

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN



MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉFICIT COGNITIVO DE LA
DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA

POR

LN. BIANCA JUDITH ROMERO DELGADO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN

Monterrey, Nuevo León

Noviembre, 2021



**MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉFICIT COGNITIVO DE LA
DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA**

Presenta:

LN. BIANCA JUDITH ROMERO DELGADO

Monterrey, Nuevo León

Noviembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN NUTRICIÓN



MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉFICIT COGNITIVO DE LA
DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA

PRESENTA

LN. BIANCA JUDITH ROMERO DELGADO

DIRECTORA

DRA. ANA LAURA ISABEL DE LA GARZA HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR

DR. ALBERTO CAMACHO MORALES

Monterrey, Nuevo León

Noviembre, 2021

COMITÉ DE EVALUACIÓN DE TESIS

El comité de evaluación de tesis **APROBÓ** la tesis titulada “MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉCIFIT COGNITIVO DE LA DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA”, presentada por la LN. Bianca Judith Romero Delgado, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Dr. en C. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Presidente

Dra. en C. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Secretario

Dr. en C. Alberto Camacho Morales

Vocal

Monterrey, Nuevo León a 22 de noviembre de 2021

**MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉFICIT COGNITIVO DE LA
DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA**

Aprobación de Tesis

Dra. en C. Ana Laura Isabel de la Garza Hernández

Presidente

Dr. en C. Jesús Alberto Vázquez Rodríguez

Secretario

Dr. en C. Alberto Camacho Morales

Vocal

Monterrey, Nuevo León a 22 de noviembre de 2021

DRA. EN C. BLANCA EDELIA GONZÁLEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECTORA DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE SALUD PÚBLICA Y NUTRICIÓN
PRESENTE

Por medio de la presente le comunicamos que hemos concluido la dirección y codirección de la tesis titulada: “MICROBIOTA INTESTINAL Y DÉFICIT COGNITIVO DE LA DESCENDENCIA: IMPORTANCIA DE LA DIETA MATERNA”, presentada por la LN. Bianca Judith Romero Delgado con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias en Nutrición.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

Atentamente

“Alere Flammam Veritatis”

Monterrey, Nuevo León a 22 de noviembre de 2021

Dra. Ana Laura de la Garza Hernández

Directora

Dr. Alberto Camacho Morales

Co-director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al creador por que me ha permitido llegar a este momento tan especial, por guiar cada paso que doy y no soltarme en ningún momento. Gracias por permitirme conocer personas maravillosas estos dos años.

Agradezo a mi familia, mis padres y hermanas por sus palabras de aliento, por su amor incondicional y su apoyo cuando más lo necesito, especialmente a mi madre, por impulsarnos a lograr nuestros sueños, por su esfuerzo diario por darnos lo mejor y su constante recordatorio “Apunta a las estrellas”. Francisca, Nancy y Diana son mi motor. Las amo infinitamente.

Gracias Joaquín, por este camino juntos, por estar en cada logro, apoyando firmemente cada paso que doy, por tu consuelo y amor infinito, gracias por hacer especial cada momento. Te amo.

Gracias amigos y amigas de generación, todos tienen un lugar especial en mi corazón, gracias por su entendimiento y compañía estos dos años, por las muchas tazas de café que compartimos con pláticas amenas, gracias por los aprendizajes que dejan cada uno en mi.

Gracias a mis hermanos del camino, ustedes saben quienes son. Gracias por mostrarme esta bella manera de vivir la vida en amor, fé y abundancia.

Gracias a la Facultad de Salud Pública y Nutrición y al Comité de la Maestría en Ciencias en Nutrición por abrirme las puertas, han sido dos años llenos de experiencias maravillosas.

Gracias a mi Directora de Tesis, Ana Laura, por su mentoría, por compartirme su pasión por enseñar y aprender constantemente, por sus palabras de aliento y paciencia inagotable en mi proceso. Gracias por confiar en mí desde el día uno.

Si tienes la capacidad de soñarlo, tienes la capacidad de lograrlo.

Este logro es por y para ustedes.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| ABREVIATURAS | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 5 |
| II. ANTECEDENTES | 7 |
| 2.1 Programación metabólica | 7 |
| 2.2 Endulzantes | 10 |
| 2.2.1 Endulzantes calóricos | 11 |
| 2.2.2 Endulzantes no calóricos | 15 |
| 2.2.3 Efectos metabólicos del consumo de endulzantes | 20 |
| 2.2.4 Efectos en el aprendizaje y memoria del consumo de endulzantes | 24 |
| 2.3 Microbiota | 27 |
| 2.3.1 Establecimiento de la microbiota intestinal | 30 |
| 2.3.2 Composición de la microbiota intestinal | 32 |
| 2.3.3 Función de la microbiota intestinal | 34 |
| 2.3.4 Dieta y microbiota | 36 |
| III. JUSTIFICACIÓN | 39 |
| IV. HIPOTESIS | 40 |
| V. OBJETIVOS | 41 |
| 5.1 Objetivo general | 41 |
| 5.2 Objetivos específicos | 41 |
| VI. METODOLOGÍA..... | 42 |
| 6.1 Diseño del estudio | 42 |
| 6.2 Dieta experimental | 45 |
| 6.3 Parámetros antropométricos | 46 |
| 6.4 Análisis de ingesta dietética | 47 |
| 6.5 Parámetros bioquímicos | 47 |

| | |
|--|----|
| 6.5.1 Niveles de glucosa en sangre | 47 |
| 6.6 Aprendizaje y memoria | 47 |
| 6.6.1 Prueba de alternancia forzada (Laberinto Y) | 47 |
| 6.6.2 Laberinto de Barnes | 49 |
| 6.7 Caracterización de microbiota | 51 |
| 6.7.1 Extracción y cuantificación de ADN | 51 |
| 6.7.2 Determinación de abundancia bacteriana..... | 55 |
| VII. PLAN DE ANÁLISIS | 57 |
| VIII. RECURSOS | 58 |
| 8.1 Financieros | 58 |
| 8.2 Humanos | 58 |
| IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD | 59 |
| X. RESULTADOS | 60 |
| 10.1 Ratas Wistar hembras | 60 |
| 10.1.1 Efecto de la alimentación con dieta cafetería en la etapa pre- gestacional sobre el peso e ingesta de ratas Wistar hembras. | 60 |
| 10.1.2 Efecto de la alimentación con dieta alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética..... | 62 |
| 10.2 Ratas Wistar crías macho..... | 64 |
| 10.2.1 Efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética en crías macho. | 64 |
| 10.2.2 Efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia, sobre el déficit de aprendizaje y memoria de la descendencia adulta..... | 69 |
| 10.2.3 Determinar el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre la modulación de la microbiota intestinal en ratas crías macho..... | 77 |
| XI. DISCUSIÓN..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| 11.1 Ratas Wistar hembras..... | 87 |
| 11.1.1 La dieta cafetería pregestacional induce mayor ganancia de peso y mayor ingesta en las ratas Wistar hembras..... | 87 |
| 11.1.2 Las dietas altas en endulzantes durante el periodo de gestación y lactancia modifican la ganancia de peso y glucosa de las ratas Wistar hembras..... | 89 |
| 11.2 Ratas crías macho..... | 92 |
| 11.2.1 Las dietas maternas altas en distintos endulzantes alteran el peso al nacer, ganancia de peso en crías macho, sin embargo, no hay cambios en la ingesta y glucosa de las crías macho..... | 92 |
| 11.2.2 Las dietas maternas altas en distintos endulzantes alteran el proceso de aprendizaje y memoria en las crías macho | 94 |
| 11.2.3 La dieta materna alta en endulzantes durante gestación y lactancia altera la composición de la microbiota a largo plazo (adultez) en las crías macho..... | 98 |
| XII. CONCLUSIONES..... | 103 |
| XIII. REFERENCIAS | 104 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Poder edulcorante de endulzantes nutritivos y no nutritivos | 11 |
| Tabla 2. Poder edulcorante de los endulzantes no nutritivos..... | 16 |
| Tabla 3. Dosis aceptada de ingesta diaria de endulzantes no nutritivos (NSS) según lo establecido por organismos reguladores. | 17 |
| Tabla 4. Preferencias tisulares de algunas bacterias conocidas..... | 28 |
| Tabla 5. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal. .. | 32 |
| Tabla 6. Efectos de endulzantes sobre la microbiota intestinal..... | 37 |
| Tabla 7. Composición de las 5 dietas experimentales. | 46 |
| Tabla 8. Curva estándar para la cuantificación por medio de picogreen. | 54 |
| Tabla 9. Primers utilizados para la amplificación del gen 16s ARNr | 55 |
| Tabla 10. Registro semanal de peso corporal (g) de crías Wistar macho alimentadas con dieta control. | 66 |
| Tabla 11. Peso de tejidos de ratas crías macho adultos..... | 69 |
| Tabla 12. Concentración de DNA obtenido de heces de ratas Wistar macho. . | 78 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Efectos de la programación de un entorno inadecuado en el útero sobre el crecimiento temprano y el desarrollo consecutivo de enfermedades crónicas. Adaptado de: (Marciniak et al., 2017). | 9 |
| Figura 2. Estructura química de la sacarosa..... | 12 |
| Figura 3. Compuestos presentes en la miel, procesos que influyen en la estabilidad de la miel, degradación de sus productos y reacciones secundarias que pueden ocurrir. | 14 |
| Figura 4. Estructura química de esteviósido (Stevia)..... | 18 |
| Figura 5. Efecto metabólico del consumo de endulzantes. Adaptado de: (Stanhope, 2016). | 21 |
| Figura 6. Número y tipo de bacterias predominantes por segmento del tracto gastrointestinal en individuos sanos. Adaptado de: (Tiihonen, Ouwehand, & Rautonen, 2010). | 29 |
| Figura 7. Cambios en la microbiota a lo largo de la vida. Adaptado de: (Gut Microbiota for Health, 2019)..... | 31 |
| Figura 8. Ejemplos de composición taxonómica de microbiota intestinal. En el recuadro se muestran ejemplos de bacterias pertenecientes a <i>Firmicutes</i> y <i>Bacteroidetes</i> , que representan el 90% de la microbiota humana. Adaptado de: (Rinninella et al., 2019). | 33 |
| Figura 9. Procesos de sitios del cuerpo y procesos microbianos centrales. Adaptado de: (Shafquat et al., 2014). | 35 |
| Figura 10. Gráfico del diseño experimental. a) Un total de 15 ratas Wistar hembras fueron aleatoriamente divididas en 2 grupos durante la etapa pregestacional (Control y Caf), posteriormente se dividieron en 5 grupos durante la gestación y lactancia donde se suministraron dietas altas en endulzantes. b) Al finalizar el periodo de lactancia, cuarenta crías macho | |

| | |
|--|----|
| fueron separados de sus madres y alimentados con dieta control durante 26 semanas. | 44 |
| Figura 11. Fórmula de eficiencia energética. | 47 |
| Figura 12. Estructura de Laberinto de “Y”. | 48 |
| Figura 13. Estructura de Laberinto de Barnes. | 49 |
| Figura 14. Peso (g) promedio de las ratas Wistar hembras alimentadas con dieta control y cafetería. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. Control (n=3); Cafetería (n=12). * $p < 0.05$ | 60 |
| Figura 15. Ingesta y Eficiencia energética de las madres en etapa pregestacional. (A) Ingesta (g/día). (B) Eficiencia energética (g/100 kcal). Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. Control (n=3); Cafetería (n=12). * $p < 0.05$ | 61 |
| Figura 16. Ganancia de peso (g) promedio de las madres en gestación y lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA sin encontrarse diferencia significativa. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1)..... | 62 |
| Figura 17. Efecto de la alimentación alta en endulzantes durante la gestación y lactancia. (A) Ingesta (g/día). (B) Eficiencia energética de las madres durante gestación y lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1). No se encontró diferencia estadísticamente significativa. | 63 |
| Figura 18. Comparación de los niveles de glucosa (mg/dl) en etapa pregestacional y post-lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA, sin | |

embargo, no se encontró diferencia significativa. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1). 64

Figura 19. Peso de las crías macho al momento del nacimiento. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). ** p<0.01 (C-C vs Caf-Az); ^{xx} p <0.01 (C-C vs Caf-M). 65

Figura 20. Ganancia de peso de las crías macho. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). ^{###} p<0.001 (C-C vs Caf-C); * p<0.05, ** p<0.01, ^{***} p<0.001 (C-C vs Caf-Az); ^{xx} p <0.01, ^{xxx} p <0.001 (C-C vs Caf-M), + p<0.05, ⁺⁺ p<0.01 (C-C vs Caf-St). 67

Figura 21. Glucosa en ayuno y eficiencia energética de crías macho. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA, sin existir diferencia significativa. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). A) Niveles de Glucosa en ayuno. B) Eficiencia energética. 68

Figura 22. Resultados de Laberinto de "Y". Los resultados de porcentaje de alternancia fueron analizados por Chi cuadrada de Pearson. Los resultados de entradas se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor, sin encontrarse diferencia significativa. C-C (n=3); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=4); Caf-St (n=4). (A) Porcentaje (%) de alternancia (B) Número de entradas..... 70

Figura 23. Resultados de entrenamiento prueba Barnes Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). (A) Latencia (seg); (B) Errores; (C) Desviación. * p <0.05, ^{***} p<0.001 (C-C vs Caf-Az); ^{##} p <0.01 (C-C vs Caf-C); x p<0.05 (C-C vs Caf-M); + p<0.05 (Caf-C vs Caf-M). 72

- Figura 24.** Estrategia de búsqueda de cada grupo durante el entrenamiento de laberinto de Barnes. Los resultados se expresan como porcentaje (%). C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). 73
- Figura 25.** Resultados de laberinto de Barnes en prueba de corto y largo plazo. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). (A) Latencia (seg); (B) Errores; (C) Desviación. No existe diferencia estadísticamente significativa. 75
- Figura 26. Estrategia de búsqueda de cada grupo durante la prueba de corto y largo plazo. Los resultados se expresan como porcentaje (%). C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). 76
- Figura 27.** Diversidad β de la microbiota intestinal según el análisis de componentes principales. Los datos son expresados como abundancia relativa (%) de secuencias. T1 – muestras recolectadas al destete; T2 – muestras al finalizar el experimento (edad adulta). 79
- Figura 28.** Diversidad alfa representado por Índice de Shannon. Todos los resultados son expresados como abundancia relativa (%) de secuencias y se presentan como media + DEM. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. Las diferencias de medias por grupo entre los dos tiempos (destete y adultez) se analizaron mediante la prueba t para muestras relacionadas. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). a $p < 0.05$ (Caf-M destete vs Caf-M adultez); b $p < 0.05$ (Caf-C destete vs Caf-C adultez); c $p < 0.05$ (Caf-Az destete vs Caf-Az adultez). 81
- Figura 29.** Determinación de los filos mediante secuenciación de la microbiota intestinal de ratas crías macho. Los datos se muestran en porcentaje (%). Se muestra la diferencia de la abundancia relativa de las especies bacterianas en ambos tiempos T1 (destete) y T2 (adultez). 82

Figura 30. Abundancia bacteriana a nivel de filo. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de Bacteroidetes (a), Cyanobacteria (b), Elusimicrobia (c), Firmicutes (d). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskall Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # p<0.05 (C-C vs Caf-C); * p<0.05, ** p<0.05 (C-C vs Caf-Az); + p<0.05 (C-C vs Caf-St). 83

Figura 31. Abundancia bacteriana a nivel de orden. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de *Bacteroidales* (a), *Lactobacillales* (b), *Clostridiales* (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskall Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # p<0.05 (C-C vs Caf-C); ** p<0.01 (C-C vs Caf-Az); + p<0.05, ++ p<0.01(C-C vs Caf-St). 84

Figura 32. Abundancia bacteriana a nivel de familia. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de *Elusimicrobiaceae* (a), *Ruminococcaceae* (b), *Enterobacteriaceae* (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskall Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # p<0.05 (C-C vs Caf-C); ** p<0.01 (C-C vs Caf-Az). 85

Figura 33. Abundancia bacteriana a nivel de género. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm DEM. En la imagen se muestra abundancia de Elusimicrobia (a), Lactobacilos (b), Clostridium (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskall Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). ## p<0.01 (C-C vs Caf-C); * p<0.05 (C-C vs Caf-Az); ++ p<0.01(C-C vs Caf-St). 86

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ADA | Asociación Americana de Diabetes (American Diabetes Association) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNr 16S | ARN ribosomal 16S |
| ASB | Bebidas endulzadas artificialmente (Artificially sweetened beverage) |
| CIDICS | Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud |
| Cm | Centímetro |
| COBICIS | Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud de la UANL |
| C-C | Control - Control |
| Caf-C | Cafetería - Control |
| Caf-Az | Cafetería – Azúcar |
| Caf-M | Cafetería - Miel |
| Caf-St | Cafetería - Stevia |
| DEM | Desviación estándar de la media |
| EEM | Error estándar de la media |
| EFSA | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria |
| FAO | Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura |
| FDA | Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug administration) |
| GI | Índice glucémico (Glycemic Index) |
| GIP | Péptido insulínico dependiente de la glucosa |
| GLUT-2 | Transportadores de glucosa tipo 2 |
| GLP-1 | Péptido similar al glucagón tipo 1 |
| GLP-2 | Péptido similar al glucagón tipo 2 |
| Gr | Gramos |
| G/día | Gramos por día |
| GRAS | Generalmente reconocido como seguro (Generally recognized as |

| | |
|-------------------|--|
| | Safe) |
| IMC | Índice de masa corporal |
| Kg | Kilogramo |
| Kcal | Kilocaloria |
| Kcal/g | Kilocaloria por gramo |
| Kcal/día | Kilocaloria por día |
| LPS | Lipopolisacaridos |
| Mg | Miligramo |
| Mg/Kg | Miligramo por Kilogramo |
| mg/dL | Miligramos por decilitro |
| ml | Mililitro |
| ng/μl | Nanogramo por microlitro |
| NOM | Norma Oficial Mexicana |
| NNS | Endulzante no nutritivo (Non-nutritive sweeteners) |
| OMS | Organización mundial de la salud |
| OTUs | Unidades taxonómicas operativa |
| PCR | Reacción en cadena de polimerasa (Polymerase Chain Reaction) |
| PCoA | Análisis de coordenadas principales |
| pH | Potencial Hidrogeno |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| SSB | Sugar Sweetened Beverages |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SCF | Comité Científico sobre Alimentación Humana |
| SGLT1 | Cotransportador de sodio-glucosa tipo 1 |
| SCFA | Ácidos grasos de cadena corta (short chain fat acid) |
| S | Segundos |
| S.A de C.V | Sociedad anónima de Capital variable |
| T1 | Tiempo 1 |
| T2 | Tiempo 2 |
| T3 | Tiempo 3 |
| μl | Microlitro |
| % | Porcentaje |
| °C | Grados Celsius |

RESUMEN

Antecedentes: En los últimos años se ha evidenciado que el ambiente materno, incluyendo la dieta, influye en la composición bacteriana de la descendencia. Así, el consumo de endulzantes, calóricos o no calóricos, durante el periodo perinatal puede inducir disbiosis intestinal y programar a la descendencia a desarrollar problemas cognitivos en la edad adulta.

Objetivo: Determinar el efecto de la dieta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre los cambios en la microbiota intestinal y el impacto en el déficit cognitivo de la descendencia adulta.

Métodos: Diez ratas crías macho de madres alimentadas con dieta estándar (C-C) y treinta con dieta cafetería pregestacional y dieta estándar (Caf-C, n=6), dieta alta en sacarosa (Caf-Az, n=11), dieta alta en miel (Caf-M, n=8) y dieta alta en stevia (Caf-S, n=5) durante la gestación y lactancia, fueron alimentadas con dieta estándar después del destete. El peso corporal y la ingesta dietética fueron registrados una vez a la semana durante 26 semanas. Las pruebas de aprendizaje y memoria se realizaron en las semanas 18 y 23 de vida utilizando los laberintos Y y de Barnes, respectivamente. Se recolectaron y analizaron muestras fecales de los periodos de lactancia y adultez mediante la secuenciación de la región 16S rRNA V3-V4 de la microbiota intestinal.

Resultados: Las dietas maternas altas en sacarosa (Caf-Az) y stevia (Caf-St) programaron a la descendencia a presentar cambios en la diversidad microbiana después del destete al analizar el índice Shannon ($p < 0.01$). Además, la programación de la dieta materna alta en stevia se prolongó hasta la edad adulta. El aumento de la abundancia relativa del filo *Firmicutes* y la disminución del filo *Bacteroidetes* fueron significativos en los grupos Caf-Az y Caf-St. A nivel de orden, se encontró una disminución de *Bacteroidales* y un aumento de *Clostridiales*, mismos que se han relacionado con la disfunción cognitiva.

Conclusiones: Las dietas maternas altas en sacarosa y stevia durante la gestación y lactancia favorecen el déficit cognitivo de ratas crías macho a través de cambios en la diversidad bacteriana y la abundancia relativa.

ABSTRACT

Background: There is increasing evidence that gut microbiota in offspring is derived in part from maternal environment such as diet. Thus, sweeteners intake including caloric or non-caloric, during perinatal period can induce gut dysbiosis and program the offspring to develop cognitive problems later in life.

Objective: To determine the effect of maternal high-sweeteners intake during gestation and lactation on gut microbiota shifts in adult male offspring rats and the impact on cognitive dysfunction.

Methods: Ten male pups from dams fed standard diet (C-C), and thirty with cafeteria in pregestational period and standard diet (Caf-C, n=6), high-sucrose diet (HS-C, n=11), high-honey diet (Ho-C, n=8) and high-stevia diet (HSt-C, n=5) were fed standard diet after weaning and body weight and food intake were recorded once a week for 26 weeks. Learning and memory tests were performed at weeks 18 and 23 of life using Y and Barnes maze tests, respectively. Fecal samples from the breastfeeding and adulthood periods were collected and analyzed by sequencing the 16S rRNA V3-V4 region of gut microbiota.

Results: Maternal high-sucrose and stevia diets programmed the male offspring and changes in microbial diversity by Shannon index were observed after weaning ($p < 0.01$). Furthermore, maternal high-stevia diet programming lasted into adulthood. The increase of *Firmicutes* abundance and the decrease in phylum *Bacteroidetes* was significantly in HS-C and HSt-C groups. Of note, of the downstream gram-negative *Bacteroidales* and the upregulation of the gram-positive *Clostridiales* abundance contribute to cognitive dysfunction.

Conclusion: These results suggest that dams fed a high-sucrose and stevia diets during gestation and lactation favor a deficient memory performance in adult male offspring rats through shifts gut microbiota diversity and relative abundance at several taxa.

Keywords: honey, sucrose, steviol glycosides, spatial learning, memory, Barnes maze, gut microbiota

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años se ha documentado un aumento significativo del consumo tanto de sacarosa (Grembecka, 2015), como de endulzantes no nutritivos añadidos en alimentos y bebidas (Lohner, Toews, & Meerpohl, 2017). Así, se ha demostrado que tanto la ingesta calórica total, como el consumo de azúcares libres son mayores a los recomendados, debido a que más del 58% de los adultos hombres y mujeres (mayores de 20 años) consumen entre el 5 y 20% de su energía diaria en forma de azúcar añadida (Stanhope, 2016). De acuerdo con lo reportado por Abbott et al., 2016 las bebidas endulzadas con azúcar, SSB (por sus siglas en inglés; Sugar Sweetened Beverages) representan el 80% del aumento en consumo de azúcar añadido de 1962 a 2000 (Abbott et al., 2016). Por lo tanto, algunos autores y organizaciones mundiales como la OMS han mencionado en numerosas ocasiones que las dietas con alto consumo de alimentos y bebidas azucaradas son un factor importante que contribuyen al aumento de la obesidad a nivel mundial. Además, están relacionadas con el aumento de enfermedades crónico degenerativas (van Dam et al., 2020; World Health Organization, 2021).

Actualmente, la prevalencia de obesidad en el embarazo oscila entre 11% y 22%, además se calcula que un 47% de los embarazos tiene un incremento de peso mayor al recomendado (Cavagnari, 2019), esto se ha asociado con el aumento en el consumo de SBB en este periodo, ya que se ha reportado que más del 30% de mujeres embarazadas consumen estas bebidas altas en azúcar (Azad et al., 2016), lo que finalmente resulta no solo perjudicial para la madre, sino también para la salud del niño. Así, se ha vinculado el consumo de endulzantes durante el embarazo con la predisposición a la descendencia a desarrollar obesidad y otras enfermedades (Azad et al., 2016).

En este sentido, se ha observado que una dieta alta en fructosa también está implicada en los trastornos cognitivos relacionados con las enfermedades neurodegenerativas (Ribaroff et al., 2017). Además, otros estudios han demostrado que soluciones de sacarosa provocan un deterioro en la memoria (Reichelt et al., 2015), sin embargo, el mecanismo por el cual se producen estos daños aún no se ha establecido (Ribaroff et al., 2017), aunque se conoce que el hipocampo, región crítica para el aprendizaje y memoria, es particularmente vulnerable a los efectos de las dietas altas en energía (Abbott et al., 2016).

Así, existen varios mecanismos potenciales por los cuales la exposición temprana a los endulzantes podría influir sobre la descendencia (Archibald et al., 2018), sin embargo, aún es un tema controversial. Por lo que, con el desarrollo de este trabajo se propone comprender uno de los posibles mecanismos responsable de que estos cambios ocurran, vinculando la dieta materna alta en endulzantes como un contribuyente del déficit cognitivo en la descendencia, a través de la modulación de la microbiota intestinal. Lo anterior considerando que el establecimiento de la microbiota intestinal a través de la transmisión microbiana de la madre a la descendencia durante la vida temprana puede tener un impacto importante en la patogénesis humana en la vida posterior (Gschwind et al., 2018).

II. ANTECEDENTES

2.1 Programación metabólica

La programación fetal fue mencionada por primera vez hace más de 20 años. El término fue introducido por el epidemiólogo británico David Barker, quien investigó la asociación entre el bajo peso al nacer y el aumento de riesgo de enfermedad coronaria en la vida adulta (Marciniak et al., 2017). Considerando que, el feto depende completamente del suministro de nutrientes maternos para el crecimiento y desarrollo normales, muchas de las señales ambientales que encuentra están vinculadas a la dieta materna (Paternain et al., 2012).

Por otro lado, el exceso de tejido adiposo cumple con funciones metabólicas endocrinas inflamatorias las cuales realizan un papel importante en los mecanismos fisiopatológicos de las complicaciones que presentan las mujeres con sobrepeso y obesidad antes, durante y después del embarazo (Kaufer-Horwitz, M. Pérez-Lizaur, A. Arroyo, 2015). Considerando que la obesidad es el problema más común en obstetricia (Catalano & Shankar, 2017), algunos estudios han demostrado que la obesidad en el embarazo tiene una fuerte tendencia hereditaria lo que conlleva no solo mayores riesgos para la embarazada durante la gestación, sino también riesgos para la salud futura del niño, consecuencia de la exposición fetal (intrauterino) a factores ambientales como las dietas maternas (Mühlhäusler, Adam, & Mcmillen, 2008; Parlee & MacDougald, 2014)

El vínculo entre la obesidad materna y las consecuencias adversas para la salud de la descendencia es un mecanismo complejo (Aune et al., 2014; Zambrano et al., 2016). Sin embargo, se ha descrito que la obesidad materna puede establecer marcas epigenéticas en el ADN del futuro niño, posteriormente estas marcas conducirán a una mayor sensibilidad a un evento adverso que puede causar ciertas enfermedades (hipertensión, enfermedad cardiovascular, hiperactividad, trastorno autista) (Gschwind et al., 2018).

Los datos epidemiológicos y experimentales han mostrado una relación entre el ambiente intrauterino y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas más adelante en la vida (Gluckman & Hanson, 2007). Así, el ambiente intrauterino (que depende de la nutrición materna) establece no solo el riesgo de enfermedad, sino también, al momento de su aparición, la intensidad de la condición médica patológica (Marciniak et al., 2017). Las perturbaciones en el periodo prenatal están vinculadas a trastornos metabólicos en la edad adulta, lo que implica los sistemas hipotalámicos de la regulación del apetito y el balance energético (Paternain et al., 2012). Por ejemplo, se conoce que la ingesta de alimentos está regulada activamente por la grelina, que induce una potente señal orexigénica. En este sentido, se ha observado que la sobrealimentación neonatal altera la señalización de la grelina, y así se ha descrito que la programación materna podría inducir a un fenotipo orexigénico en la descendencia al aumentar los niveles de grelina (Maldonado-ruiz et al., 2019). Además, el estrés oxidativo es ampliamente aceptado como un jugador clave en la neurodegeneración (He et al., 2017). Sin embargo, aún no se han descubierto los mecanismos específicos responsables de estas relaciones (Marciniak et al., 2017).

Los trastornos metabólicos, así como modificaciones de la alimentación adecuada durante el embarazo pueden llegar a desencadenar modificaciones en la expresión génica fetal, generando como resultado cierta vulnerabilidad a enfermedades crónicas en el futuro (Figura 1) (Marciniak et al., 2017). Cuando se produce un desajuste entre el entorno nutricional predicho por el feto y el entorno real encontrado después del nacimiento, aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como el síndrome metabólico o la diabetes mellitus tipo 2, la hipertensión o la enfermedad cardiovascular. Incluso, pequeños grados de desajuste pueden tener consecuencias negativas en la descendencia, aunque en general cuanto mayor sea el desajuste, mayores serán las consecuencias (Hallam & Reimer, 2016).

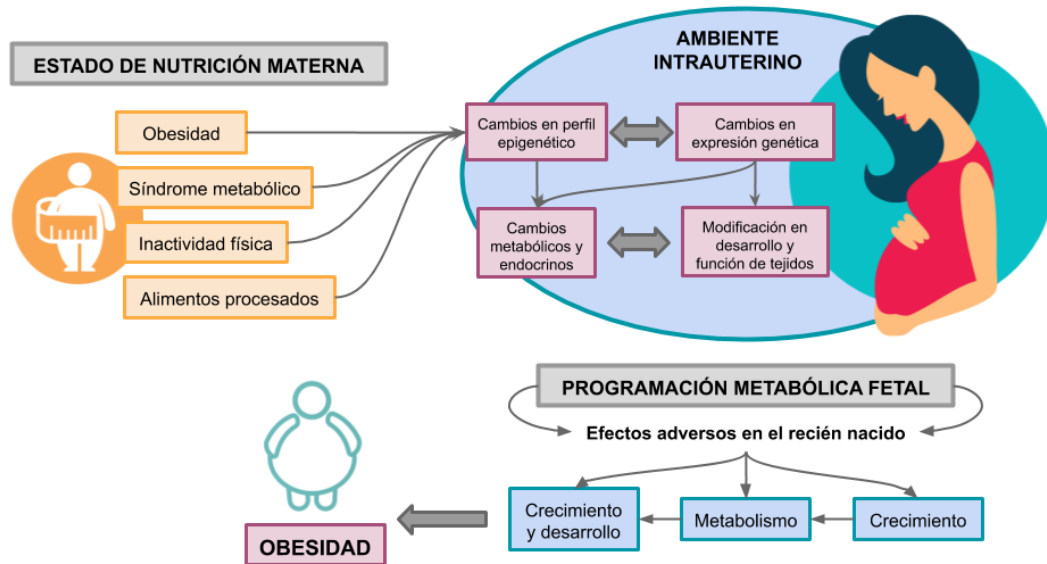


Figura 1. Efectos de la programación de un entorno inadecuado en el útero sobre el crecimiento temprano y el desarrollo consecutivo de enfermedades crónicas. Adaptado de: (Marciniak et al., 2017).

El desarrollo embrionario de mamíferos y el desarrollo fetal posterior involucran regulaciones moleculares complicadas que se producen a través de eventos secuenciales controlados precisos, que incluyen la fertilización, la implantación, la gastrulación y la organogénesis que conducen a un proceso de desarrollo completo de una nueva vida en los mamíferos (Li, 2018). Las interacciones entre factores intrínsecos, como la genética y la epigenética, con factores maternos extrínsecos, como la nutrición materna, influyen en gran parte en estos procesos de desarrollo, que pueden ocasionar anomalías o desequilibrio durante el desarrollo intrauterino, lo que representa un mayor riesgo de ciertas enfermedades o trastornos en la vejez (Li, 2018).

Por ejemplo, el consumo materno de una dieta hipercalórica rica en sacarosa aumentan el riesgo de enfermedades de los hijos que pueden manifestarse en la edad adulta (Gawlińska et al., 2021). Así mismo, el riesgo de tener un recién nacido pequeño para la edad gestacional aumenta con una mayor ingesta de carbohidratos en el primer trimestre (Amezcu-Prieto et al., 2019).

En ese contexto, los estudios en humanos y modelos animales han corroborado la teoría de la programación metabólica, al demostrar una relación clara entre el peso al nacer (alto o bajo) con morbilidades, cuyos síntomas generalmente aparecen durante la edad adulta (Sertie et al., 2020).

2.2 Endulzantes

La preferencia por el sabor dulce no solo es innata, sino universal, pues la mayoría de las personas están acostumbradas a asociar la dulzura con algo seguro, energizante y fuerte (Grembecka, 2015), lo cual convierte a los alimentos con dulzor en parte importante de la alimentación. Sin embargo, no siempre se han utilizado los mismos endulzantes a lo largo del tiempo, así anteriormente, la miel solía ser el principal edulcorante, pero en el siglo XVII el proceso de extracción de sacarosa de la remolacha azucarera y la caña de azúcar creció de manera exponencial (Saraiva, Carrascosa, Raheem, Ramos, & Raposo, 2020) y hoy en día, entre los más consumidos se encuentran: la sacarosa (o azúcar de mesa común), glucosa y fructosa, ya sea que procedan de manera natural en los alimentos o que se añadan en forma de sacarosa o jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (Grembecka, 2015). Entre 2018 y 2019 el consumo mundial de sacarosa ascendió a 174 millones de toneladas métricas, siendo México el país número 6 con mayor consumo de azúcar (Vázquez Hernández, Guevara González, Aguirre Becerra, Alvarado, & Romero Zepeda, 2017).

Los endulzantes son compuestos químicos, encontrados en la naturaleza o sintetizados químicamente, que tienen un sabor dulce que determina su uso como agentes endulzantes en alimentos o productos que de otra forma tiene sabor amargo o desagradable (Grembecka, 2015; Navarro, 2012). El poder edulcorante se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa (Tabla 1), a la que se le da un valor arbitrario de 1 o de 100. Los endulzantes se pueden clasificar por su origen (agentes naturales o sintéticos), la función tecnológica (edulcorantes y rellenos), textura (polvos y jarabes) y valor nutricional (calórico y no calórico) (Grembecka, 2015; Raatz et al., 2015).

Generalmente, los edulcorantes sintéticos no son metabolizados y por consiguiente, no producen las calorías que generan los tradicionales hidratos de carbono considerándose seguros para su consumo (Sharma et al., 2016).

Tabla 1. Poder edulcorante de endulzantes nutritivos y no nutritivos

Endulzantes nutritivos de poder edulcorante semejante a la sacarosa

- 1) Monosacáridos y oligosacáridos: sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, miel de abeja, jarabe de maíz, entre otros.
- 2) Polioles: sorbitol, jarabe de glucosa hidrogenado, maltitol, manitol, entre otros.

Endulzantes de mayor poder edulcorante que la sacarosa

- 1) Sintéticos: acesulfame K, aspartame, sacarina, sucralosa, dulcina, entre otros.
- 2) De origen vegetal: Glucósidos (glicirrina, esteviósido, dihidrochalconas) y Proteínas (taumatina, monelina y miraculina).

2.2.1 Endulzantes calóricos

Los endulzantes calóricos son todos aquellos compuestos que edulcoran y que a la vez aportan calorías, se trata de carbohidratos por lo tanto el contenido energético que aporta es en promedio 4 kcal/g, el más conocido es la sacarosa (García-Almeida, Fdez, & Alemán, 2013).

Los distintos endulzantes calóricos han sido durante mucho tiempo sospechosos como culpables del consumo excesivo de energía y el exceso de adiposidad, por lo que desde 1980, las Directrices Dietéticas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos han recomendado al público que "evite consumir demasiada azúcar" (Guyenet, 2019). Actualmente la OMS recomienda que la ingesta de azúcares libres sea menos del 10% de la ingesta calórica total.

1. Sacarosa

A principios del siglo XX, la sacarosa se convirtió en el principal edulcorante utilizado por los consumidores y la industria alimentaria. La sacarosa es llamada comúnmente “azúcar” y es el químico orgánico más abundante en el mundo, está integrada por una molécula de glucosa unida a una fructosa (Figura 2).

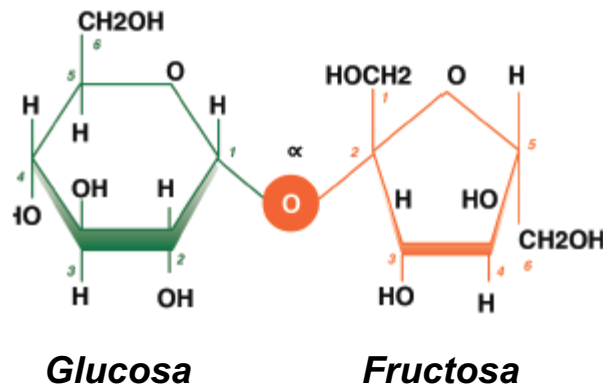


Figura 2. Estructura química de la sacarosa.

La sacarosa tiene un grado de solubilidad muy alto y una gran capacidad de hidratación, por ello es común que se emplee en la elaboración de diversos alimentos. Actualmente, el azúcar de mesa se produce en casi 120 países con una producción mundial que supera los 165 millones de toneladas al año (80% de la caña de azúcar, el resto de la remolacha azucarera) (Raatz et al., 2015), además la sacarosa abunda de forma natural en casi todas las frutas.

Desde el punto de vista nutritivo, uno de los inconvenientes que se atribuye al consumo de sacarosa es que, al ser producto químicamente puro solo aporta calorías y no otros nutrientes (Navarro & Llamas, 2013). Por otra parte, la sacarosa es un azúcar que el intestino metaboliza fácilmente, convirtiéndolo en

sus correspondientes monosacáridos; así la glucosa se absorbe con rapidez e incrementa su concentración en sangre (Badui Dergal, 2006). También se ha documentado que la sacarosa puede producir dependencia (anteriormente llamada adicción) y aunque anteriormente esta aseveración fuera inconclusa, actualmente se sabe que, además de preferir de manera innata el sabor dulce, al eliminar los azúcares de la dieta pudiera generar síndrome de abstinencia (Benton, 2010).

Debido a los problemas de salud que se asocian con el consumo excesivo de sacarosa, en la actualidad la industria alimentaria emplea muchos otros azúcares, polioles y edulcorantes sintéticos como sustitución a la sacarosa.

2. Miel

La miel es uno de los productos naturales más apreciados y valorados introducidos a la humanidad desde la antigüedad (Escuredo, 2013; Samat, Kanyan Enchang, Nor Hussein, & Wan Ismail, 2017), es producida por las abejas a partir del néctar de flores o secreciones de partes vivas de plantas (Estuardo, 2014). Se trata de un alimento viscoso, aromático, dulce que se consume por personas de todo el mundo (da Silva et al., 2016).

La miel es un endulzante nutritivo con un aporte promedio de 3.4 kcal/g y contiene cerca de 200 sustancias (Escuredo, 2013) principalmente se compone de azúcares entre ellos, glucosa (aproximadamente 40%) y otros constituyentes tales como enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, carotenoides, vitaminas, minerales y sustancias aromáticas (Badui Dergal, 2006; Da Silva, Gauche, Gonzaga, Costa, & Fett, 2016). Sin embargo, la composición, el color, el aroma y el sabor de la miel dependen de la fuente de producción (tipo de flores utilizadas por las abejas) y el procesamiento del cambio climático, la manipulación, contenido de cenizas, el envasado y el tiempo de almacenamiento (Da Silva et al., 2016). La figura 3 muestra algunos compuestos presentes en la miel y los procesos que influyen en la estabilidad de la miel y la degradación de estos.

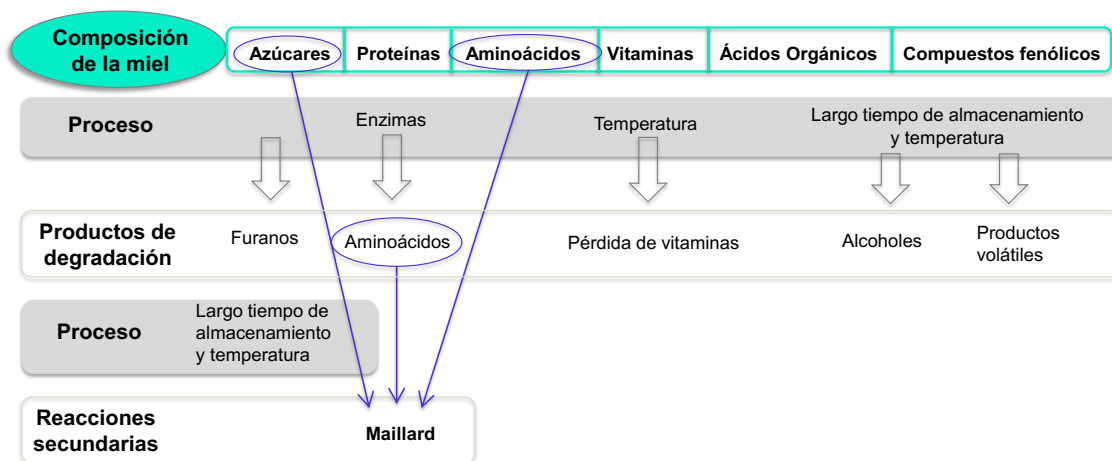


Figura 3. Compuestos presentes en la miel, procesos que influyen en la estabilidad de la miel, degradación de sus productos y reacciones secundarias que pueden ocurrir.

Adaptado de: (Da Silva et al., 2016)

Los azúcares en la miel están representados por los monosacáridos glucosa y fructosa, seguidos por disacáridos como la sacarosa, maltosa, y algunos trisacáridos (Da Silva et al., 2016).

Es rico en flavonoides y ácidos fenólicos que exhiben una amplia gama de efectos biológicos y actúan como antioxidantes naturales. Además de su sabor dulce natural, la miel tiene un índice glucémico bajo y diversas propiedades medicinales (Samat et al., 2017).

3. Otros endulzantes calóricos

La lista de endulzantes calóricos es larga, entre ellos destacan: a) la glucosa que puede encontrarse en forma de almidón en cereales y hortalizas, así como en algunas frutas, b) la maltosa que es un disacárido formado por 2 moléculas de glucosa, c) la fructosa que se encuentra de forma natural en la miel, algunas frutas como peras y fresas, y también en verduras como tomate y zanahoria, d) la lactosa que es llamada el azúcar de la leche, esta constituida por una molécula de galactosa y otra de glucosa, e) Los polioles o azúcares de

alcohol, estos se obtienen de la hidrogenación de distintos compuestos edulcorantes naturales, ejemplos de polioles son el sorbitol, manitol, eritritol, entre otros (Estuardo, 2014).

Todos los endulzantes son ampliamente utilizados en la industria alimentaria para endulzar o mejorar el sabor de muchos alimentos y bebidas, para modificar el punto de congelación y fusión, colorear los alimentos de manera natural, y también para conservarlos (Estuardo, 2014; Gil-Campos et al., 2015).

2.2.2 Endulzantes no calóricos

Los endulzantes no calóricos, NNS (por sus siglas en inglés: non-nutritive sweeteners), también conocidos como edulcorantes muy bajos en calorías, edulcorantes cero calorías, edulcorantes no calóricos o intensos, son sustancias con una mayor intensidad de dulzor por gramo que los edulcorantes calóricos como la sacarosa, y cada uno tiene sus características específicas sobre la intensidad del dulzor, persistencia del sabor dulce, recubrimiento de los dientes y efecto de retrogusto (Lohner et al., 2017) sin el agregado de calorías o con muy pocas calorías (Estuardo, 2014; Lohner et al., 2017).

Los edulcorantes sin calorías más utilizados en alimentos son sucralosa, aspartamo, sacarina, acesulfame-K, neotame, advantame y glucósidos de esteviol (Romo-Romo et al., 2017), cuyo poder edulcorante se muestra en la tabla 2.

Tabla 1. Poder edulcorante de los endulzantes no nutritivos

| | Energía (kcal / g) | Poder edulcorante |
|--|-------------------------------|------------------------------|
| Endulzantes no calóricos naturales | | |
| Estevióside | <1 | 2 - 3 |
| Taumatina | 2.4 | 14 |
| Brazeina | 0 | 9 - 10 |
| Endulzantes no calóricos sintéticos | | |
| Sacarina | 0 | 2 - 3 |
| Aspartamo | 0 | 1 - 2 |
| Neotamo | 0 | 80 - 130 |
| Acesulfame K | 0 | 1 - 1.5 |
| Sucralosa | 0 | 5 - 6.5 |

El poder edulcorante se determina en relación con la sacarosa.
Adaptado de (Romo-Romo et al., 2017).

Los edulcorantes de alta intensidad, como todos los demás ingredientes agregados deben ser seguros para el consumo, las dosis de ingesta diaria recomendadas varían entre países (Lohner et al., 2017), así organismos como FDA y SCF/EFSA han establecido dosis seguras de ingesta para cada endulzante (Tabla 3) (ADA (American Diabetes Association, 2018; Lohner et al., 2017).

Tabla 2. Dosis aceptada de ingesta diaria de endulzantes no nutritivos (NSS) según lo establecido por organismos reguladores.

| | FDA (mg/kg de peso) | SCF/EFSA (mg/kg de peso) |
|-------------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Acesulfame K | 15 | 9 |
| Aspartame | 32.8 | 5 |
| Neotame | 0.3 | 2 |
| Sacarina | 15 | 5 |
| Sucralosa | 5 | 15 |
| Glucósidos de esteviol | 4 | 4 |
| Taumatina | No aprobado | No específico |

Abreviaciones: EFSA, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria; FDA, Administración de alimentos y drogas; SCF, Comité Científico sobre Alimentación Humana.

1. Stevia

Es el término genérico utilizado para los ingredientes alimentarios derivados de la hierba *Stevia rebaudiana*, una planta nativa de América del Sur, descubierta por Bertoni en 1887 (Estuardo, 2014; Romo-Romo et al., 2017).

Los indígenas guaraníes ya utilizaban la planta endulzando sus alimentos, la llamaron “ka’a-hée”, que significa “hierba dulce”. Actualmente se cultiva en Japón, China, Brasil, Paraguay, Rusia, Indonesia, Corea, EE. UU., India, Tanzania, Canadá, Argentina y México (Vázquez Hernández et al., 2017).

La hoja de stevia en su estado natural posee gran cantidad de nutrientes entre ellos carbohidratos (>50%), fibras y proteínas vegetales (>10%), lípidos y potasio (>1%), minerales como calcio, magnesio y fósforo (<1%) y trazas de cromo, hierro, selenio, entre otros minerales, sin embargo, el uso de la hoja de stevia y la stevia cruda no se reconoce generalmente como seguro, y su uso como edulcorante no está permitido (Romo-Romo et al., 2017).

Los términos glucósidos de esteviol o esteviósido (Figura 4) son más precisos para un grupo de compuestos intensamente dulces extraídos y purificados de las hojas de esta planta. Los diversos tipos de glucósidos de esteviol incluyen rebaudiósido A (también conocido como Reb A), esteviósido, Baudiósido D, y preparaciones de mezclas de glucósidos de esteviol (con Reb A y/o esteviósido) (Romo-Romo et al., 2017). Los glucósidos que predominan en el esteviol (polvo blanco que contiene 85 a 95% esteviósido) son: el esteviósido (50%) y el rebaudiósido A (30%).

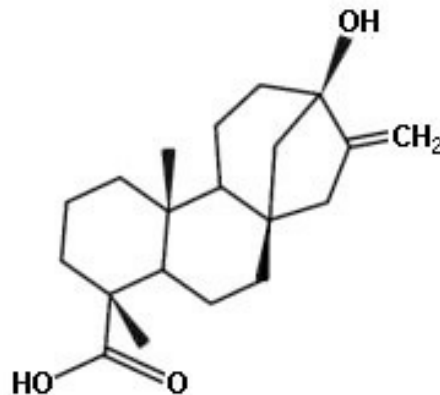


Figura 4. Estructura química de esteviósido (Stevia).

El extracto en su forma líquida tiene un poder endulzante aproximadamente 70 veces mayor que la sacarosa, mientras que los extractos refinados, llamados glucósidos de esteviol o esteviósidos son 200 a 400 veces más dulces que el azúcar de mesa (sacarosa) y presenta un ligero resabio amargo, es más estable a pH <4 y resistente a tratamientos térmicos (Badui Dergal, 2006; Brandle & Telmer, 2007).

En contraste con otros NNS, los esteviósidos tienen una ruta metabólica inusual en el cuerpo. Se absorbe como esteviol después de la degradación bacteriana en el colon, se glucoronida por el hígado y se transporta de vuelta al intestino, donde se metaboliza y se excreta (Romo-Romo et al., 2017).

En este sentido, la Administración de Drogas y Alimentos, FDA (por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration) ha clasificado los glucósidos de esteviol de alta pureza (95% de pureza mínima) generalmente como seguros, GRAS (por sus siglas en inglés: Generally Recognized As Safe). Respecto a la ingesta diaria recomendada, tanto la FDA, así como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, EFSA (por sus siglas en inglés: European Food Safety Authority) han aceptado una dosis de 4 mg/kg/día (Lohner et al., 2017).

Debido a que la stevia es un endulzante acalórico se ha recomendado para uso dietético, además se ha asociado con diversos efectos en la salud de los consumidores, entre ellos, la capacidad del esteviósido de disminuir la presión sanguínea en sujetos hipertensivos, efectos hipoglucémicos debido a que mejora la utilización de glucosa por células y tejidos, entre otros (Chen et al., 2005; Estuardo, 2014).

2. Otros endulzantes no calóricos

Los endulzantes no calóricos son utilizados como sustitutos de todo o parte del contenido en azúcares en alimentos y bebidas, además su empleo está ligado a alternativas dietéticas en el control de peso o en la diabetes, entre ellos se encuentran, brazeína, sacarina, sucralosa, neotamo, aspartamo, Acesulfame-K, taumatina, entre otros (Gil-Campos et al., 2015). Sin embargo, su uso a largo plazo aún es cuestionable, pues mientras algunos autores señalan algunos efectos positivos de estos compuestos como hepatoprotectores, antiinflamatorios, no alergénicos, etc (Saraiva et al., 2020), en contrapunto, diversos autores han señalado que prevalecen preocupaciones sobre la toxicidad de estos compuestos “no metabolizados” (Sharma, Amarnath, Thulasimani, & Ramaswamy, 2016), ya que no existen pautas concretas sobre la dosis recomendada, especialmente en las mujeres embarazadas, a pesar de la creciente evidencia de los efectos nocivos tras su consumo (Palatnik, Moosreiner, & Olivier-Van Stichelen, 2020).

2.2.3 Efectos metabólicos del consumo de endulzantes

El impacto del consumo de sacarosa en la salud sigue siendo un tema controversial, por un lado, el consumo de un modo equilibrado en la alimentación tiene funciones importantes, ya que favorece el aporte rápido de glucosa al cerebro y músculo (Gil-Campos et al., 2015), así la FAO/OMS han establecido que el consumo de azúcares libres debe ser <10% de la ingesta calórica total y que se debe limitar el consumo de bebidas azucaradas (OMS/FAO; 2013). Sin embargo, se ha reportado en Estados Unidos que el consumo de azúcares como fructosa y sacarosa, por persona cada año llega a ser hasta 42.5 kg; además este patrón es similar en países como Polonia, España, Italia, entre otros (Grembecka, 2015).

Además, en los EE. UU., los niños son los mayores consumidores de azúcar libre con un porcentaje aproximado de 16% de su ingesta calórica diaria total de azúcares añadidos (Noble et al., 2017), así también de acuerdo a lo reportado por Gil-Campos, et al. (2015), los adolescentes europeos consumen aproximadamente 384 kcal/día procedentes de bebidas, de los cuales el 30.4, el 20.7, y el 18.1% provienen de las bebidas endulzadas con azúcar, leche y jugos de fruta azucarados, respectivamente, sin embargo, el incremento en el consumo también se presenta en edad adulta.

En este sentido, se ha reportado que el 58% de los hombres y mujeres de 19 a 30 años, y el 63% de los hombres y mujeres de 31 a 50 años consumen entre el 5% y el 20% de su energía diaria como azúcar añadida (Stanhope, 2016), mientras que el 30% de las mujeres embarazadas consumen intencionalmente endulzantes no nutritivos (NNS) (Palatnik et al., 2020), por lo que se han planteado preocupaciones sobre sus posibles efectos adversos para la salud (Lohner et al., 2017). En este sentido, en la revisión publicada en 2012 por Popkin, et al. (2012) se concluyó que las bebidas endulzadas con azúcar desempeñan un papel en las epidemias de obesidad, síndrome metabólico y enfermedad de hígado graso (Popkin et al., 2012; Stanhope, 2016).

Así también, existe evidencia que sugiere que las dietas ricas en azúcares añadidos, así como el jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (HFCS-55) promueven el desarrollo de obesidad, así como una gran variedad de enfermedades metabólicas y estados patológicos. Se ha explicado que el componente de fructosa en la sacarosa causa la desregulación del metabolismo de los lípidos y los carbohidratos. Además, la sacarosa promueve un balance energético positivo, por lo tanto, el peso corporal y la ganancia de grasa (Figura 5) (Raatz et al., 2015; Stanhope, 2016).

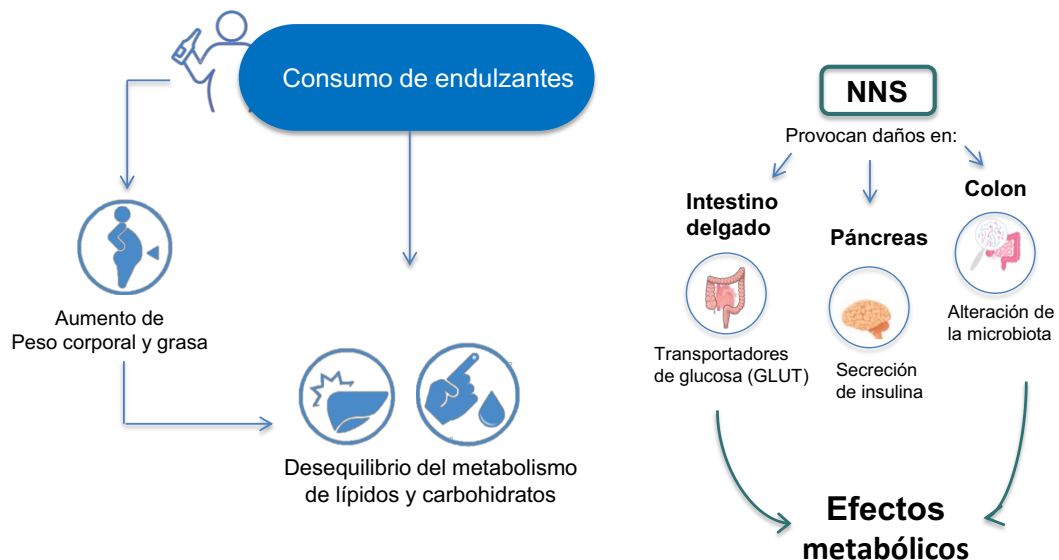


Figura 5. Efecto metabólico del consumo de endulzantes. Adaptado de: (Stanhope, 2016).

En cuanto a los endulzantes no calóricos, al parecer, la disociación de la sensación del sabor dulce y el aporte calórico deficiente producido por los edulcorantes, podría condicionar un incremento en el apetito, dando lugar a un mayor consumo energético y ganancia de peso. Esta hipótesis de condicionamiento operativo (Modelo Pavlov) ha podido demostrarse en modelos

animales. Así también, existe un creciente campo de literatura que muestra que el consumo crónico de edulcorantes bajos en calorías, en dosis bajas puede promover el aumento de peso, reducir la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina e interferir con las regiones del cerebro que desempeñan un papel crítico en el comportamiento del apetitivo, así como en la composición de la microbiota (Nettleton et al., 2019).

Por otro lado, algunas investigaciones describen un impacto positivo de los glucósidos de stevia en los parámetros metabólicos (Nettleton et al., 2019), ya que se ha reportado la disminución de la presión sanguínea en sujetos hipertensos tras la ingesta de stevia, sin embargo, esta disminución no parece tener impacto significativo en humanos con presión arterial normal. Además, la stevia se ha asociado con la disminución de niveles de glucosa, efectos antiinflamatorios, entre otros posibles efectos positivos. En contraste, algunas investigaciones han evaluado los efectos de los NNS en el metabolismo de la glucosa y las hormonas reguladoras del apetito, postulando diversos mecanismos por los cuales los NNS pueden influir en la glucosa, la insulina y otras concentraciones de péptidos (Romo-Romo et al., 2017).

Es importante destacar que muchos NNS no se absorben de manera eficiente a través del intestino y pueden acumularse en la luz del intestino (Wang et al., 2018). Así mismo, la detección de azúcar en el tracto gastrointestinal altera la absorción de nutrientes y la secreción de hormonas (Romo-Romo et al., 2017).

Margolskee et al., (2007) mostraron en su estudio que la glucosa y los NNS en la luz intestinal estimularon los receptores del gusto y aumentaron la secreción de GLP-1 y péptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), promoviendo la expresión de SGLT1 y la absorción de glucosa (Romo-Romo et al., 2017).

Los receptores del gusto, ubicados en las células de las papilas gustativas, desencadenan la secreción de diversas hormonas implicadas en la sensación de saciedad que funciona como un mecanismo de retroalimentación negativa

después de la ingestión de alimentos. Estos incluyen la colecistoquinina, el neuropéptido Y, el péptido YY, el glucagón, los tipos 1 y 2 de péptido similar al glucagón (GLP), la grelina, la oxitocina, la galanina y la leptina, entre otros (Calvo & Egan, 2015).

Además, muchas de las hormonas secretadas por las papilas gustativas en la lengua son expresadas por las células intestinales, donde tienen un papel clave en la ingesta de alimentos y en la digestión. Los estudios *in vitro* han demostrado que la sucralosa aumenta la secreción de GLP-1 y GLP-2 en células L intestinales de ratones a través de la interacción con los receptores del gusto. De manera similar, la sucralosa, el Acesulfame K (Ace-K) y la sacarina estimulan la secreción de insulina, activando los receptores del gusto en las células beta pancreáticas de ratones (Romo-Romo et al., 2017).

Por otro lado, Palmnäs, et al. (2014) mostraron en ratas que después de ocho semanas de consumo de aspartamo en dosis bajas, los niveles de glucosa aumentaron y la eliminación de la glucosa estimulada por la insulina se afectó (Palmnäs et al., 2014). Esto se asoció con un aumento en las bacterias intestinales totales, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium leptum* y *Roseburia ssp.* Además, en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, el aspartame atenuó el aumento en la proporción de Firmicutes: *Bacteroidetes* (Romo-Romo et al., 2017).

Contrariamente a los beneficios previstos, el consumo rutinario de NNS se ha asociado con aumento de IMC a largo plazo y efectos potencialmente adversos en la salud cardiometabólica en adultos. Algunos autores postulan que el consumo temprano de productos azucarados en lactantes y en niños de corta edad podría influir en la autorregulación de la ingesta y en la preferencia por sabores dulces, manteniéndose hasta la adolescencia. Incluso se ha planteado que la ingesta conjunta de edulcorantes y azúcares de la dieta podría inducir una respuesta neuronal que condicione una absorción de los azúcares más rápida, aumentando también la secreción de péptidos relacionados con el glucagón, o la insulina (Gil-Campos, San José González, & Díaz Martín, 2015).

Además, se ha observado que una dieta alta en fructosa se ha implicado no solo en la promoción de la obesidad y la resistencia a la insulina, sino también en los trastornos cognitivos relacionados con las enfermedades neurodegenerativas (Ribaroff, Wastnedge, Drake, Sharpe, & Chambers, 2017). Pocos estudios han investigado los efectos de la exposición prenatal a NNS en la salud de la descendencia, aunque se han reportado cambios a nivel metabólico y cognitivo cuando se consumen productos y/o bebidas que han sido preparadas con estos endulzantes (Azad et al., 2016), sin embargo, el mecanismo por el cual se producen estos daños aún no se ha establecido (Ribaroff et al., 2017).

2.2.4 Efectos en el aprendizaje y memoria del consumo de endulzantes

En el cerebro, el hipocampo forma parte del sistema límbico-cognitivo, que es una red integrada implicada en los procesos de aprendizaje y memoria, de atención, estados de motivación y emoción (M Guerrero, 2017). Así, se ha descrito que el hipocampo (área CA 3 principalmente) participa en la formación de la memoria declarativa (o explícita) en humanos; y en los roedores, esta estructura está implicada en la formación de la memoria de tipo espacial (o relacional). De acuerdo a investigaciones previas, la memoria de trabajo es un proceso dinámico mediante el cual la información se actualiza continuamente, y que depende de la integridad de la corteza prefrontal medial, además se ha demostrado que la noradrenalina y la dopamina son necesarias para una función cortical prefrontal medial óptima (D'Esposito, Mark and Postle, 2015; Roozendaal & Mcgaugh, 2012), por lo que demasiada o poca estimulación del receptor dopaminérgico D1 afecta la actividad cortical prefrontal y la memoria de trabajo en ratones, ratas y monos (Roozendaal & Mcgaugh, 2012).

Además, se ha reconocido que la corteza frontal también está implicada en comportamientos asociados con la alimentación (Gadde et al., 2018). En este sentido, se ha descrito que el hipotálamo basomedial es capaz de detectar la escasez en el suministro de nutrientes y traducirlos en comportamiento. Así, en

2017 un estudio mostró asociación entre alteración de hormonas relacionadas con la alimentación como adiponectina y la disfunción cognitiva leve (S.-W. Li et al., 2017), también se ha demostrado que el hipotálamo es particularmente vulnerable a los efectos de las dietas altas en energía (Abbott et al., 2016).

Por otro lado, la obesidad materna, el aumento en la ganancia de peso gestacional, desórdenes metabólicos maternos como diabetes e hipertensión, y una dieta materna no saludable impactan a nivel cognitivo y psicológico en el infante (Rivera, Christiansen, & Sullivan, 2015). Así también, el consumo de una "dieta occidental", rica en grasas saturadas y azúcares agregados, tiene efectos perjudiciales sobre la función neurocognitiva, especialmente para los procesos de memoria que dependen de la integridad del hipocampo (Noble et al., 2017). Sin embargo, aún no está claro si el consumo de edulcorante no nutritivos (NNS) afecta regiones cerebrales relacionadas con el comportamiento de la ingesta de alimentos en los seres humanos (Stanhope, 2016).

Estudios en ratas han descrito que, el acceso a una solución de jarabe de maíz con alto contenido de fructosa al 11% (HFCS-55) durante el periodo juvenil de desarrollo (inmediatamente después del destete, limitando el consumo durante la edad adulta) deteriora la memoria espacial dependiente del hipocampo en la tarea del laberinto de Barnes y aumenta la neuroinflamación en el hipocampo (Noble et al., 2017).

Por otro lado, se ha reportado que la stevia (compuesto de esteviósido y rebaudiósido A), es rica en minerales como hierro y cobalto, los cuales cumplen con algunas de las funciones importantes en el cuerpo, entre ellas se destacan el mantenimiento del ritmo cardíaco normal, la contracción muscular, la conductividad de las neuronas, la regulación del metabolismo celular y también en la memoria. Sin embargo, un consumo excesivo de minerales también puede conducir a peores casos. Así, en un estudio de modelo animal realizado en ratones (*Mus musculus*) a los cuales se les otorgó 100 mg/kg de stevia durante 32 días, se identificó un mayor porcentaje de apoptosis celular y peor resultado en las pruebas de memoria en comparación con los ratones que recibieron dieta

control y alta en sacarosa. La posible razón de su tasa y porcentaje de daño neuronal puede deberse a los componentes minerales de la stevia (Villareal, Cruz, Ples, & Vitor, 2016).

En este contexto, existen múltiples pruebas para estudiar el aprendizaje, y debido a que las ratas son excelentes corredoras, nadadoras, cavadoras y trepadoras, y mediante estas capacidades motoras encuentran su alimento y evitan la depredación, su orientación dentro de su medio es primordial. El aprendizaje y memoria espacial son indicadores de la medición de la capacidad que tiene el animal de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que le permite desenvolverse en el espacio (Vicens, Redolat, & Del Carmen Carrasco, 2003).

De esta forma, la memoria espacial consiste en múltiples mecanismos que se encargan de codificar, almacenar y recuperar información de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales (Kessels, De Haan, Kappelle, & Postma, 2001), es decir, mantiene los acontecimientos adquiridos para que puedan ser recordados posteriormente (María Guerrero, 2012; Klauer, Meiser, & Naumer, 2000). Por otro lado, el aprendizaje es un proceso continuo por el cual los organismos modifican su conducta ya que intervienen factores internos y externos (Morgado, 2005). Por lo tanto, cuando la memoria de trabajo no funciona, también lo hace la capacidad de llevar a cabo muchas actividades de la vida diaria (D'Esposito, Mark and Postle, 2015). En consecuencia, el aprendizaje y la memoria son procesos interrelacionados ya que sin aprendizaje no hay memoria (Morgado, 2005).

Así, el aprendizaje se evalúa proporcionando a un animal de experimentación, como las ratas, experiencias de aprendizaje de manera repetida, observando los cambios progresivos en el desempeño. Esto da como resultado una curva de adquisición que evalúa la forma en que mejora el desempeño, en función del número de repeticiones y el tiempo. En 1979, Carol Barnes desarrolló una prueba de comportamiento basada en tierra seca, llamada

laberinto de Barnes, esta prueba se enfoca en evaluar la memoria espacial en ratas.

Una de las ventajas que ofrece usar el Laberinto de Barnes y no otra técnica, como el laberinto acuático de Morris (MWM), es que el laberinto de Barnes permite una clara descripción de las tres posibles estrategias de búsqueda utilizadas por la rata durante la ejecución de cada prueba, además que este laberinto no implica la natación y los posibles factores de confusión o estresores asociados con ella (Pitts, 2018).

Además, para evaluar la memoria de reconocimiento espacial se utiliza la prueba de laberinto de “Y”, este laberinto puede ser útil por varias razones, entre ellas que, la memoria espacial se puede evaluar rápidamente y se pueden evaluar las diferencias de la memoria espacial entre las ratas con hipocampo intacto y lesionado. Además, esta prueba explora la inclinación natural de las ratas para investigar su entorno y por último, este laberinto permite la evaluación simultánea de la hiperactividad independientemente de la memoria espacial (Conrad, Galea, Kuroda, & McEwen, 1996).

2.3 Microbiota

Los humanos han evolucionado junto con los billones de microbios que habitan en el cuerpo y que crean ecosistemas adaptativos complejos, específicos para el hábitat del cuerpo, y que además están en sintonía con la fisiología cambiante del huésped (Lloyd-Price et al., 2016) .

En este sentido, la microbiota se ha descrito por diversos autores como comunidades de microorganismos que habitan en forma estable en un sitio anatómico y que interactúan entre sí, autorregulando su concentración numérica y dinámica metabólica, la que puede influir en el estado de salud o enfermedad del huésped (Alarcon et al., 2016).

El microbioma humano es una ecología microbiana asociada al huésped de particular interés y consiste en general en las comunidades microbianas que

residen en y sobre el cuerpo humano: principalmente en el intestino, pero también en la cavidad oral, la piel, el tracto urogenital (Shafquat, Joice, Simmons, & Huttenhower, 2014), así también se sabe que las bacterias tienen preferencias ambientales y que ciertas bacterias solo colonizan áreas específicas del cuerpo (Tabla 4) (Biedermann & Rogler, 2015). Sin embargo, el sistema gastrointestinal se considera el hábitat más importante para la microbiota (Y. Li, 2018), en donde su composición varía a lo largo del tracto gastrointestinal en sus diferentes compartimentos (Figura 6) (Tiihonen et al., 2010). Así, el intestino distal es hogar de unos 100 billones de microorganismos, que representan cientos y quizás miles de especies (Hildebrandt et al., 2009; Turnbaugh, Ridaura, Faith, Rey, & Gordon, 2009).

Tabla 3. Preferencias tisulares de algunas bacterias conocidas

| Tejido de preferencia | Bacteria |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Piel | <i>Staphylococcus epidermis</i> |
| Membrana nasal | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Boca, lengua | <i>Streptococcus salivarius</i> |
| Garganta | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> |
| Epitelio de intestino delgado | <i>Vibrio cholerae</i> |
| Epitelio de intestino delgado | <i>Escherichia coli</i> |
| Epitelio urogenital | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |

Adaptado de: (Biedermann & Rogler, 2015).

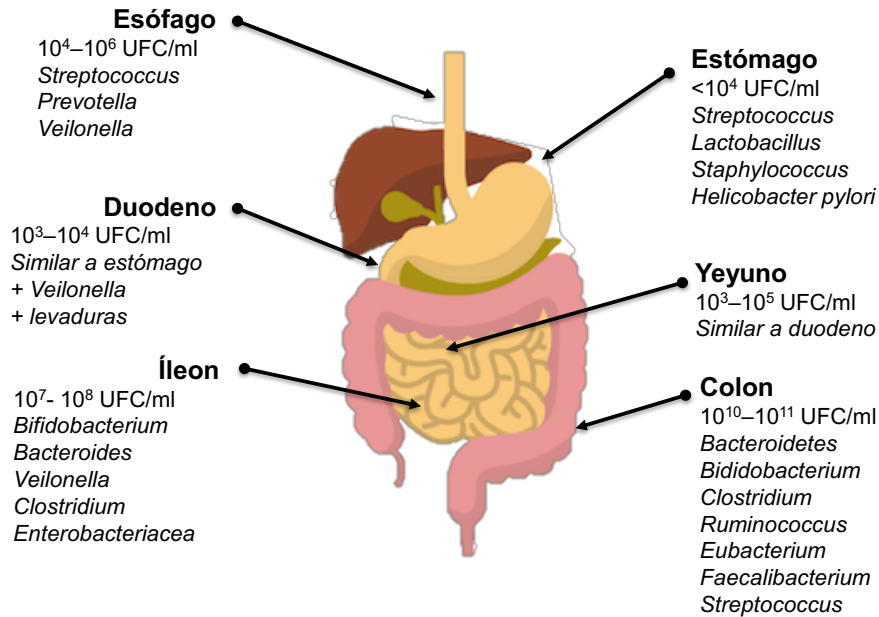


Figura 6. Número y tipo de bacterias predominantes por segmento del tracto gastrointestinal en individuos sanos. Adaptado de: (Tiihonen, Ouwehand, & Rautonen, 2010).

Regularmente, la microbiota muestra un alto grado de diversidad interpersonal incluso en ausencia de enfermedad, esto fue concluyente cuando estudios como el Human Microbiome Project Consortium revelaron una variación suficiente en la composición taxonómica del microbioma entre individuos sanos, sin embargo, las vías metabólicas se conservaban, así algunos autores sugieren que caracterizar un microbioma “sano” como un conjunto de microbios específicos ya no es una definición práctica (Bäckhed et al., 2012; Human Microbiome Project Consortium, 2012). Una hipótesis alternativa es la de un “núcleo funcional” saludable: un complemento de las funciones metabólicas y otras funciones moleculares que realiza el microbioma dentro de un hábitat particular, pero que no son necesariamente provistas por los mismos organismos en diferentes personas (Shafquat et al., 2014).

En este sentido, la disbiosis de una comunidad microbiana puede ser difícil de definir, pero podría considerarse como una perturbación que parte de una ecología equilibrada para prolongar, exacerbar o inducir un daño o efecto sobre

la salud, así la disbiosis en el microbioma se ha asociado con numerosas enfermedades, como enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, diabetes (tipos 1 y 2), alergias, asma, autismo, cáncer, entre otras (Lloyd-Price et al., 2016).

2.3.1 Establecimiento de la microbiota intestinal

El tracto gastrointestinal del feto en el útero materno anteriormente se consideraba prácticamente estéril, y en el momento del nacimiento, rápidamente colonizado con microorganismos de la madre y del ambiente hospitalario, destacando que la microbiota intestinal humana es dinámica y va evolucionando a lo largo de la vida (Martin Tejedor, 2017). En cambio, actualmente hay autores que han propuesto que la placenta presenta una microbiota comensal no patógena, por lo que la colonización inicial del intestino humano comenzaría intraútero (Aagaard et al., 2014).

Estudios recientes han indicado que el establecimiento de la microbiota intestinal a través de la transmisión microbiana de la madre a la descendencia durante la vida temprana puede tener un impacto importante en la patogénesis humana en la vida posterior (Y. Li, 2018). Además, se ha descrito que los cambios más dramáticos en la composición de la microbiota intestinal tienen lugar en la infancia. Durante los primeros días de vida, el intestino queda habitado por microbios y se caracteriza por la inestabilidad (Tiihonen et al., 2010) y después de 3 o 4 semanas del nacimiento, la microbiota intestinal comienza a estabilizarse (Sanz, Santacruz, & Gauffin, 2010), por lo que la lactancia o la alimentación con fórmula tiene una participación importante. Los siguientes grandes cambios en la composición de la microbiota intestinal vienen con la introducción de alimentos sólidos y el destete (Favier, Vaughan, De Vos, & Akkermans, 2002). Después de esto, solo ocurren cambios relativamente pequeños y un niño de aproximadamente 2 años de edad tiene una microbiota similar a la de un adulto (Tiihonen et al., 2010), así la figura 7 muestra las características de la microbiota a lo largo de la vida.

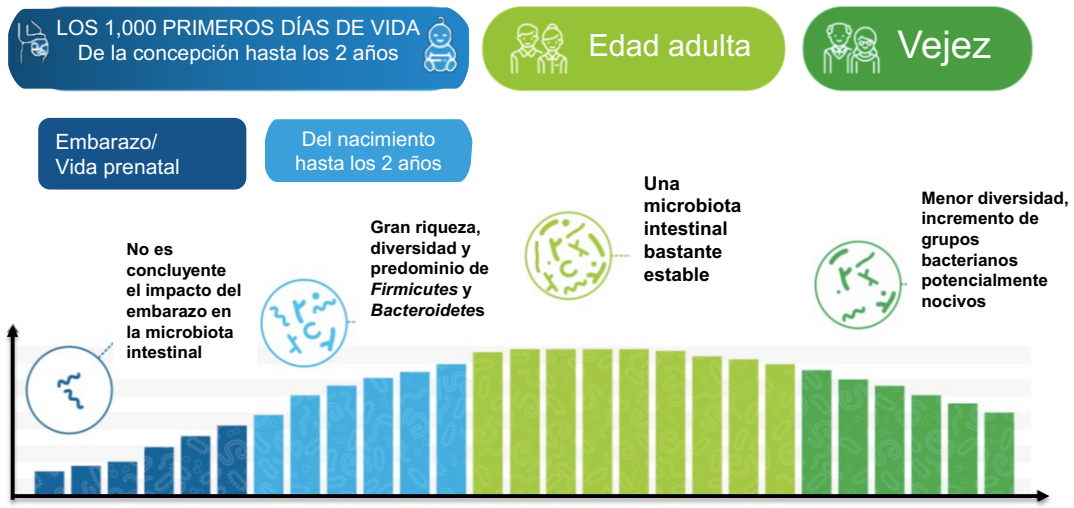


Figura 7. Cambios en la microbiota a lo largo de la vida. Adaptado de: (Gut Microbiota for Health, 2019)

Así, la transmisión materna externa abarca toda transferencia de simbioses maternos a la descendencia durante o después del nacimiento (Alarcon, Gonzales, & Castro, 2016), por lo tanto, la microbiota materna podría servir como un recurso original para el establecimiento temprano de la microbiota intestinal en la descendencia. Las exposiciones nutricionales maternas durante el embarazo y la lactancia podrían afectar la transmisión microbiana durante este período, lo que lleva a una composición microbiana modificada y consecuencias a largo plazo hacia perfiles más patógenos en la salud o la enfermedad en la descendencia (Y. Li, 2018).

La hipótesis de la “colonización en el útero” indica que la microbiota colónica se transmite de las madres y habita en el entorno intrauterino antes del nacimiento (Funkhouser & Bordenstein, 2013; Perez-Muñoz, Arrieta, Ramer-Tait, & Walter, 2017). Sin embargo, la ruta precisa de transmisión hasta la fecha sigue sin estar clara.

2.3.2 Composición de la microbiota intestinal

Los estudios longitudinales de la microbiota intestinal humana basados en el análisis de ARNr 16S han sugerido que la estructura de la comunidad bacteriana es relativamente estable en el tiempo en ausencia de perturbaciones (Bäckhed et al., 2012). Sin embargo, en el establecimiento y composición de la microbiota influyen factores extrínsecos como la dieta, la exposición a antibióticos en particular, entre otros factores que causan cambios significativos en la microbiota intestinal (Tabla 5) (Gschwind, Fournier, Butel, & Wydau-dematteis, 2018; Tiihonen et al., 2010).

Tabla 4. Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal.

| Factor | Evidencia en humanos | Evidencia en animales |
|-----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Modo de parto | ✓ | |
| Leche materna vs leche de fórmula | ✓ | |
| Origen geográfico | ✓ | |
| Genotipo del huésped | ✓ | ✓ (Ratones) |
| Dieta | ✓ | ✓ |
| Antibióticos | ✓ | ✓ (Ratones) |
| Probióticos | ✓ | ✓ |
| Edad | ✓ | |
| Estrés | ✓ | |

Así, la estructura de la microbiota se relaciona con los números y tipos de bacterias presentes, mientras que la función de la comunidad microbiana se relaciona con las actividades metabólicas y los productos finales que resultan de la actividad microbiana (Holmes, Li, Marchesi, & Nicholson, 2012).

Las bacterias se clasifican según filo, clases, órdenes, familias, géneros y especies (Figura 8). En conjunto, estas bacterias usan y producen diferentes sustratos nutricionales y metabolitos, y tienen diferentes capacidades para la recolección de energía (Turnbaugh et al., 2006). Los filos (tipos) microbianos intestinales dominantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacterias*, *Proteobacterias*, *Fusobacterias* y *Verrucomicrobia* (Rinninella et al., 2019).

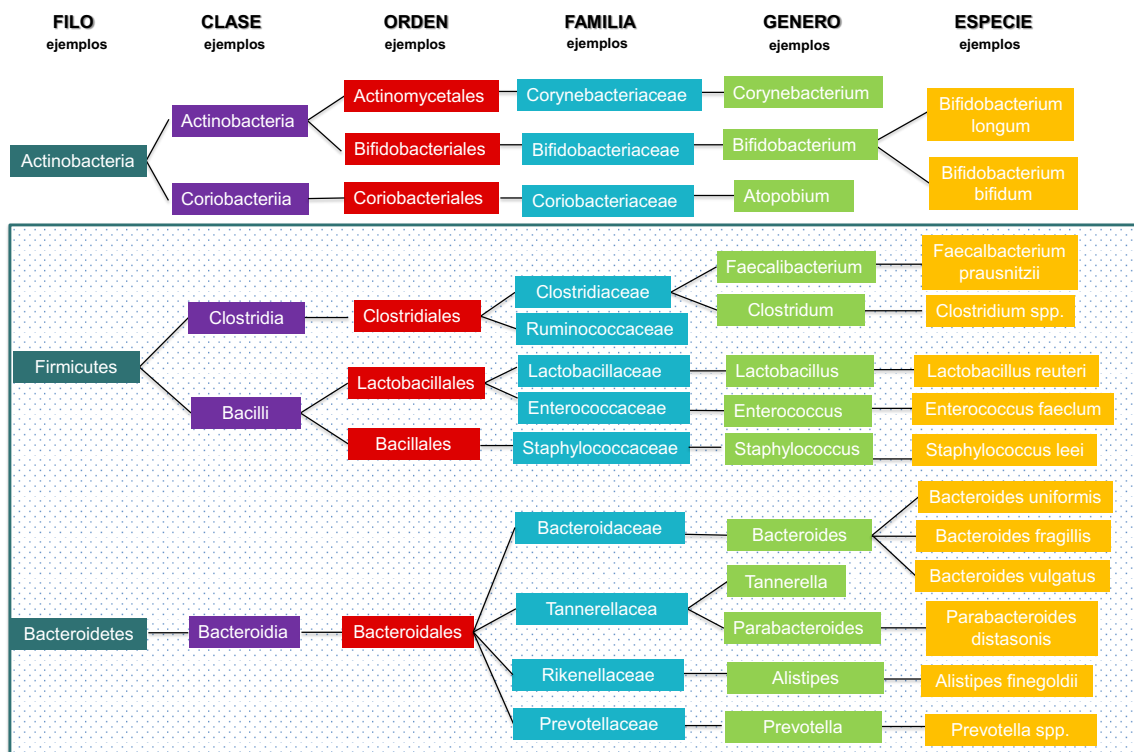


Figura 8. Ejemplos de composición taxonómica de microbiota intestinal. En el recuadro se muestran ejemplos de bacterias pertenecientes a *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, que representan el 90% de la microbiota humana. Adaptado de: (Rinninella et al., 2019).

Los estudios metagenómicos han establecido que a pesar de la extensa variabilidad interpersonal de las distintas especies que componen la microbiota, se mantiene una cierta estabilidad en los patrones metabólicos y metabolitos en todos los individuos (Martin Tejedor, 2017). Por lo tanto, al igual que en otros órganos, la función adecuada de la microbiota intestinal se basa en una composición celular estable (Weiss & Hennet, 2017) que en el caso de la microbiota humana consiste en, los filamentos más abundantes en el intestino, *Firmicutes* (Gram-positivos) y *Bacteroidetes* (Gram-negativos) que representan el 90% de la microbiota, por lo que han recibido la mayor atención (Turnbaugh et al., 2006). El filo *Firmicutes* se compone de más de 200 especies, entre ellas se encuentran *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*.

Los grandes cambios en la proporción entre estos filos o la expansión de nuevos grupos bacterianos conducen a un desequilibrio promotor de la enfermedad, que a menudo se denomina disbiosis (Weiss & Hennet, 2017).

Las importantes funciones fisiológicas de la microbiota intestinal y las relaciones establecidas entre la disbiosis y ciertas patologías han llevado a un interés en su establecimiento en las primeras semanas de vida, un periodo que ahora se reconoce como una etapa clave (Gschwind, Fournier, Butel, & Wydau-Dematteis, 2018).

2.3.3 Función de la microbiota intestinal

La importancia de comprender las funciones de la microbiota reside en el gran impacto que tiene sobre la salud humana. Cada comunidad bacteriana tiene funciones particulares que dependen de la región anatómica donde se sitúan (Figura 9) (Shafquat et al., 2014). Así, la microbiota intestinal proporciona enzimas involucradas en la fermentación de carbohidratos no digeribles, además participa en la reducción de colesterol y biosíntesis de vitaminas (grupo K y B), isoprenoides y aminoácidos como lisina (Sanz et al., 2010) ayuda al desarrollo de la inmunidad de la mucosa (Shafquat et al., 2014), siendo la fermentación de

carbohidratos, una actividad central de la microbiota intestinal humana, que impulsa la obtención de energía y carbono del colon.



Figura 9. Procesos de sitios del cuerpo y procesos microbianos centrales. Adaptado de: (Shafquat et al., 2014).

Los carbohidratos no digeribles, también llamados “fibra dietética”, son resistentes a la digestión en el intestino delgado, por lo que su fermentación ocurre en el intestino grueso. La fibra dietética puede ser clasificada de acuerdo con su fermentabilidad en fermentables o no fermentables en el colon. Así, las primeras, como su nombre lo indica, son fácilmente fermentadas por bacterias del colon, las cuales producen: monosacáridos, ácidos grasos de cadena corta, SCFA (por sus siglas en inglés: Short Chain Fatty Acids) y gases (metano y dióxido de carbono).

Los SCFA producidos son butirato (15%), acetato (60%) y propionato (25%) (Rinninella et al., 2019), la conversión eficiente de hidratos de carbono complejos no digeribles a SCFA es decir, fermentación colónica, podría

representar hasta 10% de nuestros requerimientos energéticos diarios, no obstante, los tipos y cantidades de SCFA están determinados principalmente por la composición de la microbiota intestinal y por la cantidad de carbohidratos que se consumen (Nylund et al., 2013).

Los SCFA están involucrados en la homeostasis del colon, ya que participan como combustible para las células epiteliales intestinales, fortalecen la función de la barrera intestinal y además tienen importantes funciones inmunomoduladoras (Parada Venegas et al., 2019). Por un lado, el acetato y propionato son absorbidos por el hígado donde se utilizan como sustratos para lípidos, glucosa y metabolismo del colesterol, mientras que el butirato tiene la función de mantener la barrera tisular (Rinninella et al., 2019).

2.3.4 Dieta y microbiota

El consumo de azúcares, principalmente como jarabe de sacarosa y glucosa-fructosa, ha aumentado dramáticamente en todo el mundo así también las preocupaciones sobre sus efectos adversos en la salud (Ruiz-Ojeda, Plaza-Díaz, Sáez-Lara, & Gil, 2019).

La dieta es uno de los moduladores clave de la composición de la microbiota intestinal que influye directamente en el huésped (Rinninella et al., 2019). Se ha demostrado que el consumo de una dieta alta en grasas enriquecida con sacarosa durante varios meses promueve varias alteraciones bioquímicas, estrés oxidativo, disbiosis en la microbiota y posible daño cognitivo (Avila-Nava et al., 2017), así también algunos endulzantes, que si bien pudieran aportar pocas calóricas (Carocho, Morales, & Ferreira, 2017), está en estudio el efecto que tienen en la microbiota intestinal. Por ejemplo, Abou-Donia, et al. (2008) mostraron que la microbiota intestinal en ratas se alteró después de 12 semanas de exposición a sucralosa. Los números de aerobios totales, *Bifidobacterias*, *Lactobacilos*, *Bacteroides*, *Clostridios* y bacterias aeróbicas totales se redujeron significativamente, sin efecto sobre las *Enterobacterias* (Abou-Donia, El-Masry, Abdel-Rahman, McLendon, & Schiffman, 2008). Por su parte, en el 2014 Suez,

et al., realizaron un estudio en roedores y mostraron que después de una exposición de 11 semanas a altas dosis de sacarina, sucralosa y aspartamo, las concentraciones de glucosa aumentaron significativamente (Romo-Romo et al., 2017; Suez et al., 2014). Por el contrario, se ha observado que la miel natural tiene algunos beneficios para la salud intestinal humana, ya que contiene abundantes oligosacáridos con buenos efectos prebióticos, así como una gran variedad de componentes antimicrobianos (Wang et al., 2019).

La tabla 6 muestra otros estudios donde se han demostrado algunos de los efectos en la microbiota tras el consumo de algunos endulzantes (Ruiz-Ojeda et al., 2019).

Tabla 5. Efectos de endulzantes sobre la microbiota intestinal.

| Estudio | Endulzante | Modelo experimental | Resultados |
|---|-------------------------|---------------------|--|
| (Pfeffer, Ziesenitz, & Siebert, 1985) | Acesulfame-K | Ratas | Reducción de la diversidad bacteriana. |
| (Bian et al., 2017) | Acesulfame-K | Ratón | La población de <i>Bacteroides</i> aumentó. Contrariamente, en las hembras disminuyeron los <i>Lactobacillus</i> y <i>Clostridium</i> . |
| (Nettleton et al., 2019) | Rebaudiósido A (Stevia) | Ratas Wistar | Disminución de <i>Bifidobacteriaceae</i> y <i>Clostridiales</i> . Aumento de <i>Akkermansia muciphila</i> . |
| (Beards, Tuohy, & Gibson, 2010) | Manitol | - | Sin efectos en la microbiota intestinal. |
| (Finney, et al., 2007) | Lactitol | - | Aumento de las <i>Bifidobacterias</i> y las concentraciones de ácidos propiónico y butírico. |
| (Naim, Sandovsky, Zechman, Brand, & Kare, 1985) | Sacarina | Ratas | Inhibió el crecimiento de 3 cepas de <i>Lactobacillus</i> y 3 cepas de <i>Escherichia coli</i> . |
| (Ruiz-Ojeda et al., 2019) | Glucosidos de Steviol | Humanos | El esteviósido inhibe débilmente las bacterias anaerobias, mientras que el rebaudiósido-A inhibe débilmente las bacterias aeróbicas, en particular los coliformes. |

Por otro lado, a partir de 2004, los estudios de Gordon, et al. demostraron una relación potencial entre el microbioma intestinal y el desarrollo de un fenotipo obeso, así se pudo observar que un aumento en la abundancia relativa de *Firmicutes* y una disminución proporcional en *Bacteroidetes* se asocia con la microbiota de ratones obesos (Stanhope, 2016). Así, el vínculo dieta-microbiota estaría estrechamente relacionado con el desarrollo de síndromes metabólicos como la obesidad materna y además, su transmisión a los hijos (Duranti, Ferrario, van Sinderen, Ventura, & Turrioni, 2017).

En este sentido, el papel que juega la lactancia en la primera infancia es crucial, ya que la leche materna es de los componentes más importantes para el establecimiento de la microbiota en la descendencia, en este sentido, es bien conocido que la microbiota intestinal de niños alimentados con leche materna es diferente de la de los niños alimentados con fórmulas lácteas, los primeros tienen alto porcentaje de *Bifidobacterias* y bajos de *Enterobacterias* en heces. Las primeras, ejercen una función biológica positiva ya que provoca una disminución del pH intestinal, lo que limita el crecimiento de otras poblaciones bacterianas, algunas de ellas potencialmente patógenas (Gil, 2015).

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el aumento en el consumo de alimentos con alto valor calórico, así como bebidas endulzadas con sacarosa, representan una de las causas principales en el desarrollo de ganancia energética positiva e incremento de obesidad tanto en adultos como en niños.

Además, se ha determinado que ciertas exposiciones prenatales (“*in útero*”) o posnatales tempranas (durante la lactancia) podrían “programar” nuestro metabolismo para el resto de la vida. En este contexto, el consumo de algunos NSS en estas etapas de la vida podría actuar como disparador de esta programación, y una de las consecuencias sería el deterioro cognitivo, ya que, de acuerdo con algunos autores, el hipotálamo es susceptible a las dietas altas en energía.

Si bien, no están establecidos los mecanismos por los que el uso de NNS en periodos críticos del crecimiento, como gestación y lactancia podrían ser perjudiciales para la descendencia, se han especulado algunos mecanismos, entre ellos la modulación de la microbiota intestinal.

Es por ello que, con este proyecto se pretende aportar información a la comunidad científica sobre el efecto que tiene la alimentación materna alta en endulzantes sobre la descendencia, particularmente el papel que desempeña la microbiota intestinal como posible responsable del deterioro cognitivo de la descendencia. Además, los resultados obtenidos de este trabajo podrían ser una pauta para pensar en trasladar a humanos estos experimentos y así constituir una herramienta de utilidad para que el profesional de la salud construya una postura crítica y con ello, hacer sus recomendaciones nutricionales en cuanto a los endulzantes, ya que actualmente existe mucha desinformación sobre su uso a largo plazo.

IV. HIPOTESIS

La ingesta materna alta en endulzantes como sacarosa, miel y stevia, durante la gestación y lactancia, modula la microbiota intestinal de la descendencia adulta alterando su capacidad cognitiva.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes como sacarosa, miel y stevia durante la gestación y lactancia de ratas Wistar sobre la modulación de la microbiota intestinal de las crías macho y la alteración de su capacidad cognitiva.

5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la ingesta alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética en ratas Wistar hembras adultas previamente alimentadas con dieta de cafetería.

2. Evaluar el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética en ratas crías macho.

3. Analizar el déficit de aprendizaje y memoria de la descendencia adulta de ratas Wistar hembras alimentadas con dietas altas en endulzantes durante la gestación y lactancia.

4. Determinar el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre la modulación de la microbiota intestinal en ratas crías macho.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Diseño del estudio

Los objetivos propuestos para el presente proyecto se abordaron a través de un modelo experimental en ratas Wistar en el que se estudió el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante gestación y lactancia sobre la modulación de la microbiota intestinal de las crías macho y la alteración de su capacidad cognitiva.

- **Ratas Wistar hembras**

La figura 10(a) muestra el modelo experimental, el cual se realizó con 15 ratas Wistar hembras de 6 semanas de edad, con un peso aproximado de 100 a 150 g, las cuales fueron proporcionadas por Servicios Científicos Tecnológicos y Comerciales S.A. de C.V. Tetrarium. Los animales se aclimataron y se les suministró dieta control por 2 semanas.

Todos los animales se mantuvieron alojados en cajas de polipropileno en un ambiente de 21 a 22 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas durante todo el experimento.

En la semana 8 de vida (semana 3 experimental), los animales se distribuyeron aleatoriamente en 5 grupos (Un grupo control (n = 3) y 4 grupos cafetería (n = 12)), y durante 4 semanas se les suministró dieta control y cafetería (Caf), respectivamente. A la cuarta semana, se colocó una rata macho por jaula para el apareamiento, y se mantuvo por 2 semanas.

Posterior al periodo pregestacional, en la semana 12 de vida (semana 7 experimental), se cambió la dieta y se distribuyeron en los siguientes grupos: control-control (n = 3), cafetería-control (n = 3), cafetería – control+sacarosa (n = 3), cafetería – control+miel (n = 3), cafetería – control+stevia (n = 3). Esta dieta

se administró durante las semanas de gestación y lactancia. El peso y la ingesta de las ratas hembras se registró 3 veces a la semana.

Se recogieron heces frescas de las ratas hembras antes de dar la dieta alta en endulzantes (semana 6 del experimento) y la segunda muestra se obtuvo al finalizar el periodo de lactancia en la semana 18 de vida (semana 14 experimental), las muestras fueron almacenadas en tubos falcon a -80 °C para posteriores análisis. También se evaluó el peso final y la glucosa en ayunas. Posteriormente, las ratas hembras fueron sacrificadas por decapitación, se recolectó la sangre, se hizo un raspado de mucosa intestinal y se registró el peso del hígado, cerebro y tejido adiposo mesentérico, los cuales fueron almacenados a -80 °C para posteriores análisis.

- Ratas crías macho

La figura 10(b) muestra el diseño experimental de las crías macho. En la semana 11 experimental nacieron las crías de las ratas hembras. Se pesaron al momento del nacimiento y continuó su monitoreo 1 vez por semana durante las primeras 3 semanas de vida, correspondiente al periodo de lactancia. Al destete, se tomó una muestra de heces frescas. A partir de la 3ª semana de vida de las crías (14 experimental), todas se alimentaron con dieta control hasta la semana 26 de vida de las crías (37 experimental), durante este periodo las crías se pesaron 1 vez por semana, y se registró la ingesta tres veces por semana.

Para este trabajo únicamente se consideraron crías macho, un total de 40 crías macho, 10 crías de las madres que fueron alimentadas con dieta control (C-C), 6 crías de madres que fueron alimentadas con dieta Cafetería en etapa pregestacional (Caf-C), 11 crías de madres que fueron alimentadas con dieta Cafetería en etapa pregestacional y alta en sacarosa durante la gestación y lactancia (Caf-Az), 8 crías de madres que fueron alimentadas con dieta Cafetería en etapa pregestacional y alta en miel durante la gestación y lactancia (Caf-M) y 5 crías de madres que fueron alimentadas con dieta Cafetería en etapa pregestacional y alta en stevia durante la gestación y lactancia (Caf-St).

En las semanas 18 y 23 de vida de las crías se evaluó el aprendizaje y memoria utilizando el laberinto “Y” y laberinto de Barnes, respectivamente.

En la semana 26 de vida de las crías se tomó una muestra de heces frescas, además se registró el peso final, la glucosa en ayunas y posteriormente se sacrificaron por decapitación. Se realizó un raspado de mucosa intestinal y se registró el peso del hígado, cerebro, tejido adiposo epididimal, retroperitoneal, mesentérico y subcutáneo de cada rata. Posteriormente los tejidos fueron almacenados a -80 °C para su posterior análisis.

a

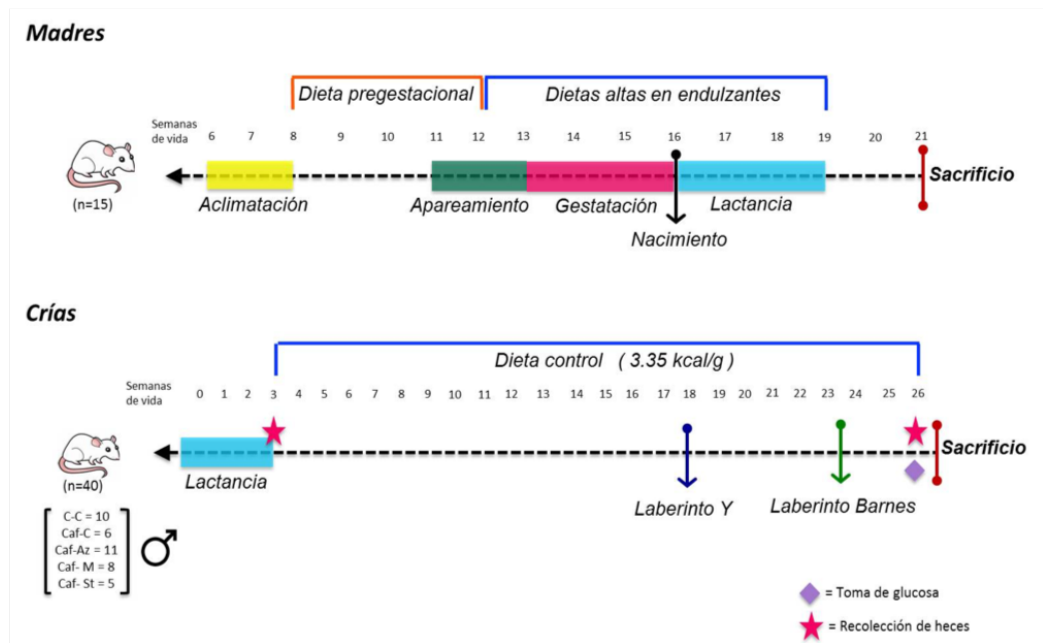


Figura 10. Gráfico del diseño experimental. a) Un total de 15 ratas Wistar hembras fueron aleatoriamente divididas en 2 grupos durante la etapa pregestacional (Control y Caf), posteriormente se dividieron en 5 grupos durante la gestación y lactancia donde se suministraron dietas altas en endulzantes. b) Al finalizar el periodo de lactancia, cuarenta crías macho fueron separados de sus madres y alimentados con dieta control durante 26 semanas.

6.2 Dieta experimental

El diseño de las dietas control, cafetería, alta en sacarosa, alta en miel y alta en stevia se muestra en la tabla 7.

Ratas madres hembras

Para la dieta control se utilizó Rodent Lab Chow Diet 5001 obtenida por la compañía LabDiet. La dieta de cafetería para inducir obesidad se elaboró a base de chocolate líquido, galletas, tocino, papas fritas, pienso molido y paté, en una proporción 1:1:1:1:1:2, respectivamente. Se molieron todos los ingredientes y se mezclaron para formar una masa homogénea.

Las dietas altas en sacarosa, miel y stevia fueron calculadas para obtener una dieta isocalórica entre los grupos, administrando pienso molido con endulzantes en una proporción 1:1.5 para la dieta alta en sacarosa; 1:1.15 para la dieta alta en miel y 1:1 para dieta alta en stevia.

La dieta alta en sacarosa se elaboró utilizando leche condensada, mientras que la dieta alta en miel se elaboró utilizando miel de flor de aguacate distribuida por Hermes honey SA de CV, por último, la dieta alta en stevia se elaboró utilizando un extracto de stevia orgánica en presentación líquida. Todas las dietas fueron otorgadas a libre demanda.

Ratas crías macho: Se les proporcionó dieta control Rodent Lab Chow Diet 5008 a libre demanda.

Tabla 6. Composición de las 5 dietas experimentales.

| Dietas | Contenido calórico |
|--------------------------------------|--|
| Control (C-C) | Densidad calórica: 335 kcal / 100 g. De los cuales: hidratos de carbono 191 kcal, lípidos 44 kcal y proteínas 100 kcal. |
| Cafetería (Caf-C) | Densidad calórica: 372 kcal / 100 g. De los cuales: hidratos de carbono 145 kcal, lípidos 182 kcal y proteínas 45 kcal. |
| Alta en sacarosa (Caf-Az) | Densidad calórica: 339 kcal / 100 g. De los cuales: hidratos de carbono 232 kcal, lípidos 64 kcal y proteínas 41 kcal. |
| Alta en miel (Caf-M) | Densidad calórica: 339 kcal / 100 g. De los cuales: hidratos de carbono 232 kcal, lípidos 64 kcal y proteínas 41 kcal. |
| Alta en Stevia (Caf-St) | Densidad calórica: 335 kcal / 100 g. De los cuales: hidratos de carbono 191 kcal, lípidos 44 kcal y proteínas 100 kcal. |

6.3 Parámetros antropométricos

El registro del peso (g) para evaluar el efecto de la dieta en madres y crías se realizó durante las 37 semanas del experimento utilizando una balanza analítica.

6.4 Análisis de ingesta dietética

La ingesta dietética se registró 3 veces por semana durante la vida de las ratas madres y de las crías macho, con ello, se evaluó la cantidad de alimento consumido por día (g/día) así como el contenido energético (kcal/día). Por último, utilizando la fórmula de eficiencia energética evaluamos la ganancia de peso en relación con las kcal consumidas tanto de las madres como de las crías (Figura 11).

$$\text{Eficiencia energética} = \frac{\text{Ganancia de peso (g)} \times 100}{\text{kcal totales}}$$

Figura 11. Fórmula de eficiencia energética.

6.5 Parámetros bioquímicos

6.5.1 Niveles de glucosa en sangre

La glucosa en ayunas (12 horas) fue medida previa al sacrificio, tanto de madres como crías, usando tiras reactivas Accu-check performa, por punción en la cola de las ratas obteniendo una gota de sangre. Los resultados de glucosa en sangre se expresan en mg/dL y fue calculada con el Glucómetro “On Call Plus”.

6.6 Aprendizaje y memoria

6.6.1 Prueba de alternancia forzada (Laberinto Y).

Las tareas de alternancia miden la disposición de los roedores para explorar nuevos entornos y se utilizan para evaluar la memoria de trabajo y el comportamiento exploratorio (Wolf, Bauer, Abner, Ashkenazy-Frolinger, & Hartz, 2016).

En la semana 18 de vida de las crías macho se realizó la prueba de alternancia forzada, utilizando un laberinto en Y simétrico, hecho de acrílico color azul, las medidas de cada brazo del laberinto “Y” fueron: 35 cm de largo, 5 cm de ancho y 10 cm de alto (Figura 12). Para reducir la ansiedad en los animales, la luz en el área de prueba se atenuó a 30 ± 5 lux. La prueba consistió en un ensayo de muestra de 5 min (T1), seguido de un tiempo de recuperación de 15 min (T2) y una última exposición de 5 min (T3).

En T1, la rata se colocó en el extremo del brazo de inicio, de cara a la pared y lejos del centro. Luego se permite que la rata explore dos brazos del laberinto Y, mientras la entrada al tercer brazo permaneció bloqueada. Después de la prueba de muestra (5 minutos), la rata fue devuelta a su jaula de inicio durante un intervalo de 15 minutos entre las pruebas (T2). En T3, se eliminó el bloque en el brazo 3 y la rata se colocó nuevamente en el brazo de inicio, luego se permitió que accediera a los tres brazos del laberinto por un tiempo total de 5 minutos.

En esta prueba se registraron las entradas totales al brazo previamente bloqueado, se contó como una entrada en el brazo cuando las 4 patas de la rata entraron en el brazo, y también se registró la alternancia forzada [%] que se define como el porcentaje de ratas que ingresan por primera vez al nuevo brazo durante T3 (Wolf et al., 2016).

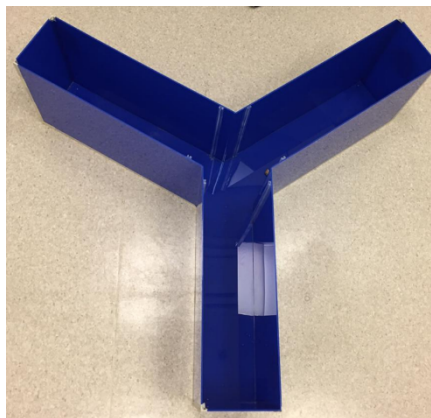


Figura 12. Estructura de Laberinto de “Y”.

6.6.2 Laberinto de Barnes

En la semana 23 de vida de las crías macho se realizó el laberinto de Barnes, una tarea de laberinto para detectar déficits cognitivos (Zappa Villar et al., 2018). Es una prueba de comportamiento para estudiar la memoria espacial en ratas y fue desarrollada originalmente por Carol Barnes (Barnes, 1979). La prueba se basa en una tarea dependiente del hipocampo en la que los animales aprenden la relación entre las señales distales en el entorno circundante y una ubicación de escape fija.

La configuración típica de laberinto de Barnes consiste en una plataforma circular elevada con 18 orificios espaciados uniformemente alrededor del perímetro (Figura 13). Un túnel de escape se monta debajo de un orificio mientras que los 17 orificios restantes se dejan vacíos. Tanto la luz brillante, los espacios abiertos y cambios en temperatura son aversivos a los roedores, por lo que fueron utilizados como factores motivadores para inducir el comportamiento de escape. El túnel de escape se mantuvo en una ubicación fija durante 5 días, este periodo implica múltiples pruebas diarias repartidas y se conoce como periodo de entrenamiento. Tras un entrenamiento de adquisición suficiente, el sexto y doceavo día se realizan las pruebas de corto y largo plazo, respectivamente.

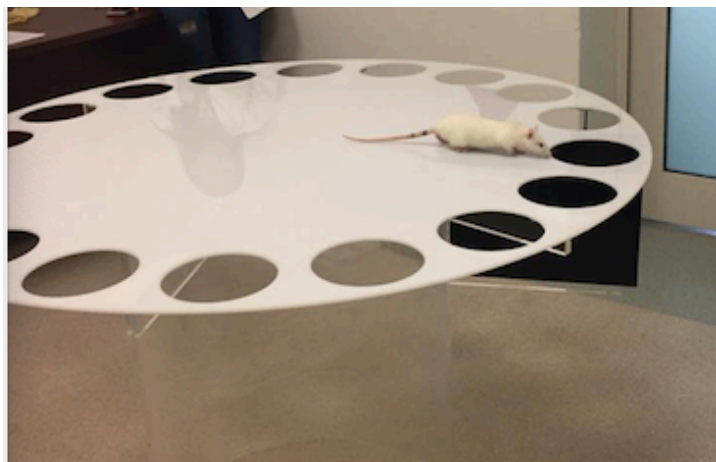


Figura 13. Estructura de Laberinto de Barnes.

El primer día de entrenamiento consistió en colocar la rata en el túnel de escape, cubrirla por completo durante 90 segundos, posteriormente se retiró del túnel de escape y se colocó en la parte central del laberinto para dar inicio a la prueba. Una vez colocada en el centro del laberinto, la rata fue cubierta con una caja oscura por 30 segundos, a continuación, se destapó y se le permitió explorar hasta que entró en el túnel de escape o hasta que transcurrieron 3 minutos. Así termina la primera exposición y posteriormente la rata se sacó del laberinto por 15 minutos para colocarla de nuevo en el centro del laberinto y realizar el mismo procedimiento completando 4 exposiciones en el primer día de entrenamiento.

El resto del entrenamiento (del día 2 al día 5) la rata siempre inició en el centro del laberinto y se dejó explorar hasta que encontrara el túnel de escape o transcurrieran 3 minutos. Si una rata no encontró el túnel de escape dentro del periodo de 3 minutos, el investigador coloca a la rata en el túnel durante 90 segundos. En todos los días de entrenamiento se cumplieron 4 exposiciones por día, dejando 15 minutos de descanso entre cada exposición.

Cada día de entrenamiento se registran una serie de parámetros para evaluar el rendimiento, para este trabajo consideramos: a) el tiempo (seg) para ingresar en el túnel de escape (latencia); b) la cantidad de orificios incorrectos que se verificaron antes de ubicar e ingresar en el túnel de escape (errores); c) número de orificios que existen entre el visitado por la rata por primera vez y el túnel de escape (puntaje de desviación); y d) tipo de búsqueda, los roedores suelen utilizar una secuencia de tres estrategias de búsqueda diferentes: 1. Espacial (definido como navegar directamente al cuadrante correcto sin cruzar el centro del laberinto más de una vez y con tres o menos errores) 2. Aleatorio (definida operacionalmente como búsquedas localizadas de orificios separados por la ruta que cruza el centro del laberinto) y 3) Serial (definida como búsqueda sistemática de orificios consecutivos en sentido horario o antihorario).

Al sexto y doceavo día, las pruebas se realizaron exponiendo a la rata por única vez durante 90 segundos, tiempo donde también se registraron latencia, errores, puntaje de desviación y tipo de búsqueda.

6.7 Caracterización de microbiota

Para el análisis de la microbiota intestinal de las crías macho fue necesario recolectar heces frescas de la primera hora de la mañana, la primera recolección de heces se llevó a cabo al destete y la segunda en la semana 26 de vida de las crías (previo al sacrificio). Al momento de recolectar las heces frescas, se colocaron en un tubo falcon 15 ml y se congelaron las muestras a -80 °C para su posterior análisis.

Se consideraron 5 muestras de cada grupo experimental para llevar a cabo la extracción de ADN, la cual se realizó mediante el uso de QIAamp Fast DNA Stool mini Kit (Qiagen), posteriormente se cuantificó el ADN con Picogreen. Así también se llevó a cabo la amplificación del gen 16S de ARN ribosomal y una posterior secuenciación y análisis por Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs).

6.7.1 Extracción y cuantificación de ADN

El ADN bacteriano fue obtenido mediante el uso de QIAamp Fast DNA Stool mini kit (Qiagen, Alemania). Este kit permite una purificación del ADN total de muestras de heces frescas o congeladas. La purificación no requiere extracción de fenol-cloroformo ni precipitación de alcohol, además el ADN purificado es de alta calidad y muy adecuado para su uso en PCR y otras aplicaciones posteriores.

Reactivos:

- Buffer AL
- Buffer InhibitEX
- Buffer AW1 y AW2
- Proteinasa K
- Buffer ATE
- Etanol 96-100%

Equipo:

- Microcentrífuga
- Vortex
- Tissue lyser
- Campana de flujo laminar
- Termomixer

Procedimiento:

1. Pesar 180-220 mg de muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
2. Resuspender la muestra en 1 ml buffer InihibEx.

Para homogenizar totalmente la muestra se utilizó Tissue Lyser (3,000 x 3 min) o vortex por 1 minuto. El resto del protocolo se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3. Calentar la suspensión por 5 minutos a 70 °C. Agitar con vortex durante 15 segundos.
4. Centrifugar la muestra por 1 minuto a 14,000 rpm.
5. Pipetear 15 µl de Proteinasa K en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml.
6. Pipetear 200 µl del sobrenadante del paso 4 al nuevo tubo que contiene proteinasa K.
7. Agregar 200 µl de Buffer AL y agita con vortex 15 segundos.
8. Incubar a 70 °C durante 10 minutos.
9. Agregar 200 µl de etanol (96-100%) al lisado, y agita con vortex.
10. Cuidadosamente aplicar 600 µl del lisado del paso 9 a una nueva columna QIAamp (columnas incluidas en el kit). Cierra la tapa y centrifuga por 1 minuto. Coloca la columna en un nuevo tubo de recolección y desecha el tubo que contiene el filtrado.
11. Cuidadosamente abre la columna y agrega 500 µl de buffer AW1. Centrifuga por 1 minuto. Coloca la columna en un nuevo tubo de recolección y desecha el tubo que contiene el filtrado.

12. Cuidadosamente abre la columna y agrega 500 μ l de buffer AW2. Centrifuga por 3 minutos. Desecha el tubo que contiene el filtrado.
13. Colocar la columna en nuevo tubo de recolección y centrifuga por 3 minutos.
14. Transferir la columna en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml previamente etiquetado y pipetear 200 μ l de Buffer ATE directamente sobre la membrana de la columna. Incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugar 1 minuto para eluir el DNA.

El DNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su cuantificación y análisis.

NOTA: Las muestras de las crías al destete (T1) fueron menores a 120 mg y de acuerdo con las especificaciones del fabricante, no fue necesario reducir los buffers o hacer cambios en el protocolo, con excepción del último paso en donde todas las muestras se diluyeron en 100 μ l de Buffer ATE.

Posteriormente, se determinó la calidad del ADN bacteriano utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific), se consideraron muestras de calidad las que tuvieron una relación 260/280 de 1.8 a 2. Así también, el ADN fue cuantificado empleando el fluorómetro Picogreen siguiendo el protocolo.

Reactivos:

- Picogreen
- Buffer TE 1x
- Estandar de DNA λ

Equipo:

- Centrifuga
- Qubit

Procedimiento:

Para 40 muestras:

1. Preparar 36.2 ml de Buffer TE 1x en un tubo falcon de 50 ml.
2. Posteriormente en un tubo Eppendorf de 1.5 ml se debe obtener una concentración de 2 ng/μl de ADN λ.
3. Diluir 90 μl de Picogreen con el buffer 1x hasta obtener un volumen final de 18.0 ml.
4. Previo a la preparación de las muestras, se debe elaborar una curva estándar de calibración, el rango de la concentración de ADN es de 0 a 1 ng/μl. Los volúmenes requeridos de ADN y Buffer se enlistan en la tabla 8.
5. Para lograr una cuantificación precisa se llevaron las muestras de ADN bacteriano a una concentración 1:200, utilizando Buffer TE 1x.
6. Cuantificar con Qubit.

Se realizó una regresión lineal para calcular la concentración final de ADN de cada muestra. Todas las muestras se cuantificaron por triplicado. Los valores fueron expresados como ng/μl ± DEM.

Tabla 7. Curva estándar para la cuantificación por medio de Picogreen.

| Tubo | Volumen de TE 1x (μl) | Volumen de ADN λ (2 ng/μl) | Volumen de Picogreen diluido (μl) | Concentración final de ADN (ng/μl) |
|------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 0.0 | 350.0 | 350 | 1.000 |
| 2 | 315.0 | 35.00 | 350 | 0.100 |
| 3 | 332.5 | 17.50 | 350 | 0.050 |
| 4 | 341.25 | 8.75 | 350 | 0.025 |
| 5 | 346.5 | 3.50 | 350 | 0.010 |
| 6 | 349.65 | 0.35 | 350 | 0.001 |
| 7 | 350 | 0.00 | 350 | 0.000 |

6.7.2 Determinación de abundancia bacteriana

Como preparación de las muestras de ADN bacteriano se realizó una purificación utilizando las perlas AMPure XP (Illumina) con el objetivo de eliminar posibles contaminantes (dNTP, sales, cebadores o dímeros de cebado). Se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Para determinar la abundancia bacteriana, se realizó la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) que consiste en:

- Amplificación del gen 16S de ARNr

La amplificación de los genes 16S ARNr se realizó utilizando los primers forward y reverse específicos (proporcionados por Integrated DNA Technologies), buffers, fluoróforos y la polimerasa de ADN Taq recombinante de Invitrogen (Thermo Scientific) descritos en la Tabla 9.

Tabla 8. Primers utilizados para la amplificación del gen 16s ARNr

| Primers 16s | Secuencia de oligos |
|-------------|--|
| Forward | 5'- TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG -3' (50 pb) |
| Reverse | 5'- GCT TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAC ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C – 3' (55 pb) |

Las condiciones de los ciclos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron las siguientes:

- 3 min a 95 ° C,
- 25 ciclos de:
 - 30 s a 95 ° C,

- 30 s a 63 ° C,
- 30 s a 72 ° C,
- 5 min a 72 ° C.

La concentración de ADN de los amplicones de interés se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (Sigma Aldrich) /Chip y posteriormente se hizo la secuenciación. Posteriormente se realizó una purificación de ADN para continuar con la adición de índices.

- Secuenciación y generación de OTUs

La secuenciación se realizó en la plataforma Illumina MiSeq de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Illumina, preparación de la biblioteca de secuenciación metagenómica 16S). Las bibliotecas se recuperaron utilizando el software bcl2fastq 1.8.4 de Illumina y las lecturas se procesaron con scripts Python personalizados para clasificarlos en las muestras. Las secuencias se verificaron con Chimera Slayer, y las secuencias quiméricas se filtraron.

El análisis inició agrupando secuencias dentro de un porcentaje de similitud de secuencia en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un umbral de similitud del 97%. Así, el 100, 100, 100, 90.77 y 73.42% de las lecturas se asignaron al nivel de filo, clase, orden, familia y género, respectivamente. Se calcularon las medidas de alpha diversidad (índice Shannon). Se utilizaron distancias UniFrac ponderadas y no ponderadas para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) para la beta diversidad.

VII. PLAN DE ANÁLISIS

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar de la media (DEM) y media \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa estadístico SPSS versión 22.0.

La significancia estadística de las diferencias entre los grupos se evaluó mediante la prueba de Análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett y el equivalente no paramétrico de Kruskal Wallis. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Para las variables cualitativas de laberinto “Y” se utilizó el análisis de Chi-cuadrada (X^2).

Se realizó una prueba t para muestras relacionadas para comparar la composición de la microbiota intestinal al final del destete y en la edad adulta.

Los tamaños de las muestras se pueden encontrar en las leyendas de las figuras, donde n representa el número de animales utilizados para cada análisis.

VIII. RECURSOS

El proyecto se desarrolló en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) en donde se utilizó el espacio de las unidades de Nutrición, Modelos biológicos, Neurometabolismo y Genómica.

Equipos:

- Para la elaboración de dietas: Balanza analítica.
- Para evaluar el peso e ingesta: Balanza analítica.
- Para determinar el deterioro cognitivo: Laberinto Y y Laberinto de Barnes.
- Para identificar cambios en la modulación de microbiota: Centrifuga, Campana de flujo laminar, Tissue Lyser, Termomixer, Espectrofotómetro (NanoDrop 8000), Qubit, Termociclador, Secuenciador.

Reactivos y materiales:

- Heces frescas de crías Wistar macho.
- QIAamp Fast DNA Stool mini kit (Qiagen)
- Picogreen (Thermo Scientific)
- Ampure XP (Illumina)

8.1 Financieros

Proyecto financiado por PAICYT SA754-19 y PRODEP UANL-CA-418.

8.2 Humanos

Durante el desarrollo del proyecto participaron: Dra. Ana Laura de la Garza (Unidad de Nutrición) así como becarios y voluntarios de la unidad de Nutrición, Dr. Alberto Camacho y Dra. Marcela Cárdenas (Unidad de Neurometabolismo), MVZ. José Herrera (Unidad de Modelos Biológicos), MC. Bianka Camacho, MC. Ramsés Medina (Unidad de Genómica).

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y DE BIOSEGURIDAD

El presente proyecto de investigación se apegó a las condiciones y lineamientos de trabajo a llevar a cabo en un laboratorio, establecidos por el Comité Institucional de Bioseguridad del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud y por el Comité de Bioética en Investigación en Ciencias de la Salud de la UANL (COBICIS).

Estos comités se apegan a las disposiciones emitidas por organismos nacionales e internacionales en materia de investigación y establecen lineamientos para el correcto uso y desecho de residuos peligrosos como:

- Usar bata, guantes y el equipo necesario según las técnicas y Unidad utilizada para los procedimientos de investigación.
- Disponer de frascos aspersores con soluciones de descontaminación en todas las áreas.
- Ubicar un espacio para el desecho de soluciones utilizadas en recipientes rotulados tipo A, B y C; así como botes y bolsas para los residuos biológicos infecciosos.
- Al inicio y término de la jornada laboral se deberán limpiar las áreas de trabajo correspondiente.

Además, para el uso de modelos animales en materia de investigación se siguieron los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999:

1. Certificado de salud y calidad. Todos los animales adquiridos por compra, donación o intercambio tenían certificado sobre las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su embarque o salida del lugar de origen.
2. Durante el mantenimiento de los animales se evaluaba la salud, se utilizaron las técnicas previstas para la identificación y registro (marcas con colorantes en la cola) y se cuidaron los espacios y ambiente.

X. RESULTADOS

10.1 Ratas Wistar hembras

10.1.1 Efecto de la alimentación con dieta cafetería en la etapa pre-gestacional sobre el peso e ingesta de ratas Wistar hembras.

La figura 14 muestra la ganancia de peso (g) promedio del grupo control (n=3) y el grupo alimentado con dieta cafetería (n=12) en etapa pre-gestacional. Encontramos que, después de 4 semanas de dieta de cafetería, el peso fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en las ratas alimentadas con dieta cafetería en comparación con las ratas del grupo control.

Así mismo, se encontró que el grupo alimentado con dieta cafetería consume significativamente más alimento al día (g/día) que el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 15A), sin embargo, en el análisis de eficiencia energética no existe diferencia significativa (Figura 15B).

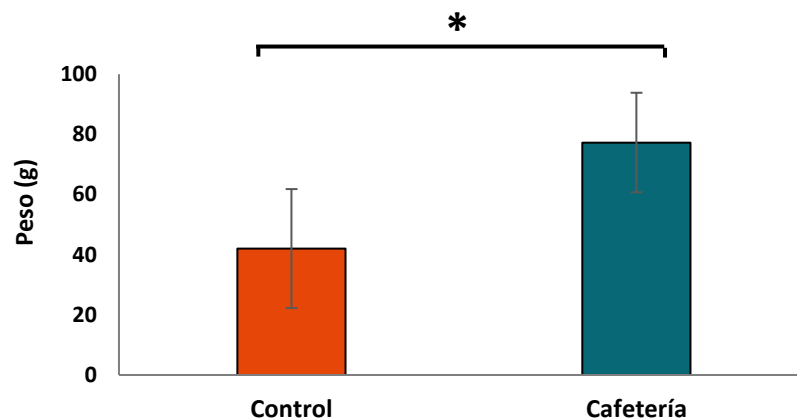


Figura 14. Peso (g) promedio de las ratas Wistar hembras alimentadas con dieta control y cafetería. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. Control (n=3); Cafetería (n=12). * $p < 0.05$.

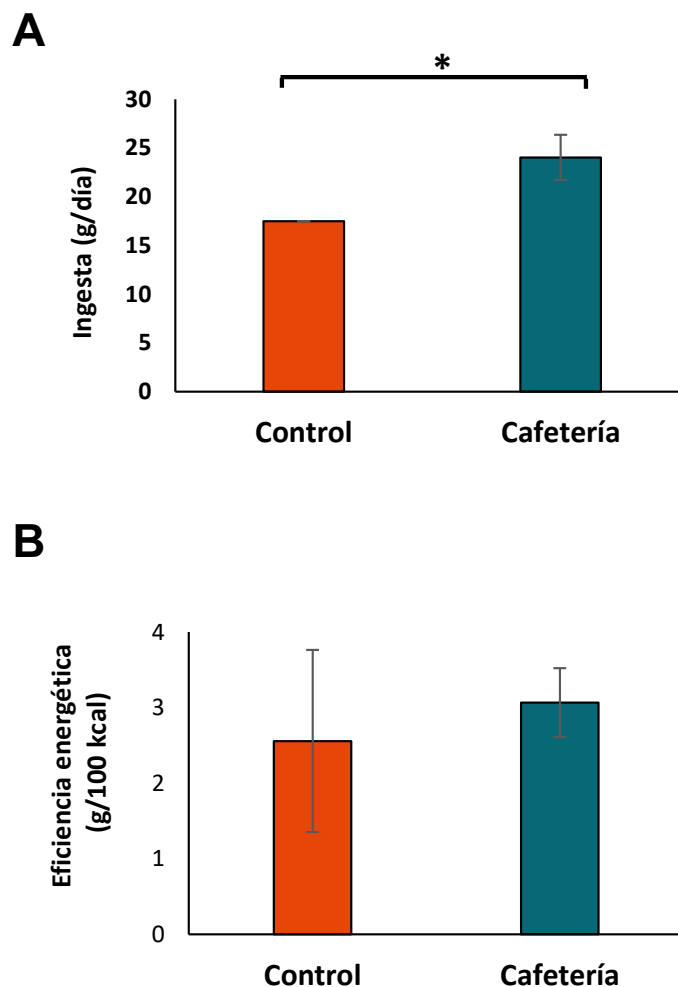


Figura 15. Ingesta y Eficiencia energética de las madres en etapa pregestacional. (A) Ingesta (g/día). (B) Eficiencia energética (g/100 kcal). Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. Control (n=3); Cafetería (n=12). * $p < 0.05$.

10.1.2 Efecto de la alimentación con dieta alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética.

La Figura 16 muestra la ganancia de peso (g) promedio de las ratas Wistar hembras durante el periodo de gestación y lactancia (7 semanas). El grupo que ganó mayor peso fue el grupo control, por el contrario, el grupo que menor peso ganó fue el que consumió dieta alta en Stevia, además las ratas alimentadas con dieta alta en sacarosa perdieron peso en este periodo, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre grupos.

Por su parte, el análisis de ingesta (g/día) mostró que las ratas alimentadas con dieta alta en Stevia (Caf-Stevia) consumen más alimento al día, sin embargo, esta diferencia no es significativa ($p > 0.05$) (Figura 17A), así mismo, al realizar el análisis de eficiencia energética encontramos que Caf-Stevia gana menos peso por la cantidad de alimento consumido, sin encontrarse diferencia significativa (Figura 17B).

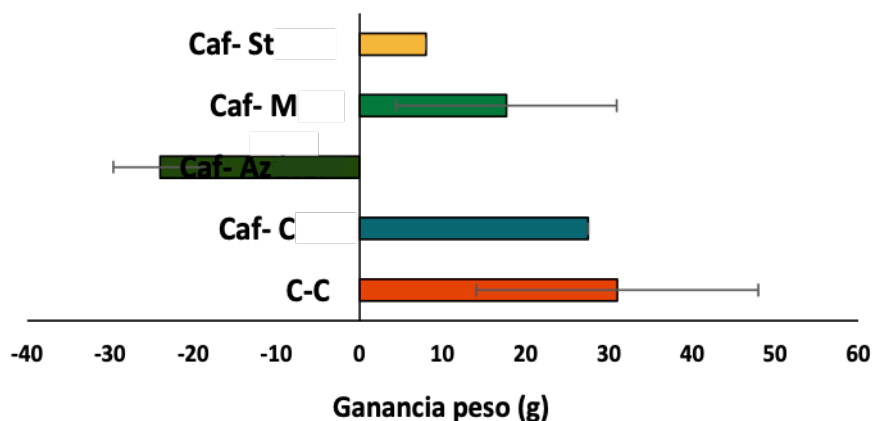


Figura 16. Ganancia de peso (g) promedio de las madres en gestación y lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA sin encontrarse diferencia significativa. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1).

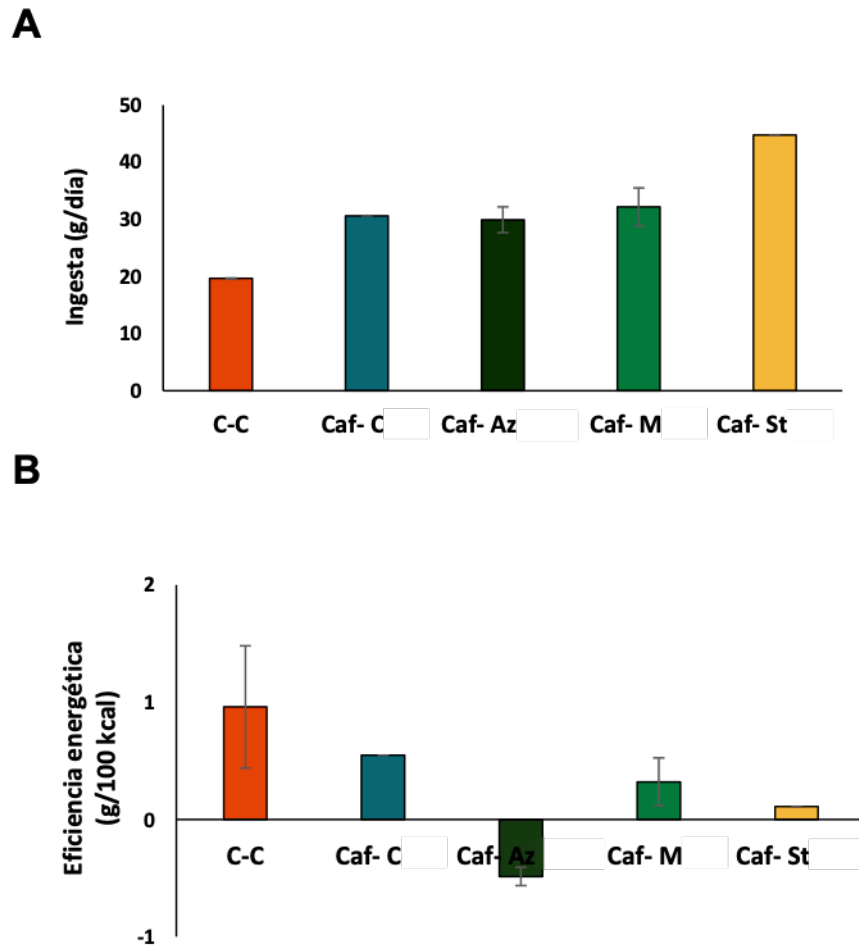


Figura 17. Efecto de la alimentación alta en endulzantes durante la gestación y lactancia. (A) Ingesta (g/día). (B) Eficiencia energética de las madres durante gestación y lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1). No se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Por otro lado, se realizó un análisis de los niveles de glucosa en sangre de las ratas Wistar hembras comparando la etapa pre-gestacional con el periodo post-lactancia de cada grupo, se encontró que el grupo Caf-Control disminuyó sus niveles de manera importante, mientras que el resto de los grupos mantuvo

niveles de glucosa similares en ambos periodos, sin embargo, no se observó diferencia significativa (Figura 18).

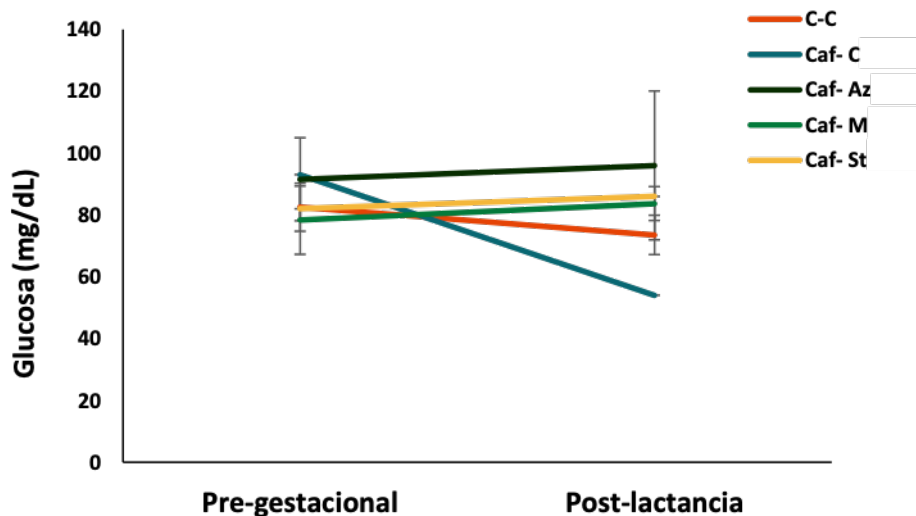


Figura 18. Comparación de los niveles de glucosa (mg/dl) en etapa pre-gestacional y post-lactancia. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA, sin embargo, no se encontró diferencia significativa. C-C (n=2); Caf-Con (n=1); Caf-Azúcar (n=2); Caf-Miel (n=3); Caf-Stevia (n=1).

10.2 Ratas Wistar crías macho

10.2.1 Efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre el peso, niveles de glucosa e ingesta dietética en crías macho.

Con el fin de analizar los efectos de la alimentación materna en la descendencia, se registró el peso al nacer de las crías macho (Figura 19). Así, se identificó que las crías macho de madres alimentadas con dietas alta en sacarosa (Caf-Az) y miel (Caf-M) mostraron un peso estadísticamente significativo menor respecto al control (C-C) ($p < 0.01$). Además, en la Tabla 10

se muestran los pesos semanales desde el nacimiento (semana 0) hasta la semana 26 de vida de las crías.

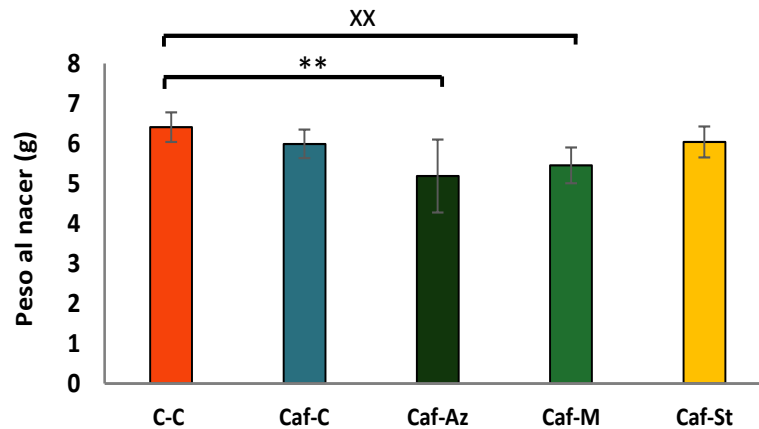


Figura 19. Peso de las crías macho al momento del nacimiento. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). ** $p < 0.01$ (C-C vs Caf-Az); ^{xx} $p < 0.01$ (C-C vs Caf-M).

Tabla 9. Registro semanal de peso corporal (g) de crías Wistar macho alimentadas con dieta control.

| Semana | C-C n=10 | Caf-C n=6 | Caf-Az n=11 | Caf-M n=8 | Caf-St n=5 |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 6.41 ± 0.37 | 5.99 ± 0.35 | 5.18 ± 0.91 | 5.45 ± 0.49 | 6.04 ± 0.38 |
| 1 | 17.37 ± 1.81 | 8.82 ± 0.72 | 13.47 ± 4.13 | 11.59 ± 0.83 | 13.84 ± 0.69 |
| 2 | 26.56 ± 2.14 | 20.45 ± 1.50 | 21.48 ± 3.92 | 18.85 ± 0.87 | 23.59 ± 1.71 |
| 3 | 36.41 ± 2.69 | 33.59 ± 2.64 | 30.95 ± 2.59 | 25.82 ± 1.32 | 34.27 ± 1.66 |
| 4 | 73.21 ± 10.61 | 74.06 ± 6.69 | 67.07 ± 8.35 | 48.55 ± 5.77 | 90.81 ± 5.94 |
| 5 | 119.58 ± 15.00 | 115.92 ± 12.19 | 82.07 ± 10.31 | 73.23 ± 9.71 | 133.50 ± 14.60 |
| 6 | 164.20 ± 17.74 | 148.65 ± 19.43 | 104.28 ± 15.19 | 96.38 ± 14.49 | 172.44 ± 18.70 |
| 7 | 199.50 ± 21.24 | 191.63 ± 24.13 | 138.32 ± 21.56 | 119.61 ± 18.49 | 217.80 ± 23.67 |
| 8 | 234.80 ± 22.46 | 227.83 ± 27.28 | 171.59 ± 27.32 | 150.36 ± 28.51 | 254.60 ± 35.03 |
| 9 | 247.40 ± 14.05 | 259.50 ± 31.16 | 203.36 ± 27.90 | 182.63 ± 32.36 | 290.80 ± 45.14 |
| 10 | 275.20 ± 20.70 | 272.67 ± 35.57 | 225.82 ± 30.13 | 204.25 ± 34.16 | 313.80 ± 51.83 |
| 11 | 299.40 ± 14.96 | 286.50 ± 34.95 | 247.64 ± 31.10 | 227.25 ± 37.02 | 338.20 ± 58.82 |
| 12 | 324.10 ± 15.23 | 308.17 ± 44.31 | 263.45 ± 32.94 | 248.25 ± 41.30 | 351.80 ± 56.27 |
| 13 | 346.00 ± 18.76 | 316.67 ± 46.65 | 273.27 ± 35.34 | 264.25 ± 42.32 | 365.40 ± 65.75 |
| 14 | 364.34 ± 23.34 | 330.17 ± 42.52 | 281.45 ± 41.21 | 267.63 ± 41.60 | 375.60 ± 63.81 |
| 15 | 370.40 ± 19.91 | 341.33 ± 36.72 | 291.73 ± 42.12 | 283.00 ± 44.15 | 383.32 ± 56.53 |
| 16 | 383.96 ± 22.87 | 349.17 ± 36.15 | 304.45 ± 40.72 | 290.25 ± 39.53 | 393.80 ± 59.67 |
| 17 | 393.25 ± 25.32 | 351.50 ± 31.12 | 312.36 ± 43.43 | 297.05 ± 35.16 | 401.40 ± 63.90 |
| 18 | 405.86 ± 27.65 | 363.00 ± 32.20 | 315.06 ± 41.12 | 302.25 ± 30.01 | 409.84 ± 71.90 |
| 19 | 412.40 ± 26.81 | 365.17 ± 33.24 | 329.77 ± 41.57 | 312.15 ± 31.15 | 411.40 ± 72.32 |
| 20 | 416.47 ± 29.96 | 366.67 ± 38.45 | 337.39 ± 40.21 | 319.23 ± 29.56 | 422.04 ± 72.69 |
| 21 | 422.90 ± 28.78 | 373.17 ± 33.47 | 342.90 ± 38.42 | 329.30 ± 30.96 | 429.40 ± 69.31 |
| 22 | 430.87 ± 28.26 | 379.10 ± 31.39 | 350.73 ± 36.74 | 321.48 ± 38.78 | 428.46 ± 66.43 |
| 23 | 436.70 ± 32.82 | 384.17 ± 32.63 | 354.12 ± 35.00 | 333.69 ± 30.90 | 432.80 ± 75.58 |
| 24 | 443.90 ± 31.76 | 388.85 ± 31.42 | 359.73 ± 36.51 | 337.15 ± 28.40 | 439.84 ± 79.45 |
| 25 | 445.99 ± 30.04 | 384.73 ± 31.77 | 359.37 ± 41.96 | 337.56 ± 26.72 | 438.40 ± 80.55 |
| 26 | 450.93 ± 29.30 | 389.39 ± 32.73 | 365.45 ± 37.66 | 339.89 ± 30.45 | 437.02 ± 77.33 |

Además, en la figura 20 se observa la ganancia de peso durante las 26 semanas de vida de las crías macho. En ese sentido, la tendencia de menor peso en el grupo de madres con dieta alta en sacarosa y miel se mantiene a lo largo del tiempo de manera significativa ($p < 0.05$). Las crías de madres alimentadas con dieta alta en stevia (Caf-St) tuvieron un peso similar a las crías control al momento del nacimiento, y esta tendencia continua a lo largo del tiempo sin diferencia significativa, excepto en la semana 1 ($p < 0.01$) y semana 4 ($p < 0.05$).

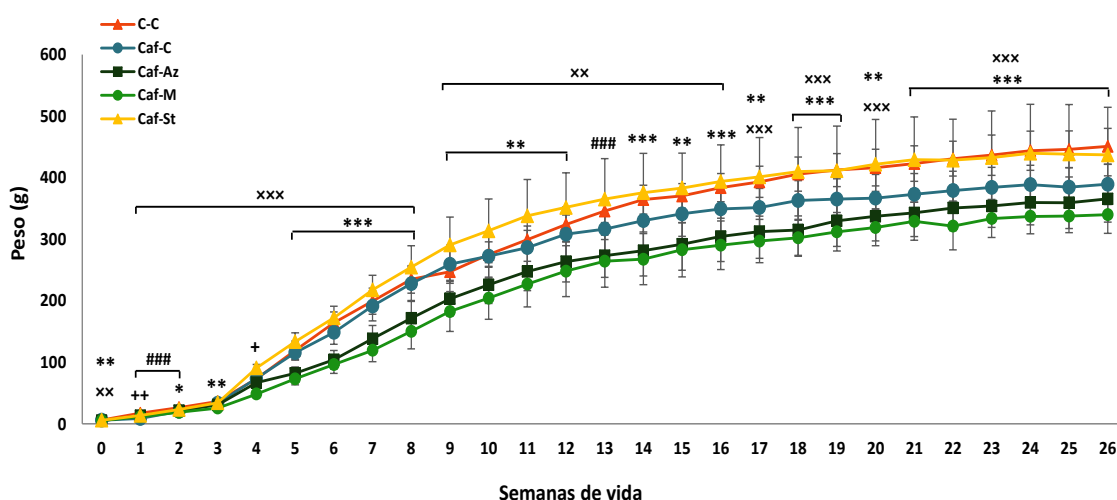


Figura 20. Ganancia de peso de las crías macho. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA y test de Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). $###$ $p < 0.001$ (C-C vs Caf-C); * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (C-C vs Caf-Az); xx $p < 0.01$, xxx $p < 0.001$ (C-C vs Caf-M), + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ (C-C vs Caf-St).

Por otro lado, de acuerdo con el análisis de los niveles glucosa en ayunas (mg/dL), no se observó diferencia estadísticamente significativa entre grupos (Figura 21A). Además, se calculó la cantidad de alimento (g) y kcal consumidas semanalmente y se asoció con la ganancia de peso que tuvieron a lo largo de las 26 semanas de vida utilizando la fórmula de eficiencia energética, sin embargo, los datos indican que no existe diferencia significativa entre grupos (Figura 21B).

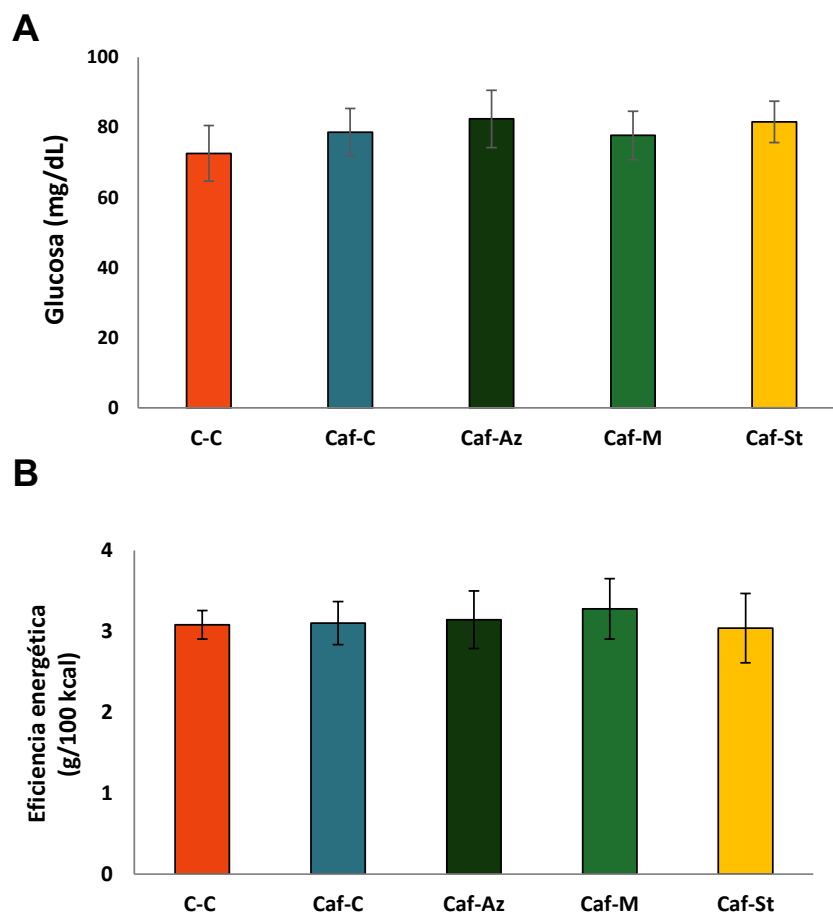


Figura 21. Glucosa en ayuno y eficiencia energética de crías macho. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA, sin existir diferencia significativa. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). A) Niveles de Glucosa en ayuno. B) Eficiencia energética.

Finalmente, al momento del sacrificio se recolectaron tejidos, se registró el peso de cada uno y finalmente el peso bruto de los tejidos se ajustó por 100 g de peso corporal de cada rata. Así, como se observa en la Tabla 11, existe diferencia significativa entre el tejido adiposo marrón de C-C con los grupos Caf-C, Caf-Az y Caf-St ($p < 0.05$), sin embargo, en el resto de los tejidos no existe diferencia significativa.

Tabla 10. Peso de tejidos de ratas crías macho adultas.

| | C-C | Caf-C | Caf-Az | Caf-M | Caf-St |
|--------------------------------|-------------|---------------|----------------|-------------|---------------|
| Tejido (g/100 g peso corporal) | | | | | |
| Hígado | 2.32 ± 0.07 | 2.42 ± 0.10 | 2.39 ± 0.10 | 2.50 ± 0.16 | 2.50 ± 0.20 |
| Bazo | 0.16 ± 0.01 | 0.15 ± 0.01 | 0.15 ± 0.20 | 0.16 ± 0.01 | 0.16 ± 0.02 |
| Tejido adiposo blanco | | | | | |
| Grasa Visceral | 3.47 ± 0.78 | 4.08 ± 0.93 | 3.35 ± 0.73 | 2.66 ± 0.49 | 3.98 ± 1.30 |
| Grasa subcutánea | 0.22 ± 0.08 | 0.28 ± 0.06 | 0.27 ± 0.20 | 0.25 ± 0.09 | 0.20 ± 0.11 |
| Tejido adiposo marrón | 0.04 ± 0.01 | 0.06 ± 0.00 * | 0.04 ± 0.01 ** | 0.04 ± 0.02 | 0.03 ± 0.01 # |

Todos los resultados se expresan como media ± DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=10); Caf-C (n=6); Caf-Az (n=11); Caf-M (n=8); Caf-St (n=5). * p<0.05 (C-C vs Caf-C); ++ p<0.01 (Caf-C vs Caf-Az); # p<0.05 (Caf-C vs Caf-St).

10.2.2 Efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia, sobre el déficit de aprendizaje y memoria de la descendencia adulta.

Respecto a las pruebas de aprendizaje y memoria, la prueba de laberinto Y, y la de laberinto Barnes fueron realizadas en la semana 18 y 24 de vida, respectivamente. En ese sentido, la figura 22 muestra los resultados de la prueba de laberinto Y, evaluando la alternancia forzada (%) y el número de entradas al brazo previamente bloqueado. Los resultados muestran que las crías de madres alimentadas con dieta Control (C-C) y dieta alta en Stevia (Caf-St) tienen mayor porcentaje (%) de alternancia, esto es, que un mayor número de animales entraron primero al brazo previamente bloqueado cuando se realizó la prueba.

Sin embargo, también las crías de los grupos C-C y Caf-St tuvieron un menor número de entradas al brazo nuevo (brazo previamente bloqueado). Esto es, que a pesar de que seleccionaron primero el brazo nuevo, pasaron menos tiempo explorando el brazo en comparación con las crías de los grupos Caf-C, Caf-Az y Caf-M, sin embargo, los resultados no son considerados estadísticamente significativos.

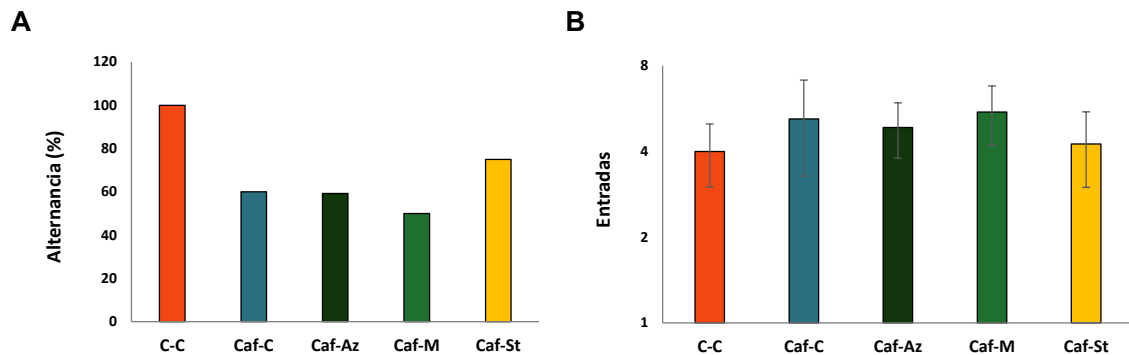


Figura 22. Resultados de Laberinto de "Y". Los resultados de porcentaje de alternancia fueron analizados por Chi cuadrada de Pearson. Los resultados de entradas se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor, sin encontrarse diferencia significativa. C-C (n=3); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=4); Caf-St (n=4). (A) Porcentaje (%) de alternancia (B) Número de entradas.

Por otro lado, en las figuras 23 y 24 se muestran los resultados de las pruebas realizadas en la fase de entrenamiento usando el laberinto de Barnes. Esta fase consiste en 5 días de entrenamiento. Cada día de entrenamiento se evaluó la latencia, errores, desviación y estrategia de escape. Posteriormente, se realizaron las pruebas de corto y largo plazo, al 6to y 12vo día, respectivamente, y se evaluaron los mismos parámetros que en la fase de entrenamiento (Figuras 25 y 26).

En ese sentido, respecto a los resultados del periodo de entrenamiento, se encontró que los grupos Caf-C, Caf-St y Caf-Az tardaron más tiempo en encontrar el túnel de escape (latencia) en el día 1 y 4 en comparación con el grupo C-C, sin embargo, solo se encontró diferencia significativa entre el grupo C-C y Caf-Az ($p < 0.05$) (Figura 23 A). Así mismo, respecto a la escala de error, los mismos grupos presentaron mayores errores antes de encontrar el túnel de escape, encontrando diferencia significativa respecto al grupo C-C (Figura 23 B). Por otro lado, al analizar el tiempo promedio por grupo en el día 5 de entrenamiento, se encontró que todos los grupos presentaron valores similares. No obstante, respecto a la escala de error, se encontró mayor número de errores en los grupos Caf-M y Caf-C. Respecto a la desviación se observa que el primer día de entrenamiento, las crías de C-C tuvieron menor desviación respecto a los otros grupos, existiendo diferencia significativa entre C-C y Caf-C, y para el último día de entrenamiento todos tuvieron una desviación similar, excepto por Caf-Az que tuvo un puntaje de desviación mayor (Figura 23 C).

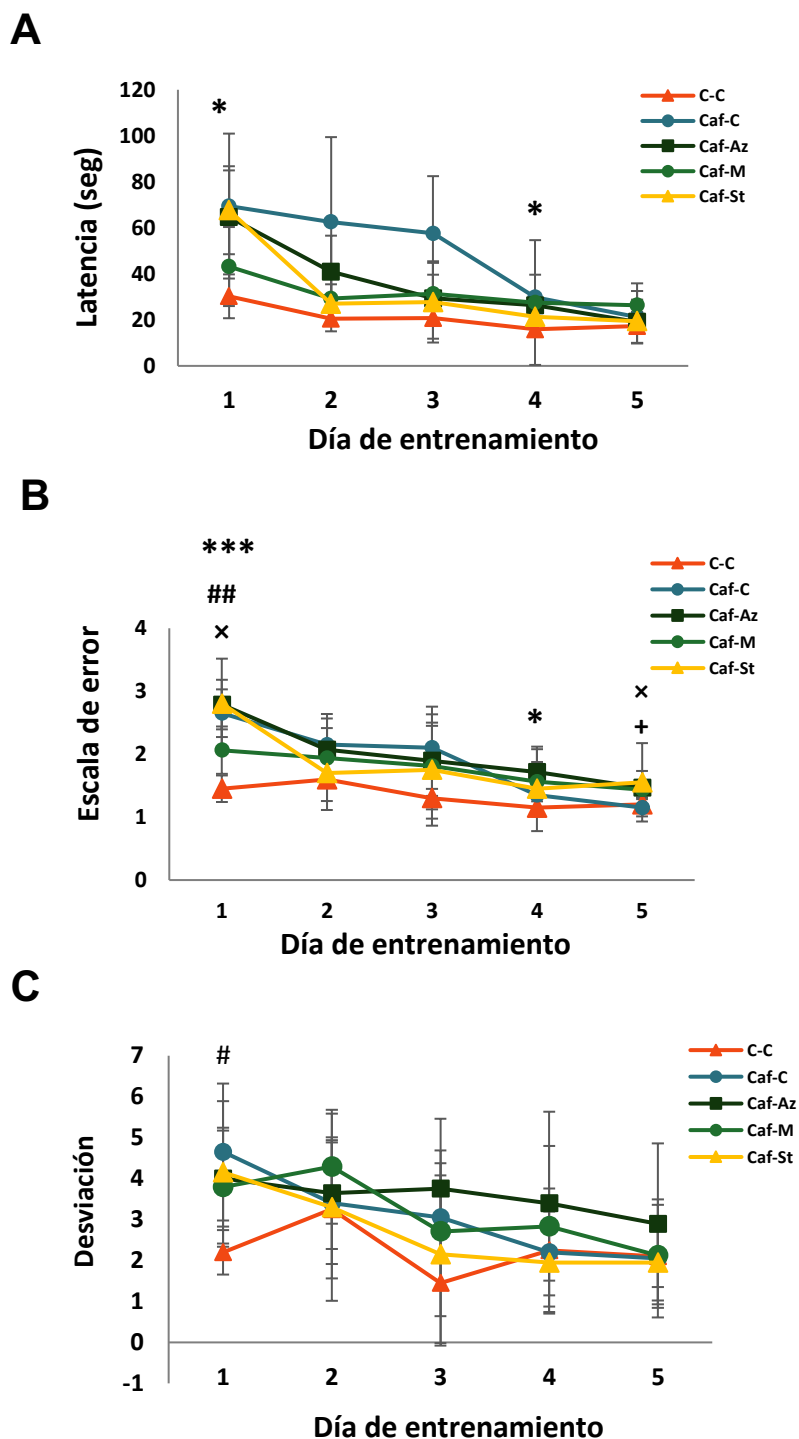


Figura 23. Resultados de entrenamiento prueba Barnes Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). (A) Latencia (seg); (B) Errores; (C) Desviación. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (C-C vs Caf-Az); ## $p < 0.01$ (C-C vs Caf-C); x $p < 0.05$ (C-C vs Caf-M); + $p < 0.05$ (Caf-C vs Caf-M).

En la figura 24 se muestra la estrategia de búsqueda por cada grupo a lo largo del entrenamiento. Así, los resultados muestran que el grupo C-C utiliza la estrategia espacial en mayor porcentaje en los 5 días de entrenamiento, mientras que los grupos Caf-Az, Caf-M y Caf-St tienen mayor porcentaje de estrategia serial. Por otro lado, el grupo que utilizó en mayor porcentaje la búsqueda aleatoria fue Caf-C, especialmente en el día 1, 2 y 3 de entrenamiento, sin embargo, para el quinto día de entrenamiento este grupo utilizó la estrategia serial en mayor porcentaje.

Podemos observar que en el quinto día de entrenamiento se obtuvo un porcentaje similar de estrategia serial entre los grupos C-C, Caf-M y Caf-St, los resultados fueron 60, 66 y 60%, respectivamente.

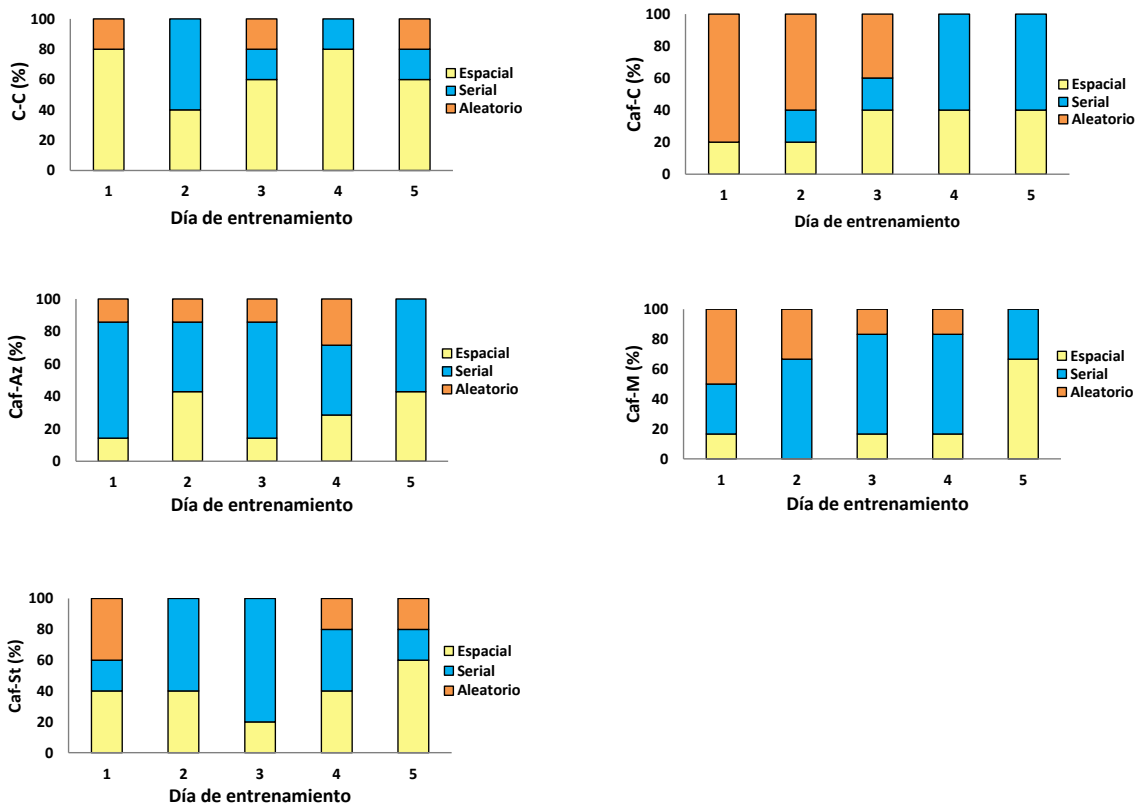


Figura 24. Estrategia de búsqueda de cada grupo durante el entrenamiento de laberinto de Barnes. Los resultados se expresan como porcentaje (%). C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5).

Respecto a los resultados de las pruebas de corto y largo plazo (Figura 25), se encontró que, como era de esperarse, el grupo C-C tuvo menor latencia en ambas pruebas en comparación con los otros grupos. Por otro lado, Caf-M fue el grupo que tardó más tiempo en encontrar el túnel de escape en las pruebas de corto y largo plazo (Figura 25 A). Sin embargo, todos estos resultados no fueron estadísticamente significativos.

Los resultados de la prueba de corto plazo muestran que los grupos con menor número de errores fueron C-C y Caf-C, mientras que en la prueba de largo plazo el grupo Caf-St tuvo menor número de errores. Por su parte, el grupo Caf-M obtuvo mayor número de errores en ambas pruebas (Figura 25 B). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa.

Por otro lado, en la prueba de corto plazo, el grupo C-C obtuvo menor desviación y el grupo Caf-C obtuvo mayor desviación en la misma prueba, mientras que, en la prueba de largo plazo ocurrió lo contrario, encontrando a C-C con mayor desviación y Caf-C con menor desviación, sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa (Figura 25 C).

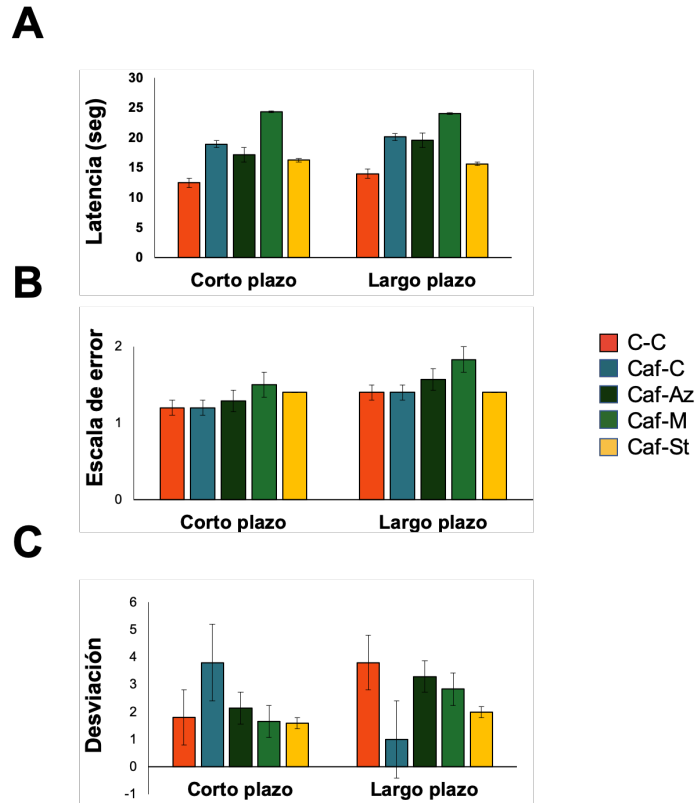


Figura 25. Resultados de laberinto de Barnes en prueba de corto y largo plazo. Los resultados se expresan como media \pm DEM. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5). (A) Latencia (seg); (B) Errores; (C) Desviación. No existe diferencia estadísticamente significativa.

Por último, evaluando la estrategia de escape, encontramos que, en la prueba de corto plazo, la estrategia espacial fue utilizada en mayor porcentaje por el grupo C-C, la serial por el grupo Caf-C, mientras que la estrategia aleatoria predominó en el grupo Caf-St. Respecto a la prueba de largo plazo, la estrategia espacial fue utilizada por los grupos C-C y Caf-C en igual porcentaje, mientras que la serial por el grupo Caf-Az y aleatorio por Caf-St (Figura 26).

La estrategia aleatoria no fue utilizada por los grupos C-C y Caf-Az en las pruebas de corto y largo plazo.

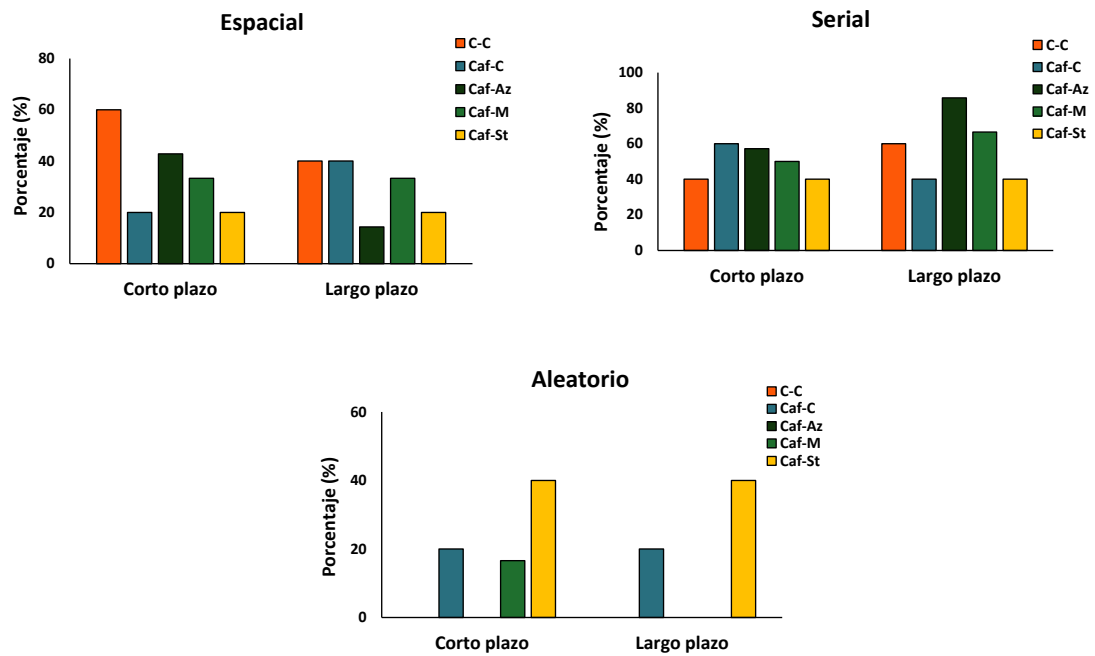


Figura 26. Estrategia de búsqueda de cada grupo durante la prueba de corto y largo plazo. Los resultados se expresan como porcentaje (%). C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=7); Caf-M (n=6); Caf-St (n=5).

10.2.3 Determinar el efecto de la ingesta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre la modulación de la microbiota intestinal en ratas crías macho.

Para evaluar el efecto de la dieta materna alta en endulzantes durante la gestación y lactancia sobre la modulación de la microbiota intestinal de las crías, se realizó un reagrupamiento considerando 5 crías por grupo. Un total de 50 muestras de heces fueron consideradas para realizar la extracción de ADN por medio de QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). El ADN obtenido fue almacenado a -20°C hasta el momento de la cuantificación y secuenciación.

La cuantificación se realizó a través del fluoróforo Picogreen (Thermo Fisher), los resultados se muestran en la Tabla 12. Todas las muestras se cuantificaron por triplicado.

Tabla 11. Concentración de DNA obtenido de heces de ratas Wistar macho.

| Grupo | Rata | Concentración (ng/μl) | | | |
|--------|------|-----------------------|------|-----------|------|
| | | Muestra 1 | DEM | Muestra 2 | DEM |
| C-C | 1 | 81.58 | 1.00 | 13.11 | 1.57 |
| | 2 | 73.02 | 2.45 | 20.94 | 1.46 |
| | 3 | 146.67 | 5.51 | 9.41 | 0.92 |
| | 4 | 39.29 | 0.92 | 13.79 | 0.78 |
| | 5 | 91.08 | 2.45 | 20.76 | 0.27 |
| Caf-C | 6 | 75.82 | 1.00 | 69.26 | 0.86 |
| | 7 | 62.77 | 0.35 | 17.25 | 0.78 |
| | 8 | 26.86 | 1.01 | 16.22 | 1.22 |
| | 9 | 76.32 | 3.04 | 35.27 | 1.66 |
| | 10 | 92.17 | 1.70 | 60.48 | 1.10 |
| Caf-Az | 11 | 60.68 | 1.70 | 46.19 | 1.60 |
| | 12 | 61.52 | 0.56 | 20.01 | 1.19 |
| | 13 | 30.36 | 0.68 | 51.00 | 2.00 |
| | 14 | 33.17 | 0.26 | 25.94 | 0.82 |
| | 15 | 88.42 | 1.68 | 19.82 | 1.14 |
| Caf-M | 16 | 16.12 | 1.08 | 32.41 | 1.98 |
| | 17 | 15.69 | 0.50 | 22.31 | 0.25 |
| | 18 | 26.44 | 1.11 | 18.09 | 0.78 |
| | 19 | 51.23 | 1.86 | 17.94 | 0.96 |
| | 20 | 30.76 | 1.37 | 120.73 | 8.78 |
| Caf-St | 21 | 81.36 | 1.28 | 33.92 | 0.65 |
| | 22 | 57.73 | 1.39 | 17.73 | 0.15 |
| | 23 | 55.74 | 0.76 | 37.61 | 0.16 |
| | 24 | 69.90 | 1.56 | 40.46 | 0.95 |
| | 25 | 76.67 | 1.19 | 13.72 | 0.77 |

Se determinó la concentración de DNA bacteriano contenido en muestras de heces mediante PicoGreen. Muestra 1 = muestra recolectada a la semana 3 de vida; Muestra 2 = muestra recolectada a la semana 26 de vida. Los resultados son expresados como ng/μl ± DEM.

La diversidad Beta se calculó utilizando un análisis Unifrac no ponderado, así el gráfico de dispersión tridimensional generado utilizando el análisis de componentes principales (PCoA) revela que el tipo de dieta materna modifica la composición de la microbiota en las crías (Figura 27).

En este estudio encontramos que el 32.0% de la variación microbiana se explica por la dieta materna, es decir, el tipo de endulzante consumido por las ratas hembras durante la gestación y lactancia. Además, se puede observar la diferencia por edad al comparar las muestras al destete y en la edad adulta. Así, independientemente del grupo, las muestras de las ratas crías analizadas tras finalizar el destete, mostraron una similitud en la diversidad a excepción del grupo Caf-St. Por otro lado, en la adultez, después del consumo de dieta control, se encontró menor variación bacteriana entre grupos (Figura 27).

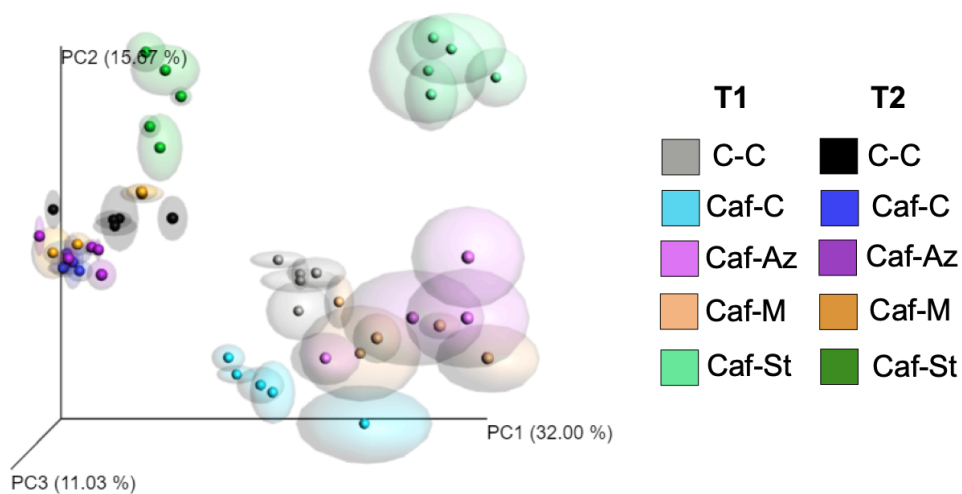


Figura 27. Diversidad β de la microbiota intestinal según el análisis de componentes principales. Los datos son expresados como abundancia relativa (%) de secuencias. T1 – muestras recolectadas al destete; T2 – muestras al finalizar el experimento (edad adulta).

También se determinó la diversidad alfa mediante el análisis de índice de Shannon, el cual mostró que en general existe gran diversidad en la comunidad bacteriana de todos los grupos (Índice >4), sin embargo la dieta materna ocasiona diferencias significativas principalmente en el destete, donde encontramos que el grupo C-C y Caf-C tienen mayor diversidad bacteriana (5.89 ± 0.07 y 5.68 ± 0.19 , respectivamente) mientras que los grupos Caf-Az y Caf-St tienen menor diversidad (5.05 ± 0.2 y 5.16 ± 0.46) en esta etapa ($p < 0.001$ y $p < 0.002$, respectivamente). Por otro lado, en la edad adulta no existe diferencia significativa entre grupos, sin embargo, esto representó cambios significativos al comparar el índice de Shannon a lo largo del tiempo en un mismo grupo.

Así, encontramos diferencias significativas al comparar la diversidad bacteriana de los grupos Caf-C ($p = 0.027$), Caf-Az ($p = 0.017$) y Caf-M (0.036) a lo largo del tiempo (entre el destete y la edad adulta). Los resultados representan entonces, que la microbiota puede remodelarse al cambiar el tipo de dieta administrada (Figura 28).

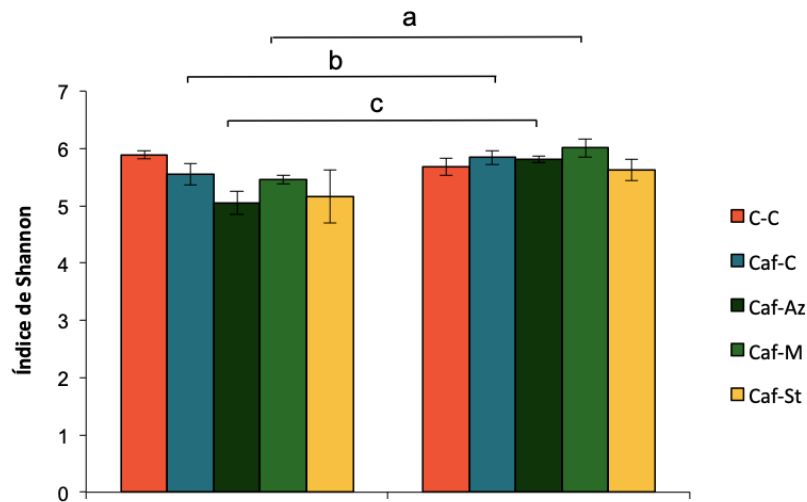


Figura 28. Diversidad alfa representado por Índice de Shannon. Todos los resultados son expresados como abundancia relativa (%) de secuencias y se presentan como media \pm DEM. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. Las diferencias de medias por grupo entre los dos tiempos (destete y adultez) se analizaron mediante la prueba t para muestras relacionadas. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). a $p < 0.05$ (Caf-M destete vs Caf-M adultez); b $p < 0.05$ (Caf-C destete vs Caf-C adultez); c $p < 0.05$ (Caf-Az destete vs Caf-Az adultez).

Composición de la microbiota intestinal.

Sólo las lecturas de Illumina con una puntuación media superior a 30% se conservaron, así, el 100%, 100%, 100%, 90.77% y 73.42% de las lecturas se asignaron al nivel de filo, clase, orden, familia y género, respectivamente.

Encontramos 11 fillos bacterianos diferentes, sin embargo, en el destete las especies predominantes son *Bacteroidetes*, *Firmicutes* y *Proteobacteria*, mientras que en la adultez predominan *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, y en menor cantidad *Spirochaetes* (Figura 29).

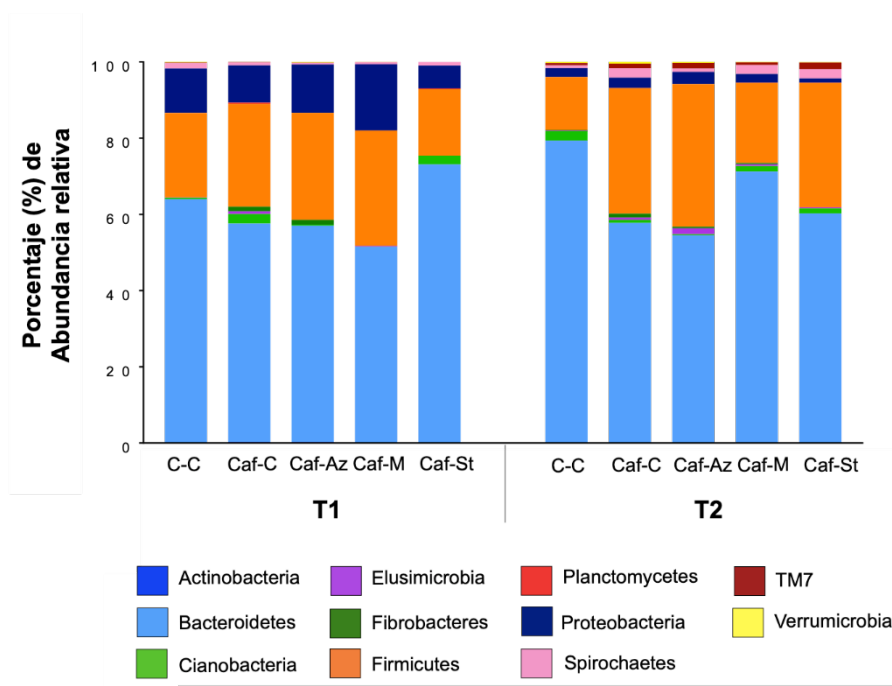


Figura 29. Determinación de los filos mediante secuenciación de la microbiota intestinal de ratas crías macho. Los datos se muestran en porcentaje (%). Se muestra la diferencia de la abundancia relativa de las especies bacterianas en ambos tiempos T1 (destete) y T2 (adultez).

Para realizar el análisis de la modulación de la microbiota intestinal en ratas crías macho adultas, se consideraron las muestras recolectadas al final del experimento. Así, a continuación, se describen los cambios a nivel de filo, clase, orden, familia y género en la descendencia adulta.

El efecto de la dieta materna en la microbiota intestinal de las crías en la edad adulta a nivel filo se observa en la figura 30. En este estudio encontramos que la dieta materna alta en endulzantes, excepto con miel de abeja, disminuye significativamente la abundancia de *Bacteroidetes* en la edad adulta. En nuestro análisis encontramos diferencia significativa al comparar el grupo C-C (79.34 ± 3.03) vs Caf-C (57.73 ± 6.69), Caf-Az (54.53 ± 4.69) y Caf-St (60.27 ± 5.46) con $p < 0.02$, $p < 0.009$ y $p < 0.05$, respectivamente (Figura 30).

Así mismo, como lo muestra la figura 30, el grupo C-C disminuyó la abundancia de *Firmicutes* y *Elusimicrobia*, siendo significativa al compararla con Caf-Az ($p < 0.001$ y $p < 0.004$, respectivamente) quien obtuvo mayor abundancia. Mientras que la abundancia de *Cyanobacteria* fue mayor en el grupo C-C en comparación con el grupo Caf-Az ($p < 0.05$).

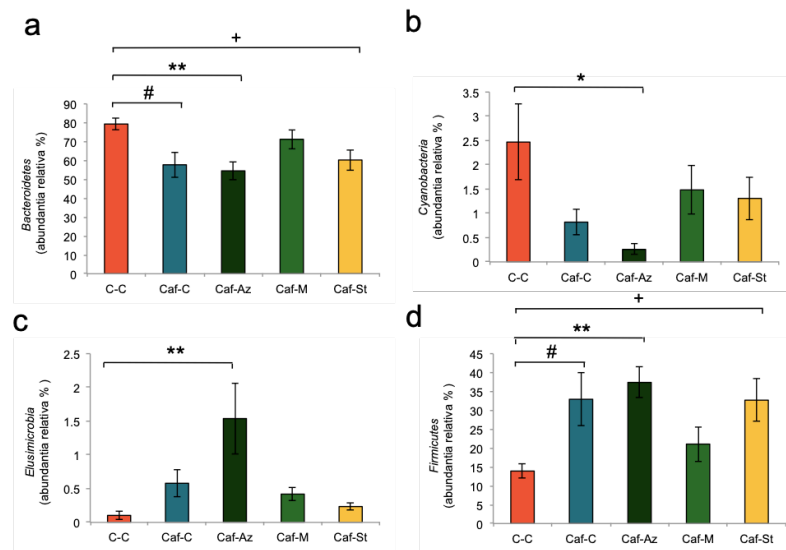


Figura 30. Abundancia bacteriana a nivel de filo. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de Bacteroidetes (a), Cyanobacteria (b), Elusimicrobia (c), Firmicutes (d). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # $p < 0.05$ (C-C vs Caf-C); * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$ (C-C vs Caf-Az); + $p < 0.05$ (C-C vs Caf-St).

A nivel de orden, nuestro estudio demostró que el grupo C-C presentó mayor abundancia de *Bacteroidales* en comparación con el grupo Caf-Az, Caf-C y Caf-St ($p < 0.01$, $p < 0.05$, $p = 0.05$, respectivamente) (Figura 31A). Por otro lado, la abundancia en la orden *Clostridiales*, del filo *Firmicutes*, fue mayor en los grupos con dieta materna alta en endulzantes en comparación con el C-C, encontrando diferencias significativas en el grupo Caf-Az y Caf-C ($p < 0.01$,

$p < 0.05$, respectivamente). Además, se encontró un aumento en la abundancia relativa de *Lactobacillales* en el grupo Caf-St en comparación con el grupo C-C ($p < 0.01$) (Figura 31C).

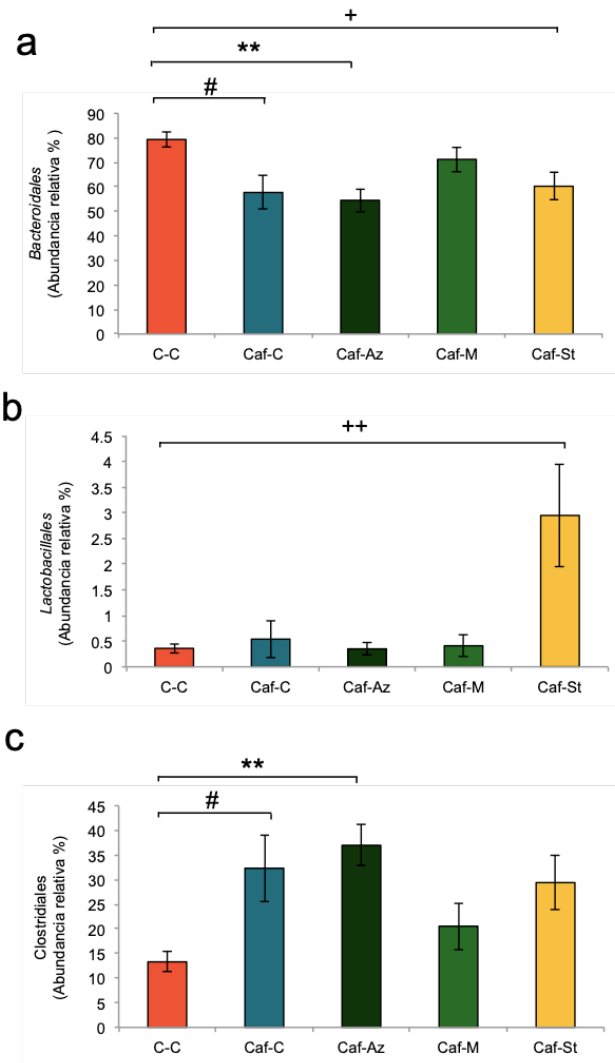


Figura 31. Abundancia bacteriana a nivel de orden. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de *Bacteroidales* (a), *Lactobacillales* (b), *Clostridiales* (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # $p < 0.05$ (C-C vs Caf-C); ** $p < 0.01$ (C-C vs Caf-Az); + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ (C-C vs Caf-St).

Continuando con el análisis, comparamos la abundancia microbiana que presentan las crías en la edad adulta a nivel familia, encontrando resultados similares, pues nuestras diferencias fueron significativas al comparar el grupo C-C con el grupo Caf-Az en la abundancia de la familia *Elusimicrobiaceae* ($p < 0.01$), *Ruminococcaceae* ($p < 0.01$) y *Enterobacteriaceae* ($p < 0.05$). Además encontramos diferencia al comparar la abundancia de *Elusimicrobiaceae* entre C-C y Caf-C ($p < 0.05$) (Figura 32).

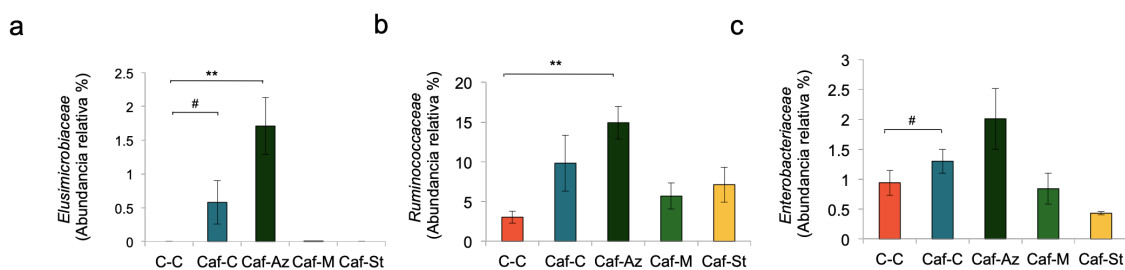


Figura 32. Abundancia bacteriana a nivel de familia. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm EEM. En la imagen se muestra abundancia de *Elusimicrobiaceae* (a), *Ruminococcaceae* (b), *Enterobacteriaceae* (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). # $p < 0.05$ (C-C vs Caf-C); ** $p < 0.01$ (C-C vs Caf-Az).

Finalmente, a nivel género encontramos que la abundancia de *Elusimicrobia*, *Lactobacillus* y *Clostridium* aumenta significativamente en las ratas de madres alimentadas con dietas altas en endulzantes durante la gestación y lactancia. Sorprendentemente el grupo Caf-M no mostró diferencia significativa (Figura 33).

Nuestras diferencias fueron significativas al comparar la abundancia de *Elusimicrobia* entre C-C con Caf-C y Caf-Az ($p < 0.05$), la abundancia de *Lactobacillus* y *Clostridium* entre C-C y Caf-St ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente) (Figura 33).

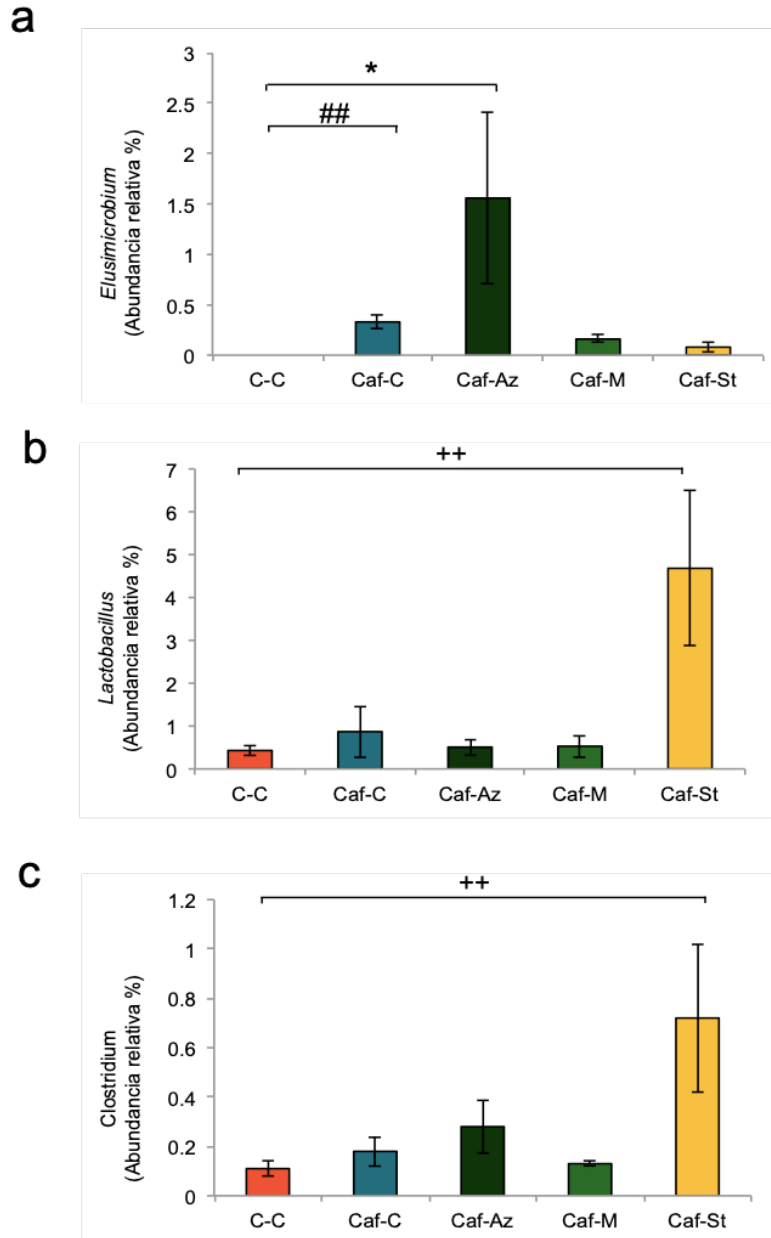


Figura 33. Abundancia bacteriana a nivel de género. Los datos se muestran en porcentaje (%) \pm DEM. En la imagen se muestra abundancia de Elusimicrobia (a), Lactobacilos (b), Clostridium (c). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando ANOVA de un factor y con Dunnett como prueba post hoc o la prueba equivalente no paramétrica de Kruskal Wallis. C-C (n=5); Caf-C (n=5); Caf-Az (n=5); Caf-M (n=5); Caf-St (n=5). ## $p < 0.01$ (C-C vs Caf-C); * $p < 0.05$ (C-C vs Caf-Az); ++ $p < 0.01$ (C-C vs Caf-St).

XI. DISCUSIÓN

Los datos epidemiológicos y experimentales han mostrado una relación entre el ambiente intrauterino y el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas y trastornos metabólicos negativos tanto para la madre como para la descendencia (Catalano & Shankar, 2017; Zambrano et al., 2016). Así, la sobrealimentación en el periodo perinatal promueve alteraciones bioquímicas, sensibilizando a la descendencia al desarrollo de adiposidad postnatal y aumento de peso excesivo, estrés oxidativo, así como disbiosis en la microbiota intestinal (Avila-Nava et al., 2017; Castro, Pomar, Palou, Picó, & Sánchez, 2017). Por otro lado, se ha reportado que las dietas altas en grasa y azúcares producen déficits en la flexibilidad cognitiva y la memoria dependiente del hipocampo en humanos (Magnusson et al., 2015), especialmente las dietas maternas altas en sacarosa se han asociado con alteraciones en el hipocampo y trastornos cognitivos relacionados con las enfermedades neurodegenerativas en la descendencia (Ribaroff et al., 2017). Sin embargo, a la fecha, no se ha evaluado el efecto de la dieta materna alta en endulzantes en el aprendizaje y memoria de la descendencia y su asociación con una disbiosis en la microbiota intestinal. Por lo que el objetivo de este trabajo fue comprender el papel de la microbiota intestinal como posible mecanismo responsable del daño cognitivo en ratas Wistar machos adultas, en un modelo de programación con dietas altas en endulzantes durante la gestación y lactancia.

11.1 Ratas Wistar hembras

11.1.1 La dieta cafetería pregestacional induce mayor ganancia de peso y mayor ingesta en las ratas Wistar hembras.

Por lo general, dietas altas en grasa son utilizadas para el estudio de la obesidad en ratas y ratones, ya sea añadiendo una grasa particular a la dieta del animal o usando una variedad de alimentos ricos en grasa y azúcar, como es en el caso de la dieta de cafetería (Treviño de Alba, 2018).

A pesar de que otros autores han reportado que la dieta de cafetería no modifica el peso previo al apareamiento (Cardenas-Perez et al., 2018), en el trabajo realizado por Castro et al., (2017) utilizaron ratas Wistar hembras con el objetivo de evaluar el efecto de la dieta cafetería en el periodo pregestacional, para lograrlo alimentaron a un grupo de ratas Wistar durante noventa días con dieta cafetería y al otro grupo con dieta estándar. La dieta estándar proporcionada al grupo control contenía 3300 kcal / kg, con 73% de carbohidratos, 8% de lípidos y 19% de proteínas, mientras que la dieta proporcionada a las ratas del grupo cafetería contenía 3270 kcal / kg, con 27% de carbohidratos, 62% de lípidos y 11% de proteínas. Ellos encontraron que la ganancia de peso estadísticamente significativa se produjo a partir del día 42 con dieta cafetería.

Si bien, la dieta pre-gestacional utilizada en nuestro estudio no fue suficiente para inducir obesidad en las ratas Wistar hembras, este tipo de alimentación modificó algunos parámetros fisiológicos, ya que registramos una ganancia de peso estadísticamente significativa y cambios en la ingesta (g/día) tras una alimentación con dieta cafetería por un periodo de cuatro semanas.

Se ha descrito que la dieta de cafetería causa hiperfagia, y gracias a esto el aumento de peso se produce en un corto tiempo en comparación con otras dietas altas en grasa. Así lo ha reportado Crew, Waddell, & Mark (2016), en un estudio donde evaluaron el efecto de la dieta cafetería en el periodo perinatal utilizando 14 ratas Wistar hembras. Los autores encontraron que el grupo de cafetería aumentó un 48% la ingesta calórica durante la primera semana de exposición a la dieta. Así también en nuestro estudio encontramos un aumento significativo en la ingesta de las ratas que fueron alimentadas con dieta cafetería, en comparación con las alimentadas con dieta control.

11.1.2 Las dietas altas en endulzantes durante el periodo de gestación y lactancia modifican la ganancia de peso y glucosa de las ratas Wistar hembras.

Se ha reportado que tras la eliminación de la dieta cafetería se produce una pérdida de peso que pudiera ser provocada por una disminución en la ingesta. Esto se ha mencionado debido a que en el trabajo de Castro et al., (2017) se registró el peso e ingesta de ratas Wistar hembras alimentadas con dieta cafetería (90 días) y posteriormente con dieta estándar, y ellos encontraron que disminuyó de manera significativa la ingesta y en consecuencia el peso cuando fue eliminada la dieta cafetería.

De manera similar, en nuestro estudio encontramos que al eliminar la dieta cafetería se produjo menor ganancia de peso. Sin embargo, nosotros registramos una mayor ingesta (g/día) en los grupos alimentados previamente con dieta cafetería en comparación con el grupo control, lo anterior puede ser resultado de la hiperfagia que causó la dieta cafetería, aunque la disminución en la ganancia de peso puede explicarse por la composición en macronutrientes de la dieta que se otorgó tras eliminar la dieta cafetería, ya que de ser una dieta apetecible e hipercalórica con alto porcentaje de azúcar y grasa, se cambió a una dieta estándar con endulzantes como miel, azúcar y stevia, lo que termino por afectar la ganancia de peso.

A pesar de que el aumento en la ingesta (g/día) no fue estadísticamente significativo, nuestros resultados son similares a los reportados por Atangwho et al., (2020) quienes mostraron que, en cantidades moderadas, edulcorantes como miel (10%) y sacarosa (8%) no afectan significativamente la ingesta de dieta. Así también, esta observación fue descrita por Chepulis & Starkey (2008) que en su estudio mostraron que el consumo moderado de azúcar y miel (7.9% de sacarosa y 10% de miel) durante 52 semanas no afectaron de manera significativa la ingesta de la dieta (Atangwho et al., 2020; Chepulis, Starkey, Waas, & Molan, 2009).

Además, al comparar los niveles de glucosa en etapa pre-gestacional con el periodo post-lactancia no encontramos diferencia significativa, aunque en los grupos Caf-Stevia y Caf-Miel se registraron niveles de glucosa más bajos en comparación con Caf-Az, esto podría deberse a que la stevia es un endulzante no calórico que promueve la utilización de glucosa por células y tejidos, de esta manera disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Así mismo, un efecto hipoglucémico fue reportado en un estudio donde se utilizaron ratas Wistar macho a los cuales se les administraron dietas altas en fructosa con diferentes dosis de esteviósido (0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg y 5.0 mg/kg). Los autores encontraron que tras el consumo de esteviósido disminuyeron los niveles de glucosa en sangre en ratas Wistar, además el esteviósido aumentó de forma dependiente de la dosis la secreción de insulina y la utilización de glucosa en ratas Wistar, es decir, la dosis más alta de esteviósido (5.0 mg/kg) obtuvo los efectos más fuertes en la promoción de la utilización de glucosa en ratas. Por lo tanto, se concluyó que el esteviósido aumenta la utilización de glucosa y resuelve rápidamente la condición hiperglucémica en ratas (Chen et al., 2005).

Así también, los menores niveles de glucosa que registramos en el grupo Caf-M pueden explicarse debido a que el índice glucémico de la miel es más bajo que el índice glucémico de la sacarosa, además del alto contenido antioxidante de la miel (Chepulis et al., 2009). De manera similar (Chepulis et al., 2007) encontraron que las ratas alimentadas con 10% de miel durante 52 semanas obtuvieron menores niveles de hemoglobina glucosilada (HbA1c) que el grupo alimentado con 7.9% de sacarosa. La HbA1c se usa habitualmente como una medida de la regulación de la glucosa en suero a largo plazo, ya que es fácilmente cuantificable, y la hemoglobina se produce en grandes cantidades en la sangre. Además, la glicación es un proceso de radicales libres no enzimático, y la presencia de antioxidantes puede reducir la frecuencia de esta reacción, reduciendo así la cantidad de HbA1c presente (Chepulis et al., 2007). La miel utilizada en nuestro estudio era de flor de aguacate con alto contenido de antioxidantes y, por lo tanto, es posible que la composición de la miel fuera responsable del nivel reducido de glucosa detectado en estos animales.

Por otro lado, en el estudio de Sánchez-Tapia, Martínez-Medina, Tovar, & Torres, (2019) en donde el objetivo fue estudiar el efecto de endulzantes naturales y artificiales en los receptores del sabor de la lengua y el intestino en presencia o ausencia de una dieta alta en grasas para comprender los posibles mecanismos moleculares, utilizaron ratas Wistar macho y se les otorgaron dietas altas en grasa con diferentes endulzantes en agua potable (sacarosa, sucralosa, azúcar morena, miel, glucósido de steviol, y fructosa), a otros grupos de ratas se les otorgaron dietas control con los mismos endulzantes en agua potable, y por último, los grupos control que fueron alimentadas con dieta control o alta en grasa sin endulzantes. Los autores encontraron que las ratas alimentadas con sacarosa y sucralosa aumentaron la abundancia de GLUT-2 en los enterocitos, esta situación condujo a un aumento en el transporte de glucosa y a registrar los niveles más altos de glucosa en sangre circulante. En ese sentido, esto pudo ocurrir en nuestro modelo, ya que el grupo que recibió dieta alta en sacarosa durante la gestación y lactancia (Caf-Az), obtuvieron niveles más altos de glucosa en ayunas que el grupo que recibió miel o stevia. Además, se ha demostrado un aumento en GLUT-2 en enterocitos humanos de sujetos obesos, que están asociados con resistencia a la insulina e hiperglucemia (Sánchez-Tapia et al., 2019).

Para concluir, encontramos que la alimentación materna afectó la ganancia de peso e ingesta, situación que pudiera implicar riesgos para la descendencia. En este sentido, la evidencia de estudios en humanos y animales muestra que el metabolismo, las vías endocrinas y las trayectorias de aumento o disminución de peso están "programadas" durante el desarrollo temprano, por lo tanto, la nutrición prenatal juega un papel clave en este proceso (Azad et al., 2016).

11.2 Ratas crías macho

11.2.1 Las dietas maternas altas en distintos endulzantes alteran el peso al nacer, ganancia de peso en crías macho, sin embargo, no hay cambios en la ingesta y glucosa de las crías macho.

Encontramos que la dieta materna alta en stevia durante la gestación y lactancia no modifica de manera significativa el peso al nacer de las crías macho, estos resultados son similares a la cohorte publicada en el 2016 por Azad, et al. en el cual se evalúa la asociación del consumo de bebidas endulzadas artificialmente (ASB, por sus siglas en inglés) durante el embarazo y el índice de masa corporal (IMC) infantil. Para el desarrollo de ese estudio se incluyeron 3033 madres-bebés del Estudio de Desarrollo Longitudinal Infantil Saludable de Canadá (CHILD) que reclutó mujeres embarazadas sanas de 2009 a 2012. Las mujeres completaron evaluaciones dietéticas durante el embarazo y la ingesta de ASB se determinó a partir del consumo informado de "refrescos dietéticos o refrescos" (1 porción = 12 oz o 1 lata) y "edulcorante artificial agregado al té o café" (1 porción = 1 paquete). Así, los resultados indican que el peso al nacer del lactante no se vio afectado tras el consumo de ASB, sin embargo, los autores han sugerido que el consumo materno de bebidas endulzadas influyó en el aumento de peso posnatal en lugar del crecimiento fetal (Azad et al., 2016).

Así también, otro estudio publicado en el 2009 por Nakai, et al. demostró que el consumo de xilitol durante el embarazo, tampoco afecta el peso al nacer de los hijos (Nakai et al., 2010). Además, en el grupo Caf-St la tendencia de un peso similar a las crías control se mantuvo durante las 26 semanas de vida.

Por otro lado, en un estudio realizado en el 2009 por Chepulis, et al. en donde un grupo de ratas Sprague Dawley machos fueron alimentadas con sacarosa y otro grupo con miel por un periodo de 52 semanas, se concluyó que las ratas alimentadas con un 60% de miel muestran menos aumento de peso en

comparación con las alimentadas con una cantidad similar de azúcares mixtos o sacarosa, lo que sugiere que la bioactividad de la miel juega un papel importante. A pesar de que nuestro modelo fue de programación con dieta materna alta en miel, nuestros resultados en crías macho son similares a los encontrados por Chepulís et al., (2009), ya que registramos menor peso al nacer en las crías macho ($p < 0.05$) y el menor peso se mantuvo durante las 26 semanas de vida de las crías. De hecho, el peso de estas crías era menor al de las crías de madres alimentadas con azúcar durante la gestación y lactancia.

Por lo tanto, podríamos suponer que los componentes de la miel programan a la descendencia para tener una menor ganancia de peso. Aunque el mecanismo exacto por el cual la miel disminuye el aumento de peso no se conoce completamente, los datos de algunos estudios indican que la miel podría reducir el aumento de peso mediante la modulación de las hormonas reguladoras del apetito como la leptina, la grelina y el péptido AA (Atangwho et al., 2020). Estos pueden ser los efectos insulino-miméticos del peróxido de hidrógeno producido por la miel, pero no está claro si el peróxido de hidrógeno alcanza niveles suficientes *in vivo* para provocar tal respuesta (Chepulís et al., 2009).

Así también, de acuerdo con lo reportado por Amezcua-Prieto et al., (2019) los azúcares refinados y la ingesta de dulces de fábrica aumentaron las probabilidades de tener un recién nacido pequeño a la edad gestacional, por lo tanto, el tipo de azúcar proporcionado en la dieta Caf-Az de nuestro estudio pudo influir en el resultado que obtuvimos en donde las crías macho de este grupo tuvieron menor peso al nacer ($p < 0.05$).

En nuestra investigación, el modelo de programación consistió en alimentación materna alta en endulzantes durante gestación y lactancia, mientras que las crías recibieron exclusivamente dieta control, así nuestros resultados revelan que la descendencia de los grupos Caf-Az y Caf-M, no mostraron una predisposición al aumento de peso como se ha reportado anteriormente en otros modelos de programación (He et al., 2017). Estos animales mostraron un peso

corporal más bajo que los controles durante el periodo de lactancia hasta la semana 26 de vida, manteniéndose por debajo de los controles ($p < 0.05$).

Además, no registramos diferencia significativa en los niveles de glucosa al comparar entre grupos, esto puede deberse a que las crías macho todo el tiempo fueron alimentadas con dieta control. De manera similar, Cardenas-Perez, (2018) reportó que no existe diferencia significativa en los niveles de glucosa en un modelo de programación con dietas altas en azúcar y grasa cuando las crías consumen dietas control (Cardenas-Perez et al., 2018).

11.2.2 Las dietas maternas altas en distintos endulzantes alteran el proceso de aprendizaje y memoria en las crías macho

Se ha descrito que la exposición a NNS en el útero es frecuente, ya que se ha reportado que hasta el 29.5% de mujeres embarazadas ha utilizado NNS durante el embarazo (Archibald, Dolinsky, & Azad, 2018). Esto representa una situación de riesgo, ya que cuando se discute la posibilidad de que la dieta afecte el comportamiento de los niños, el consumo de azúcar y aditivos compiten como las principales causas de preocupación (Benton, 2010).

Así, nuestros resultados muestran que tras el consumo pre-gestacional de dieta cafetería y dietas altas en endulzantes (miel, azúcar y stevia) durante la gestación y lactancia, se presentan alteraciones en la memoria espacial de las crías macho, ya que al realizar las pruebas de laberinto “Y”, el cual se utiliza frecuentemente para evaluar la memoria espacial, encontramos que disminuyó de manera importante el porcentaje de alternancia en comparación con el control, aunque no hubo diferencias significativas entre grupos en el número de entradas.

De manera similar, en el estudio realizado por Chepulis, et al. (2009) se reportó que las ratas Sprague Dawley macho alimentadas con miel durante 52 semanas tienen menor pérdida de memoria en comparación con las ratas alimentadas con sacarosa. Esto se determinó, al realizar las tareas de laberinto

“Y”, donde los autores encontraron que las ratas alimentadas con miel obtuvieron mayor porcentaje de alternancia que las alimentadas con sacarosa o el control (dieta sin azúcar). De igual manera, nuestros resultados muestran que las crías macho de ratas hembras alimentadas con miel (Caf-M) tienen un mayor número de entradas que el resto de las crías, aunque no es estadísticamente significativo. Sin embargo, se sugiere que los animales alimentados con miel no muestran la misma reducción en la memoria espacial exhibida por las ratas alimentadas con las otras dietas (Chepulis et al., 2007).

Se han realizado estudios clínicos para evaluar la capacidad que tienen los antioxidantes de mejorar el rendimiento cognitivo, ya que los antioxidantes parecen jugar un papel vital en la prevención de daños estructurales cuando los radicales libres creados por especies reactivas de oxígeno comienzan a dañar las células a través de sus reacciones en cadena (Ghorbanian et al., 2018) y se ha determinado que la ingesta de antioxidantes se relaciona con mejores puntuaciones de memoria. Por lo tanto, es posible que el contenido de antioxidantes de la miel empleada en nuestro modelo haya contribuido a disminuir la ansiedad y a mejorar la memoria espacial al reducir los radicales libres. También habría que evaluar si la situación se mantiene o mejora aún más cuando las crías continúan con la misma alimentación materna.

Con respecto al laberinto de Barnes, que es comúnmente empleado para evaluar el proceso de aprendizaje, se observó que la latencia, errores y desviación de todos los grupos incluyendo los controles, disminuyeron después de los 5 días de entrenamiento. Sin embargo, encontramos aumento significativo ($p < 0.05$) de la latencia entre Caf-Az y C-C en el día 1 y 4 de entrenamiento, aumento significativo de errores ($p < 0.05$) al comparar C-C con Caf-Az, Caf-M y en el día 1 de entrenamiento. De igual manera en el trabajo de He, et al. (2017) con ratas Sprague-Dawley encontraron que las crías macho adultas presentan aumento significativo en la latencia de escape y una disminución del tiempo que pasaron en el cuadrante objetivo cuando fueron expuestos al laberinto acuático de Morris en un modelo de programación con dieta materna alta en azúcar (solución de sacarosa al 20%). Además los autores encontraron un menor peso

cerebral en estas ratas y resistencia a insulina, comúnmente determinada por el índice HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment), un método indirecto que considera la relación entre los valores de glucosa de ayuno e insulina sérica para determinar la resistencia a esta última hormona (Treviño de Alba, 2018). Otras investigaciones han demostrado que la intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina son las características del estado pre-diabético, y que este predispone a déficits cognitivos y demencia en personas a medida que envejecen (He et al., 2017). En este sentido, podemos deducir que las dietas con mayor índice glucémico (GI) (como la de los endulzantes empleados en este modelo) pueden ser perjudiciales para la salud y se ha relacionado con las reducciones en el aprendizaje (Burke & Small, 2015) en donde el estrés oxidativo se ha sugerido como un jugador clave con efectos acumulativos a largo plazo para manifestar el deterioro cognitivo (Soares et al., 2013). Esta situación pudo ocurrir con nuestras ratas de acuerdo al diseño del modelo experimental, aunque para confirmarlo se requieren más pruebas y tiempo. Así, He, et al. (2017) mencionan que la lesión que causó la dieta prenatal más el envejecimiento pueden causar un peor rendimiento en las tareas de aprendizaje y memoria.

Por otro lado, Zhu et al., (2016) demostraron en un modelo de programación en ratas Sprague-Dawley alimentadas con dietas bajas en proteína, que el peso de las crías era significativamente menor en comparación con los controles y, al realizar las tareas de laberinto de Barnes, encontraron que la latencia y la escala de error eran mayores, mientras la velocidad de escape era menor en estas crías en comparación con los controles. Respecto a la estrategia de búsqueda los autores encontraron que las crías programadas utilizaban en mayor porcentaje la búsqueda aleatoria, aunque este porcentaje disminuyó con las exposiciones al laberinto y aumentaron los porcentajes de espacial y serial. De manera similar, encontramos que en los grupos Caf-C y Caf-M iniciaron con mayor % de búsqueda aleatoria, este porcentaje disminuyó, dando paso al aumento de la estrategia serial a lo largo del entrenamiento. Así, el uso de diferentes estrategias de búsqueda para localizar el agujero de escape es un

indicador del bajo rendimiento de las ratas programadas por la dieta materna durante los días de entrenamiento (Zhu et al., 2016).

Además, es posible que el impacto combinado de alto contenido de azúcar y grasa en la dieta sea mayor que el impacto de la grasa. Alternativamente, la exposición perinatal al azúcar puede tener más efecto perjudicial sobre la función de memoria del adulto que la exposición perinatal a la grasa (Noble, Hsu, Liang, & Kanoski, 2017). Así, nuestros resultados pueden deberse a que el modelo de programación consistió en brindar dietas altas en endulzantes durante este periodo, y que de manera involuntaria pudo disminuir el porcentaje de proteínas otorgadas a las madres. Esto cobra importancia ya que diversos autores han sugerido que la desnutrición prenatal así como el bajo consumo de proteínas en etapa perinatal puede ocasionar déficits de aprendizaje espacial en el laberinto de Barnes (Wu et al., 2014). Además se ha demostrado que este daño se mantiene después de un periodo prolongado aún y cuando las crías hayan consumido dieta control (Noble et al., 2017).

Por otro lado, se ha propuesto que las hembras son menos susceptibles a presentar desórdenes cognitivos, gracias a que los estrógenos le ofrecen una acción protectora. Se sabe que el área CA1 del hipocampo presenta disminución en la potenciación de largo plazo y que el mal funcionamiento se mantiene y se manifiesta hasta la edad adulta (Gi et al., 2006). Las pruebas realizadas en nuestro estudio fueron exclusivamente con machos, por lo tanto, los efectos de la programación pudieron ser más evidentes.

Por último, la idea de que los alimentos y productos con azúcar añadida podrían tener un efecto adverso sobre el comportamiento fue explicada en 1922 por Shannon. Más tarde, en la década de 1970 la sacarosa apareció como un agente ofensivo importante cuando la literatura mencionó por primera vez la condición llamada "hipoglucemia reactiva funcional" (Wolraich, 1995).

La hipótesis de la relación entre el consumo de azúcar y alteraciones del comportamiento, especialmente la hiperactividad, se basa en 2 teorías. La primera, una posible respuesta alérgica a la azúcar refinada, se concibió en la

primera mitad de este siglo como el síndrome de fatiga por tensión (Wolraich, 1995).

La segunda teoría sugiere que algunos niños pueden experimentar hipoglucemia reactiva funcional similar a la observada en adultos. Se informa que los adultos con esta afección experimentan niveles de glucosa en el rango de hipoglucemia mientras se consumen dietas altas en carbohidratos, se teorizó que los niños mostrarían una mayor actividad motora a niveles bajos de glucosa en sangre (Wolraich, 1995). Esta situación pudo presentarse en nuestro modelo, debido a que las crías macho no presentaron niveles elevados de glucosa, aunque en las pruebas que realizamos se registró una alteración de la memoria. Sin embargo, se requiere de más estudios para demostrarlo.

Otra posibilidad, es que la exposición directa o indirecta a distintos endulzantes en la vida temprana produzca cambios duraderos en el microbioma intestinal que contribuyen a la cognición negativa. Varios hallazgos recientes son consistentes con esta posibilidad (Noble et al., 2017).

11.2.3 La dieta materna alta en endulzantes durante gestación y lactancia altera la composición de la microbiota a largo plazo (adultez) en las crías macho.

Si bien los estudios existentes informan que el microbioma materno puede modular las respuestas del huésped a las agresiones agudas, es necesario investigar si afecta el desarrollo de la descendencia en ausencia de desafíos ambientales, por ejemplo, la dieta (Vuong et al., 2020).

Al determinar la diversidad alfa en nuestro estudio mediante el índice de Shannon, encontramos que, en el destete, las crías macho de las madres que consumieron dietas altas en endulzantes durante la gestación y lactancia tenían menor diversidad, especialmente en el grupo Caf-St en comparación con las crías de madres que no lo consumieron (C-C y Caf-C), estos cambios también fueron observados en el estudio de (Kong, Gao, Yan, Huang, & Qin, 2019) en donde los

índices de diversidad microbiana del grupo que recibió dieta alta en sacarosa mostraron una tendencia a la baja, especialmente en el índice de Shannon. Sin embargo, por nuestros resultados obtenidos de la diversidad beta podemos concluir que los cambios se debieron más a un efecto sobre la uniformidad de la comunidad microbiana y menos a un impacto en la riqueza de OTU (Gerasimidis et al., 2020).

Por otro lado, Magnusson et al., (2015) reportó que la microbiota es tan sensible que puede modificar su composición con tan solo 2 semanas de exposición a distintas dietas (Magnusson et al., 2015), entonces, aunque en el destete nuestros grupos tuvieran una microbiota “distinta” derivada de la dieta materna, en el momento que todos consumen el mismo tipo de dieta estándar durante su crecimiento, en la adultez (26 semanas) se observó un restablecimiento en la composición bacteriana.

En estudios previos se ha demostrado que las dietas altas en sacarosa cambian la diversidad de la microbiota, así a nivel de filo se ha descrito una tendencia hacia la disminución en *Bacteroidetes* y un aumento en *Firmicutes* (Kong et al., 2019; Magnusson et al., 2015). Estas desregulaciones en *Firmicutes* y *Bacteroidetes* ya se han asociado a cambios metabólicos como la obesidad (Etxeberria, Milagro, González Navarro, & Martínez, 2016), como posible mecanismos a la acción de los lipopolisacaridos (LPS), los cuales están asociados con los estímulos inflamatorios, y a su vez con la obesidad (Indiani et al., 2018).

Los resultados de nuestro estudio concuerdan con lo descrito anteriormente, pues todos los grupos de endulzantes aumentaron significativamente el filo de *Firmicutes* y disminuyeron *Bacteroidetes*, Sorprendentemente en nuestro estudio, los cambios encontrados en la diversidad y abundancia de la microbiota ocurrieron en la edad adulta independientemente del aumento de peso corporal, por ello la importancia de resaltar el vínculo esencial entre la dieta materna y la programación neurológica en la descendencia, pues se ha sugerido que la disbiosis intestinal podría vincular las

dietas modernas, poco saludables, con el aumento en la prevalencia de trastornos del desarrollo neurológico (Bruce-Keller et al., 2017).

En este sentido, existe evidencia de que la composición del microbioma intestinal se relaciona con la actividad neuronal y estructura del cerebro en humanos (Cheung et al., 2019) desarrollando deterioros cognitivos (Abbott et al., 2016) y trastornos del sistema nervioso central (SNC) como la ansiedad, depresión, trastornos del espectro autista, entre otros (Etxeberria et al., 2016). Anteriormente se reportó que géneros microbianos como *Bacteroides* (del filo *Bacteroidetes*) se asocia con trastorno depresivo mayor (Cheung et al., 2019), mientras que el género *Bifidobacterium* (del filo *Actinobacteria*) se ha reconocido como un eficiente productor del neurotransmisor GABA (Yunes et al., 2016) y respecto al filo *Firmicutes*, se ha encontrado que suplementar con *Lactobacillus plantarum* puede tener un efecto antidepresivo (Liu et al., 2016).

La evidencia experimental ha documentado que los ingredientes dietéticos selectivos modulan la microbiota intestinal, así como su relación con la disfunción neurocognitiva, por ejemplo, en nuestro estudio encontramos a nivel de orden un aumento significativo en la abundancia de *Clostridiales* (Filo: *Firmicutes*) en los grupos Caf-C y Caf-Az; y disminución significativa en *Bacteroidales* (Filo: *Bacteroidetes*) en los mismos grupos. En cuanto al grupo Caf-St, observamos el mismo comportamiento, pues obtuvimos aumento de la abundancia de *Clostridiales* bacterias que, anteriormente se han asociado con peores rendimientos de flexibilidad cognitiva (Magnusson et al., 2015) y una disminución de *Bacteroidales*.

A nivel de orden en el grupo Caf-St registramos un aumento en la abundancia relativa de *Lactobacillales* (Filo: *Firmicutes*), también en el experimento de Magnusson et al., realizado en 2015, encontraron que las ratas alimentadas durante 5 semanas con dietas altas en sacarosa presentan mayor porcentaje de *Lactobacillales*, y además describió que estas ratas presentaron peor memoria espacial en las pruebas realizadas. Por otro lado en el estudio de (Nettleton et al., 2019) se encontró que tras el consumo de stevia durante 11

semanas los receptores de dopamina estaban disminuidos, lo que pudiera conducir a cambios en la conducta neuronal y de la regulación del sistema neurolimbico, que tiene importancia en el comportamiento alimentario (Nettleton et al., 2019), así también lo mencionó (Narayanaswami, Thompson, Cassis, Bardo, & Dwoskin, 2013), quien encontró que las ratas propensas a obesidad tenían los receptores de dopamina disminuidos. En nuestro estudio las madres que consumieron dieta alta en stevia tuvieron mayor ingesta aunque sin ser estadísticamente significativo, independientemente del peso registrado, mientras que en las crías no hubo diferencia en peso o ingesta, sin embargo el comportamiento en las pruebas de memoria reflejan alteraciones cognitivas. Estos resultados pueden deberse a que el efecto de la programación pudo atenuarse cuando las ratas Wistar nunca consumieron directamente el endulzante, sería interesante exponer en futuras investigaciones a las crías a los endulzantes para explorar los cambios en la ingesta, microbiota y memoria que pudieran presentarse.

Así también Bruce-Keller et al., (2017) reportaron que las crías macho de madres alimentadas con dietas altas en sacarosa tenían déficit en el comportamiento exploratorio y cognitivo en comparación con las crías macho del grupo control, además en estos grupos también observaron cambios importantes en diversidad microbiana y distribución taxonómica durante el embarazo y la lactancia.

Por otro lado, los niveles de glucosa elevados pueden estar involucrados con enfermedades relacionadas con el cerebro, pues en nuestro estudio obtuvimos niveles más elevados de glucosa en madres con Caf-Az así como un mayor % de abundancia de la familia *Elusimicrobiaceae*, la cual se ha asociado con inflamación cerebral y abdominal. Por tanto, uno de los mecanismos implicados en el desarrollo de enfermedades cognitivas puede ser la presencia de bacterias como *Elusimicrobiaceae* que regulan el proceso inflamatorio y glucémico en el hospedador. Además se sabe que la disbiosis provoca aumentos de marcadores inflamatorios (LPS), citocinas y metabolitos, tanto a nivel local como periférico, lo cual se ha relacionado con aparición de ansiedad o depresión.

Por último, en cuanto a nivel de género encontramos aumento significativo de *Lactobacillus* (Orden: *Lactobacillales*) en el grupo Caf-St. Anteriormente ya se ha relacionado este grupo de bacterias con la memoria de ratones, lo que conduce a la hipótesis que los *Lactobacillus* producen metabolitos específicos que podrían atravesar la barrera hematoencefálica e influir en la memoria del huésped (Mao et al., 2020).

En este sentido, el grupo Caf-St obtuvo menor diversidad que el resto de los grupos debido a la programación por exposición a dietas altas en stevia durante la gestación y lactancia. Además esto puede estar relacionado con los resultados obtenidos en las pruebas de memoria, especialmente, de largo plazo.

XII. CONCLUSIONES

Este estudio demostró importantes efectos de programación debido a una dieta materna alta en endulzantes durante la gestación y la lactancia.

- La dieta cafetería en el periodo pre-gestacional aumenta de manera significativa el peso e ingesta de las ratas Wistar hembras.
- La dieta materna alta en stevia durante la gestación y lactancia no afecta el peso al nacer de las crías, sin embargo, se presentan alteraciones en procesos cognitivos en la descendencia adulta.
- Las dietas maternas altas en miel y sacarosa disminuyen el peso al nacer y esta disminución se mantiene hasta la edad adulta.
- La dieta cafetería durante la etapa pre-gestacional programa a la descendencia a un deterioro cognitivo, a pesar de que durante la gestación y lactancia las ratas madres fueron alimentadas con dieta estándar.
- Las dietas maternas altas en sacarosa y miel durante la gestación y lactancia inducen una disbiosis en la microbiota intestinal de la descendencia, sin embargo, la microbiota intestinal puede reestablecerse en las crías después del consumo de una dieta estándar posterior al destete.
- Las dietas maternas altas en stevia durante la gestación y lactancia programan a las crías macho a disminuir la diversidad microbiana, sin restablecimiento hasta la edad adulta.
- Las dietas maternas altas en stevia durante la gestación y lactancia programan a las crías macho a presentar mayor abundancia de bacterias del filo *Firmicutes* como *Clostridium* y *Lactobacillus*.

XIII. REFERENCIAS

- Aagaard, K., Ma, J., Antony, K. M., Ganu, R., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Science Translational Medicine*, 6(237). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008599>
- Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., Abdel-Rahman, A. A., McLendon, R. E., & Schiffman, S. S. (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal P-glycoprotein and cytochrome P-450 in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 71(21). <https://doi.org/10.1080/15287390802328630>
- ADA (American Diabetes Association. (2018). Additional information about High-Intensity sweeteners. Retrieved from <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>
- Alarcon, P., Gonzales, M., & Castro, E. (2016). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Red Med*, 144, 910–916. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872016000700013>
- Amezcuaprieto, C., Martínez-Galiano, J. M., Cano-Ibáñez, N., Olmedo-Requena, R., Bueno-Cavanillas, A., & Delgado-Rodríguez, M. (2019). Types of carbohydrates intake during pregnancy and frequency of a small for gestational age newborn: A case-control study. *Nutrients*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/nu11030523>
- Archibald, A. J., Dolinsky, V. W., & Azad, M. B. (2018). Early-life exposure to non-nutritive sweeteners and the developmental origins of childhood obesity: Global evidence from human and rodent studies. *Nutrients*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/nu10020194>
- Atangwho, I. J., Ibeneme, C. E., Egbung, G. E., Ibeneme, E., Eno, M. A., & Nwankpa, P. (2020). Effect of long-term feeding of the Obudu natural honey and table sugar-sweetened diets on obesity and pro-inflammatory biomarkers in rats. *BMC Nutrition*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40795-019-0327-2>
- Avila-Nava, A., Noriega, L. G., Tovar, A. R., Granados, O., Perez-Cruz, C., Pedraza-Chaverri, J., & Torres, N. (2017). Food combination based on a pre-hispanic Mexican diet decreases metabolic and cognitive abnormalities and gut microbiota dysbiosis caused by a sucrose-enriched high-fat diet in rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61(1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201501023>
- Azad, M. B., Sharma, A. K., De Souza, R. J., Dolinsky, V. W., Becker, A. B., Mandhane, P. J., ... Laprise, C. (2016). Association between artificially sweetened beverage consumption during pregnancy and infant body mass index. *JAMA Pediatrics*, 170(7), 662–670. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.0301>

- Bäckhed, F., Fraser, C. M., Ringel, Y., Sanders, M. E., Sartor, R. B., Sherman, P. M., ... Finlay, B. B. (2012). Defining a healthy human gut microbiome: Current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.012>
- Badui Dergal, S. (2006). Carbohidratos. In *Química de los Alimentos* (4th ed., pp. 29–34). Pearson Education.
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1). <https://doi.org/10.1037/h0077579>
- Beards, E., Tuohy, K., & Gibson, G. (2010). A human volunteer study to assess the impact of confectionery sweeteners on the gut microbiota composition. *British Journal of Nutrition*, 104(5). <https://doi.org/10.1017/S0007114510001078>
- Benton, D. (2010, June). The plausibility of sugar addiction and its role in obesity and eating disorders. *Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.12.001>
- Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., & Lu, K. (2017). The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178426>
- Biedermann, L., & Rogler, G. (2015, January 20). The intestinal microbiota: its role in health and disease. *European Journal of Pediatrics*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00431-014-2476-2>
- Brandle, J. E., & Telmer, P. G. (2007). Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14), 1855–1863. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.010>
- Bruce-Keller, A. J., Fernandez-Kim, S. O., Townsend, R. L., Kruger, C., Carmouche, R., Newman, S., ... Berthoud, H. R. (2017). Maternal obese-Type gut microbiota differentially impact cognition, anxiety and compulsive behavior in male and female offspring in mice. *PLoS ONE*, 12(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175577>
- Burke, M. V., & Small, D. M. (2015). Physiological mechanisms by which non-nutritive sweeteners may impact body weight and metabolism. *Physiology and Behavior*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.036>
- Calvo, S. S. C., & Egan, J. M. (2015). The endocrinology of taste receptors. *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.7>
- Cardenas-Perez, R. E., Fuentes-Mera, L., De La Garza, A. L., Torre-Villalvazo, I., Reyes-Castro, L. A., Rodriguez-Rocha, H., ... Camacho, A. (2018). Maternal overnutrition by hypercaloric diets programs hypothalamic mitochondrial fusion and metabolic dysfunction in rat male offspring. *Nutrition and Metabolism*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0279-6>

- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chemical Toxicology*, *107*, 302–317. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.06.046>
- Castro, H., Pomar, C. A., Palou, A., Picó, C., & Sánchez, J. (2017). Offspring predisposition to obesity due to maternal-diet-induced obesity in rats is preventable by dietary normalization before mating. *Molecular Nutrition and Food Research*, *61*(3). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600513>
- Catalano, P. M., & Shankar, K. (2017). Obesity and pregnancy: Mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ (Online)*. <https://doi.org/10.1136/bmj.j1>
- Chen, T. H., Chen, S. C., Chan, P., Chu, Y. L., Yang, H. Y., & Cheng, J. T. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta Medica*, *71*(2). <https://doi.org/10.1055/s-2005-837775>
- Chepulis, L. M., Starkey, N. J., Waas, J. R., & Molan, P. C. (2009). The effects of long-term honey, sucrose or sugar-free diets on memory and anxiety in rats. *Physiology and Behavior*, *97*(3–4). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.001>
- Chepulis, L., Starkey, N., Waas, J. R., & Molan, P. C. (2007). The long-term effects of feeding honey compared with sucrose and a sugar-free diet on weight gain, lipid profiles, and DEXA measurements in rats. *Journal of Food Science*, *73*(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00592.x>
- Cheung, S. G., Goldenthal, A. R., Uhlemann, A. C., Mann, J. J., Miller, J. M., & Sublette, M. E. (2019). Systematic review of gut microbiota and major depression. *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2019.00034>
- Conrad, C. D., Galea, L. A. M., Kuroda, Y., & McEwen, B. S. (1996). Chronic stress impairs rat spatial memory on the Y maze, and this effect is blocked by tianeptine pretreatment. *Behavioral Neuroscience*, *110*(6). <https://doi.org/10.1037/0735-7044.110.6.1321>
- Crew, R. C., Waddell, B. J., & Mark, P. J. (2016). Maternal obesity induced by a “cafeteria” diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation. *Placenta*, *39*. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.01.002>
- D’Esposito, Mark and Postle, B. (2015). D’Esposito 2015. *Annual Review of Psychology*, *66*(1), 115–142. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-010814-015031>.THE
- Da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, *196*, 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>

- Duranti, S., Ferrario, C., van Sinderen, D., Ventura, M., & Turrone, F. (2017). Obesity and microbiota: An example of an intricate relationship. *Genes and Nutrition*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12263-017-0566-2>
- Escuredo, O. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015>
- Estuardo, D. (Universidad de S. C. de G. (2014). *Estudio de Mercado para la introducción de Stevia Rebaudiana Bertoni en el mercado Guatemalteco*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Retrieved from http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_3568.pdf
- Etzeberria, U., Milagro, F., González Navarro, C., & Martínez, J. A. (2016). Papel en la obesidad de la microbiota intestinal. *Anales de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 82(0).
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1). <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.219-226.2002>
- Finney, M., Smullen, J., Foster, H. A., Brokx, S., & Storey, D. M. (2007). Effects of low doses of lactitol on faecal microflora, pH, short chain fatty acids and gastrointestinal symptomology. *European Journal of Nutrition*, 46(6). <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0666-7>
- Funkhouser, L. J., & Bordenstein, S. R. (2013). Mom Knows Best: The Universality of Maternal Microbial Transmission. *PLoS Biology*, 11(8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
- García-Almeida, J. M., Fdez, G. M. C., & Alemán, J. G. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutricion Hospitalaria*, 28(SUPPL.4), 17–31.
- Gawlińska, K., Gawliński, D., Korostyński, M., Borczyk, M., Frankowska, M., Piechota, M., ... Przegaliński, E. (2021). Maternal dietary patterns are associated with susceptibility to a depressive-like phenotype in rat offspring. *Developmental Cognitive Neuroscience*, 47. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100879>
- Gerasimidis, K., Bryden, K., Chen, X., Papachristou, E., Verney, A., Roig, M., ... Parrett, A. (2020). The impact of food additives, artificial sweeteners and domestic hygiene products on the human gut microbiome and its fibre fermentation capacity. *European Journal of Nutrition*, 59(7). <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02161-8>
- Ghorbanian, D., Gol, M., Pourghasem, M., Faraji, J., Pourghasem, K., & Soltanpour, N. (2018). Spatial memory and antioxidant protective effects of raisin (currant) in aged rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 23(3). <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.196>

- Gi, H. S., Geum, D., Chung, S., Eun, J. K., Jo, J. H., Kim, C. M., ... Kim, K. (2006). Maternal stress produces learning deficits associated with impairment of NMDA receptor-mediated synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 26(12). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3850-05.2006>
- Gil-Campos, M., San José González, M. A., & Díaz Martín, J. J. (2015). Uso de azúcares y edulcorantes en la alimentación del niño. Recomendaciones del Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría. *Anales de Pediatría*, 83(5), 353.e1-353.e7. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.02.013>
- Gil, A. (2015). *Tratado de Nutrición*. Medica Panamericana.
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2007). Developmental plasticity and human disease: Research directions. *Journal of Internal Medicine*, 261(5), 461–471. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2007.01802.x>
- Grembecka, M. (2015). 17. Natural sweeteners in a human diet. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66(3), 195–202. Retrieved from http://wydawnictwa.pzh.gov.pl/roczniki_pzh/%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26400114
- Gschwind, R., Fournier, T., Butel, M. J., & Wydau-Dematteis, S. (2018). Microbiota establishment: An in utero colonization decisive for future health? *Medecine/Sciences*, 34(4), 331–337. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404014>
- Gschwind, R., Fournier, T., Butel, M., & Wydau-dematteis, S. (2018). Déterminante Pour La Santé Future ?, 34.
- Guerrero, M. (2017). *EFFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN TÁCTIL SOBRE LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL, EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y LA MEMORIA EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE*. Universidad Autónoma Metropolitana. Retrieved from <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=17691&docs=UAMI17691.pdf>
- Guerrero, María. (2012). *EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL EN EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN LA RATA*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Retrieved from <http://tesiuami.izt.uam.mx/uam/aspuam/presentatesis.php?recno=15714&docs=UAMI15714.pdf>
- He, A., Zhang, Y., Yang, Y., Li, L., Feng, X., Wei, B., ... Sun, M. (2017). Prenatal high sucrose intake affected learning and memory of aged rat offspring with abnormal oxidative stress and NMDARs/Wnt signaling in the hippocampus. *Brain Research*, 1669. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.05.022>
- Hildebrandt, M., Hoffman, C., Sherrill-Mix, S., Keilbaugh, S., Hamady, M., Chen, Y.-Y., ... Bushman, F. (2009). HFD-microbiome/NIH Public Access. *Gastroenterology*, 137, 24.e1-24.e2.

<https://doi.org/doi:10.1053/j.gastro.2009.08.042>.

- Holmes, E., Li, J. V., Marchesi, J. R., & Nicholson, J. K. (2012). Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metabolism*, 16(5), 559–564. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.007>
- Human Microbiome Project Consortium, T. (2012). A framework for human microbiome research The Human Microbiome Project Consortium*. *Nature*, 486.
- Indiani, C. M. D. S. P., Rizzardi, K. F., Castelo, P. M., Ferraz, L. F. C., Darrieux, M., & Parisotto, T. M. (2018). Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood Obesity*. <https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>
- Kaufer-Horwitz, M. Pérez-Lizaur, A. Arroyo, P. (2015). Nutrición en el Embarazo. In *Nutriología Médica* (pp. 251–272). Editorial Médica Panamericana.
- Kessels, R. P. C., De Haan, E. H. F., Kappelle, L. J., & Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: A meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*, 35(3), 295–303. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00058-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00058-3)
- Klauer, K. C., Meiser, T., & Naumer, B. (2000). Training propositional reasoning. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section A: Human Experimental Psychology*, 53(3), 868–895. <https://doi.org/10.1080/713755911>
- Kong, C., Gao, R., Yan, X., Huang, L., & Qin, H. (2019). Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. *Nutrition*, 60. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.10.002>
- Li, S.-W., Yu, H.-R., Sheen, J.-M., Tiao, M.-M., Tain, Y.-L., Lin, I.-C., ... Huang, L.-T. (2017). A maternal high-fat diet during pregnancy and lactation, in addition to a postnatal high-fat diet, leads to metabolic syndrome with spatial learning and memory deficits: beneficial effects of resveratrol. *Oncotarget*, 8(67), 111998–112013. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22960>
- Li, Y. (2018). Epigenetic mechanisms link maternal diets and gut microbiome to obesity in the offspring. *Frontiers in Genetics*, 9(AUG). <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00342>
- Liu, W. H., Chuang, H. L., Huang, Y. Te, Wu, C. C., Chou, G. T., Wang, S., & Tsai, Y. C. (2016). Alteration of behavior and monoamine levels attributable to *Lactobacillus plantarum* PS128 in germ-free mice. *Behavioural Brain Research*, 298, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.10.046>
- Lohner, S., Toews, I., & Meerpohl, J. J. (2017). Health outcomes of non-nutritive sweeteners: Analysis of the research landscape. *Nutrition Journal*, 16(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0278-x>

- Magnusson, K. R., Hauck, L., Jeffrey, B. M., Elias, V., Humphrey, A., Nath, R., ... Bermudez, L. E. (2015). Relationships between diet-related changes in the gut microbiome and cognitive flexibility. *Neuroscience*, 300. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.05.016>
- Mao, J. H., Kim, Y. M., Zhou, Y. X., Hu, D., Zhong, C., Chang, H., ... Snijders, A. M. (2020). Genetic and metabolic links between the murine microbiome and memory. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00817-w>
- Marciniak, A., Patro-Małyśza, J., Kimber-Trojnar, Ż., Marciniak, B., Oleszczuk, J., & Leszczyńska-Gorzela, B. (2017). Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 56(2), 133–138. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.01.001>
- Martin Tejedor, B. (2017). Análisis de la relación entre microbiota intestinal, permeabilidad intestinal y niveles de glucemia, en niños con Diabetes Mellitus tipo 1 comparados con niños con diabetes tipo MODY 2 y controles sanos., 1–160.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista De Neurologia*, 40(5), 289–297. <https://doi.org/10.5209/CIYC.8143>
- Mühlhäusler, B. S., Adam, C. L., & Mcmillen, I. C. (2008). Maternal Obesity and Programming.pdf, (September), 144–152.
- Naim, M., Sandovsky, V., Zechman, J. M., Brand, J. G., & Kare, M. R. (1985). Effects of Sodium Saccharin on the Activity of Trypsin, Chymotrypsin, and Amylase and upon Bacteria in Small Intestinal Contents of Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 178(3). <https://doi.org/10.3181/00379727-178-42022>
- Nakai, Y., Shinga-Ishihara, C., Kaji, M., Moriya, K., Murakami-Yamanaka, K., & Takimura, M. (2010). Xylitol gum and maternal transmission of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, 89(1). <https://doi.org/10.1177/0022034509352958>
- Narayanaswami, V., Thompson, A. C., Cassis, L. A., Bardo, M. T., & Dwoskin, L. P. (2013). Diet-induced obesity: Dopamine transporter function, impulsivity and motivation. *International Journal of Obesity*, 37(8). <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.178>
- Nettleton, J. E., Klancic, T., Schick, A., Choo, A. C., Shearer, J., Borgland, S. L., ... Reimer, R. A. (2019). Low-dose stevia (Rebaudioside A) consumption perturbs gut microbiota and the mesolimbic dopamine reward system. *Nutrients*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/nu11061248>
- Noble, E. E., Hsu, T. M., Liang, J., & Kanoski, S. E. (2017). Early-life sugar consumption has long-term negative effects on memory function in male rats. *Nutritional Neuroscience*, 0(0), 1–11. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1378851>

- Nylund, L., Satokari, R., Nikkilä, J., Rajilić-Stojanović, M., Kalliomäki, M., Isolauri, E., ... de Vos, W. M. (2013). Microarray analysis reveals marked intestinal microbiota aberrancy in infants having eczema compared to healthy children in at-risk for atopic disease. *BMC Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-12>
- Palatnik, A., Moosreiner, A., & Olivier-Van Stichelen, S. (2020). Consumption of non-nutritive sweeteners during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 223(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.03.034>
- Palmnäs, M. S. A., Cowan, T. E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R. A., Vogel, H. J., ... Shearer, J. (2014). Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., ... Hermoso, M. A. (2019). Corrigendum: Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01486>
- Parlee, S. D., & MacDougald, O. A. (2014). Maternal nutrition and risk of obesity in offspring: The Trojan horse of developmental plasticity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.007>
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M. C., Ramer-Tait, A. E., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: Implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0268-4>
- Pfeffer, M., Ziesenitz, S. C., & Siebert, G. (1985). Acesulfame K, cyclamate and saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria. *Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft*, 24(4). <https://doi.org/10.1007/BF02023668>
- Ribaroff, G. A., Wastnedge, E., Drake, A. J., Sharpe, R. M., & Chambers, T. J. G. (2017). Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obesity Reviews*, 18(6), 673–686. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rivera, H. M., Christiansen, K. J., & Sullivan, E. L. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00194>

- Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C. A., Gómez-Díaz, R. A., Brito-Córdova, G. X., Gómez-Velasco, D. V., López-Rocha, M. J., & Almeda-Valdés, P. (2017). Non-nutritive sweeteners: Evidence on their association with metabolic diseases and potential effects on glucose metabolism and appetite. *Revista de Investigación Clínica*, 69(3), 129–138. <https://doi.org/10.24875/RIC.17002141>
- Roosendaal, B., & Mcgaugh, J. L. (2012). Modulation, Memory. *Behavioral Neuroscience*, 125(6), 797–824. <https://doi.org/10.1037/a0026187>.MEMORY
- Ruiz-Ojeda, F. J., Plaza-Díaz, J., Sáez-Lara, M. J., & Gil, A. (2019). Effects of Sweeteners on the Gut Microbiota: A Review of Experimental Studies and Clinical Trials. In *Advances in Nutrition* (Vol. 10). <https://doi.org/10.1093/advances/nmy037>
- Samat, S., Kanyan Enchang, F., Nor Hussein, F., & Wan Ismail, W. I. (2017). Four-Week Consumption of Malaysian Honey Reduces Excess Weight Gain and Improves Obesity-Related Parameters in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1342150>
- Sánchez-Tapia, M., Martínez-Medina, J., Tovar, A., & Torres, N. (2019). and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats. *Nutrients*, 2(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/nu11040880>
- Sanz, Y., Santacruz, A., & Gauffin, P. (2010). Gut microbiota in obesity and metabolic disorders. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 434–441. <https://doi.org/10.1017/S0029665110001813>
- Saraiva, A., Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., & Raposo, A. (2020). Natural sweeteners: The relevance of food naturalness for consumers, food security aspects, sustainability and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176285>
- Sertie, R., Kang, M., Antipenko, J. P., Liu, X., Maianu, L., Habegger, K., & Garvey, W. T. (2020). In utero nutritional stress as a cause of obesity: Altered relationship between body fat, leptin levels and caloric intake in offspring into adulthood. *Life Sciences*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117764>
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.011>
- Sharma, A., Amarnath, S., Thulasimani, M., & Ramaswamy, S. (2016). Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe? *Indian Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.182888>

- Soares, E., Prediger, R. D., Nunes, S., Castro, A. A., Viana, S. D., Lemos, C., ... Pereira, F. C. (2013). Spatial memory impairments in a prediabetic rat model. *Neuroscience*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.07.055>
- Stanhope, K. L. (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 53(1), 52–67. <https://doi.org/10.3109/10408363.2015.1084990>
- 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, 181. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature13793>
- Tiihonen, K., Ouwehand, A. C., & Rautonen, N. (2010, April). Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2009.10.004>
- Treviño de Alba, C. (2018). *Efecto de la suplementación materna con flavonoides sobre la expresión génica de GCK hepática en la descendencia adulta*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature05414>
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., & Gordon, J. I. (2009). Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Science Translational Medicine*, 1(6), 1–19. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.The
- Vázquez Hernández, C., Guevara González, R., Aguirre Becerra, H., Alvarado, M., & Romero Zepeda, H. (2017). *Current consumption of natural sweeteners (benefits and problems): Stevia*.
- Vicens, P., Redolat, R., & Del Carmen Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: Metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539–544.
- Villareal, L. M. A., Cruz, R. A. M., Ples, M. B., & Vitor, R. J. S. (2016). Neurotropic effects of aspartame, stevia and sucralose on memory retention and on the histology of the hippocampus of the ICR mice (*Mus musculus*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.11.001>
- Vuong, H. E., Pronovost, G. N., Williams, D. W., Coley, E. J. L., Siegler, E. L., Qiu, A., ... Hsiao, E. Y. (2020). The maternal microbiome modulates fetal neurodevelopment in mice. *Nature*, 586(7828). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2745-3>
- Wang, K., Wan, Z., Ou, A., Liang, X., Guo, X., Zhang, Z., ... Xue, X. (2019).

Monofloral honey from a medical plant, *Prunella Vulgaris*, protected against dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis via modulating gut microbial populations in rats. *Food and Function*, 10(7). <https://doi.org/10.1039/c9fo00460b>

Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

Wolf, A., Bauer, B., Abner, E. L., Ashkenazy-Frolinger, T., & Hartz, A. M. S. (2016). A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/ Tg2576 mice. *PLoS ONE*, 11(1), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147733>

Wolraich, M. L. (1995). The Effect of Sugar on Behavior or Cognition in Children. *JAMA*, 274(20). <https://doi.org/10.1001/jama.1995.03530200053037>

Wu, C., Li, J., Bo, L., Gao, Q., Zhu, Z., Li, D., ... Xu, Z. (2014). High-sucrose diets in pregnancy alter angiotensin II-mediated pressor response and microvessel tone via the PKC/Ca v 1.2 pathway in rat offspring. *Hypertension Research*, 37(9). <https://doi.org/10.1038/hr.2014.94>

Yunes, R. A., Poluektova, E. U., Dyachkova, M. S., Klimina, K. M., Kovtun, A. S., Averina, O. V., ... Danilenko, V. N. (2016). GABA production and structure of gadB/gadC genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. *Anaerobe*, 42, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>

Zambrano, E., Ibáñez, C., Martínez-Samayoa, P. M., Lomas-Soria, C., Durand-Carbajal, M., & Rodríguez-González, G. L. (2016). Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. *Archives of Medical Research*, 47(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.01.004>

Zappa Villar, M. F., López Hanotte, J., Falomir Lockhart, E., Trípodí, L. S., Morel, G. R., & Reggiani, P. C. (2018). Intracerebroventricular streptozotocin induces impaired Barnes maze spatial memory and reduces astrocyte branching in the CA1 and CA3 hippocampal regions. *Journal of Neural Transmission*, 125(12). <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1928-7>

Zhu, C. H., Wu, T., Jin, Y., Huang, B. X., Zhou, R. F., Wang, Y. Q., ... Zhu, H. L. (2016). Prenatal choline supplementation attenuates spatial learning deficits of offspring rats exposed to low-protein diet during fetal period. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.003>