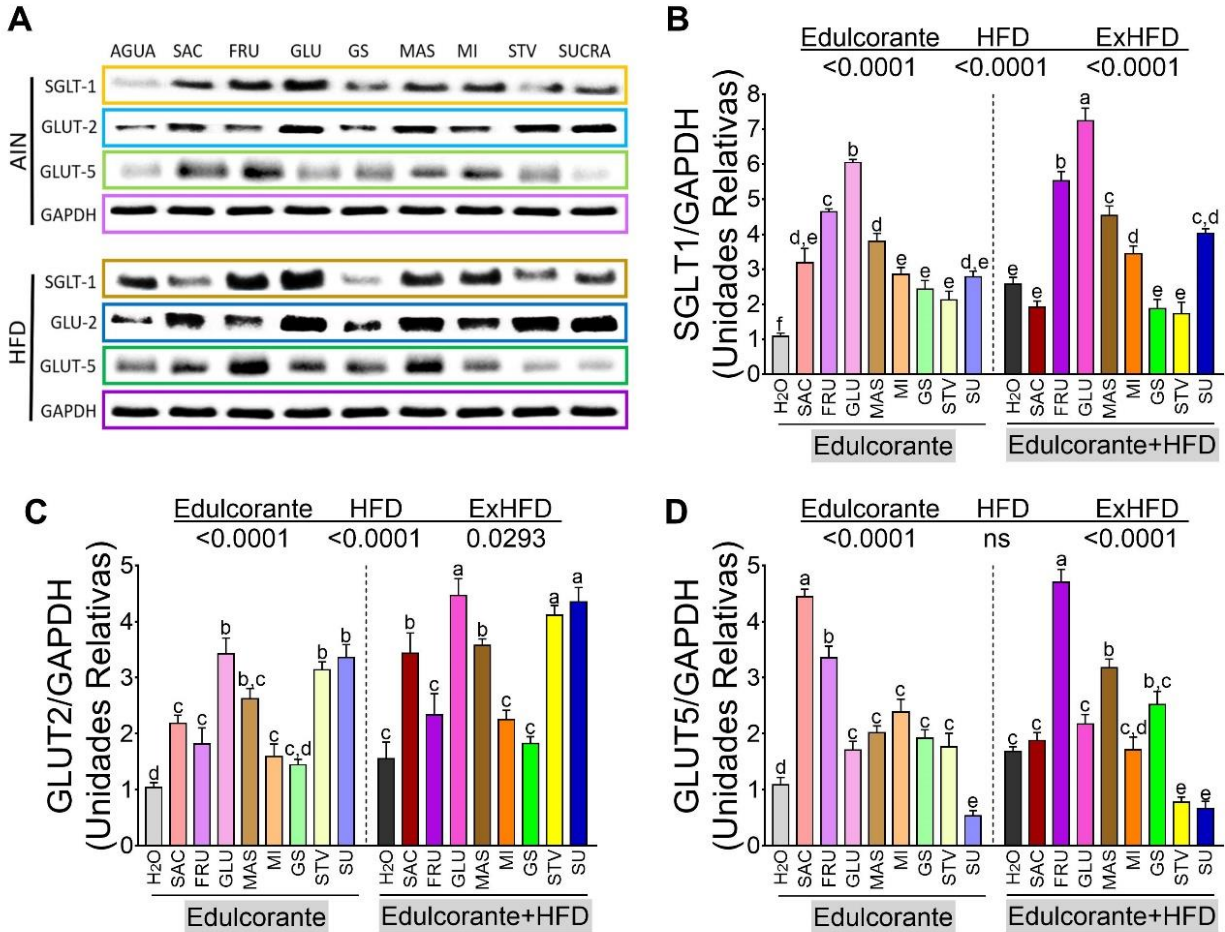


Figura 31. Determinación de los transportadores de monosacáridos en el intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. A) Imágenes representativas de abundancia de SGLT-1, GLUT-2 Y GLUT-5 en intestinos de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) Abundancia relativa de SGLT-1 C) Abundancia relativa de GLUT-2. D) Abundancia relativa de GLUT-5. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e$, $p<0.05$

XVII. Evaluación de incretinas secretadas en el intestino

Para evaluar el efecto del consumo de una HFD y edulcorantes sobre la secreción de incretinas en el intestino se evaluó la expresión de GLP-1 (Figura 32A) y CCK (Figura 32B). Además de la abundancia de GIP, GLP-1 y CCK mediante el WB (Figura 33)

GLP-1 es el producto de un gen llamado proglucagón en las células L del intestino. Su secreción es dependiente de la presencia de nutrientes en la luz del intestino delgado. Los agentes que causan o estimulan la secreción de GLP-1 incluyen los carbohidratos, las proteínas y los lípidos. Una vez que el GLP-1 alcanza la circulación, tiene una vida media de solo 2 minutos, debido a la rápida degradación por parte de la enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), lo que nos indica que un aumento en la expresión de este gen es un posible incremento de células L en el intestino. GLP-1 posee diversas funciones, principalmente aumenta la secreción de insulina por parte del páncreas de manera dependiente de la glucosa y disminuir la secreción de glucagón, por lo que un incremento en el mismo podría estar relacionado con la intolerancia a la glucosa observada.

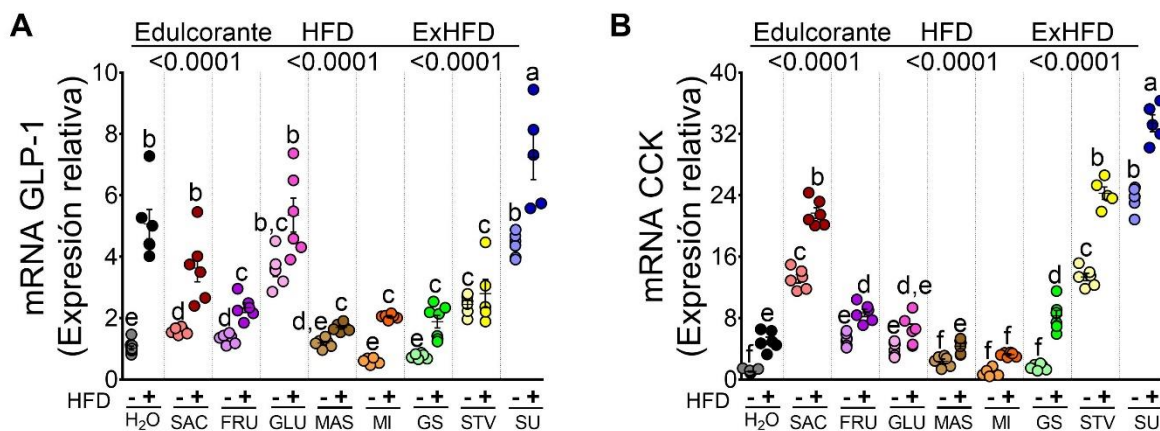


Figura 32. Determinación de la expresión génica de GLP-1 y cck en el intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes

Por otra parte, la colecistoquinina (CCK) es una hormona producida en el intestino delgado, específicamente en el duodeno y el yeyuno por las células I. Su función es estimular la secreción de enzimas del páncreas, así como de la bilis almacenada en la vesícula biliar hacia el duodeno, produciendo que se contraiga, estimulando la relajación y apertura del esfínter de Oddi. Participando en la regulación endocrina de la digestión, principalmente de lípidos, lo que explica su incremento con una HFD (Figura 32B)

En adición, GIP es un péptido de 42 aminoácidos perteneciente a la familia peptídica glucagón-secretina y se origina del Pro-GIP constituido por 153 aminoácidos. GIP se secretado por células enteroendocrinas específicas, las células K, localizadas principalmente en el duodeno, pero presentes a lo largo de toda la mucosa del intestino delgado. Su secreción se estimulada por la ingestión de alimentos ricos en carbohidratos y grasas que producen un incremento de 10 a 20 veces en su concentración plasmática. Además, evidencias experimentales indican que GIP regula el metabolismo de las grasas en los adipocitos, incluyendo un incremento de la incorporación de los ácidos grasos a triglicéridos inducida por insulina, estimulación de la actividad de la lipasa de lipoproteínas y de la síntesis de ácidos grasos. En los adipocitos, GIP de manera significativa incrementa la reesterificación, estimula la lipólisis y atenúa la respuesta lipolítica al isoproterenol. Estas propiedades fueron similares a las mostradas por insulina in vitro, sugiriendo que en el adipocito GIP posee efectos lipogénicos semejantes a la insulina.

Los resultados obtenidos de esta hormona en el intestino se observan en la Figura 33. GIP fue inducido por sveltia, sucralosa y sacarosa; la presencia de alto contenido de grasa en la dieta indujo en mayor medida tanto GLP-1, GIP y CCK en el intestino. Estos resultados concuerdan con lo observado en el suero. La sucralosa y la sacarosa fueron los principales estimuladores de GIP y GLP-1, seguidos por fructosa, glucosa y sveltia, por el contrario, glucósidos de esteviol, mascabado o miel se vieron concentraciones similares al grupo control, y

ligeramente disminuidas en la presencia de una HFD, comparado con el grupo HFD+agua, lo que indica que no sólo el tipo de edulcorante sino también la presencia de grasas saturadas juega un papel importante en los niveles de incretinas circulantes.

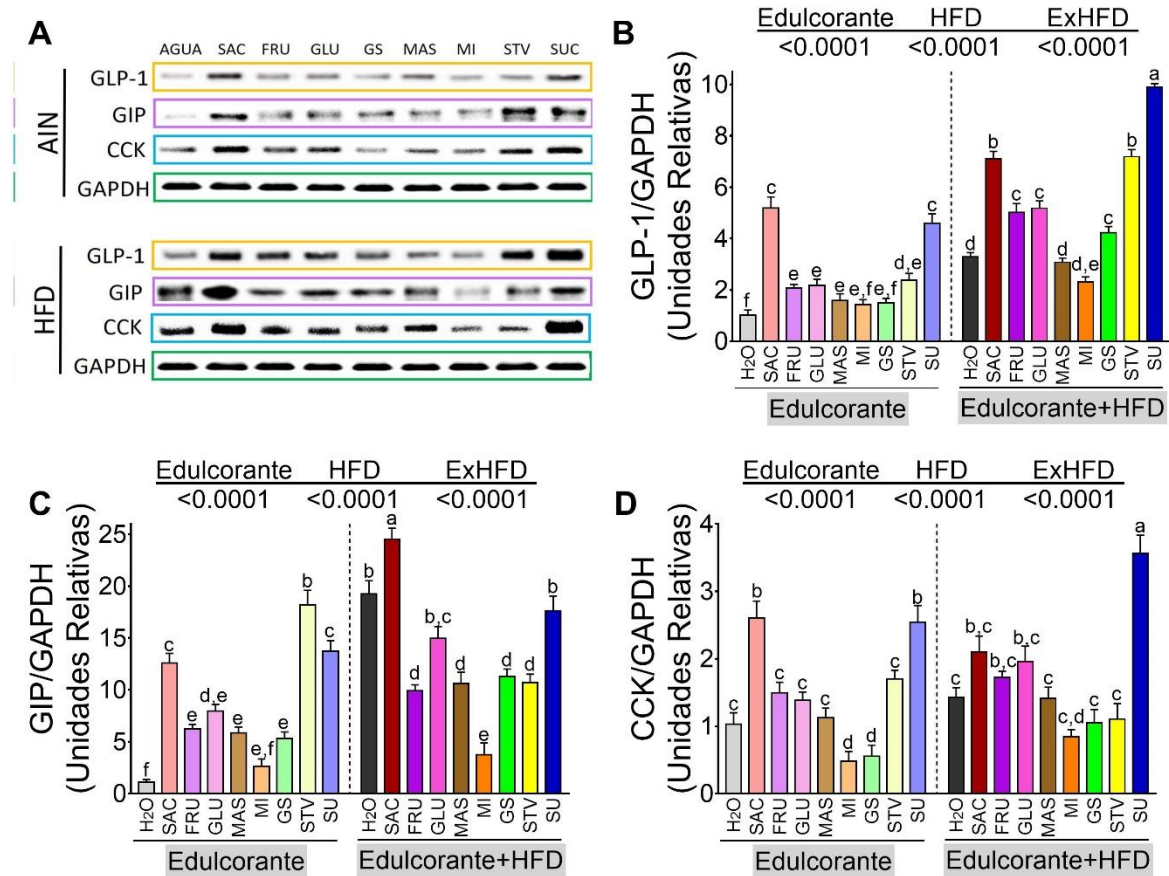


Figura 33. Determinación de hormonas secretadas en el intestino de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. A) Imágenes representativas de abundancia de GLP-1, GIP Y CCK en intestinos de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) Abundancia relativa de GLP-1 C) Abundancia relativa de GIP. D) Abundancia relativa de CCK. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f$, $p<0.05$

XVIII. Estudio de la morfología de intestinos de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes

Se realizaron cortes de colon con un grosor de 4 micras y tinciones de hematoxilina-eosina. A continuación, se muestran los resultados obtenidos

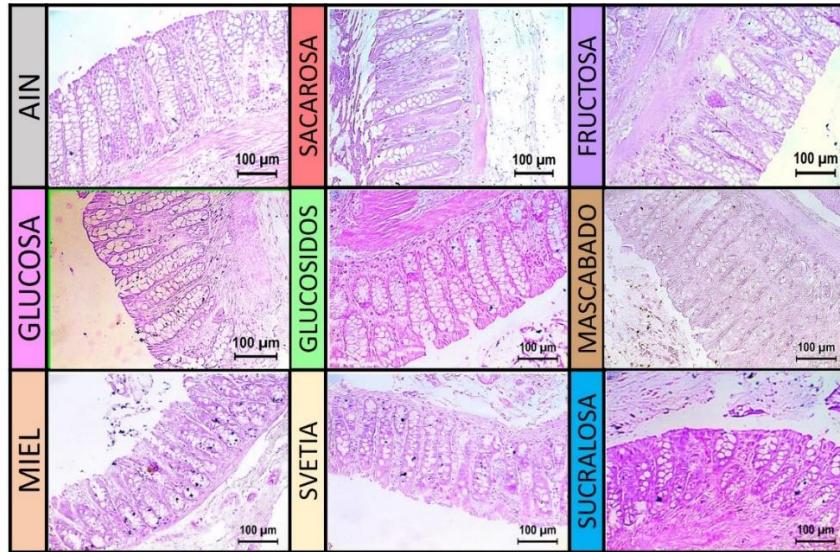


Figura 34. Estudio histológico de colon de ratas alimentadas con una dieta control y diferentes edulcorantes en el agua de bebida

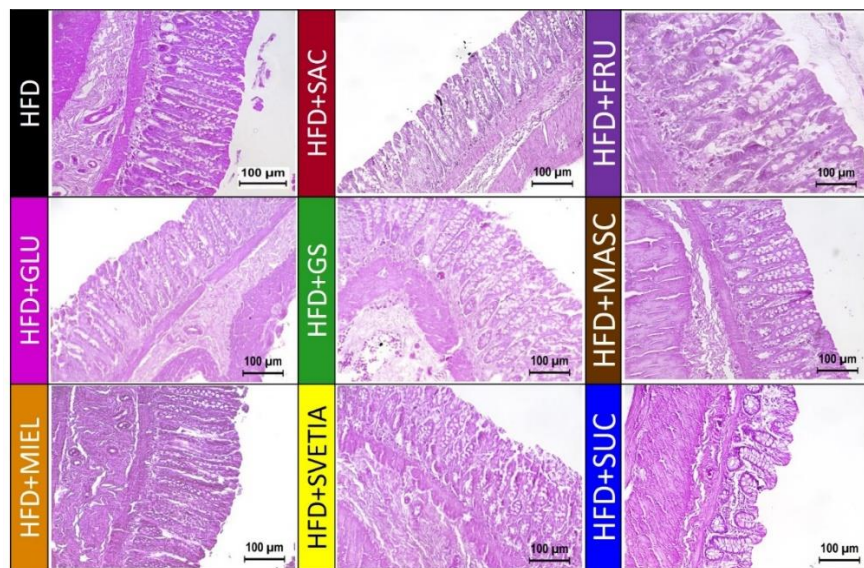


Figura 35. Estudio histológico de colon de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y diferentes edulcorantes en el agua de bebida

Se midió la longitud del epitelio intestinal mediante el uso del software ImageJ, y se observó que en los todos los grupos alimentados con dieta control tenían un comportamiento similar al grupo AIN con agua, exceptuando los grupos alimentadas con sacarosa o sucralosa. Respecto a la adición de una dieta alta en grasa, hubo una reducción significativa del epitelio, exceptuando los grupos alimentados con GS, mascabado o miel. Algo interesante, es que ambos grupos alimentados con miel tenían una mayor longitud del epitelio intestinal (Figura 36), esto puede estar relacionado con la abundancia de la ocludina en las diferentes porciones de intestino ya que muestran un patrón similar (Figura 37).

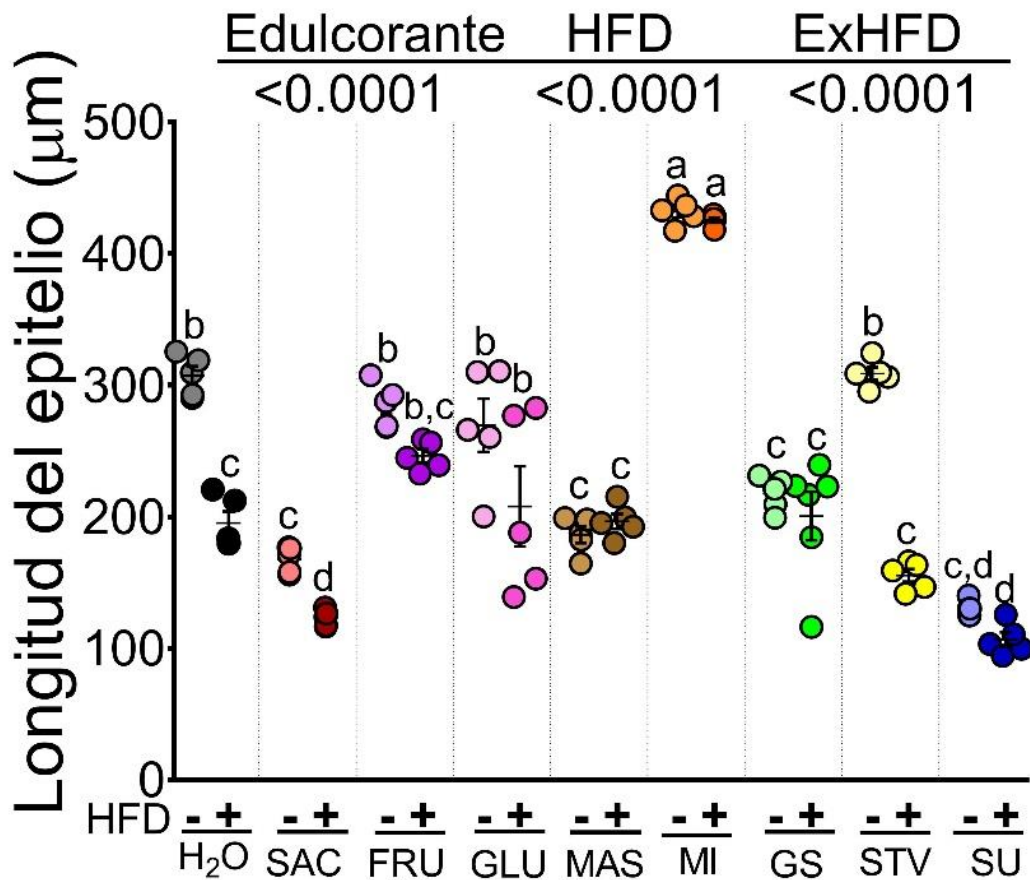


Figura 36. Determinación del grosor del epitelio de colon de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d$, $p<0.05$

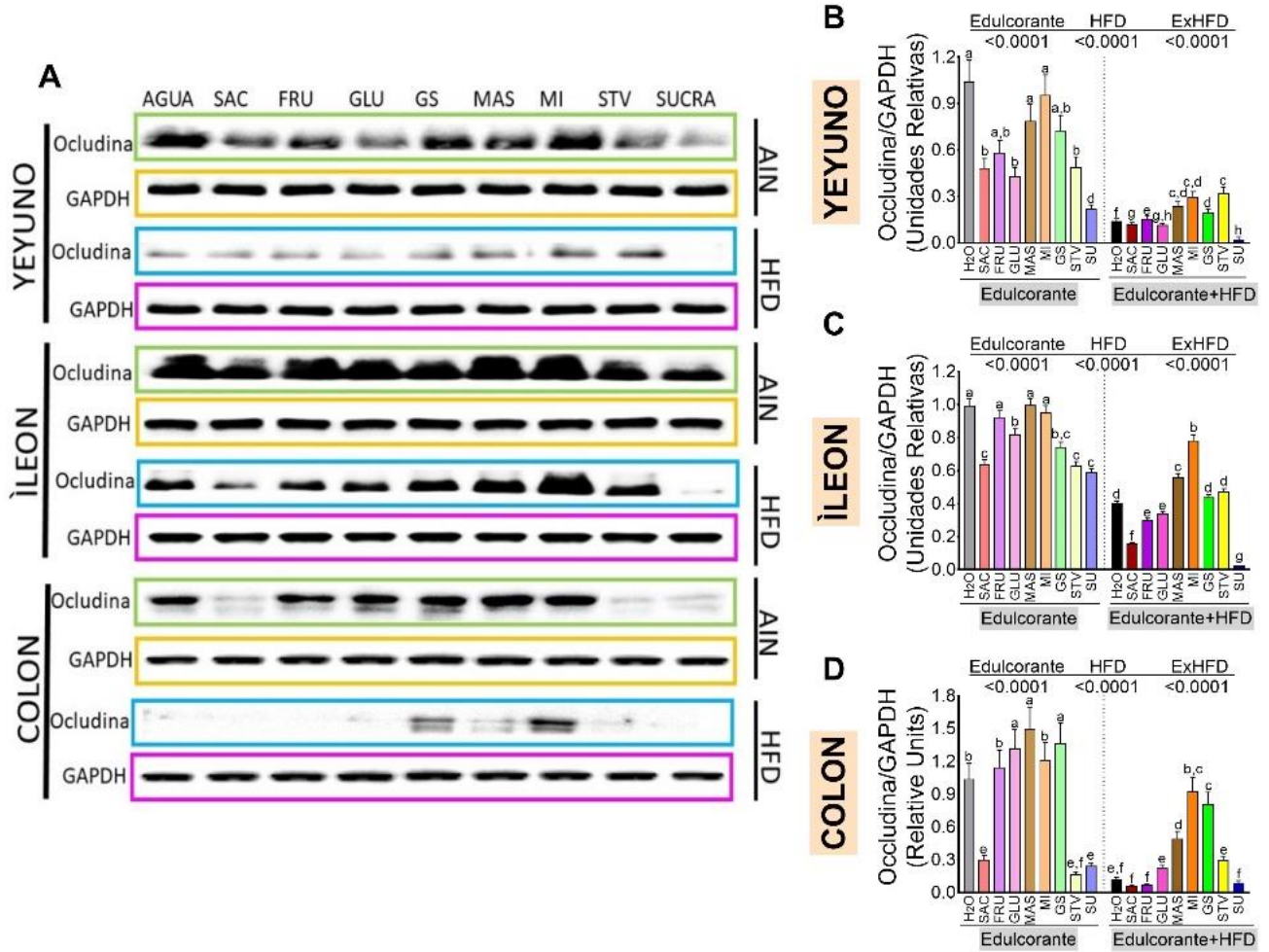


Figura 37. Determinación de la abundancia de las ocludinas en intestino de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa saturada y diferentes edulcorantes en el agua de bebida. A) Imágenes representativas de abundancia de ocludina en diferentes secciones de intestinos de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes. B) Abundancia relativa de ocludina en yeyuno C) Abundancia relativa de ocludina en íleon D) Abundancia relativa de ocludina en colon. Los datos se presentan en promedio \pm EEM, $a>b>c>d>e>f>g$, $p<0.05$

XIX. Caracterización del microbioma intestinal de ratas alimentadas con una dieta control o dieta alta en grasa y diferentes edulcorantes

De la secuenciación por síntesis en la plataforma HiSeq Illumina se obtuvieron $3,182,927 \pm 94,780$ lecturas por muestra después del ensamblaje con IDBA-UD se obtuvieron contigs con una longitud promedio de 713.59 ± 10.72 pb. Se tomaron los genes de codificación de proteínas y se anotaron con PROKKA. Los genes se reportaron con una homología el 90% y longitud de alineamiento el 95% usando CD-hit Se obtuvieron 4538494 de genes, pero se hizo una análisis de conglomerados teniendo una reducción al 64.4%. Se estudió la diversidad genética por tratamiento utilizando el índice de diversidad de Margalef corregido por FDR, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 38

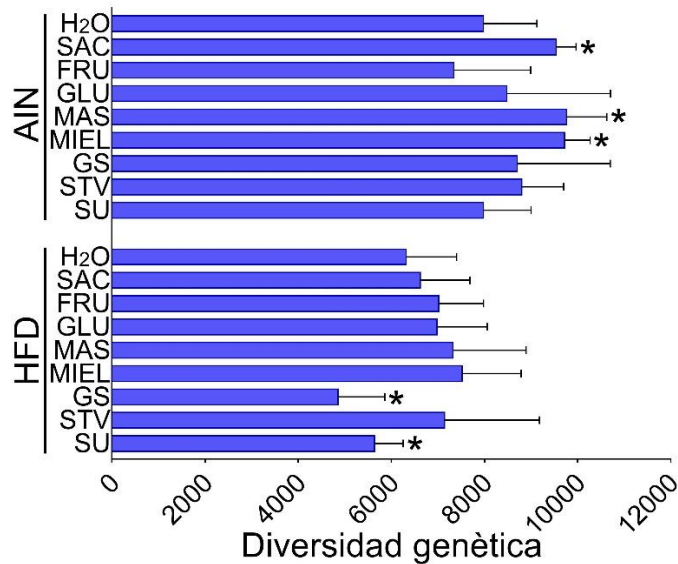


Figura 38. Diversidad genética de las bacterias provenientes de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes

Curiosamente, la diversidad microbiana más baja observada en los grupos alimentados con HFD+sucralosa o HFD+glucósidos de esteviol se asoció con la menor riqueza de genes (Figura 38) y las concentraciones más altas de triglicéridos séricos, colesterol LDL y colesterol total.

Posteriormente se analizaron los metagenomas usando las tablas de recuento de genes normalizados y se compararon con una matriz de disimilitud binomial en Vegan para representarse en un PCoA (Figura 39)

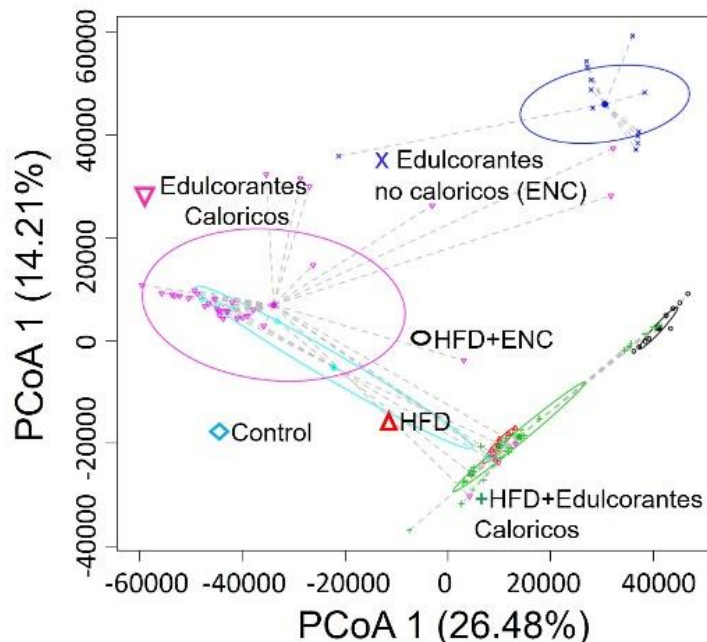


Figura 39. Análisis de componentes principales del microbioma de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes

Finalmente se determinó la abundancia de genes diferenciales usando el algoritmo DESeq2 que ejecuta una prueba de Wald binomial negativa y encuentra una significancia estadística con el cambio en el registro de los genes dividido por el error estándar. Se usó un análisis de 2 factores para comparar tipo de azúcar y presencia de grasa obteniendo la Figura 40 en donde cada círculo representa un gen, los círculos verdes son significativamente diferentes según el tipo de azúcar, mientras que los círculos azules son significativamente diferentes por la grasa. Los círculos rojos reflejan genes que son significativamente diferentes por tipo de azúcar y grasa

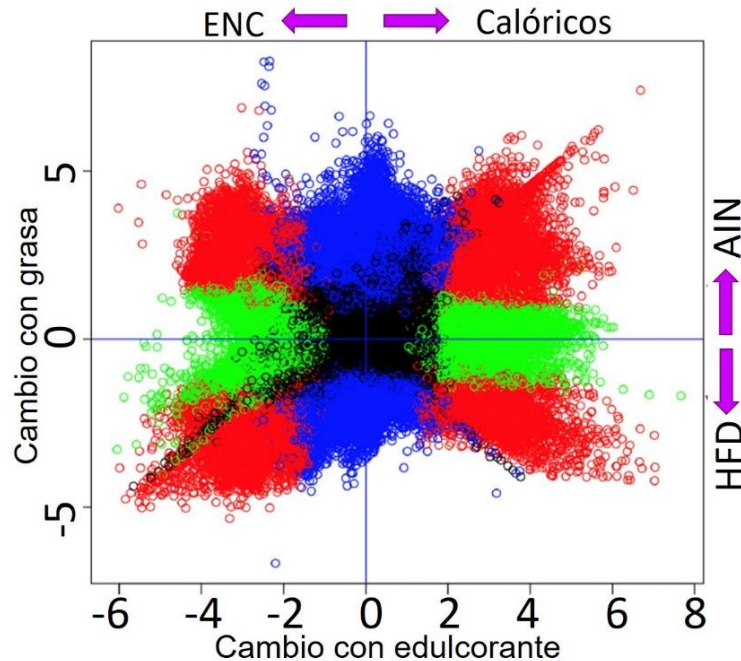


Figura 40 Análisis bifactorial del microbioma de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes

El análisis metagenómico mostró, que el número de genes involucrados en la formación de AGCC aumentó en los grupos sacarosa, sucralosa y svertia, y la presencia de un HFD aumentó el número de genes en todos los grupos, con la excepción de los grupos alimentados con mascabado y miel, incluso con la presencia de una dieta alta en grasa (Figura 41). Por otro lado, el análisis metagenómico reveló que los grupos alimentados con un HFD+glucósidos de esteviol, HFD+sacarosa, HFD+sucralosa y sacarosa tenían el mayor número de genes involucrados en la producción de LPS. Es importante tener en cuenta que los grupos alimentados con miel, mascabado o glucósidos de esteviol tenían el menor número de genes involucrados en la producción de LPS (Figura 42). Esto nos habla de que, aunque la población bacteriana no cambió de manera similar, existe redundancia en los genes involucrados en las vías de señalización por lo que los efectos metabólicos observados son similares

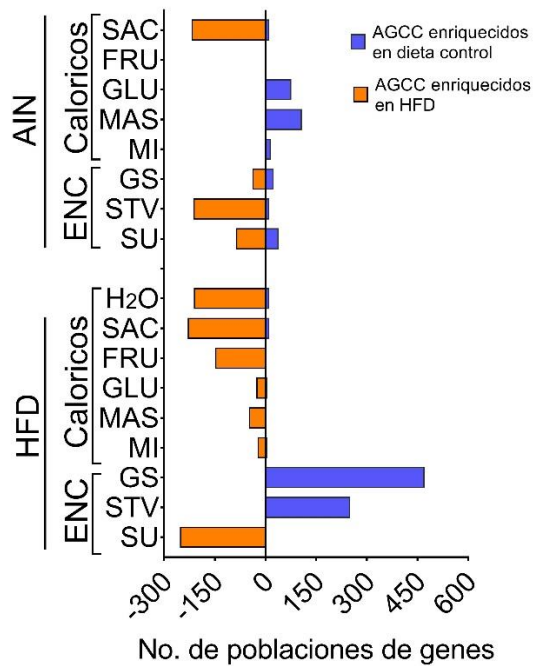


Figura 41 Análisis del microbioma de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes sobre la vía de producción de AGCCs

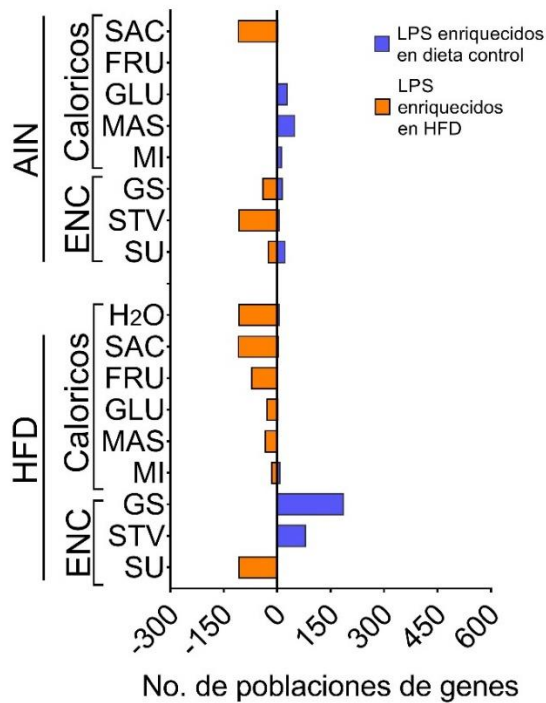


Figura 42 Análisis del microbioma de ratas alimentadas con una dieta control o alta en grasa y diferentes edulcorantes sobre la vía de producción de LPS

Discusión.

Actualmente los problemas de obesidad y las comorbilidades asociadas han generado la incorporación de nuevos edulcorantes con pocas calorías, como una posible estrategia para combatir estos problemas de salud; sin embargo, algunos estudios han asociado algunos de estos edulcorantes con intolerancia a la glucosa (Suez et al., 2014), esto ha generado una gran confusión para el consumidor sobre qué tipo de edulcorante es la mejor opción (Fernstrom, 2015). Por otro lado, el alto consumo de grasas saturadas se ha asociado con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares (Goossens, 2017); por ello, es difícil saber si el desarrollo de ciertas complicaciones durante la obesidad son a causa de los edulcorantes, de la grasa saturada o la combinación de ambos factores (Siri-Tarino, Sun, Hu, & Krauss, 2010)

En los últimos años, el consumo de azúcar ha incrementado de manera significativa llegando hasta a 4 veces la ingesta máxima recomendada (Bleich, Vercammen, Koma, & Li, 2018) además, este exceso de azúcar así como el consumo de edulcorantes no calóricos no calóricos se han asociado con la generación de intolerancia a la glucosa (Liauchonak, Qorri, Dawoud, Riat, & Szewczuk, 2019), un incremento en los picos posprandiales de insulina (Pepino & Bourne, 2011) y un significativo aumento en el riesgo de desarrollar síndrome metabólico, obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Nettleton et al., 2009; Pereira, 2014). Sin embargo, la evaluación del impacto de los azúcares en la dieta a menudo se ve obstaculizada por la falta de un comparador isocalórico, por lo que no está claro si los efectos son el resultado del consumo de cierto tipo de edulcorantes o simplemente el consumo excesivo de energía (Della Corte et al., 2018). Actualmente, no existen estudios claros sobre los mecanismos de acción asociados con estas enfermedades, pero se ha postulado que el vínculo entre los edulcorantes y estas enfermedades puede ser parcialmente mediado a través de los cambios en la microbiota intestinal (Suez,

Korem, Zilberman-Schapira, Segal, & Elinav, 2015). Cabe resaltar que estos cambios en la microbiota intestinal en respuesta a edulcorantes específicos varía, en parte, dependiendo de cómo se absorbe y transporta en el intestino (O'Brien & Corpe, 2016), así como la capacidad de regular la liberación de incretinas en las células enteroendocrinas intestinales mediante la activación de ciertos receptores como lo son los receptores del dulzor, presentes en el intestino (Mortensen, Christensen, Holst, & Orskov, 2003) y por otra parte a la generación de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Canfora, Jocken, & Blaak, 2015) o moléculas asociadas a la estimulación de una respuesta inflamatoria de bajo grado, como el lipopolisacárido (LPS) que puede generar una endotoxemia metabólica, asociada a la generación de resistencia a la insulina (Cani et al., 2007; Ley, Turnbaugh, Klein, & Gordon, 2006).

Los resultados obtenidos demostraron que el consumo continuo de edulcorantes, particularmente sacarosa o sucralosa, aumentaron de manera significativa la abundancia de los receptores del dulzor T1R2 y T1R3 en la lengua y el epitelio intestinal. Estos receptores funcionan como sensores de azúcar luminal para controlar la expresión del transportador SGLT1 en respuesta a los edulcorantes consumidos (Margolskee et al., 2007), incrementando también la abundancia del transportador GLUT2, el cual permite el transporte de glucosa del intestino a circulación, lo cual explica en parte un incremento en la glucosa en suero. (Moran et al., 2014). Se ha demostrado un aumento en GLUT2 en enterocitos humanos de sujetos con obesidad, que están asociados con resistencia a la insulina e hiperglucemia (Ait-Omar et al., 2011). Por otra parte, las células L del intestino contienen receptores gustativos que modulan la secreción de GLP-1 en el intestino y puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de obesidad, diabetes y cambios en la motilidad intestinal (Jang et al., 2007). Los resultados muestran que el consumo de sacarosa o sucralosa aumenta significativamente la secreción de las incretinas GIP y GLP-1, lo que

favorece un mayor aumento de peso corporal, hiperglucemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia (Holst, 2007; Yip & Wolfe, 2000). En adición, la combinación de ambos edulcorantes con una dieta alta en grasa saturada, pronunciaron las anormalidades mencionadas. Por otro lado, también es importante considerar que GIP puede desempeñar un papel crítico en el metabolismo del adipocito, generando resistencia a la insulina al impedir la fosforilación de IRS y de AKT de manera adecuada.

Respecto al consumo de edulcorantes y la microbiota intestinal, se observó que los grupos con edulcorantes calóricos tenían una mayor alpha diversidad en comparación con los no calóricos, además de que la composición de esta microbiota era muy diferente. Interesantemente, a pesar de que tanto sucralosa como sacarosa mostraron diferentes cambios en la microbiota, produjeron anormalidades fisiológicas, bioquímicas e inmunológicas similares, lo que nos sugiere que estos daños son mediados por diferentes mecanismos. La disbiosis más notoria, junto con la menor alpha diversidad y riqueza de genes se observó después del consumo de sucralosa en el que la bacteria predominante fue *B. fragilis* con un aumento del 103% con respecto al grupo control. Mientras que el consumo de sacarosa produjo una mayor diversidad, así como un incremento de bacterias Gram-positivas. Independientemente de que estos desequilibrios de la microbiota intestinal son muy diferentes, ambos edulcorantes generaron una respuesta inflamatoria de bajo grado; por un lado, el consumo de sacarosa aumentó de manera significativa los niveles circulantes de LPS y TNF- α , mientras que el consumo de sucralosa inhibió la citocina antiinflamatoria IL-10 y disminuyó de manera considerable la sIgA, lo cual está asociado a un incremento del LPS circulante (Dahlgren, Wold, Hanson, & Midtvedt, 1990). Sin embargo, el resultado para ambos edulcorantes fue la inducción de la abundancia de TLR4 y una reducción de la longitud del epitelio intestinal, esto puede ser explicado en parte a la redundancia en los genes bacterianos que como se observa en los análisis metagenómicos tanto los animales que

consumieron sacarosa como los que consumieron sucralosa incrementan las vías de síntesis de LPS. Cabe mencionar, que incluso la baja concentración usada de sucralosa (1.5%), mostró efectos similares a 10% de sacarosa, estos resultados podrían deberse, en parte, al hecho de que la sucralosa puede generar compuestos que son menos polares y más lipofílicos que el compuesto original, ayudando a almacenarse por un tiempo en el tejido adiposo después del consumo (Bornemann, Werness, Buslinger, & Schiffman, 2018).

El consumo de sacarosa produjo una mayor endotoxemia metabólica, estimulando en mayor medida la abundancia del factor de transcripción NFκB en el intestino, además de que varias bacterias, particularmente en la familia de los Clostridiales están asociadas con la disrupción de la barrera intestinal, disminuyendo la abundancia de las proteínas de unión estrecha como las ocludinas, lo cual también estimula al factor NFκB que a su vez participa en la regulación de la producción de citocinas proinflamatorias, como TNFα que altera la señalización de la insulina mediante el cambio en la fosforilación en un residuo de serina del IRS-1 en músculo esquelético (Aguirre, Uchida, Yenush, Davis, & White, 2000) produciendo resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, incremento de la ganancia de masa grasa y lipogénesis, al aumentar la fosforilación de ACC produciendo resistencia a la insulina.

De manera contraria, los edulcorantes menos refinados, como la miel, los glucósidos de steviol y el mascabado promovieron el crecimiento de otras especies bacterianas, asociadas con efectos benéficos a la salud como *Bifidobacterium animalis*, *Akkermansia muciniphila* y *Ruminococcus bromii*. Estos edulcorantes no produjeron anomalías bioquímicas y aumentaron la producción de IL-10, asociada a un estado antiinflamatorio (Ouyang, Rutz, Crellin, Valdez, & Hymowitz, 2011), esto también puede estar relacionado con el incremento de la IgA secretora, la cual representa una herramienta para influir directamente en las comunidades bacterianas a través de la vía MyD88 (Kubinak

et al., 2015), ya que MyD88 regula las células B para producir sIgA manteniendo una comunidad microbiana equilibrada así como un aumento en la producción de IL-10, necesaria para mantener la mucosa y la homeostasis intestinal (Mestecky, Russell, & Elson, 1999).

Notablemente, el consumo de sucralosa produjo los niveles más altos de ácidos grasos libres circulantes indicando un posible aumento de la lipólisis del triacilglicerol por la HSL en el tejido adiposo, estos ácidos grasos libres son capaces de estimular a PPAR α , un factor de transcripción involucrado en la regulación de la oxidación de ácidos grasos, cetogénesis y gluconeogénesis, esta última, a través de PEPCCK cuando existen concentraciones altas de glucagón (Patsouris et al., 2004) todos estos mecanismos promueven un aumento en la concentración sérica de glucosa e insulina produciendo intolerancia a la glucosa (Grandl et al., 2018; Mahendran et al., 2013). Aunado a esto, el consumo de sucralosa fue el único edulcorante que produjo un coeficiente respiratorio (RER) de 0.65 indicando la formación de cuerpos cetónicos, esto sugiere que el consumo a largo plazo de sucralosa imita un estado de ayuno prolongado. Esto se confirmó por el aumento significativo del β -hidroxibutirato en suero y una disminución en el peso corporal tanto de masa magra como grasa. Por otro lado, el consumo de sacarosa no aumentó la oxidación de ácidos grasos ni produjo cetogénesis, por lo tanto, las ratas alimentadas con este disacárido tuvieron el mayor aumento de peso corporal y grasa corporal.

Como ya se ha mencionado es difícil atribuir a un solo factor dietario como los edulcorantes las anomalías presentadas durante enfermedades como la obesidad, otro factor que tiene gran impacto es la presencia de grasa saturada en conjunto con estos edulcorantes (Bisanz, Upadhyay, Turnbaugh, Ly, & Turnbaugh, 2019; Drewnowski, 2007) por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si el añadir una dieta alta en grasa saturada tenía un efecto

aditivo en las anomalías metabólicas asociadas con cambios en la microbiota intestinal. Interesantemente, la adición de esta dieta alta en grasa saturada (HFD) sí tuvo un efecto aditivo sobre la ganancia de peso y de grasa corporal cuando se combinó con sacarosa, aumentando esta última hasta 45% mientras que los grupos con únicamente uno de los dos factores (sacarosa o HFD) tenían aproximadamente un 30% de grasa corporal. Por otro lado, los edulcorantes no calóricos no mostraron una ganancia adicional de grasa corporal, mientras que los edulcorantes calóricos poco refinados (miel y mascabado) mostraron una ganancia similar a la de sus respectivos controles, es decir el efecto estaba dado únicamente por la presencia o ausencia de grasa y el edulcorante en estos dos grupos no tuvo un efecto significativo.

Respecto al gasto calórico, los animales alimentados con la combinación de HFD y sacarosa mostraron una inflexibilidad metabólica, asociada con el menor consumo de oxígeno, es decir, con un gasto calórico mucho menor. En contraste, los animales que consumieron una HFD en combinación con miel, mostraron un cociente respiratorio muy similar al grupo control, es decir, hubo una atenuación de la inflexibilidad metabólica parcial generada por el consumo de una dieta alta en grasa, lo cual también se asoció a un mayor gasto calórico y una menor ganancia de peso. Cuando se incrementa de manera significativa la grasa corporal se tiende a aumentar las concentraciones circulantes de leptina. En este estudio, al combinar una HFD con los edulcorantes esta hormona incremento de manera significativa siendo la combinación con sacarosa y sorprendentemente con sucralosa los grupos que desarrollaron hiperleptinemia. En el caso de la sucralosa, esta puede estar relacionada con la activación de los receptores gustativos en tejido adiposo implicados en la secreción de leptina (Kohno et al., 2016). Se ha demostrado que una alta concentración de leptina promueve la producción de $TNF\alpha$ en presencia de LPS (Shen, Sakaida, Uchida, Terai, & Okita, 2005). Los animales que consumieron la combinación de HFD con sacarosa aumentaron significativamente la concentración de LPS en suero y

disminuyeron la abundancia de ocludinas intestinales, lo cual desencadenó la estimulación del receptor tipo toll-4 (TLR4). El cual a través de su cascada de señalización promueve la secreción de citocinas capaces de reducir la señalización de insulina en órganos periféricos, generando intolerancia severa a la glucosa (Cani et al., 2007). Cabe resaltar que este patrón no se observó en los animales que consumieron una HFD en combinación con los edulcorantes calóricos menos refinados (miel, glucósidos de steviol y mascabado), esto se puede deber en parte a los cambios en la microbiota intestinal. Aproximadamente el 30% de la variación en la microbiota intestinal podría explicarse por la presencia o ausencia de una HFD mientras que el 18% de esta variación podría ser explicado por el tipo de edulcorante y se observaron resultados similares al hacer el análisis metagenómico de shot-gun.

Algunos de los metabolitos con mayor asociación a los cambios en la microbiota intestinal son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Los AGCC se producen principalmente a partir de la fermentación microbiana de fibra dietética. Sin embargo, los resultados del presente estudio mostraron que el consumo de sacarosa, sucralosa y svertia (glucósidos+sacarosa) presentaron la mayor concentración de AGCC en heces, siendo el acetato el más abundante. La adición de una HFD aumentó la producción de AGCC en un 58-70%. El incremento notable de acetato en los grupos antes mencionados tuvo como consecuencia la estimulación del receptor GPR43, el cual tuvo una mayor abundancia en la presencia de una HFD. Esto podría estar relacionado con la hiperleptinemia e intolerancia a la glucosa, debido a la presencia de este receptor en órganos periféricos como el tejido adiposo y el páncreas (McNelis et al., 2015), o bien también puede estar relacionado con las anomalías observadas como la hiperinsulinemia. Por otra parte los monosacáridos (fructosa y glucosa) así como los edulcorantes no refinados (glucósidos de steviol, mascabado y miel) estimularon con mayor afinidad a GPR41, el cual es un receptor que reconoce el butirato y este AGCC está relacionado con mantener la

integridad del epitelio intestinal (Baothman et al., 2016), por lo que se ha asociado a un entorno antiinflamatorio.

Por otro lado, una baja diversidad microbiana, así como una baja riqueza de genes observada en los grupos alimentados con una HFD y edulcorantes no calóricos tuvo una asociación con la desregulación del metabolismo de lípidos, generando niveles altos de triglicéridos, colesterol total y colesterol LDL. Curiosamente, los genes microbianos de las vías estudiadas se modificaron tanto por el tipo de edulcorante como por la presencia de un HFD, siendo el grupo con una HFD y sucralosa el que mostró la mayor disbiosis.

Con los resultados generados en el presente estudio pudimos conocer los mecanismos de acción de los diferentes edulcorantes calóricos y no calóricos y el efecto adverso de la adición de grasas a la dieta y su función en la modulación de la microbiota intestinal, la formación de AGCCs y su efecto sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Sin embargo, son necesarios otros estudios para evaluar los efectos a largo plazo de estos edulcorantes en humanos con una duración adecuada para caracterizar completamente la naturaleza compleja y la importancia biológica de cada edulcorante. Cabe resaltar, que el presente trabajo demostró que la miel tiene un efecto protector en el desarrollo de la obesidad, ya que las ratas que se alimentan con miel mostraron los niveles más bajos de incretinas, insulina, glucosa sérica y leptina y la menor estimulación de las vías de señalización inflamatorias.

Conclusiones.

- El consumo de sacarosa o sucralosa promueve la ganancia de peso, la acumulación de grasa corporal, disminución del gasto energético, siendo más pronunciada con la adición de una dieta alta en grasa saturada.
- El consumo de glucósidos de esteviol, mascabado o miel, mantiene valores de ganancia de peso, composición corporal y gasto energético muy similares al grupo control, incluso con la adición de grasa en la dieta pareciera tener un efecto protector al mostrar menor inflexibilidad metabólica, menos grasa corporal y mayor consumo de oxígeno.
- La sacarosa y la sucralosa por si solas generan intolerancia a la glucosa, siendo esta exacerbada al adicionar una dieta alta en grasa saturada.
- Los grupos que consumieron glucósidos de esteviol, mascabado o miel tuvieron curvas de tolerancia a la glucosa muy similares a los controles.
- En ayuno, la glucosa, el colesterol total, los triglicéridos y la insulina fueron alterados por sacarosa, svertia y sucralosa con ambas dietas (control o HFD) así como por los glucósidos de esteviol, pero únicamente en combinación con una dieta alta en grasa. En el resto de los grupos si bien presento un incremento en dichos parámetros al adicionar una HFD, los valores se encontraban en rango normal.
- La sucralosa incrementa de manera significativa los valores de colesterol LDL y de ácidos grasos libres circulantes.
- El consumo de edulcorantes no calóricos disminuye la alfa diversidad y la riqueza genética de las bacterias.

- La beta diversidad de la microbiota intestinal se ve afectada tanto por el tipo de dieta (30%) y por el tipo de edulcorante (18%).
- El consumo de miel, glucósidos de esteviol y mascabado incrementaron la presencia de *Bifidobacterium animalis*, *Akkermansia muciniphila* y *Ruminococcus bromii*, respectivamente, bacterias consideradas benéficas.
- A pesar de tener alteraciones bioquímicas similares la sacarosa y sucralosa el perfil microbiano es diferente, teniendo un importante aumento de *B. fragilis* en el caso de sucralosa.
- Existe una mayor abundancia de GPR43 en los grupos con sacarosa o sucralosa, ya que existe una mayor producción de acetato, mientras que los grupos que consumieron miel, mascabado y glucósidos de esteviol, presentan una mayor producción de butirato y mayor abundancia de GPR41.
- Los grupos que consumieron sacarosa, sucralosa, sveltia o fructosa mostraron un incremento importante de LPS y TNF α en suero siendo este incremento mas pronunciado con la adición de una dieta alta en grasa.
- El consumo de glucósidos, mascabado y miel disminuyen de manera considerable la endotoxemia metabólica, aunque con la adición de una dieta alta en grasa los niveles aumentan, pero de manera similar al grupo que consumió la dieta alta en grasa sin edulcorante.
- Los grupos con una dieta alta en grasa tuvieron una mayor abundancia de los receptores TLR-4 y TLR-2 así como de NF κ B en el intestino. Este incremento tuvo sinergia con el consumo de sacarosa, sveltia o sucralosa, estos cambios coinciden con la disminución de ocludinas en particular en colon.
- Los grupos alimentados con una dieta alta en grasa tuvieron una disminución de la abundancia de T1R2 y T1R3 en la lengua en comparación con los alimentados con una dieta control

- El consumo de Svetia y sucralosa incrementan de manera importante la abundancia de los receptores de dulzor en intestino, esto se ve exacerbado con el consumo de una dieta alta en grasa saturada
- Existe una menor abundancia de los receptores de dulzor en el intestino de ratas que consumieron glucósidos de esteviol, mascabado o miel, lo cual está puede estar relacionado con una menor abundancia de los transportadores de glucosa en el mismo.
- El consumo de sacarosa, sucralosa y svetia produce un incremento de las incretinas tanto en intestino como en suero.
- El consumo de glucósidos de esteviol, mascabado o miel mantiene niveles de incretinas similares a los del grupo control. La miel incluso en presencia de una dieta alta en grasa.
- El consumo de sacarosa, svetia o sucralosa incrementa la fosforilación en el residuo de serina de IRS en musculo esquelético, lo que podría estar relacionado con la resistencia a la insulina, esto se ve mas pronunciado al combinarse estos edulcorantes con una dieta alta en grasa.
- El consumo de miel, glucósidos de esteviol y mascabado incrementan la fosforilación de AKT en musculo esquelético, lo que mantiene una adecuada respuesta a la insulina, aun en presencia de una dieta alta en grasa.
- El consumo de sacarosa, sucralosa y svetia en combinación con una dieta alta en grasa incrementa la expresión de genes lipogénicos, por lo que estos grupos muestran esteatosis hepática.
- El consumo de miel incrementa la longitud del epitelio intestinal

Resumen gráfico.

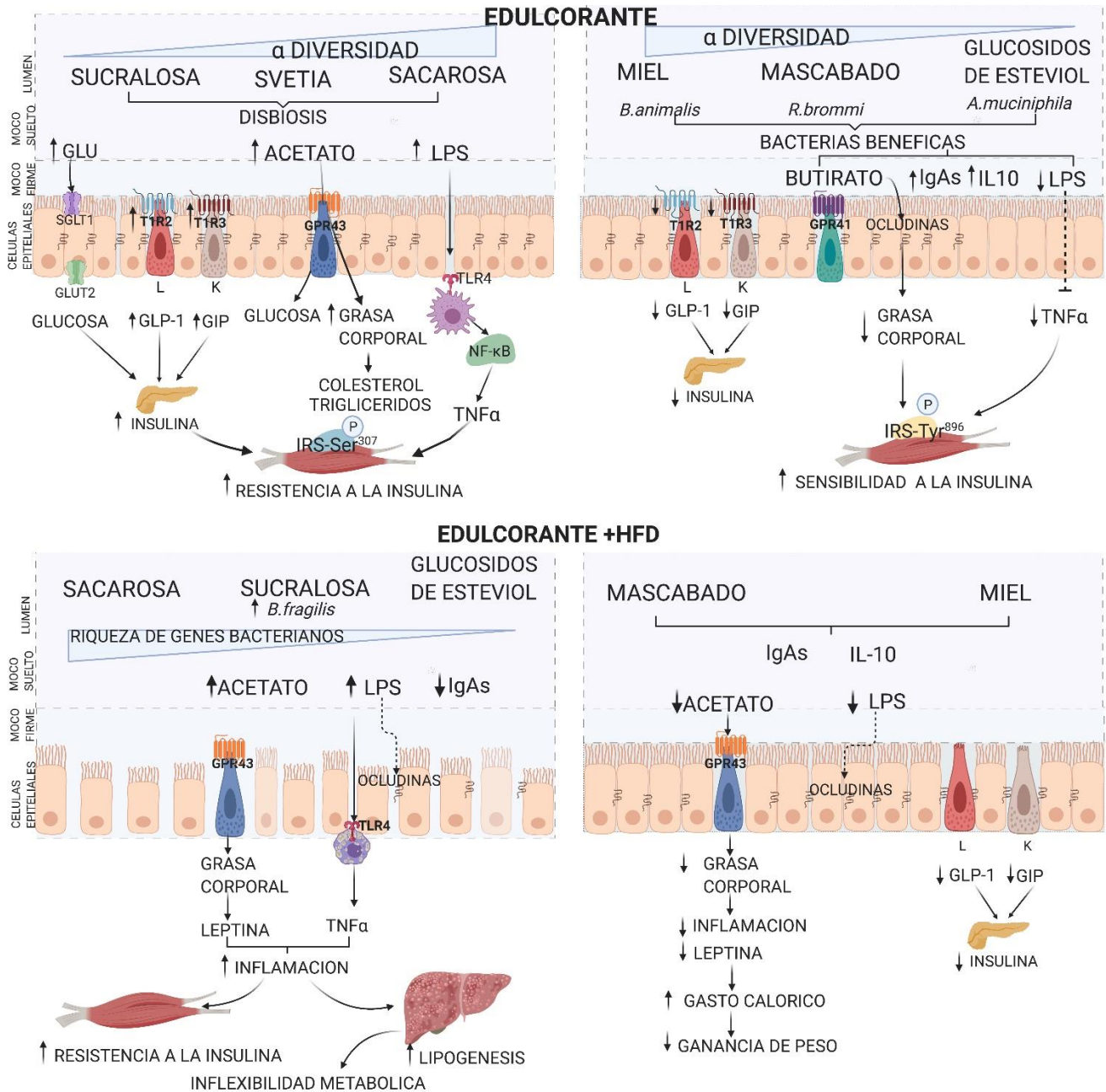


Figura 43. Efectos metabólicos del consumo de edulcorantes calóricos y no calóricos en combinación con una dieta alta en grasa saturada. El consumo de sacarosa y sucralosa por si solas incrementan la resistencia a la insulina, mientras que el consumo de miel, mascabado y glucósidos de esteviol en combinación con una dieta control mantienen la sensibilidad a la insulina. La combinación de una dieta alta en grasa saturada con sacarosa o sucralosa incrementa la lipogénesis y la inflexibilidad metabólica; mientras que el consumo de miel o mascabado disminuyen los marcadores de inflamación y la ganancia de grasa corporal aun en combinación con una HFD.

Bibliografía.

1. Aguirre, V., Uchida, T., Yenush, L., Davis, R., & White, M. F. (2000). The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem*, *275*(12), 9047-9054. doi:10.1074/jbc.275.12.9047
2. Ait-Omar, A., Monteiro-Sepulveda, M., Poitou, C., Le Gall, M., Cotillard, A., Gilet, J., . . . Brot-Laroche, E. (2011). GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes*, *60*(10), 2598-2607. doi:10.2337/db10-1740
3. Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
4. Apovian, C. M. (2016). Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. *Am J Manag Care*, *22*(7 Suppl), s176-185.
5. Arch, J. R., Hislop, D., Wang, S. J., & Speakman, J. R. (2006). Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals. *Int J Obes (Lond)*, *30*(9), 1322-1331. doi:10.1038/sj.ijo.0803280
6. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., . . . Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(44), 15718-15723. doi:10.1073/pnas.0407076101
7. Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(3), 979-984. doi:10.1073/pnas.0605374104
8. Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, *132*(6), 2131-2157. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.054
9. Baothman, O. A., Zamzami, M. A., Taher, I., Abubaker, J., & Abu-Farha, M. (2016). The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis*, *15*, 108. doi:10.1186/s12944-016-0278-4
10. Bhattarai, Y., & Kashyap, P. C. (2016). Germ-Free Mice Model for Studying Host-Microbial Interactions. *Methods Mol Biol*, *1438*, 123-135. doi:10.1007/978-1-4939-3661-8_8
11. Bisanz, J. E., Upadhyay, V., Turnbaugh, J. A., Ly, K., & Turnbaugh, P. J. (2019). Meta-Analysis Reveals Reproducible Gut Microbiome Alterations in Response to

a High-Fat Diet. *Cell Host Microbe*, 26(2), 265-272 e264.
doi:10.1016/j.chom.2019.06.013

12. Bleich, S. N., Vercammen, K. A., Koma, J. W., & Li, Z. (2018). Trends in Beverage Consumption Among Children and Adults, 2003-2014. *Obesity (Silver Spring)*, 26(2), 432-441. doi:10.1002/oby.22056
13. Boesmans, L., Valles-Colomer, M., Wang, J., Eeckhaut, V., Falony, G., Ducatelle, R., . . . Verbeke, K. (2018). Butyrate Producers as Potential Next-Generation Probiotics: Safety Assessment of the Administration of *Butyricoccus pullicaecorum* to Healthy Volunteers. *mSystems*, 3(6). doi:10.1128/mSystems.00094-18
14. Bornemann, V., Werness, S. C., Buslinger, L., & Schiffman, S. S. (2018). Intestinal Metabolism and Bioaccumulation of Sucralose In Adipose Tissue In The Rat. *J Toxicol Environ Health A*, 81(18), 913-923. doi:10.1080/15287394.2018.1502560
15. Canfora, E. E., Jocken, J. W., & Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol*, 11(10), 577-591. doi:10.1038/nrendo.2015.128
16. Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., . . . Burcelin, R. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772. doi:10.2337/db06-1491
17. Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (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. doi:10.2337/db07-1403
18. Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food Chem Toxicol*, 107(Pt A), 302-317. doi:10.1016/j.fct.2017.06.046
19. Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117), 288-294. doi:10.1038/nature05401
20. Chen, L., Chen, R., Wang, H., & Liang, F. (2015). Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol*, 2015, 508409. doi:10.1155/2015/508409
21. Cummings, J. H., Pomare, E. W., Branch, W. J., Naylor, C. P., & Macfarlane, G. T. (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10), 1221-1227. doi:10.1136/gut.28.10.1221

22. Dahlgren, U. I., Wold, A. E., Hanson, L. A., & Midtvedt, T. (1990). The secretory antibody response in milk and bile against fimbriae and LPS in rats monocolonized or immunized in the Peyer's patches with *Escherichia coli*. *Immunology*, *71*(2), 295-300.
23. Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., . . . Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. *Foods*, *8*(3). doi:10.3390/foods8030092
24. Della Corte, K. W., Perrar, I., Penczynski, K. J., Schwingshackl, L., Herder, C., & Buyken, A. E. (2018). Effect of Dietary Sugar Intake on Biomarkers of Subclinical Inflammation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients*, *10*(5). doi:10.3390/nu10050606
25. Denina, I., Semjonovs, P., Fomina, A., Treimane, R., & Linde, R. (2014). The influence of stevia glycosides on the growth of *Lactobacillus reuteri* strains. *Letts Appl Microbiol*, *58*(3), 278-284. doi:10.1111/lam.12187
26. DeWeerd, S. (2014). Microbiome: A complicated relationship status. *Nature*, *508*(7496), S61-63. doi:10.1038/508S61a
27. Drewnowski, A. (2007). The real contribution of added sugars and fats to obesity. *Epidemiol Rev*, *29*, 160-171. doi:10.1093/epirev/mxm011
28. Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, *27*(1), 73-83. doi:10.1016/j.bpg.2013.03.007
29. Fernstrom, J. D. (2015). Non-nutritive sweeteners and obesity. *Annu Rev Food Sci Technol*, *6*, 119-136. doi:10.1146/annurev-food-022814-015635
30. Fernstrom, J. D., Munger, S. D., Sclafani, A., de Araujo, I. E., Roberts, A., & Molinary, S. (2012). Mechanisms for sweetness. *J Nutr*, *142*(6), 1134S-1141S. doi:10.3945/jn.111.149567
31. Flores, M., Macias, N., Rivera, M., Lozada, A., Barquera, S., Rivera-Dommarco, J., & Tucker, K. L. (2010). Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight or obese. *J Nutr*, *140*(10), 1869-1873. doi:10.3945/jn.110.121533
32. Foley, M. H., Cockburn, D. W., & Koropatkin, N. M. (2016). The Sus operon: a model system for starch uptake by the human gut Bacteroidetes. *Cell Mol Life Sci*, *73*(14), 2603-2617. doi:10.1007/s00018-016-2242-x
33. Frazier, T. H., DiBaise, J. K., & McClain, C. J. (2011). Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, *35*(5 Suppl), 14S-20S. doi:10.1177/0148607111413772

34. Gao, Z., Hwang, D., Bataille, F., Lefevre, M., York, D., Quon, M. J., & Ye, J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*, *277*(50), 48115-48121. doi:10.1074/jbc.M209459200
35. Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003). Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *J Agric Food Chem*, *51*(22), 6618-6622. doi:10.1021/jf0303619
36. Genton, L., Cani, P. D., & Schrenzel, J. (2015). Alterations of gut barrier and gut microbiota in food restriction, food deprivation and protein-energy wasting. *Clin Nutr*, *34*(3), 341-349. doi:10.1016/j.clnu.2014.10.003
37. Ghoshal, S., Witta, J., Zhong, J., de Villiers, W., & Eckhardt, E. (2009). Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides. *J Lipid Res*, *50*(1), 90-97. doi:10.1194/jlr.M800156-JLR200
38. Goossens, G. H. (2017). The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function. *Obes Facts*, *10*(3), 207-215. doi:10.1159/000471488
39. Gordon, J. I., Dewey, K. G., Mills, D. A., & Medzhitov, R. M. (2012). The human gut microbiota and undernutrition. *Sci Transl Med*, *4*(137), 137ps112. doi:10.1126/scitranslmed.3004347
40. Grandl, G., Straub, L., Rudigier, C., Arnold, M., Wueest, S., Konrad, D., & Wolfrum, C. (2018). Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet. *J Physiol*, *596*(19), 4597-4609. doi:10.1113/JP275173
41. Grembecka, M. (2015). Natural sweeteners in a human diet. *Rocz Panstw Zakl Hig*, *66*(3), 195-202.
42. Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, *124*(1), 3-20; quiz 21-22. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038
43. Guerville, M., Leroy, A., Siquin, A., Laugerette, F., Michalski, M. C., & Boudry, G. (2017). Western-diet consumption induces alteration of barrier function mechanisms in the ileum that correlates with metabolic endotoxemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *313*(2), E107-E120. doi:10.1152/ajpendo.00372.2016
44. Guevara-Cruz, M., Flores-Lopez, A. G., Aguilar-Lopez, M., Sanchez-Tapia, M., Medina-Vera, I., Diaz, D., . . . Torres, N. (2019). Improvement of Lipoprotein Profile and Metabolic Endotoxemia by a Lifestyle Intervention That Modifies the

- Gut Microbiota in Subjects With Metabolic Syndrome. *J Am Heart Assoc*, 8(17), e012401. doi:10.1161/JAHA.119.012401
45. Guo, S., Nighot, M., Al-Sadi, R., Alhmoud, T., Nighot, P., & Ma, T. Y. (2015). Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *J Immunol*, 195(10), 4999-5010. doi:10.4049/jimmunol.1402598
 46. Hess, E. L., Myers, E. A., Swithers, S. E., & Hedrick, V. E. (2018). Associations Between Nonnutritive Sweetener Intake and Metabolic Syndrome in Adults. *J Am Coll Nutr*, 37(6), 487-493. doi:10.1080/07315724.2018.1440658
 47. Hofmann, S. M., & Tschop, M. H. (2009). Dietary sugars: a fat difference. *J Clin Invest*, 119(5), 1089-1092. doi:10.1172/jci39332
 48. Holst, J. J. (2007). The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev*, 87(4), 1409-1439. doi:10.1152/physrev.00034.2006
 49. Hooper, L. V., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 22, 283-307. doi:10.1146/annurev.nutr.22.011602.092259
 50. Hooper, L. V., Wong, M. H., Thelin, A., Hansson, L., Falk, P. G., & Gordon, J. I. (2001). Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*, 291(5505), 881-884. doi:10.1126/science.291.5505.881
 51. Ingerslev, A. K., Theil, P. K., Hedemann, M. S., Laerke, H. N., & Bach Knudsen, K. E. (2014). Resistant starch and arabinoxylan augment SCFA absorption, but affect postprandial glucose and insulin responses differently. *Br J Nutr*, 111(9), 1564-1576. doi:10.1017/S0007114513004066
 52. Jang, H. J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M. J., Carlson, O. D., Kim, B. J., Zhou, J., . . . Egan, J. M. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(38), 15069-15074. doi:10.1073/pnas.0706890104
 53. Karlsson, F., Tremaroli, V., Nielsen, J., & Backhed, F. (2013). Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes*, 62(10), 3341-3349. doi:10.2337/db13-0844
 54. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11(5), 373-384. doi:10.1038/ni.1863
 55. Kochem, M. (2017). Type 1 Taste Receptors in Taste and Metabolism. *Ann Nutr Metab*, 70 Suppl 3, 27-36. doi:10.1159/000478760

56. Kohno, D., Koike, M., Ninomiya, Y., Kojima, I., Kitamura, T., & Yada, T. (2016). Sweet Taste Receptor Serves to Activate Glucose- and Leptin-Responsive Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and Participates in Glucose Responsiveness. *Front Neurosci*, *10*, 502. doi:10.3389/fnins.2016.00502
57. Kok, B. P., Galmozzi, A., Littlejohn, N. K., Albert, V., Godio, C., Kim, W., . . . Saez, E. (2018). Intestinal bitter taste receptor activation alters hormone secretion and imparts metabolic benefits. *Mol Metab*, *16*, 76-87. doi:10.1016/j.molmet.2018.07.013
58. Kokrashvili, Z., Mosinger, B., & Margolskee, R. F. (2009). T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Ann N Y Acad Sci*, *1170*, 91-94. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04485.x
59. Kubinak, J. L., Petersen, C., Stephens, W. Z., Soto, R., Bake, E., O'Connell, R. M., & Round, J. L. (2015). MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health. *Cell Host Microbe*, *17*(2), 153-163. doi:10.1016/j.chom.2014.12.009
60. Laffitte, A., Neiers, F., & Briand, L. (2014). Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *17*(4), 379-385. doi:10.1097/MCO.0000000000000058
61. Lee, J., Koehler, J., Yusta, B., Bahrami, J., Matthews, D., Rafii, M., . . . Drucker, D. J. (2017). Enteroendocrine-derived glucagon-like peptide-2 controls intestinal amino acid transport. *Mol Metab*, *6*(3), 245-255. doi:10.1016/j.molmet.2017.01.005
62. Ley, R. E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C. A., Knight, R. D., & Gordon, J. I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(31), 11070-11075. doi:10.1073/pnas.0504978102
63. Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, *444*(7122), 1022-1023. doi:10.1038/4441022a
64. Liauchonak, I., Qorri, B., Dawoud, F., Riat, Y., & Szewczuk, M. R. (2019). Non-Nutritive Sweeteners and Their Implications on the Development of Metabolic Syndrome. *Nutrients*, *11*(3). doi:10.3390/nu11030644
65. Mace, O. J., Affleck, J., Patel, N., & Kellett, G. L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol*, *582*(Pt 1), 379-392. doi:10.1113/jphysiol.2007.130906
66. Mahendran, Y., Vangipurapu, J., Cederberg, H., Stancakova, A., Pihlajamaki, J., Soininen, P., . . . Laakso, M. (2013). Association of ketone body levels with

- hyperglycemia and type 2 diabetes in 9,398 Finnish men. *Diabetes*, 62(10), 3618-3626. doi:10.2337/db12-1363
67. Margolskee, R. F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *J Biol Chem*, 277(1), 1-4. doi:10.1074/jbc.R100054200
68. Margolskee, R. F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K. S., Ilegems, E., Daly, K., . . . Shirazi-Beechey, S. P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(38), 15075-15080. doi:10.1073/pnas.0706678104
69. McNelis, J. C., Lee, Y. S., Mayoral, R., van der Kant, R., Johnson, A. M., Wollam, J., & Olefsky, J. M. (2015). GPR43 Potentiates beta-Cell Function in Obesity. *Diabetes*, 64(9), 3203-3217. doi:10.2337/db14-1938
70. Medina-Vera, I., Sanchez-Tapia, M., Noriega-Lopez, L., Granados-Portillo, O., Guevara-Cruz, M., Flores-Lopez, A., . . . Torres, N. (2019). A dietary intervention with functional foods reduces metabolic endotoxaemia and attenuates biochemical abnormalities by modifying faecal microbiota in people with type 2 diabetes. *Diabetes Metab*, 45(2), 122-131. doi:10.1016/j.diabet.2018.09.004
71. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397. doi:10.1038/41131
72. Mestecky, J., Russell, M. W., & Elson, C. O. (1999). Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut*, 44(1), 2-5. doi:10.1136/gut.44.1.2
73. Moran, A. W., Al-Rammahi, M., Zhang, C., Bravo, D., Calsamiglia, S., & Shirazi-Beechey, S. P. (2014). Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption. *J Dairy Sci*, 97(8), 4955-4972. doi:10.3168/jds.2014-8004
74. Moreira, A. P., Texeira, T. F., Ferreira, A. B., Peluzio Mdo, C., & Alfenas Rde, C. (2012). Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br J Nutr*, 108(5), 801-809. doi:10.1017/S0007114512001213
75. Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082
76. Mortensen, K., Christensen, L. L., Holst, J. J., & Orskov, C. (2003). GLP-1 and GIP are colocalized in a subset of endocrine cells in the small intestine. *Regul Pept*, 114(2-3), 189-196. doi:10.1016/s0167-0115(03)00125-3

77. Nettleton, J. A., Lutsey, P. L., Wang, Y., Lima, J. A., Michos, E. D., & 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. doi:10.2337/dc08-1799
78. Neves, A. L., Coelho, J., Couto, L., Leite-Moreira, A., & Roncon-Albuquerque, R., Jr. (2013). Metabolic endotoxemia: a molecular link between obesity and cardiovascular risk. *J Mol Endocrinol*, 51(2), R51-64. doi:10.1530/JME-13-0079
79. O'Brien, P., & Corpe, C. P. (2016). Acute Effects of Sugars and Artificial Sweeteners on Small Intestinal Sugar Transport: A Study Using CaCo-2 Cells As an In Vitro Model of the Human Enterocyte. *PLoS One*, 11(12), e0167785. doi:10.1371/journal.pone.0167785
80. O'Callaghan, A., & van Sinderen, D. (2016). Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Front Microbiol*, 7, 925. doi:10.3389/fmicb.2016.00925
81. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A., & Hymowitz, S. G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 29, 71-109. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101312
82. Patsouris, D., Mandard, S., Voshol, P. J., Escher, P., Tan, N. S., Havekes, L. M., . . . Kersten, S. (2004). PPARalpha governs glycerol metabolism. *J Clin Invest*, 114(1), 94-103. doi:10.1172/JCI20468
83. Pepino, M. Y., & Bourne, C. (2011). Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14(4), 391-395. doi:10.1097/MCO.0b013e3283468e7e
84. Pereira, M. A. (2014). Sugar-sweetened and artificially-sweetened beverages in relation to obesity risk. *Adv Nutr*, 5(6), 797-808. doi:10.3945/an.114.007062
85. Quevrain, E., Maubert, M. A., Michon, C., Chain, F., Marquant, R., Tailhades, J., . . . Seksik, P. (2016). Identification of an anti-inflammatory protein from *Faecalibacterium prausnitzii*, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut*, 65(3), 415-425. doi:10.1136/gutjnl-2014-307649
86. Rocha, D. M., Caldas, A. P., Oliveira, L. L., Bressan, J., & Hermsdorff, H. H. (2016). Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. *Atherosclerosis*, 244, 211-215. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.11.015
87. Rogers, P. J., Hogenkamp, P. S., de Graaf, C., Higgs, S., Lluch, A., Ness, A. R., . . . Mela, D. J. (2016). Does low-energy sweetener consumption affect energy

- intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int J Obes (Lond)*, 40(3), 381-394. doi:10.1038/ijo.2015.177
88. Rutkowski, J. M., Stern, J. H., & Scherer, P. E. (2015). The cell biology of fat expansion. *J Cell Biol*, 208(5), 501-512. doi:10.1083/jcb.201409063
 89. Saad, M. J., Santos, A., & Prada, P. O. (2016). Linking Gut Microbiota and Inflammation to Obesity and Insulin Resistance. *Physiology (Bethesda)*, 31(4), 283-293. doi:10.1152/physiol.00041.2015
 90. Schumann, R. R. (1992). Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol*, 143(1), 11-15. doi:10.1016/0923-2494(92)80074-u
 91. Schwiertz, A., Taras, D., Schafer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*, 18(1), 190-195. doi:10.1038/oby.2009.167
 92. Shao, B., Munford, R. S., Kitchens, R., & Varley, A. W. (2012). Hepatic uptake and deacylation of the LPS in bloodborne LPS-lipoprotein complexes. *Innate Immun*, 18(6), 825-833. doi:10.1177/1753425912442431
 93. Shen, J., Sakaida, I., Uchida, K., Terai, S., & Okita, K. (2005). Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci*, 77(13), 1502-1515. doi:10.1016/j.lfs.2005.04.004
 94. Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 91(3), 502-509. doi:10.3945/ajcn.2008.26285
 95. Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417-1435. doi:10.3390/nu5041417
 96. Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., . . . Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521), 181-186. doi:10.1038/nature13793
 97. Suez, J., Korem, T., Zilberman-Schapira, G., Segal, E., & Elinav, E. (2015). Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes*, 6(2), 149-155. doi:10.1080/19490976.2015.1017700
 98. Swartz, T. D., Duca, F. A., de Wouters, T., Sakar, Y., & Covasa, M. (2012). Up-regulation of intestinal type 1 taste receptor 3 and sodium glucose luminal

- transporter-1 expression and increased sucrose intake in mice lacking gut microbiota. *Br J Nutr*, 107(5), 621-630. doi:10.1017/S0007114511003412
99. Swithers, S. E. (2015). Artificial sweeteners are not the answer to childhood obesity. *Appetite*, 93, 85-90. doi:10.1016/j.appet.2015.03.027
100. Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol*, 121, 91-119. doi:10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9
101. Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & 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. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
102. Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *J Physiol*, 587(Pt 17), 4153-4158. doi:10.1113/jphysiol.2009.174136
103. Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., . . . Gordon, J. I. (2009). A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), 480-484. doi:10.1038/nature07540
104. Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031. doi:10.1038/nature05414
105. Ussar, S., Griffin, N. W., Bezy, O., Fujisaka, S., Vienberg, S., Softic, S., . . . Kahn, C. R. (2015). Interactions between Gut Microbiota, Host Genetics and Diet Modulate the Predisposition to Obesity and Metabolic Syndrome. *Cell Metab*, 22(3), 516-530. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.007
106. Villanueva-Millan, M. J., Perez-Matute, P., & Oteo, J. A. (2015). Gut microbiota: a key player in health and disease. A review focused on obesity. *J Physiol Biochem*, 71(3), 509-525. doi:10.1007/s13105-015-0390-3
107. Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., & Mathison, J. C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249(4975), 1431-1433. doi:10.1126/science.1698311
108. Yip, R. G., & Wolfe, M. M. (2000). GIP biology and fat metabolism. *Life Sci*, 66(2), 91-103. doi:10.1016/s0024-3205(99)00314-8
109. Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, 115(3), 255-266. doi:10.1016/s0092-8674(03)00844-4