



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTO DE LA INGESTA DE DIFERENTES EDULCORANTES SOBRE LA
LIBERACIÓN DE LAS HORMONAS INCRETINAS GLP-1 Y GIP Y SU EFECTO
SOBRE LA LIPOGÉNESIS A LARGO PLAZO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.A. Samuel Mendoza Pérez

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa
Facultad de Química

Ciudad de México, febrero de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LA INGESTA DE DIFERENTES EDULCORANTES
SOBRE LA LIBERACIÓN DE LAS HORMONAS INCRETINAS GLP-
1 Y GIP Y SU EFECTO SOBRE LA LIPOGÉNESIS A LARGO
PLAZO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.A. SAMUEL MENDOZA PÉREZ



Ciudad de México, México 2017

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
Vocal	Dra. Amelia Guadalupe Farrés González Sarabia
Vocal	Dra. Nimbe Torres y Torres
Vocal	Dra. Ruth Bustamante García
Secretario	Dr. José Fausto Rivero Cruz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- **Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAyQA) del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM**
- **Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM**
- **Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ)**
- **Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM**

ASESOR DEL TEMA

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUSTENTANTE

Q. A. Samuel Mendoza Pérez

RECONOCIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la excelente formación que me ha brindado, así como ser un segundo hogar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca brindada (No. de becario: 576643 CVU: 660755). Así mismo, se reconoce el apoyo financiero para la compra de materiales, reactivos, equipos y especímenes a través del proyecto CONACYT 178656.

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por su asesoría, orientación y apoyo a lo largo de este trayecto.

A los honorables miembros del jurado por su valioso tiempo dedicado en la revisión de la tesis y sus apreciadas observaciones de la misma.

Al Maestro Rolando García Gomez por su incondicional apoyo y amistad otorgada a lo largo de todo este tiempo.

A los compañeros de los Laboratorios 301, 302 y 303 del Conjunto E de la Facultad de Química.

A Itzel Orta, Yael Vargas, Irene García, David Espinoza, Carlos Ramírez y Marilyn García por su apoyo en el cuidado de nuestros 176 pequeños amigos.

Al personal del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiran, especialmente al Químico Guillermo Ordaz.

Al Dr. Gerardo Salas de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo durante la fase experimental, especialmente en la disección de las ratas y los análisis histológicos.

Al personal de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química, especialmente a la M.V.Z Lucía Macías por su asesoría en el cuidado y aseguramiento del bienestar de los animales modelo empleados.

DEDICATORIAS

A mi familia

"Declaro conocer el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, plasmado en la Legislación Universitaria. Con base en las definiciones de integridad y honestidad ahí especificadas, aseguro mediante mi firma al calce que el presente trabajo es original y enteramente de mi autoría. Todas las citas de, o referencias a, las obras de otros autores aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante los recursos editoriales convencionales"

Samuel Mendoza Pérez

ÍNDICE

	Página
Glosario de siglas, abreviaturas y acrónimos	xv
Resumen / Abstract	xix
CAPÍTULO 1 PROBLEMÁTICA	1
1.1 Introducción	1
CAPÍTULO 2 FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1 Edulcorantes	3
2.1.1 Edulcorantes calóricos	3
2.1.1.1 Sacarosa	3
2.1.1.2 Fructosa	4
2.1.1.3 Glucosa	5
2.1.2 Edulcorantes hipocalóricos	6
2.1.2.1 Acesulfamo de potasio	6
2.1.2.2 Aspartamo	7
2.1.2.3 Sucralosa	8
2.1.2.4 Glucósidos de esteviol	9
2.1.2.5 Sacarina	11
2.1.2.6 Mezcla aspartamo: acesulfamo de potasio	12
2.2 Hormonas incretinas	13
2.2.1 Polipéptido insulínotropo dependiente de glucosa (<i>GIP</i>)	13
2.2.1.1 Síntesis de <i>GIP</i>	13
2.2.1.2 Acción de <i>GIP</i> en el páncreas	14
2.2.1.3 Efectos extrapancreáticos de la hormona <i>GIP</i>	15
2.2.2 Péptido similar al glucagón tipo 1 (<i>GLP-1</i>)	16

		Página
2.2.2.1	Síntesis del péptido similar al glucagón tipo 1 (<i>GLP-1</i>)	16
2.2.2.2	Acción de <i>GLP-1</i> en el páncreas	16
2.2.2.3	Efectos extrapancreáticos de la hormona <i>GLP-1</i>	17
2.3	Lipogénesis	17
2.3.1	Regulación de la lipogénesis	18
2.3.2	Regulación transcripcional de la lipogénesis	19
2.3.2.1	Proteína de unión al elemento regulador del esterol 1c (<i>SREBP-1c</i>)	20
2.3.2.2	Proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos (<i>ChREBP</i>)	21
2.4	Grelina	22
2.5	Leptina	24
2.6	Insulina	25
2.7	Glucagón	27
2.8	Transportador de glucosa de difusión facilitada tipo 2 (<i>GLUT-2</i>)	29
2.9	Cotransportador de sodio/glucosa tipo 1 (<i>SGLT-1</i>)	30
CAPÍTULO 3	HIPÓTESIS, OBJETIVOS, ALCANCES Y JUSTIFICACIÓN	32
3.1	Hipótesis	32
3.2	Objetivos	32
3.2.1	Objetivo general	32
3.2.2	Objetivos particulares	32
3.3	Alcances de la investigación	33
3.4	Justificación	33
CAPÍTULO 4	MATERIALES Y MÉTODOS	34
4.1	Diseño experimental	35
4.2	Análisis estadístico	35

		Página
4.3	Metodología	36
4.3.1	Modelo animal	36
4.3.2	Dietas suministradas	36
4.3.3	Concentraciones de las bebidas suministradas	36
4.3.4	Determinación de la curva de crecimiento e ingesta	38
4.3.5	Eutanasia de los especímenes	38
4.3.6	Disección de los órganos de interés	38
4.3.7	Pruebas bioquímicas	39
4.3.8	Extracción de ARN	39
4.3.9	Cuantificación relativa por <i>PCR</i> en tiempo real	40
4.3.10	Extracción y cuantificación de proteínas totales	40
4.3.11	Determinación de proteínas mediante <i>Western blot</i>	41
4.3.12	Método para la determinación de la curva de tolerancia a la glucosa de los animales de experimentación	42
CAPÍTULO 5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1	Parámetros bioquímicos	43
5.1.1	Péptido insulínico dependiente de glucosa (<i>GIP</i>)	43
5.1.2	Determinación del péptido similar al glucagón tipo 1 (<i>GLP-1</i>)	45
5.1.3	Determinación de glucosa	45
5.1.3.1	Curva de tolerancia a la glucosa	46
5.1.4	Determinación de triglicéridos	47
5.1.5	Colesterol total	49
5.1.6	Determinación de insulina	51
5.1.7	Determinación de glucagón	53
5.1.8	Determinación de grelina	54
5.1.9	Determinación de leptina	55

		Página
5.2	Expresión relativa de factores de transcripción relacionados con la lipogénesis	57
5.2.1	Expresión relativa de <i>SREBP-1</i>	57
5.2.2	Expresión relativa de <i>ChREBP</i>	59
5.3	Expresión relativa de <i>SGLT-1</i>	60
5.4	Expresión relativa del gen codificante del receptor de insulina	62
5.5	Análisis de proteínas mediante <i>Western blot</i>	63
5.5.1	Análisis de la proteína de unión al elemento regulador del esterol (<i>SREBP-1</i>)	63
5.5.2	Sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>)	65
5.5.3	Análisis del cotransportador de sodio-glucosa (<i>SGLT-1</i>)	68
5.5.4	Transportador de glucosa <i>GLUT-2</i>	70
5.6	Resumen de los resultados bioquímicos, expresión génica y <i>Western blot</i>	74
5.7	Incremento en masa corporal	75
5.8	Consumo de alimento	82
5.9	Ingesta de agua potable con y sin edulcorantes	85
5.10	Ingesta energética	88
5.11	Análisis histológico	92
5.11.1	Análisis del tejido adiposo retroperitoneal	92
5.11.2	Análisis del tejido hepático	95
5.11.3	Análisis de tejido cardíaco	99
5.11.4	Análisis del tejido renal	102
CAPÍTULO 6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	105
6.1	Conclusiones	106
6.2	Recomendaciones	107

		Página
ANEXOS		
Anexo 1	Cálculos de equidulzura	109
Anexo 2.	Descripción detallada de la determinación de <i>GIP</i> , <i>GLP-1</i> , leptina, grelina, insulina y glucagón	112
Anexo 3	Cromatogramas de las determinaciones de los edulcorantes en las bebidas suministradas a las ratas	115
Anexo 4	Disposición de residuos de la investigación	118
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		120

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 4.1	Información nutrimental de la dieta Teklad Global 2018S (Envigo, 2016a)	35
Tabla 4.2	Información nutrimental de la dieta <i>AIN93M</i> (Envigo, 2016b)	36
Tabla 5.1	Resumen del resultado de las pruebas bioquímicas, genéticas y de <i>Western blot</i>	74
Tabla 5.2	Porcentaje de cambio de masa corporal de ratas macho tras 120 días de consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos	81
Tabla 5.3	Porcentaje de cambio de masa corporal de ratas hembra tras 120 días de consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos	81
Tabla 5.4	Porcentaje de cambio en la ingesta energética respecto del grupo control de ratas macho	91
Tabla 5.5	Porcentaje de cambio en la ingesta energética respecto al grupo control en ratas hembra	91
Tabla 5.6	Diámetro de los adipocitos (μm) de ratas macho	92
Tabla 5.7	Diámetro de los adipocitos (μm) de ratas hembra	94
Tabla A.1.1	Resumen de datos de prueba de equidulzura	111
Tabla A.2.1	Concentración de los estándares de las hormonas	113

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 2.1	Estructura química de la sacarosa (Varzakas et al., 2012)	3
Figura 2.2	Estructura química de la fructosa (White y Osberger, 2011)	4

		Página
Figura 2.3	Metabolismo de la fructosa (Hui et al., 2012)	5
Figura 2.4	Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)	6
Figura 2.5	Estructura química del acesulfamo K (Haber et al., 2012)	6
Figura 2.6	Estructura del aspartamo (O'Donell, 2012)	7
Figura 2.7	Metabolismo del aspartamo (O'Donell, 2012)	8
Figura 2.8	Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)	9
Figura 2.9	Steviol la aglucona de los glucósidos de esteviol (R1 y R2= H) (Lemus-Mondaca et al., 2012)	10
Figura 2.10	Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien, 2011)	11
Figura 2.11	Representación esquemática de principales eventos moleculares durante la secreción de insulina inducida por la incretina <i>GIP</i> , desde una célula β pancreática (Modificado de Kim y Egan, 2008)	14
Figura 2.12	Efectos del <i>GIP</i> en tejidos periféricos (Modificado de Baggio y Drucker, 2007)	15
Figura 2.13	Interacción funcional entre los factores de transcripción <i>SREBP-1c</i> , <i>ChREBP-1</i> y <i>LXR</i> en la lipogénesis (López-Oliva y Muñoz, 2014)	21
Figura 2.14	Representación esquemática de los efectos fisiológicos de la grelina (Müller et al., 2015)	23
Figura 2.15	Representación esquemática de la principal cascada de reacciones que conllevan a la liberación de insulina (Modificada de Fu et al., 2013)	26
Figura 2.16	Regulación de la liberación de glucagón. A. En bajas concentraciones de glucosa se produce la liberación de glucagón por el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la polarización de la membrana por la actividad de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} y Na^{+} . B. Bajo altas concentraciones de glucosa se bloquean los canales K_{ATP} necesarios para que los canales dependientes del voltaje se encuentren abiertos, disminuyéndose entonces los niveles de Ca^{2+} . Para altos niveles de glucosa se libera la insulina de las células β y somatostatina de las células δ , ambas inhibitoras de la secreción de glucagón (Gaisano et al., 2012)	28
Figura 2.17	Transportadores I. Uniporte, II simporte y III antiporte de moléculas a través de una membrana M (Lodish et al., 2016)	30
Figura 4.1	Diagrama general del desarrollo experimental	34
Figura 5.1	Niveles de <i>GIP</i> en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de <i>GIP</i> \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a, b, c, d, e, f, g	43

		Página
Figura 5.2	Niveles de glucosa en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. . Donde cada barra representa el promedio de los niveles de glucosa en ayuno \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b	45
Figura 5.3	Curva de tolerancia a la glucosa. A) Determinación de curva de intolerancia a la glucosa. B) Área bajo la curva de intolerancia a la glucosa	47
Figura 5.4	Niveles de triglicéridos en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de triglicéridos en ayuno \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d	48
Figura 5.5	Niveles de colesterol en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de colesterol total \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d	50
Figura 5.6.	Niveles de insulina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de insulina \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e	52
Figura 5.7	Niveles de glucagón en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de glucagón \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c	53
Figura 5.8	Niveles de grelina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de grelina \pm DEM	54
Figura 5.9	Niveles de leptina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de leptina \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e	55
Figura 5.10	Niveles de expresión relativa de <i>SREBP-1</i> en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e	57
Figura 5.11	Niveles de expresión relativa de <i>ChREBP</i> en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c	59
Figura 5.12	Niveles de expresión relativa de <i>SGLT-1</i> en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d	60

	Página	
Figura 5.13	Niveles de expresión relativa del gen codificante para el receptor de insulina en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e,f	62
Figura 5.14	A. Expresión de <i>SREBP-1</i> en hígado de ratas macho. Media \pm DEM, B. Expresión de <i>SREBP-1</i> determinada por <i>Western blot</i>	63
Figura 5.15	A. Expresión de <i>SREBP-1</i> en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>SREBP-1</i> determinada por <i>Western blot</i>	64
Figura 5.16	A. Expresión de <i>FAS</i> en hígado de ratas macho. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>FAS</i> determinada por <i>Western blot</i>	66
Figura 5.17	A. Expresión de <i>FAS</i> en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>FAS</i> determinada por <i>Western blot</i>	68
Figura 5.18	A. Expresión de <i>SGLT-1</i> en hígado de ratas macho. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>SGLT-1</i> determinada por <i>Western blot</i>	69
Figura 5.19	A. Expresión de <i>SGLT-1</i> en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>SGLT-1</i> determinada por <i>Western blot</i>	70
Figura 5.20	A. Expresión de <i>GLUT-2</i> en hígado de ratas macho. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>GLUT-2</i> determinada por <i>Western blot</i>	71
Figura 5.21	A. Expresión de <i>GLUT-2</i> en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM. B. Expresión de <i>GLUT-2</i> determinada por <i>Western blot</i>	72
Figura 5.22	Gráfica de la ganancia de masa corporal por parte de las ratas macho a lo largo de 120 días después del destete (Media \pm DEM, n=8)	76
Figura 5.23	Ganancia final de masa en ratas macho a 120 días después del destete (Media \pm DEM, n=8)	77
Figura 5.24	Ganancia de masa corporal de las ratas hembra, a lo largo de 120 días después del destete (media \pm DEM, n=8)	79
Figura 5.25	Ganancia final de masa en ratas hembra a 120 días después del destete (Media \pm DEM, n=8)	80
Figura 5.26	Alimento consumido por ratas que ingerian diversos grupos de edulcorantes hasta el día 120 después del destete (Media \pm DEM, n = 8). A. Machos. B. Hembras	83
Figura 5.27	Alimento ingerido por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de alimento ingerido \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d	84
Figura 5.28	Consumo de bebidas (mL) en un periodo de 120 días en función del sexo por tratamiento. A) Ratas macho. B) Ratas hembra. Cada línea representa la tendencia en el periodo evaluado donde cada punto comprende al promedio de bebida \pm DEM	86

		Página
Figura 5.29	Bebida ingerida por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de la ingesta energética \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P<0.05$: a,b,c,d	87
Figura 5.30	Ingesta energética (kJ) en un periodo de 120 días en función del sexo por tratamiento. A) Ratas macho. B) Ratas hembra. Cada línea representa la tendencia en el periodo evaluado donde cada punto comprende al promedio de la ingesta energética \pm DEM	89
Figura 5.31	Ingesta energética acumulada por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de la bebida ingerida \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P<0.05$: a,b,c,d	90
Figura 5.32	Cortes histológicos de tejido adiposo retroperitoneal. A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) ACE K, E) Mezcla ACE K:ASP, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa y K) Glucosa	93
Figura 5.33	Adipocitos de los distintos grupos de ratas hembra que bebieron edulcorantes. A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	95
Figura 5.34	Cortes histológicos de hígado de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes tinción hematoxilina-eosina. A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	98
Figura 5.35	Cortes histológicos de hígado de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes con tinción de hematoxilina-eosina. A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	99
Figura 5.36	Cortes histológicos de músculo cardíaco de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	100
Figura 5.37	Figura 5.37 Cortes histológicos de músculo cardíaco de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	101
Figura 5.38	Cortes histológicos de la zona cortical de riñones de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control <i>AIN93M</i>, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	103

	Página	
Figura 5.39	Cortes histológicos de la zona cortical de riñones de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control, Teklad B) Control <i>AIN93M</i> , C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa	104
Figura A. 1.1	Gráfica para el cálculo de equidulzura	110
Figura A.3.1	Cromatograma correspondiente a la fructosa	115
Figura A.3.2	Cromatograma correspondiente a la glucosa	115
Figura A.3.3	Cromatograma correspondiente a la sacarosa	115
Figura A.3.4	Cromatograma del esteviósido (TR=2.32 min) y del Rebaudiósido A (TR=2.453 min). Las concentraciones son 341µg/mL para el esteviósido y 582µg/mL para el Rebaudiósido A	116
Figura A.3.5	Cromatograma de la sucralosa	116
Figura A.3.6	Cromatograma del acesulfamo K	116
Figura A.3.7	Cromatograma de la sacarina	117
Figura A.3.8	Cromatograma de la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo K. Contenido de aspartamo 0.32 mg/mL, contenido de acesulfamo K 0.147mg/mL	117
Figura A.3.9	Cromatograma de la solución de aspartamo comercial. Concentración de aspartamo 0.125mg/mL	117
Figura A.4.1	Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación	118

Nota: Todos los datos experimentales, los análisis estadísticos y demás información que respalda esta investigación se encuentra adjunta en un disco compacto que está a la disposición de quien desee consultarlos (correos-e: lamzamu@hotmai.com, rolandoga2000_a@yahoo.com, mcduran@unam.mx)

GLOSARIO DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACE K. Acesulfamo de potasio

ACC. Acetil-Coenzima A carboxilasa

ACL. ATP-Citrato liasa

ADI. En inglés *Acceptable Daily Intake*

Ad libitum. Sin restricción, del latín y su significado literal es *a placer, a voluntad*

ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario

ARNm. Ácido ribonucleico mensajero

AIN93M. *American Institution of Nutrition Number 93M*

ANDEVA. Análisis de varianza, en inglés *ANOVA*

AKT. En inglés *serine/threonine protein kinase*. Serina/treonina proteína cinasa

ASP. Aspartamo

ATP. Adenosin trifosfato

AMPc. Adenosin monofosfato cíclico

ChREBP. En inglés *Carbohydrate-responsive element-binding protein*.

ChORES. En inglés *Carbohydrates Response Element*. Elemento de respuesta a los carbohidratos

CICUAL. Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química, UNAM

DEM. Desviación estándar de la media

DHAP. Dihidroxiacetona fosfato en inglés.

DPP4. En inglés *Dipeptidyl peptidase-4*. Dipeptidil dipeptidasa 4

ELISA. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas en inglés

ELOVL6. En inglés *Elongation of very long chain fatty acids protein 6*. Elongasa de cadenas muy largas de ácidos grasos de la proteína 6

F-2,6-P. Fructosa-2,6-bifosfato

FAO. En inglés *Food and Agriculture Organization*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FAS. En inglés *Fatty acid synthase*. Sintasa de ácidos grasos. Enzima fundamental en la síntesis de ácidos grasos. Genera palmitato a partir de acetil-CoA y malonil-CoA

FDA. En inglés *Food and Drug Administration*. Administración de Alimentos y Fármacos. Agencia del Gobierno de Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y medicamentos

G6P. Glucosa-6-fosfato

GH. En inglés *Growth Hormone*. Hormona del crecimiento.

GHRS. Receptor de la hormona del crecimiento, en inglés.

GIP. En inglés *glucose-dependent insulintropic peptide*. Péptido insulínico dependiente de glucosa

GI. Grados de libertad

GLP-1. En inglés *glucagon like peptide*. Péptido similar al glucagón tipo 1

GLUT-2. En inglés *glucose transporter 2*. Transportador de glucosa tipo 2

GK. Glucoquinasa en inglés

GOAT. Grelina O-acil-transferasa en inglés

GPAT. Glicerol-3-fosfato aciltransferasa en inglés

GRACE. Elemento conservado de activación en respuesta a la glucosa en inglés

GRAS. En inglés *generally recognized as safe*. Generalmente reconocido como seguro

GRPP. En inglés *glicentin-related polypeptide*. Polipéptido relacionado con glicentina

HGNA. Hígado graso no alcohólico

HPLC. Cromatografía de líquidos de alta resolución en inglés

ID. Identificación de los roedores en estudio

INCMyNSZ. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (México)

INSIG. Proteína regulada por la insulina en inglés

IPI. En inglés *intervening peptide-1*. Péptido intermedio 1

IP2. En inglés *intervening peptide-2*. Péptido intermedio 2

JECFA. En inglés *Joint Expert Committee on Food Additives*. Comité científico internacional de expertos en aditivos alimentarios, administrado conjuntamente por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

kJ. Unidad para la medición de energía, es un múltiplo de la unidad de energía, el Joule (J) del Sistema Internacional de Unidades (SI). 1 kJ=1000 J, 4.184J= 1 cal

LID. En inglés *low glucose inhibitory domain*. Dominio inhibidor a baja glucosa

LPK. Piruvato quinasa hepática en inglés

LXR. En inglés *Liver X receptor*. Receptor X hepático.

MAD. En inglés *Median Absolute Deviation*. Desviación absoluta de la mediana.

MAP. En inglés *mitogen-activated protein*. Proteína activada por mitógenos

Masa. La masa de un cuerpo es una propiedad característica del mismo, que está relacionada con el número y clase de las partículas que lo forman. Se mide en kilogramos (kg)

MFI. Intensidad media de fluorescencia en inglés

NEC2. Convertasa neuroendocrina 2 en inglés

NcoR. Co-represor 1 del receptor nucle

ar en inglés

OMS. Organización Mundial de la Salud (*WHO, World Health Organization*)

PC1. Convertasa de prohormona 1 en inglés

PC2. Convertasa de prohormona 2 en inglés

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa en inglés

Pellet. Bolita o pequeña pastilla de alguna sustancia

Peso. El peso de un cuerpo es la fuerza con que lo atrae la Tierra y depende de la masa del mismo. Un cuerpo de masa el doble que otro, pesa también el doble. Se mide en Newtons (N). No debe confundirse masa con peso. Los astronautas, por ejemplo, no pesan nada en gravedad cero, pero siguen teniendo masa (kg). El peso es la fuerza con que los cuerpos caen debido a la gravedad. Una persona no pesa lo mismo en la Tierra que en otros planetas o en Acapulco o en la Ciudad de México o en el Tibet

PFVD. En inglés polyvinylidene difluoride. Fluoruro de polivinilideno

PI3K. Fosfatidilinositol 3-cinasa en inglés

PKA. Proteína quinasa A en inglés

PKB. Proteína quinasa B en inglés

PUFAs. En inglés *polyunsaturated fatty acids*. Ácidos grasos poliinsaturados

REB. Rebaudiósido proveniente de *Stevia rebaudiana* Bertoni

RER. Reticulo endoplasmático rugoso

RIPA. La solución *RIPA* es una solución amortiguadora de lisis que extrae proteínas de manera eficaz a partir de células de mamíferos (*Radioimmunoprecipitation assay buffer* en inglés)

SCAP. Proteína de escisión activada en inglés

SCF. En inglés *Scientific Committee on Food*. Comité Científico sobre la Alimentación Humana

SCD1. Esteroil coenzima A desaturasa 1 en inglés

SD. Desviación estándar en inglés

SEM. Error estándar de la media

SGLT-1. Transportador de glucosa acoplados a sodio 1 en inglés

SIRT1. Sirtuina 1. Enzima deacetilasa que contribuye a la regulación celular

SMRT. Silenciador-mediador de los receptores de las hormonas tiroideas/retinoides

SREBP-1. En inglés *Sterol regulatory element-binding protein*. Proteína de unión al elemento de respuesta del esterol

SREBF-1. Gen codificante para la proteína de unión al elemento regulador del esterol 1 en inglés

SREBF-2. Gen codificante para la proteína de unión al elemento regulador del esterol 2 en inglés

STE. *Stevia rebaudiana* Bertoni

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México

UNEXA. Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química de la UNAM

WAT. En inglés *white adipose tissue*. Tejido adiposo blanco

VDCC. Canales de calcio dependientes del voltaje en inglés

Xu-5-P. Xilulosa-5-fosfato

RESUMEN

El sobrepeso y la obesidad son enfermedades de etiología multifactorial destacando el aumento desmedido del consumo de alimentos ricos en grasa y glúcidos simples como posible origen. Una opción fue la comercialización de edulcorantes hipocalóricos. En este proyecto se evaluaron 3 edulcorantes calóricos (glucosa 10%, fructosa 10% y sacarosa 10%) y 6 edulcorantes hipocalóricos (aspartamo 0.3%, acesulfamo K 0.05%, infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* 0.94%, mezcla comercial de aspartamo:acesulfamo de potasio 0.15%, sacarina 0.033% y sucralosa 0.017%), administrados con el agua potable, así como dos grupos control sin edulcorantes en el agua. Se emplearon 176 ratas, 88 machos y 88 hembras de la cepa Wistar. Transcurridos 120 días después del destete se determinaron las concentraciones del péptido insulínico dependiente de glucosa, el péptido similar al glucagón, glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina, glucagón, leptina y grelina. Así mismo se realizaron los análisis histológicos de hígado, tejido adiposo retroperitoneal y corazón. Se evaluó la expresión de los genes de la proteína de unión al elemento regulador del esterol, la proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos y el transportador sodio glucosa 1. Se evaluó la proteína de unión al elemento regulador del esterol, la sintasa de ácidos grasos, el transportador de glucosa 2 y el cotransportador de sodio glucosa 1. En ratas macho existieron diferencias en los niveles séricos del péptido insulínico dependiente de glucosa, triglicéridos, colesterol total, insulina, glucagón, leptina y grelina. En este lapso ningún parámetro sobrepasó los niveles considerados normales. Los grupos de acesulfamo de potasio y la mezcla de aspartamo con acesulfamo presentaron la mayor expresión del gen de la proteína de unión al elemento regulador del esterol. El gen del transportador de sodio y glucosa se expresó en menor cantidad en el grupo de acesulfamo de potasio. Los mayores niveles de la proteína de unión al elemento regulador del esterol se presentaron en los grupos que ingirieron acesulfamo de potasio, la mezcla de acesulfamo con aspartamo, sacarosa y fructosa. La sintasa de ácidos grasos tuvo su mayor expresión en el grupo que ingirió sacarosa. El grupo que ingirió fructosa presentó la mayor expresión del transportador de glucosa. En las ratas hembra existieron diferencias en los niveles séricos del péptido insulínico dependiente de glucosa, triglicéridos, colesterol, glucosa, insulina y leptina. En este lapso ningún grupo superó los niveles considerados normales. En ratas hembra los grupos de acesulfamo de potasio y fructosa presentaron niveles del gen de la proteína de unión al elemento regulador del esterol similares al control. Todos los grupos de edulcorantes calóricos e hipocalóricos presentaron niveles superiores al control de proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos. Solamente los grupos de acesulfamo de potasio y aspartamo presentaron niveles del cotransportador de sodio glucosa similares al control. El grupo de sacarosa presentó la mayor expresión de la proteína de unión al elemento regulador del esterol. Los mayores niveles de la sintasa de ácidos grasos se presentaron en los grupos de sacarosa, aspartame y glucosa. Tanto el transportador de difusión facilitada como el cotransportador de sodio glucosa se sobre-expresaron en los grupos de edulcorantes calóricos. Los análisis histológicos indicaron la presencia de esteatosis microvesicular leve en los grupos que ingirieron glucosa, fructosa, sacarosa, acesulfamo, aspartamo y la mezcla de estos dos últimos. En ratas hembra el grupo de sucralosa presentó esteatosis microvesicular moderada. Existió daño glomerular debido a la ingesta de la infusión de *Stevia rebaudiana*. Respecto de los patrones de ingesta de bebida y alimento se observó que los grupos de edulcorantes calóricos consumieron la menor cantidad de alimento debido a la mayor ingesta de bebida. Tanto en ratas macho como hembra la ganancia de masa fue muy homogénea. El consumo crónico de edulcorantes calóricos e hipocalóricos junto con una dieta balanceada conlleva a cambios en los niveles de diversos parámetros metabólicos, pero en este lapso no se sobrepasaron los niveles considerados normales.

ABSTRACT

Overweight and obesity are diseases of multifactorial etiology that have its origin, among other factors, in the increase of fatty and simple glucids consumption. A possible option was the commercialization of hypocaloric sweeteners. In this project 3 caloric sweeteners (glucose 10%, fructose 10%, and sucrose 10%) and 6 hypocaloric sweeteners (aspartame 0.3%, acesulfame K 0.05%, *Stevia rebaudiana* leaves infusión 0.94%, commercial mixture of aspartame:potassium acesulfame 0.15%, saccharin 0.033%, and sucralose 0.017%), administered in drinking water, as well as two control groups with no sweeteners in water were studied. A population of 176 weaned, 88 male and 88 female Wistar rats was studied. After 120 days concentrations of glucose-dependent insulintropic peptide, glucose, triglycerides, cholesterol, insulin, glucagon, leptin, and ghrelin were determined. Also, histological analyses of liver, retroperitoneal adipose tissue, and heart were performed. The gene expression of sterol regulatory element-binding protein 1, carbohydrate-responsive element-binding protein and sodium-glucose linked transporter 1 were also assessed. The sterol regulatory element-binding protein 1, the fatty acid synthase, the glucose transporter 2 and the sodium-glucose linked transporter 1 were evaluated. For male rats differences in the seric levels of the glucose-dependent insulintropic peptide, triglycerides, total cholesterol, insulin, glucagon, leptin and ghrelin were found. In the studied lapse, none of the studied parameters were higher than the considered normal levels. The groups of acesulfame K and the mixture of aspartame with acesulfame K presented the highest expression of the gene of sterol regulatory element-binding protein. The gene of sodium-glucose linked transporter 1 was expressed in a lower quantity in the group of acesulfame K. The highest levels of sterol regulatory element-binding protein 1 were presented in the groups of rats that consumed acesulfame K, mixture of acesulfame and aspartame, sucrose, and fructose. The fatty acid synthase, FAS, had its higher expression in the group drinking water with sucrose. The group drinking water with fructose presented the highest expression of the glucose transporter. For the female rats there were differences in the seric levels of the glucose-dependent insulintropic peptide, triglycerides, cholesterol, glucose, insulin, and leptin. During the 120 day lapse after weaning, no group reached levels above those considered normal. The groups of acesulfame K and fructose had levels of the gene of sterol regulatory element-binding protein 1 similar to those of the control group. All the groups ingesting both caloric and hypocaloric sweeteners presented higher levels of the carbohydrate-responsive element-binding protein than the control group. Only the groups of acesulfame K and aspartame presented levels of the sodium-glucose linked transporter 1 similar to those of the control group. The group drinking water with sucrose presented the highest expression of the sterol regulatory element-binding protein 1. The highest levels of fatty acid synthase, FAS, were presented in the groups drinking water with sucrose, aspartame, and glucose. Both, the glucose transporter 2 and the sodium-glucose linked transporter 1 were over-expressed in the groups drinking water with caloric sweeteners. Histological analyses indicated the presence of slight microvesicular steatosis for those groups that ingested glucose, fructose, sucrose, acesulfame, aspartame, and the mixture acesulfame-aspartame. For female rats, the sucralose group presented moderate microvesicular steatosis. Glomerular damage was found in those rats drinking the *Stevia rebaudiana* infusion. With respect to the food and drinking water consumption patterns it was observed that those groups consuming caloric sweeteners ate less due to the higher drinking volume consumed. For both male and female rats mass gain was homogeneous. The chronic consumption of caloric and hypocaloric sweeteners and the balanced diet indicates changes in the levels of different metabolic parameters, but in the lapse studied their values did not exceed the levels considered normal.

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1. INTRODUCCIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica y de etiología multifactorial, la cual está asociada con el desarrollo de muchos otros padecimientos asociados con el síndrome metabólico¹, como son la diabetes mellitus tipo II y las enfermedades cardiovasculares (Zimmet et al., 2005). Los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 son muy alarmantes revelando una cada vez mayor prevalencia de este conjunto de enfermedades (Gutiérrez et al., 2012).

Las conclusiones de esta encuesta nacional también señalan particularmente una alta prevalencia de *diabetes mellitus* tipo II e hipertensión. Estas dos enfermedades están estrechamente correlacionadas con el padecimiento de sobrepeso u obesidad. Entre los múltiples factores que contribuyen al desarrollo del sobrepeso y la obesidad se encuentran una incorrecta alimentación y los cada vez más frecuentes hábitos de sedentarismo, así como componentes de índole genética.

En los últimos años ha existido un consumo desmedido de productos que contienen edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa, fructosa) e hipocalóricos (aspartame y sucralosa principalmente) y se ha relacionado su excesivo consumo como uno de los factores más importantes que influyen en el desarrollo de esta pandemia, que es la obesidad.

Como se ha tendido a asociar a los edulcorantes calóricos más que a los hipocalóricos con ella, desde principios de los años sesenta se ha incrementado la comercialización de un cada vez mayor número de los edulcorantes hipocalóricos (como el acesulfamo de K, la sacarina y la stevia entre otros).

Particularmente los edulcorantes hipocalóricos, que han sido introducidos desde hace relativamente poco tiempo, han generado controversia sobre su uso ya que, si bien han sido establecidos los efectos de toxicidad aguda (FDA, 2014; EFSA, 2011) y algunos de los efectos a largo plazo como lo es su potencial carcinogénico, aún no se ha caracterizado por completo cuál

¹ Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA) y la hiperglucemia (Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. Lancet. 2005; 365:1415-1428)

es su influencia sobre el apetito, el balance de energía y el incremento de masa corporal entre otros (Carraro et al., 2016; Davidson et al., 2011; De Matos et al., 2013; Fujita et al., 2008; Soffritti et al., 2006, 2010, 2016; Swithers et al., 2009, 2013; Wang et al., 2016).

Algunos estudios señalan que los edulcorantes hipocalóricos afectan el equilibrio energético, aumentan el apetito y aumentan la ingesta energética, al no estimular la liberación de las hormonas intestinales de la saciedad como son el *GLP-1* y *GIP* (en inglés). De igual manera se les ha asociado a alteraciones en la lipogénesis (Carraro et al., 2016; Davidson et al., 2011; De Matos et al., 2013; Fujita et al., 2008; Swithers et al., 2009, 2013; Wang et al., 2016).

A continuación se presentan los fundamentos teóricos que dan la base para esta investigación y conducen a la hipótesis establecida, los objetivos y a la metodología empleada para alcanzarlos.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. EDULCORANTES

Los edulcorantes son sustancias de diversa naturaleza y estructura química que poseen la capacidad de provocar la sensación de dulzor en los alimentos. Una de las tantas maneras de clasificarlos es con base en su potencia y valor nutritivo (Baduí, 2006):

- 1) **Edulcorantes nutritivos o calóricos de poder edulcorante semejante a la sacarosa**
 - a) Monosacáridos y oligosacáridos: Sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, isomaltosa, miel de abeja, azúcar invertido, jarabe de maíz, etc.
 - b) Polioles: sorbitol, xilitol, isomaltitol, maltitol, manitol, etcétera.

- 2) **Edulcorantes de mayor poder edulcorante que la sacarosa o hipocalóricos**
 - a) Sintéticos: Acesulfamo K, aspartamo, ciclamato, sacarina, sucralosa, alitame, dulcina.
 - b) De origen vegetal: glucósidos de esteviol, taumatina, monelina, miraculina, glicirricina, etc.

2.1.1. Edulcorantes calóricos

2.1.1.1 Sacarosa

La sacarosa es el azúcar de mesa, también conocida como el azúcar de caña o remolacha. Químicamente es un disacárido formado por la fructosa y glucosa unidos mediante un enlace glucosídico (β -D-fructofuronosil- α -D-glucopiranososa). Su estructura química se muestra en la Figura 2.1 (Varzakas, 2012).

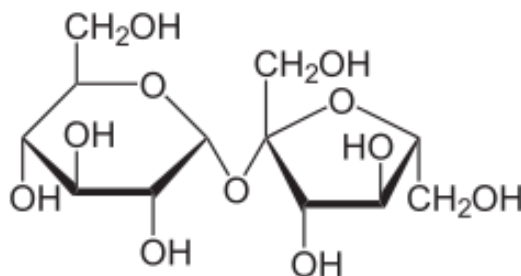


Figura 2.1 Estructura química de la sacarosa (Varzakas, 2012)

La sacarosa abunda de forma natural en casi todas las frutas, en algunas raíces (como la remolacha), en ciertos granos y en algunas leguminosas, además del pasto gigante, la caña de azúcar. Su concentración varía en gran medida en los alimentos según la madurez del producto. (Valdés-Martínez, 2006).

La sacarosa es hidrolizada mediante la acción de enzimas intestinales como la sacarasa, a los dos monosacáridos correspondientes: glucosa y fructosa. La glucosa entra en las rutas metabólicas de la glucólisis y del ciclo de Krebs dentro de la mitocondria para producir finalmente ATP, mientras que la fructosa puede seguir la rutas catabólicas (degradación hasta CO_2 , H_2O y ATP) o anabólicas (síntesis de ácidos grasos) (Fox, 2011).

2.1.1.2 Fructosa

La fructosa es un monosacárido. Su estructura química se muestra en la Figura 2.2, se encuentra presente en una gran cantidad de frutas. Por ejemplo, la pera y la manzana contienen 7 y 6% de fructosa, respectivamente. De igual manera, la fructosa se encuentra presente en cantidades abundantes en la miel de abeja, entre un 28 y 44%. También es conocida como el azúcar de las frutas. Además de las fuentes naturales, industrialmente es producida cuando se hidroliza la sacarosa o bien, cuando se trata el jarabe de almidón de maíz con enzimas glucoisomerasas. Debido a su mayor poder edulcorante (de 1.2 a 1.5 veces el de la sacarosa), su alta solubilidad y por ser considerado el más higroscópico de los monosacáridos, es ampliamente utilizado en la industria alimentaria (Ramírez-Gómez y Orozco-Sánchez, 2011).

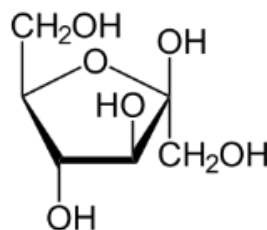


Figura 2.2 Estructura química de la fructosa (White y Osberger, 2011)

La fructosa es absorbida por el epitelio intestinal y trasladada hasta el hígado en donde se lleva a cabo su metabolismo. En las células del hígado es fosforilada mediante una fructocinasa. Después se escinde por las aldosas presentes en el hígado, las triosas resultantes pueden utilizarse para la gluconeogénesis, la glucogénesis o la lipogénesis. También puede sufrir fosforilación por parte de la hexocinasa o la fructocinasa, originando a la fructosa-6-fosfato y la fructosa-1-fosfato, la fructosa-1-fosfato tiende a incorporarse a la ruta de la lipogénesis, mientras que la fructosa-6-

fosfato puede incorporarse en la glucólisis. Sin embargo, la fructocinasa presenta mayor afinidad por la fructosa que la hexocinasa (White y Osberger, 2011). En la Figura 2.3 se ilustra de manera general el metabolismo de la fructosa en el hígado (Hui et al., 2014).

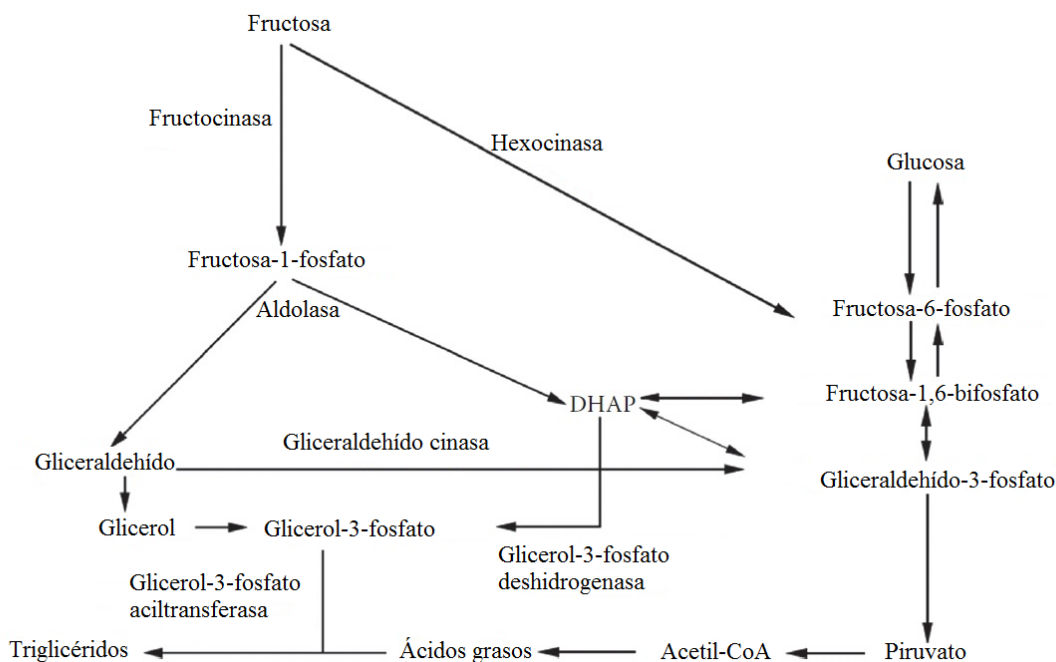


Figura 2.3 Metabolismo de la fructosa (Hui et al., 2014)

2.1.1.3 Glucosa

La glucosa es un monosacárido conocido como dextrosa, debido a que es dextrorrotatoria. La glucosa es el monosacárido más abundante de la naturaleza; se encuentra en diferentes frutas como las manzanas, las fresas, las peras, etc., también está presente en una gran cantidad de hortalizas. Otro producto rico en glucosa es la miel de abeja, la cual contiene hasta un 40% de esta sustancia. La glucosa que se emplea comercialmente en diversos productos es obtenida mediante reacciones de hidrólisis controladas del almidón, utilizando para ello amilasas y otras enzimas diversas. Su estructura química se muestra en la Figura 2.4 (Valdés-Martínez, 2006).

2.1.2 Edulcorantes hipocalóricos

2.1.2.1 Acesulfamo de potasio

El acesulfamo de potasio (acesulfamo K) fue descubierto accidentalmente por Karl Clauss. Químicamente se trata de un dióxido de dihidro-oxatiazinona y su estructura se muestra en la Figura 2.5 (Haber et al., 2012).

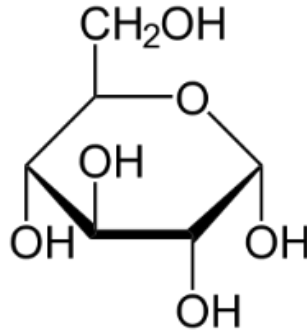


Figura 2.4 Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)

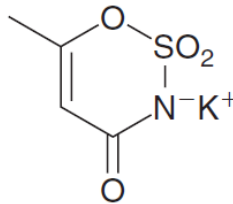


Figura 2.5 Estructura química del acesulfamo de potasio (Haber et al., 2012)

Su síntesis se lleva a cabo por la reacción del ácido sulfónico con una dicetona dando lugar al ácido acetoacetamido-N-sulfónico, el cual se cicla en presencia de trióxido de azufre al anillo de acesulfamo.

El acesulfamo de K es aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa, aunque su dulzor es percibido rápidamente como desagradable debido a que presenta un resabio amargo-metálico. Por ello es que este edulcorante no se emplea de manera aislada, sino en combinación con algún otro edulcorante debido a los efectos sinérgicos que presentan las mezclas resultantes, tratando de enmascarar el resabio desagradable del acesulfamo de potasio. Por ejemplo, la mezcla de aspartamo y acesulfamo de potasio, presenta una sinergia del 40-50%, mientras que la mezcla de aspartamo, acesulfamo de potasio y el ciclamato presentan una sinergia del 90%. La primera de estas mezclas es la más comercializada (Haber et al., 2012).

Presenta una excelente solubilidad (270 g/L a 20°C) y una gran estabilidad térmica. Se descompone a 225°C. Tiene estabilidad a valores de pH ácidos, por lo que es adecuado para

diversos productos, como productos de panificación, bebidas carbonatadas no alcohólicas, gomas de mascar, jugos, batidos de proteínas, etc. (Lipinski y Hanger, 2011).

De acuerdo con el Comité Mixto *FAO/OMS* de Expertos en Aditivos Alimentarios (*JECFA*, en inglés) su ingesta diaria admisible (*ADI*) es de 0-15 mg/kg de masa corporal/día. La *FDA* de los EE.UU. establece el mismo valor. Sin embargo, el Comité Científico para Alimentos de la Unión Europea (*SCF*) establece un *ADI* de 9 mg/kg de masa corporal/día (Haber et al., 2012).

2.1.2.2 Aspartamo

El aspartamo fue descubierto en 1965 por G. D. Searle y James Schlatter. Químicamente se trata del metil éster del dipéptido formado por el ácido aspártico y la fenilamina y su estructura se muestra en la Figura 2.6 (O'Donell, 2012).

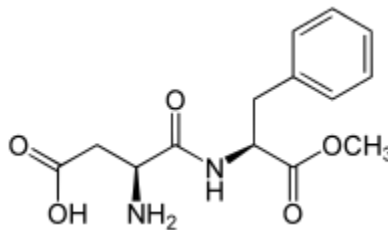


Figura 2.6 Estructura del aspartamo (O' Donell, 2012)

Su síntesis se lleva a cabo mediante métodos enzimáticos patentados por diversas corporaciones. El aspartamo es de 180-200 veces más dulce que la sacarosa. A diferencia de otros edulcorantes presenta un sabor dulce limpio y su intensidad máxima de dulzura es equivalente a soluciones de sacarosa del 12-14%. El aspartamo desafortunadamente no es estable a las altas temperaturas. Además, tampoco es muy estable con respecto del pH. Su pH óptimo en soluciones acuosas es de 4-6. (O'Donell, 2012).

En el organismo humano, el aspartamo sí es metabolizado, llevándose a cabo su hidrólisis y dando lugar a los dos aminoácidos que lo conforman: el ácido aspártico y la fenilalanina. La ruta completa del metabolismo del aspartamo se muestra en la Figura 2.7 (O'Donell, 2012). Actualmente está aprobado su uso por agencias regulatorias de más de 100 países, aunque su empleo sigue siendo muy debatido debido a diversos estudios que muestran posibles efectos adversos debido a su consumo (Abhilash et al., 2015; Ashok et al., 2015; Soffritti et al., 2006;

Soffritti et al., 2010). Además, se ha señalado que el consumo de aspartamo es capaz de alterar la microbiota intestinal (Palmnäs et al., 2014). Su ingesta diaria admisible, de acuerdo con la FDA, es de 50mg/kg de masa corporal, mientras que la FAO ha establecido una IDA de 40 mg/kg de masa corporal (Buchko et al., 2011).

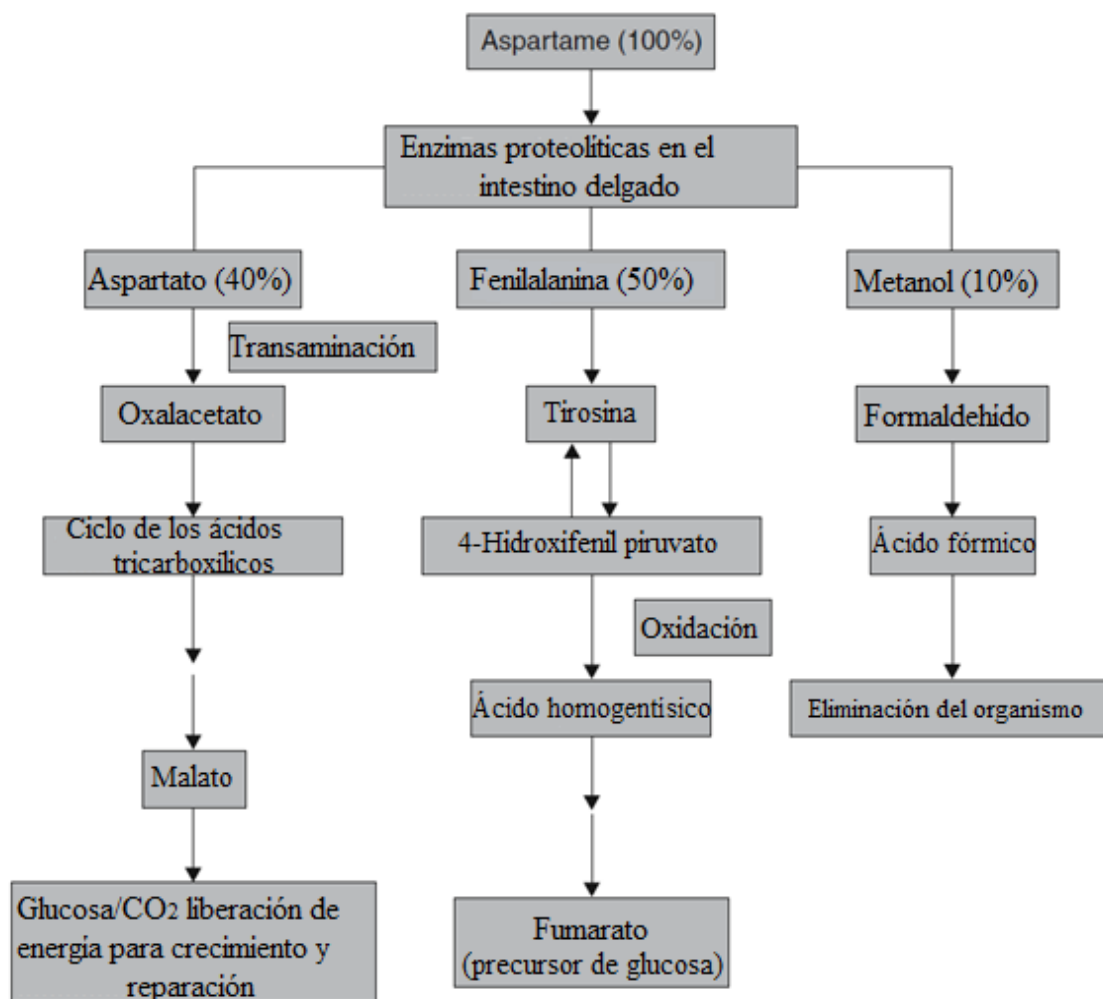


Figura 2.7 Metabolismo del aspartamo (O'Donell, 2012)

2.1.2.3 Sucralosa

La sucralosa fue descubierta en la década de 1970. Es el resultado de la cloración selectiva de la sacarosa. Su nombre químico es 4-cloro-4-desoxi- α -D-galactopiranosido de 1,6-dicloro-1,6-didesoxi- β -D-fructofuranosilo, su estructura se muestra en la Figura 2.8 (Goldsmith y Merkel, 2011).

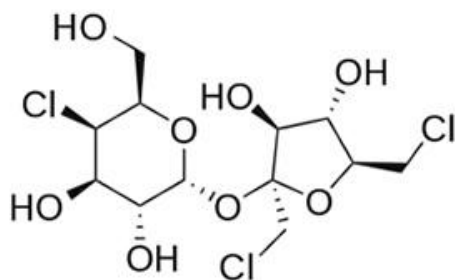


Figura 2.8 Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)

La cloración de la molécula de sacarosa le otorga una gran estabilidad, así como un incremento sustancial de su poder edulcorante, pues la sucralosa es 600 veces más dulce que la sacarosa. Además, su dulzor es limpio y no presenta resabio después de su ingesta. La estabilidad de la sucralosa es de las mayores presentes en los edulcorantes, ya que es estable a temperaturas elevadas, lo cual permite su uso en productos horneados, además de que es resistente a diversas variaciones de pH. Esta cloración impide que la sucralosa reaccione con otros componentes presentes en las matrices alimentarias (Goldsmith y Merkel, 2011).

La sucralosa en su mayor parte pasa a través del cuerpo sin ser metabolizada, 85 % es eliminada a través de las heces sin cambio alguno mientras que el 15% restante sí es absorbido por el tracto gastrointestinal y entra a la circulación general para ser eliminada después por la orina. Solamente entre el 1-5% de la sucralosa que es ingerida aparece en la orina en forma de glucuronatos conjugados (Molinary y Quinlan, 2012).

La sucralosa se encuentra aprobada en más de 100 países. A pesar de ello aún existe controversia respecto a su uso, Wang et al (2016) indicaron que la sucralosa promueve una mayor ingesta de alimentos a través del neuropéptido “Y” y la respuesta neurológica al ayuno. La JECFA establece una ADI de 15 mg/kg de masa corporal (Molinary y Quinlan, 2012).

2.1.2.4 Glucósidos de esteviol

La planta *Stevia rebaudiana Bertoni* es una planta nativa de la parte norte de Paraguay y ha adquirido una gran importancia económica en los últimos años debido a su uso como sustituto del azúcar, aunque existe cierta controversia respecto a su uso (Lemus-Mondaca et al., 2012).

idéntico al de ADI. La FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) de igual manera establece una ADI de 4mg/kg de masa corporal para los esteviósidos con una pureza de $\geq 95\%$ (EU, 2011; FAO, 2010; FDA, 2015a,b).

De acuerdo con la FDA: “no se permite el uso de las hojas de stevia o los extractos crudos, ya que estas sustancias no han sido aprobadas como aditivos alimentarios. La FDA no considera que deban ser considerados como GRAS, debido a diversos reportes encontrados en la literatura. Entre los efectos reportados destacan alteraciones de los niveles de glucosa en sangre y efectos en los sistemas reproductor, cardiovascular y renal (Chen et al., 2005; Melis, 1992, 1995, 1996, 1999a, 1999b; Melis et al., 2009; Oliveira-Filho et al., 1989; Planas y Kuc, 1968). Las peticiones que la FDA ha recibido en el pasado no han contenido los datos y la información necesaria para establecer el uso seguro de estas sustancias como ingredientes en los alimentos” (FDA, 2015b).

2.1.2.5 Sacarina

La sacarina fue descubierta desde 1879 por Remsen y Fahlberg, pero fue hasta la década de 1950 cuando comenzó su comercialización como sustituto del azúcar. Químicamente la sacarina es una N-sulfonil-amida, su estructura se muestra en la Figura 2.10 (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011).

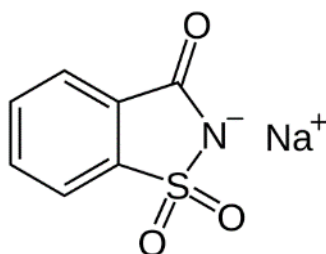


Figura 2.10 Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011)

Comercialmente se emplean las sales de sodio o calcio debido a su elevada solubilidad. Se utilizó frecuentemente mezclada con el ciclamato debido al potente efecto sinérgico observado. La sacarina es 300 veces más dulce que la sacarosa y se puede disolver en agua en concentraciones de hasta el 7% (m/v). Desafortunadamente, a determinadas concentraciones, cierto porcentaje de la población percibe un resabio amargo. Es por ello que la sacarina no se utiliza muy frecuentemente de manera aislada en los productos comerciales, sino en combinación con otros edulcorantes hipocalóricos de alta intensidad como el ciclamato, el aspartamo, el alitame y la

sucralosa, con los cuales presenta un efecto sinérgico del dulzor (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011; Dubois, 2012). La sacarina y sus respectivas sales son estables a largos periodos de almacenamiento incluso por varios años. Las soluciones acuosas de sacarina tienen además una gran estabilidad a un amplio rango de valores de pH del medio, así como a elevadas temperaturas (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011).

Dadas las características anteriores la sacarina es utilizada en diversos productos alimentarios tales como jugos de frutas, bebidas carbonatadas no alcohólicas, frutas procesadas, gomas de mascar, gelatinas, helados, así como en las pastas dentales. La sacarina, según sus fabricantes, no es metabolizada por los humanos, es absorbida en un 95% en el intestino delgado. La mayoría de los bioensayos de biotransformación concluyen que la sacarina es excretada de forma inalterada principalmente por la orina. El 5% es excretado a través de las heces (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011; Dubois 2012). Actualmente la *ADI* establecida por la *FDA* (*U.S. Food Drug Administration*) es de 5 mg/kg de masa corporal.

Sin embargo, la controversia acerca de su uso aún sigue. Los experimentos de Suez et al. (2014) concluyeron que la sacarina producía intolerancia a la glucosa debido a la alteración de la microbiota intestinal. Por otro lado, Swithers et al. (2009), encontraron que las ratas que eran alimentadas con sacarina, tenían un mayor aporte energético comparado con las ratas que ingerían glucosa.

2.1.2.6 Mezcla aspartamo: acesulfamo de potasio

Existen algunas mezclas de edulcorantes que presentan el fenómeno de sinergia, es decir, el dulzor que se obtendría de sus respectivas mezclas es mucho mayor a la simple suma de sus valores individuales, existiendo un incremento exponencial en el dulzor de estas mezclas. La mezcla más empleada a nivel comercial es la de aspartamo con acesulfamo debido a que presenta un poder edulcorante de 300 veces el de la sacarosa, inclusive a altas concentraciones (Klug y von Rymon-Lipinski, 2011).

Las hormonas incretinas son hormonas producidas en el tracto gastrointestinal en respuesta a la ingesta de nutrientes y se ha sugerido que en respuesta a los edulcorantes. Tienen efecto sobre las

células de los islotes pancreáticos e intervienen en la liberación de insulina y la homeostasis de glucosa. En la siguiente sección se habla acerca de ellas.

2.2 HORMONAS INCRETINAS

Las incretinas son hormonas intestinales secretadas por las células enteroendocrinas al torrente sanguíneo poco tiempo después de la ingesta de alimentos. Uno de sus diversos roles fisiológicos es regular la cantidad de insulina que es secretada después de la ingesta de alimentos (Kim y Egan, 2008).

Modelos experimentales en roedores concluyeron que el polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (*GIP* en inglés) y el péptido semejante al glucagón tipo I (*GLP-1* en inglés) eran los polipéptidos responsables del efecto incretino (mayor respuesta a la insulina con carga oral de glucosa contra carga intra venosa) (Dupre et al., 1973; Schmidt et al., 1985).

Ambas comparten un mismo mecanismo de acción similar en el páncreas y ambas son rápidamente desactivadas por una enzima llamada dipeptidil peptidasa 4 (*DPP4* por sus siglas en inglés) (Kim y Egan, 2008).

2.2.1 Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (*GIP*)

2.2.1.1 Síntesis de *GIP*

La primera incretina descrita fue la hormona *GIP*, la cual es un polipéptido de 42 aminoácidos derivado del procesamiento postraducciona l de un polipéptido precursor de 153 aminoácidos codificado por el gen *GIP*. La hormona *GIP* se sintetiza y se libera en respuesta a los nutrimentos, por las células K enteroendocrinas que se encuentran en la mucosa del duodeno y en el yeyuno (Kim y Egan, 2008).

Los carbohidratos y las grasas son estimulantes de la secreción de *GIP*, mientras que los aminoácidos estimulan débilmente su secreción. No todos los carbohidratos estimulan la secreción de *GIP*, mientras que la sacarosa, la galactosa y especialmente la fructosa estimulan su secreción, no así la manosa (Baggio y Drucker, 2007).

2.2.1.2 Acción de *GIP* en páncreas

Estudios han demostrado que estimula la secreción de insulina dependiendo de la glucosa, el llamado efecto incretino. Estas acciones ocurren a niveles fisiológicos de *GIP*. En ayuno los niveles circulantes de *GIP* son bajos (20-25 pmol/L) con respecto a los alcanzados después de la ingesta de alimentos (60-70pmol/L). La liberación de *GIP* en el torrente sanguíneo es estimulada por la ingesta de alimentos ricos en glucosa y grasas, pero en ausencia de carbohidratos la grasa no es capaz de estimular la secreción de *GIP* en niveles suficientes como para lograr la secreción de insulina (Kim y Egan, 2008). La unión de *GIP* a sus receptores *GIPR* en las células β pancreáticas estimula la liberación de insulina contenida en los gránulos. El receptor de *GIP* es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G y consta de 7 dominios transmembranales. (Kim y Egan, 2008). La Figura 2.11 ilustra el proceso que conlleva a la liberación de insulina mediada por *GIP*.

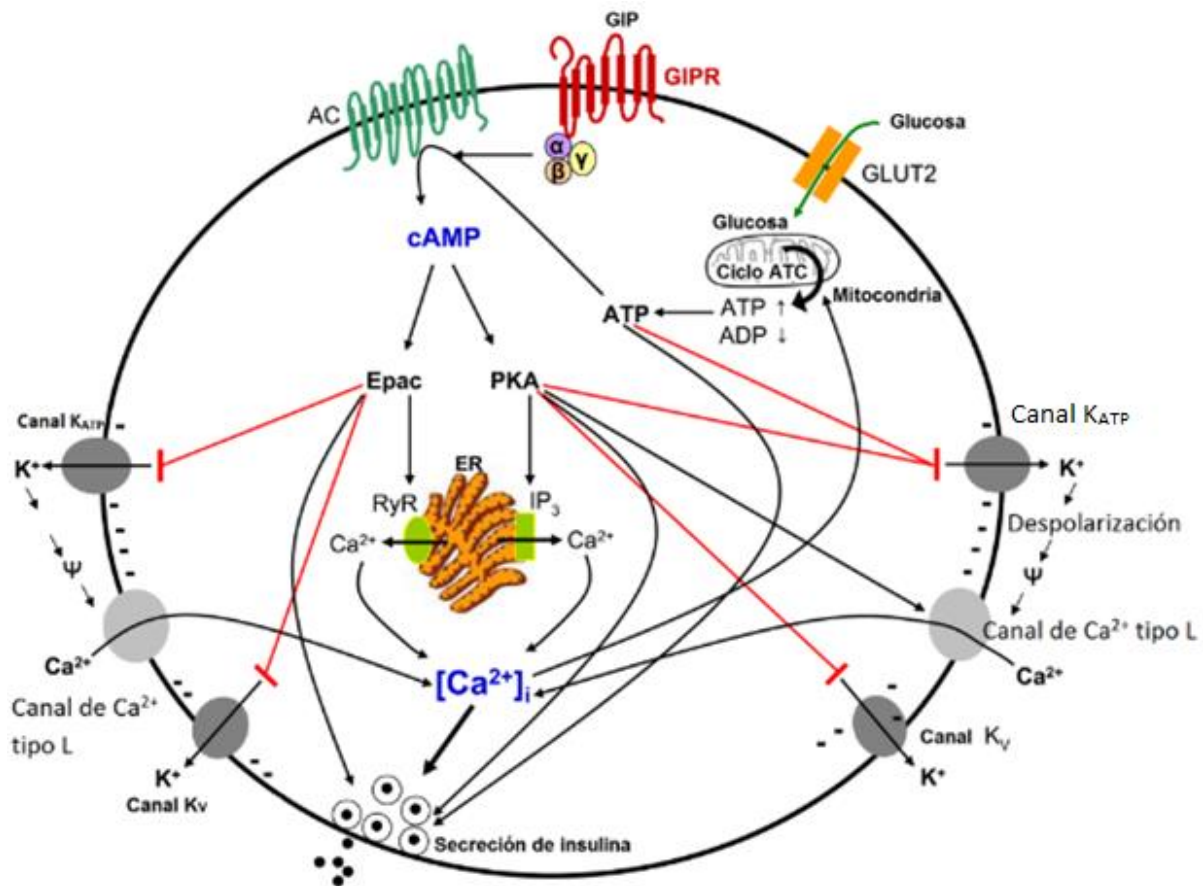


Figura 2.11 Representación esquemática de principales eventos moleculares durante la secreción de insulina inducida por la incretina *GIP*, desde una célula β pancreática (Modificado de Kim y Egan, 2008)

2.2.1.3 Efectos extrapancreáticos de la hormona *GIP*

Adicionalmente al efecto insulínico, la hormona *GIP* en los adipocitos, los cuales tienen receptores para *GIP*, estimula la lipogénesis y estimula la actividad de la lipoproteína lipasa. Modula la síntesis de ácidos grasos. En el páncreas promueve la proliferación de células β y reduce su apoptosis (Renner et al., 2016). En la Figura 2.12 se ilustra los efectos de la hormona *GIP* sobre los tejidos periféricos.

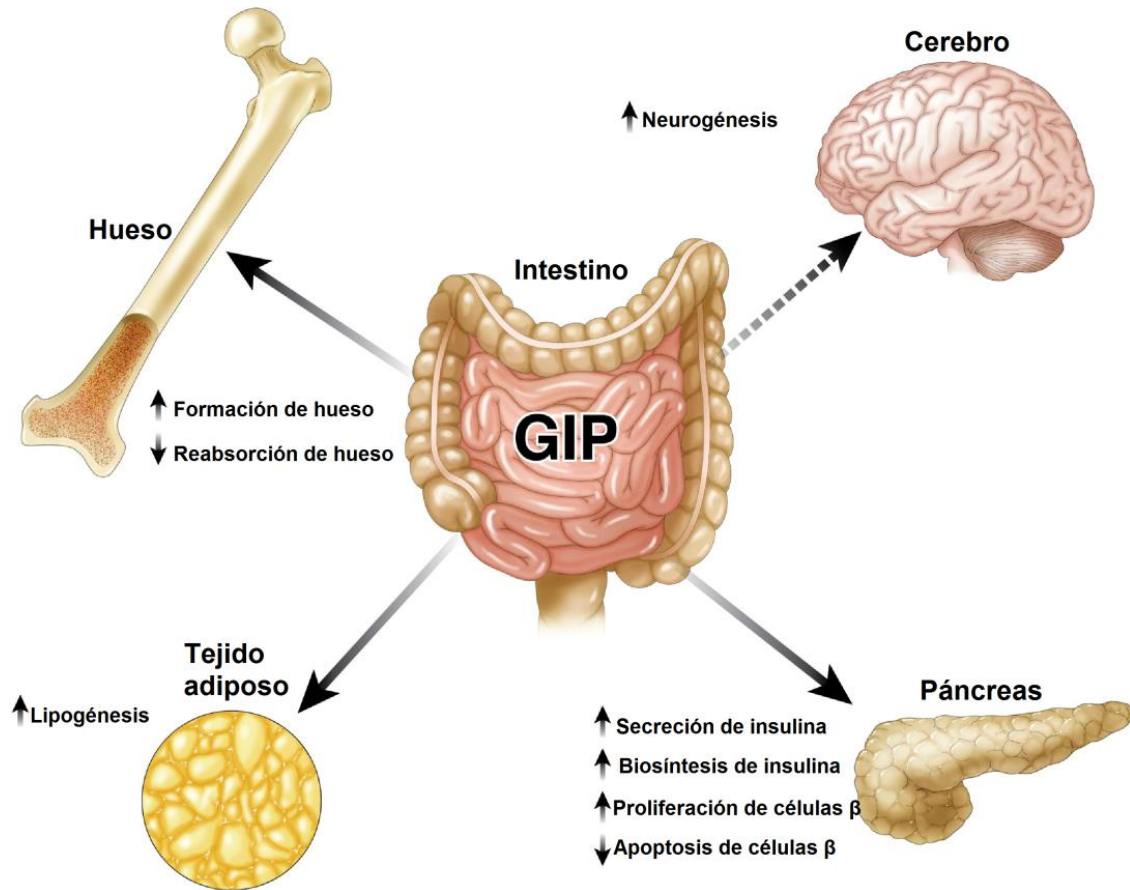


Figura 2.12 Efectos del *GIP* en tejidos periféricos (Modificado de Baggio y Drucker, 2007)

En el sistema nervioso central la hormona *GIP* se expresa en el hipocampo. La expresión del receptor de *GIP* es detectable en varias regiones del cerebro incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo y el bulbo olfatorio. Los estudios de Nyberg et al. (2005) encontraron que la administración de *GIP* exógeno induce la proliferación de células progenitoras en el hipocampo *in vivo* en ratas, así como *in vitro* en cultivos de células humanas.

La hormona *GIP* está involucrada en el metabolismo de lípidos y en el desarrollo de la obesidad. En humanos, la ingesta de grasa y de carbohidratos son estimuladores de la secreción de *GIP*. Los efectos anabólicos del *GIP* incluyen la estimulación de la síntesis de ácidos grasos, su re-esterificación, lo cual mejora la incorporación estimulada por insulina de ácidos grasos a triglicéridos, regula la síntesis de lipoproteínlipasa y reduce la lipólisis estimulada por glucagón. Sin embargo, pacientes con diabetes tipo II son resistentes a los efectos insulínotropicos del *GIP* exógeno (Baggio y Drucker, 2007).

2.2.2 Péptido similar al glucagón tipo 1 (*GLP-1*)

2.2.2.1 Síntesis del péptido similar al glucagón tipo 1 (*GLP-1*)

La hormona *GLP-1* es un producto de escisión resultante de las modificaciones postraduccionales del proglucagón. Estas modificaciones son llevadas a cabo por la convertasa de prohormona 1/3 (*PC1/3*) (Ugleholdt et al., 2006). El resultado de estas modificaciones postraduccionales es un péptido que potencialmente estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa. El gen codificante proglucagón, codifica para el glucagón y para otro péptido, el *GLP-2*, pero este último carece de la actividad insulínótropica propia de la hormona *GLP-1*. Tanto el *GLP-1* como el *GLP-2* son producidos mayoritariamente en las células neuroendocrinas L que se encuentran dispersas entre los enterocitos, a lo largo de todo el intestino delgado. Están en mayor concentración en el íleon, en donde se secretan al torrente sanguíneo como respuesta a la ingesta de alimentos (Asmar y Holst, 2010; Kim y Egan, 2008; Marathe et al., 2013). El principal estímulo fisiológico para la secreción de la hormona *GLP-1* está relacionado a las dietas ricas en grasas y carbohidratos; sin embargo, algunas sustancias individuales como la glucosa, los edulcorantes, ciertos ácidos grasos y la fibra dietética también estimulan su secreción. Adicionalmente, la leptina es otro estimulante para la secreción de *GLP-1* (Baggio y Drucker, 2007).

2.2.2.2 Acción de *GLP-1* en el páncreas

El receptor de *GLP-1* es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G y consta de 7 dominios transmembranales. La unión del *GLP-1* a su receptor en las células β -pancreáticas conduce a una cascada de reacciones muy similares a las que provoca el *GIP*, las cuales conllevan finalmente a un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Estos incrementos de

Ca^{2+} conducen a la fusión de las vesículas contenedoras de insulina con la membrana plasmática, dándose lugar a la exocitosis de la insulina (Baggio y Drucker, 2007).

El *GLP-1* actúa sinérgicamente con la glucosa para promover la transcripción del gen de insulina, mejora la capacidad de las células β -pancreáticas de evaluar y responder a la glucosa. Además, se ha estudiado que el *GLP-1* inhibe la secreción y estimula la secreción de somatostatina (Drucker, 2006).

2.2.2.3 Efectos extrapancreáticos de la hormona *GLP-1*

Estudios en roedores han demostrado que la administración de *GLP-1* reduce a corto plazo la ingesta de alimento y bebida, además de promover la saciedad y de disminuir la ingesta calórica, debido a la interacción de *GLP-1* con su receptor en las células de los centros hipotalámicos del sistema nervioso central (Meeran et al., 1999; Szayna et al., 2000; Tang-Christensen et al., 1996; Turton et al., 1996). En hepatocitos y en el músculo esquelético de ratas se ha observado que incrementa la transformación de glucosa a glucógeno. En hepatocitos el *GLP-1* inhibe la gluconeogénesis y estimula la adsorción de glucosa en el tejido adiposo y en músculo. En roedores el *GLP-1* tiene efectos lipolíticos. En el caso de los humanos se ha observado que tiene tanto efectos lipolíticos como lipogénicos (Baggio y Drucker, 2007).

2.3 LIPOGÉNESIS

La lipogénesis es una vía metabólica que sintetiza ácidos grasos a partir de un exceso de carbohidratos. Estos ácidos grasos pueden ser incorporados en forma de triglicéridos como moléculas de almacenamiento de energía. Estos procesos ocurren principalmente en el hígado y en el tejido adiposo. El flujo de carbono de la glucosa hasta los ácidos grasos involucra una serie de muchas y coordinadas reacciones enzimáticas. La glucosa al oxidarse provee dos moléculas de piruvato. El piruvato ingresa a la mitocondria y da origen al acetil-coenzima A. Este último se une al oxalacetato para dar origen al citrato gracias a la acción de la citrato sintasa. Al existir exceso de ATP, este citrato es transportado al citosol en donde se da la conversión del citrato a acetil coenzima A y oxalacetato por acción de la enzima citrato liasa (Ameer et al., 2014).

El acetil-coenzima A es carboxilado a malonil coenzima A por la acetil coenzima A carboxilasa (ACC). El producto principal de la lipogénesis es el palmitato. También se produce el estearato

ácidos de cadena corta. Las cadenas carbonadas largas de los ácidos grasos se forman mediante una secuencia repetida de reacciones catalizadas por la enzima ácido graso sintasa (*FAS*) en cuatro etapas: (1) La condensación de un grupo acilo activado y dos carbonos provenientes del malonil-Coenzima A, con la eliminación de CO_2 , extendiéndose la cadena dos carbonos. (2) El grupo β -ceto se reduce a alcohol. (3) La eliminación de H_2O , origina un doble enlace. Y (4) el doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilosaturado a partir del cual, se vuelve a repetir el proceso hasta cumplir 7 ciclos que dan origen al ácido palmítico. Este, es liberado por la acción de la tioesterasa (Nelson y Cox, 2009).

La mayor parte de los ácidos grasos sintetizados (así como los ingeridos) tienen alguno de estos dos destinos: incorporación en triglicéridos para el almacenamiento de energía o incorporación en los fosfolípidos componentes de la membrana. El reparto entre estos destinos depende del estado del organismo.

Los precursores de los triglicéridos son los acil graso-CoA y el L-glicerol 3-fosfato. El L-glicerol-3-fosfato procede de la dihidroxiacetona fosfato (*DHAP* en inglés) generada en la glucólisis por la acción de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. El primer paso en la biosíntesis de los triglicéridos es la acilación de los dos grupos hidroxilos libres del L-glicerol 3-fosfato por dos moléculas de acil graso-CoA para dar origen al ácido fosfatídico. Este ácido fosfatídico es hidrolizado por la ácido fosfatídico fosfatasa y forma el 1,2-diacilglicerol. Los diacilgliceroles son convertidos en triglicéridos por transesterificación con un tercer acil graso-CoA (Nelson y Cox, 2009).

2.3.1 Regulación de la lipogénesis

La lipogénesis esta regulada en varios niveles hormonales, nutricionales y transcripcionales, siendo el factor nutricional el más importante debido a que tambien regula los otros dos factores. La reacción catalizada por la acetil-coenzima A carboxilasa (*ACC*) es el paso limitante en la velocidad de biosíntesis de los ácidos grasos. La forma activa de la *ACC* es un estado desfosforilado. El glucagón y la adrenalina provocan la fosforilación de esta enzima, disminuyendo su actividad y favoreciendo la lipólisis. La insulina presenta el efecto contrario al glucagón y favorece la desfosforilación (forma activa) de la acetil-coenzima A carboxilasa favoreciendo la lipogénesis (Nelson y Cox, 2009).

Respecto al papel de los nutrientes, se sabe que la glucosa estimula la lipogénesis a través de varios mecanismos: Uno de ellos es proveer la fuente de carbono necesaria para la síntesis de los ácidos grasos. En segundo término, la glucosa estimula la expresión de las enzimas involucradas en la lipogénesis. Este efecto es regulado principalmente por la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*, por sus siglas en inglés). Los elementos de respuesta a carbohidratos (*ChoREs*, por sus siglas en inglés), se encuentran presentes en las regiones promotoras de los genes de varias enzimas lipogénicas y regulan su sensibilidad ante la glucosa (Ameer et al., 2014).

Los niveles de glucosa regulan a su vez la liberación de insulina. El efecto de la insulina sobre la expresión de los genes se controla principalmente por la proteína de unión al elemento regulador del esterol (*SREBP-1*, por sus siglas en inglés). La insulina estimula y regula su exportación del retículo endoplasmático al núcleo en donde se une a los elementos reguladores de esterol, presentes en los genes diana (Ameer et al., 2014).

La leptina, producida principalmente por los adipocitos, también está involucrada en la regulación de la lipogénesis. La leptina es una señal de retroalimentación negativa, regulando la masa del tejido adiposo, por lo que altas concentraciones de leptina reducen la expresión de *SREBP-1*, lo cual a su vez suprime la expresión de ciertas enzimas involucradas en la lipogénesis (Ameer et al., 2014).

2.3.2 Regulación transcripcional de la lipogénesis

A largo plazo muchas de las enzimas de las que se encuentran involucradas en la lipogénesis y la síntesis de ácidos grasos son reguladas de manera transcripcional. La activación transcripcional de los genes lipogénicos es una serie de mecanismos complejos que involucran múltiples factores de transcripción en respuesta a las señales de la insulina y la glucosa.

La insulina activa quinasas y fosfatasas específicas que modifican los factores de transcripción como los factores estimulantes corriente arriba (*upstream-stimulatory factors USFs* en inglés), la proteína de unión al elemento regulador del esterol 1c (*SREBP-1c* en inglés), la proteína de unión

al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP* en inglés) y los receptores hepáticos X (*LXR*s en inglés), entre otros (Wang et al., 2015).

2.3.2.1 Proteína de unión al elemento regulador del esterol 1c (*SREBP-1c*)

La familia de las proteínas de unión al elemento regulador del esterol, son factores de transcripción que consisten en *SREBP-1a*, *SREBP-1b* y *SREBP-2*, codificados por los genes *SREBF-1* y *SREBF-2*. Los *SREBPs* difieren en su expresión específica en cada tejido y la selectividad de los genes diana. Por ejemplo, *SREBP-1c* predomina en el hígado, mientras que *SREBP-1a* y *SREBP-2* son expresados en todos los tejidos. La proteína *SREBP-1c* juega un rol fundamental en la activación transcripcional de los genes codificantes para enzimas involucradas con la lipogénesis (Raghow et al., 2007).

La transcripción de los genes *SREBF1* y *SREBF2* está regulada en el tejido adiposo, el hígado y el músculo esquelético. La insulina es un regulador de la expresión del gen de *SREBP-1c*. Por otra parte, la expresión es suprimida por el glucagón, los ácidos grasos poliinsaturados (*PUFAS* en inglés). La proteína *SREBP-1c* también es activada por los receptores X hepáticos (*LXR*, por sus siglas en inglés) (Raghow et al., 2007). En la Figura 2.13 se observa la interacción de los diferentes factores de transcripción *SREBP-1c*, *ChREBP* y *LXR*, sobre el control de la glucólisis y la lipogénesis.

La proteína *SREBP-1c* reside en la membrana del retículo endoplasmático. La insulina activa a *SREBP-1c* a través de mecanismos que involucran su fosforilación por parte de la serina/treonina proteína cinasa. La fosforilación de *SREBP-1c* facilita su traslado al aparato de Golgi, en donde sufre la escisión necesaria para ser trasladado al núcleo en donde se une a los elementos de regulación del esterol presentes en la región promotora de los genes codificantes de las enzimas involucradas en la lipogénesis (Wang et al., 2015).

La proteína *SREBP-1c* induce la expresión de los genes lipogénicos y glucolíticos, que intervienen en la lipogénesis *de novo*. Entre las enzimas que induce su transcripción se encuentran las siguientes: la glucoquinasa (*GK* en inglés), la piruvato quinasa hepática (*L-PK* en inglés), la ATP-citrato liasa (*ACL* en inglés), la acetil-coenzima A carboxilasa (*ACC*), la ácido

graso sintasa (*FAS*), la elongasa de ácidos grasos 6 (*ELOVL6* en inglés), la estearoil coenzima A desaturasa 1 (*SCD1*) y la lipina-1 (López-Oliva y Muñoz, 2014).

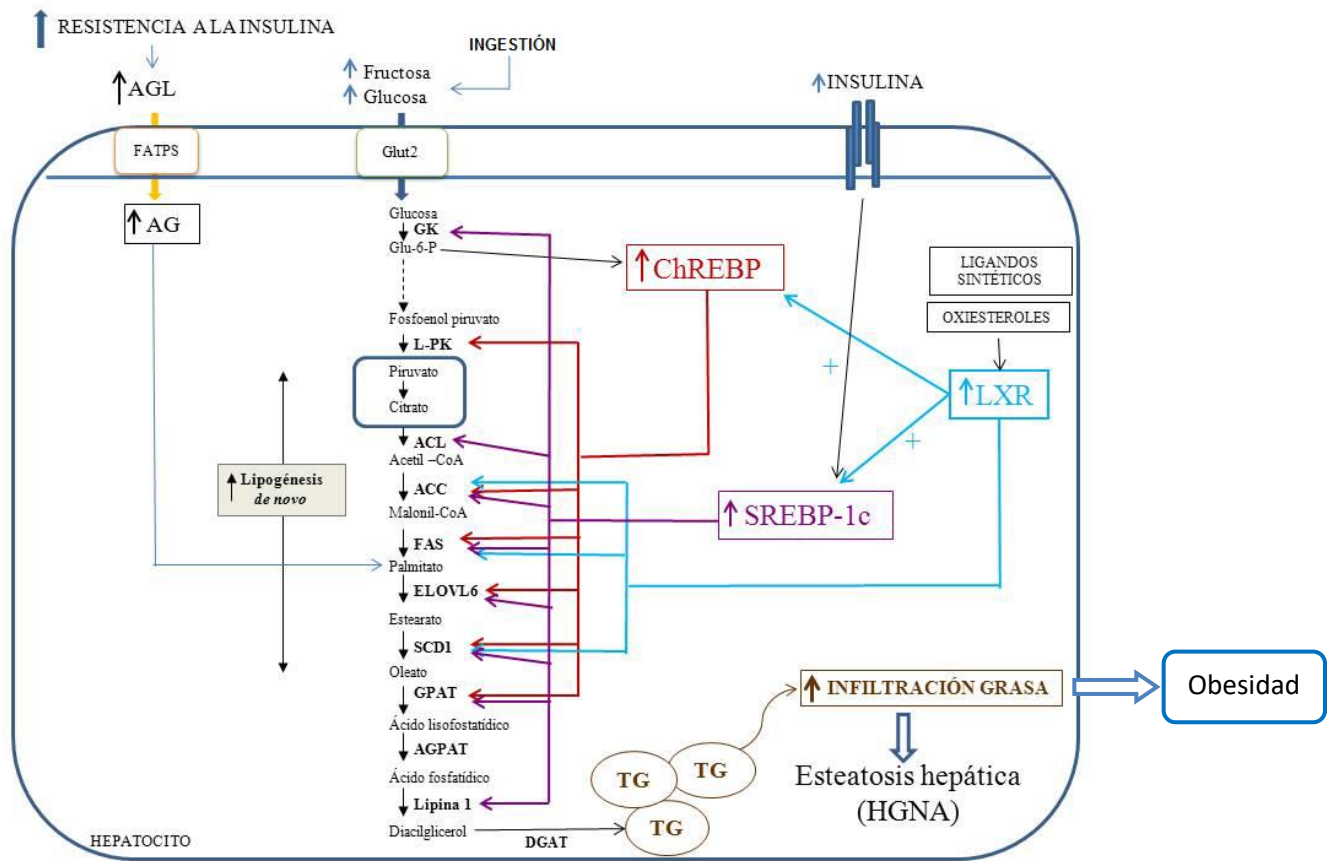


Figura 2.13 Interacción funcional entre los factores de transcripción *SREBP-1c*, *ChREBP-1* y *LXR* en la lipogénesis (López-Oliva y Muñoz, 2014)

2.3.2.2 Proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos (*ChREBP*)

El efecto de la glucosa sobre la expresión de los genes lipogénicos está regulado principalmente por la proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos (*ChREBP* en inglés). La activación de *ChREBP* conduce a su traslado al interior del núcleo, en donde se une a los elementos de respuesta de los carbohidratos (*ChoREs* en inglés). Los elementos de respuesta a los carbohidratos están presentes en las regiones promotoras de muchos genes codificantes de enzimas involucradas en la lipogénesis y regulan la respuesta a los cambios en la concentración de glucosa (Ameer et al., 2014).

En el hígado la expresión de *ChREBP* es baja durante el ayuno y es inducida en respuesta a dietas ricas en carbohidratos, pero no es inducida por ácidos grasos. *ChREBP*, al igual que *SREBP-1c*, es un factor de transcripción. Los metabolitos derivados de la glucosa que se ha sugerido que activan a *ChREBP* son glucosa-6-fosfato (*G6P* en inglés), xilulosa-5-fosfato (*X5P* en inglés) y fructosa-2,6-bifosfato (*F2,6P*). Existen dos isoformas de *ChREBP*: *ChREBP-α* y *ChREBP-β*. Los metabolitos de la glucosa, anteriormente mencionados, estimulan la transcripción de *ChREBP-α*. Este último a su vez estimula la transcripción de *ChREBP-β*, el cual es un activador transcripcional mucho más potente. A pesar de ello tanto *ChREBP-α* y *ChREBP-β* son capaces de unirse a los *ChoREs* y de activar los genes de la lipogénesis (Baraille et al., 2015).

La xilulosa-5-fosfato (*X5P* en inglés) y la glucosa-6-fosfato activan selectivamente a la fosfatasa 2A (*PP2A* en inglés). La fosfatasa 2A desfosforila a *ChREBP* en el residuo serina 196. Esta desfosforilación es necesaria para el traslado de *ChREBP* al núcleo. Una vez en el núcleo, sufre otra desfosforilación por parte de *PP2A*, pero ahora en el residuo treonina 666. Estas desfosforilaciones permiten su unión con los *ChoREs* (Baraille et al., 2015; Iizuka y Horikawa, 2008).

La proteína *ChREBP* contiene un módulo de detección de glucosa. Este módulo está conformado por dos partes, la primera de ellas es el dominio inhibitorio a baja glucosa (*LID*, *low glucose inhibitory domain* en inglés) y la segunda parte, es un elemento conservado de activación en respuesta a la glucosa (*GRACE* en inglés). *LID* es capaz de inhibir la actividad de *ChREBP* conferida por *GRACE*, por lo que el dominio *LID* es el determinante en la activación de *ChREBP*. La isoforma *ChREBP-β* sólo tiene el elemento de respuesta a la glucosa (*GRACE*). Es por ello que se sospecha que es regulado por *ChREBP-α*, el cual contiene tanto *LID* como *GRACE* (López-Oliva y Muñoz, 2014).

Se ha reportado que *ChREBP* es capaz de estimular la transcripción de los genes codificantes de las siguientes enzimas involucradas en la glucólisis y lipogénesis: la piruvato quinasa hepática (*LPK* en inglés), la acetil-CoA carboxilasa (*ACC* en inglés), la sintasa de ácidos grasos (*FAS* en inglés), la elongasa de ácidos grasos 6 (*ELOVL6* en inglés), la esteroil-coenzima-A desaturasa (*SCD1*) y la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (*GPAT* en inglés) (López-Oliva y Muñoz, 2014).

2.4 GRELINA

La grelina es una hormona peptídica gastrointestinal descubierta en 1999. En el año 2000, Mark Heiman y Matthias Tschöp, descubrieron que la grelina actúa en el cerebro, regulando la ingesta de alimentos, la masa corporal, la adiposidad y el metabolismo de la glucosa. Se encontró además que la grelina modula el metabolismo sistémico a través de la activación de los circuitos neurales orexigénicos (Müller et al., 2015). En años posteriores numerosas acciones fisiológicas fueron asociadas con la grelina (Figura 2.14).

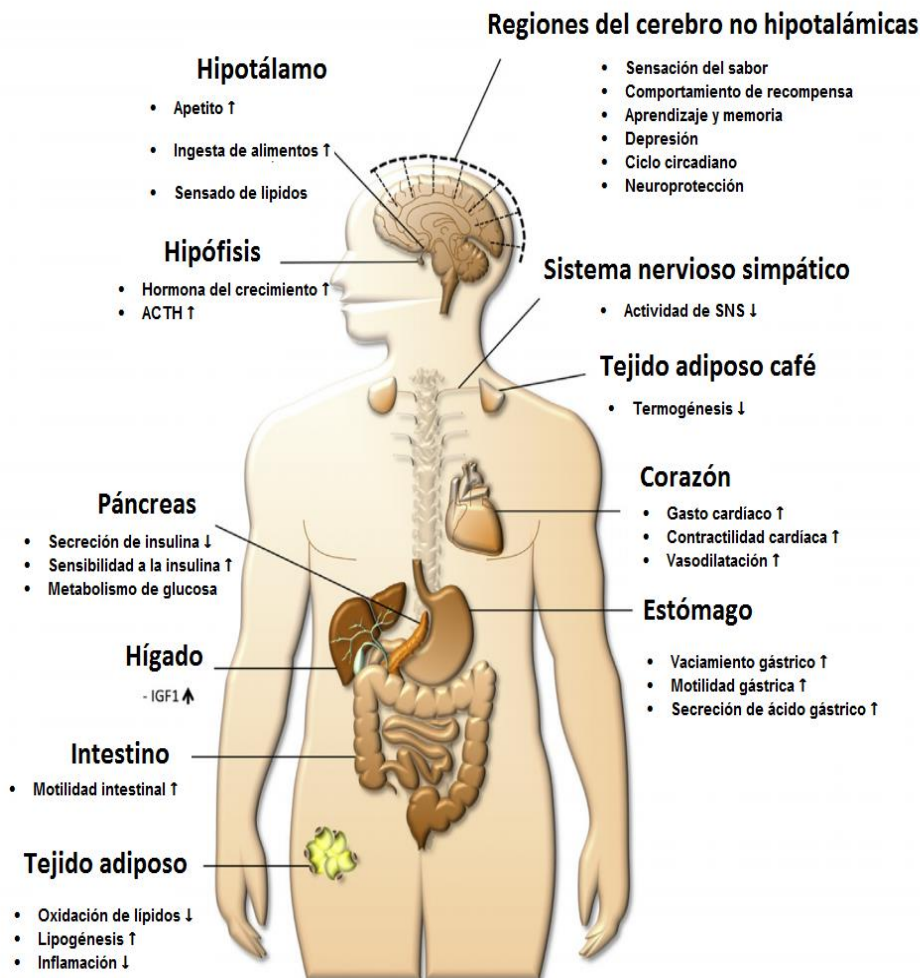


Figura 2.14 Representación esquemática de los efectos fisiológicos de la grelina (Müller et al., 2015)

Entre los efectos reportados se encuentran: la estimulación de la motilidad intestinal, secreción del ácido gástrico, la modulación del sueño, la sensación del gusto y la recompensa del comportamiento de búsqueda, regulación del metabolismo de la glucosa, la supresión de la termogénesis en el tejido adiposo pardo, modulación del estrés y la ansiedad y las funciones de

vasodilatación y contracción cardiaca (Asakawa et al., 2001; Cai et al., 2013; Druce et al., 2005; Nagaya et al., 2004; Okumura et al., 2002; Overduin et al., 2012; Reed et al., 2008; Spencer et al., 2012; Tolle et al., 2002; Tsubone et al., 2005; Weikel et al., 2003).

La grelina es conocida como la hormona del apetito u “hormona del hambre”. La investigación de Overduin et al. (2012) indicó que la grelina incrementaba la motivación de las ratas para obtener alimento después de una administración intracerebroventricular de grelina, aquellas ratas que fueron administradas con el vehículo, prácticamente no ingirieron alimento en los 30 minutos posteriores a la intervención, caso contrario a aquellas en las que se les administro grelina en dosis de 0.1 nM y 1nM. En humanos se han observado efectos similares. Hotta et al. (2009), desarrollaron un ensayo clínico piloto con pacientes de anorexia nerviosa, observando que la administración de 3µg de grelina/kg de masa corporal incrementaba el hambre y la ingesta de alimentos de manera significativa. Druce et al. (2005) demostraron que la grelina exógena induce una mayor ingesta de alimentos tanto en personas con masa normal como en personas obesas.

De acuerdo con Cummings (2006), la grelina es la hormona conocida con el mayor efecto orexigénico; es la molécula, hasta el momento, que estimula de manera más efectiva la ingesta de alimento a corto plazo, únicamente igualada por el neuropéptido Y. Se ha observado que su administración crónica ocasiona la ganancia en masa corporal de muchas especies. Los carbohidratos y las proteínas disminuyen en mayor grado los niveles de grelina, comparados con la misma cantidad de energía aportada por lípidos (Foster-Schubert et al., 2004; Overduin et al., 2005). La grelina sufre modificaciones postraduccionales antes de su liberación; específicamente sufre una acilación por parte de la grelina O-acil-transferasa (GOAT). Sin esta acilación la grelina no presenta sus diversos efectos sistémicos (Müller et al., 2015).

2.5 LEPTINA

La leptina es una hormona peptídica de 167 aminoácidos, aunque la forma presente en la circulación sanguínea es de solamente 146 aminoácidos. Es conocida como “la hormona de la saciedad”. La leptina se expresa primordialmente en tejido adiposo y especialmente por el tejido adiposo blanco (WAT, por sus siglas en inglés). Se ha descubierto que es secretada en otros tejidos como la placenta, el músculo esquelético, los ovarios y el estómago, pero en concentraciones mucho menores a las secretadas por el tejido adiposo (Myers et al., 2008).

Las principales funciones de la leptina son: la regulación de la homeostasis energética, función neuroendocrina y control del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Kelesidis et al., 2010). Los niveles de la leptina circulante son un reflejo directo de la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo ya que, a mayor tejido adiposo, mayores serán los niveles de leptina circulante (Myers et al., 2008). Los niveles de leptina dirigen al sistema nervioso central para ajustar la ingesta de alimentos. La leptina actúa directamente ejerciendo efectos reguladores del apetito (Oswal y Yeo, 2010). Se ha sugerido que la leptina atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa impidiendo la síntesis neural del neuropéptido Y, una hormona que junto con la grelina se relaciona con el apetito (Myers et al., 2008; Oswal y Yeo, 2010). Se ha observado que la leptina no sólo manda señales para la disminución de la ingesta energética, sino que también manda señales para incrementar el gasto energético. Por ejemplo, en ratas y en ratones se ha observado que aumentan la termogénesis en el tejido adiposo pardo (Kelesidis et al., 2010).

La resistencia a la leptina es un término usado para describir la aparente paradoja de la acción anoréxica de la leptina y sus elevadas concentraciones en sujetos obesos. Se han propuesto diversos mecanismos que traten de explicarlo. Niveles crónicos elevados de leptina podrían ocasionar la disminución del transporte de leptina hacia el sistema nervioso central y afectar las propiedades de señalización de los receptores de leptina. Esta resistencia a la leptina confiere mayor susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta, lo cual a su vez incrementa aún más los niveles de leptina empeorando la resistencia a la leptina. Esto se convierte en un círculo vicioso, ya que, a mayor obesidad, se tienen mayores niveles de leptina y, a mayores niveles de leptina, hay más intolerancia a ésta, por lo que existe mayor susceptibilidad a la obesidad. Todavía no están del todo claro todos los mecanismos fisiológicos involucrados (Myers et al., 2008; Oswal y Yeo, 2010).

2.6 INSULINA

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en las células β -pancreáticas. El gen de la insulina codifica para un precursor de 110 aminoácidos, conocido como pre-proinsulina. La pre-proinsulina entra al lumen del retículo endoplasmático rugoso (*RER* en inglés) en donde se remueve el péptido señal por la acción de una peptidasa, formándose la proinsulina. Las vesículas celulares transfieren la proinsulina del *RER* al aparato de Golgi, en donde se forman hexámeros

solubles de proinsulina Zn^{2+} . La pro-insulina se secreta dentro de vesículas, las enzimas que se encuentran fuera del aparato de Golgi, llamadas convertasas de prohormonas (*PC1* y *PC2* en inglés), cortan en dos sitios específicos liberando el péptido C y a la insulina y son liberados a la circulación sanguínea por exocitosis (Wilcox, 2005).

Al incrementarse los niveles de glucosa ésta entra a las células a través del transportador de glucosa *GLUT-2*. Al entrar a la célula es fosforilada por la glucoquinasa, para formar la glucosa-6-fosfato e iniciar la glucólisis. Como resultado ésta se genera piruvato y ATP. La glucoquinasa actúa como un sensor de glucosa, ya que debido a su baja afinidad sólo funciona a elevadas concentraciones de glucosa. El piruvato en la mitocondria entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y se genera más ATP. Al incrementarse la relación ATP/ADP se cierran los canales de K^+ sensibles al ATP. Al cerrarse los canales de K^+ -ATP, se despolariza la membrana abriéndose entonces los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje y, al abrirse estos canales se da un influjo de Ca^{2+} , por lo que estos cambios en la concentración de Ca^{2+} conducen a la fusión de las vesículas contenedoras de insulina con la membrana plasmática (Fu et al., 2013; Wilcox, 2005). La Figura 2.15 es la representación esquemática de lo descrito anteriormente. Algunas hormonas también se encargan de la regulación de la secreción de insulina. Entre estas hormonas se encuentran el estrógeno, la melatonina, el *GLP-1*, el *GIP*, la leptina y la hormona del crecimiento (*GH*) (Fu et al., 2013).

La insulina inicia sus acciones biológicas por la unión con sus receptores específicos localizados en la membrana celular. El receptor de insulina es una glucoproteína compuesta por dos subunidades α y dos subunidades β , unidas por puentes disulfuros (Mayer et al., 2007; Olivares y Arellano, 2008).

Al interactuar la insulina con su receptor, se desencadenan una cascada de reacciones. Uno de los resultados de la interacción de la insulina con sus receptores es el traslado de los transportadores de glucosa *GLUT-4*, de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática, permitiendo de este modo un mayor ingreso de glucosa a las células. Otras respuestas metabólicas son el transporte de glucosa al interior de las células, lipogénesis, apoptosis, síntesis de glucógeno, síntesis de proteínas, transcripción de genes, etc. (Fu et al., 2013; Olivares y Arellano 2008).

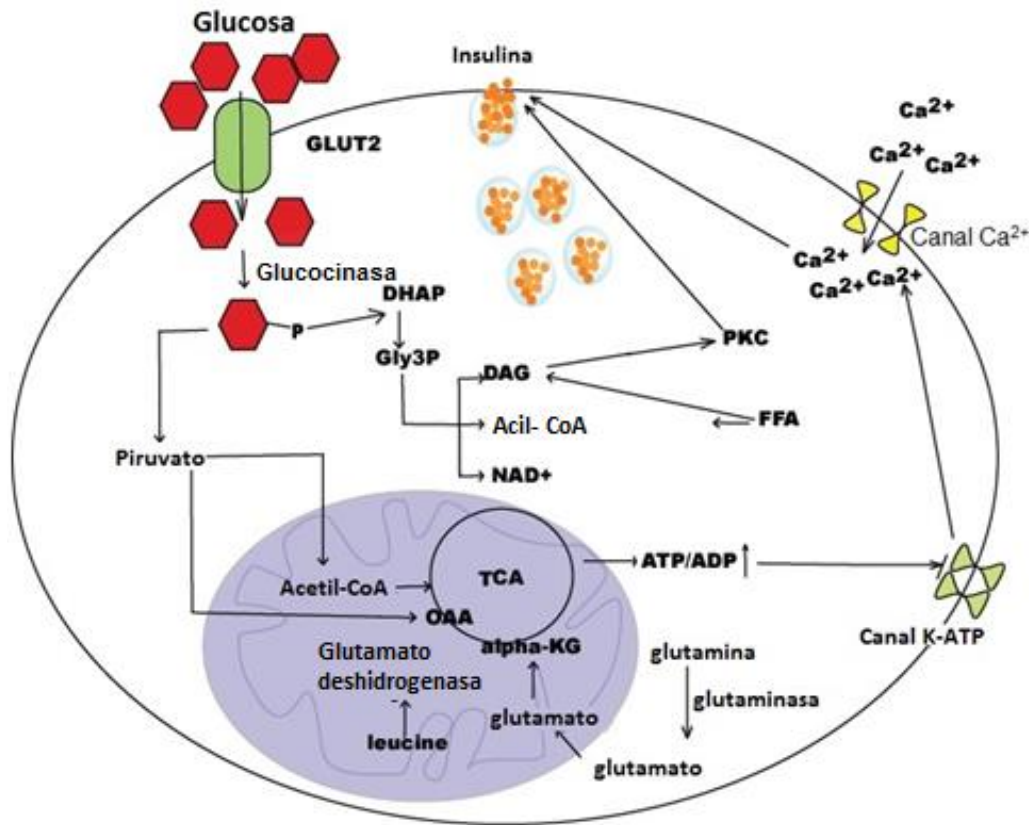


Figura 2.15 Representación esquemática de la principal cascada de reacciones que conllevan a la liberación de insulina (Modificada de Fu et al., 2013)

2.7 GLUCAGÓN

El glucagón es una hormona producida por las células α del páncreas. El glucagón contrarresta a la insulina y promueve la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado. Así como sucede con la insulina, los cambios en los niveles de glucosa son el control principal de la secreción de glucagón. Contrario a la insulina, el glucagón es secretado de las células α cuando disminuyen los niveles de glucosa (Gaisano et al., 2012; Marroquí et al., 2014; Walker et al., 2011).

El mecanismo por el cual se regula la secreción de glucagón de las células α es similar al mecanismo regulador de la secreción de insulina en las células β . El glucagón está contenido en gránulos. Las células α , a diferencia de las β , en bajas concentraciones de glucosa, mantienen la acción de los canales de sodio dependientes del voltaje y de los canales de calcio dependientes del voltaje (*VDCC* en inglés), incrementando la concentración de Ca^{2+} intracelular. Como resultado de esto, se cierran la mayoría de los canales K_{ATP} , lo cual resulta en la despolarización de la membrana. La despolarización ocasiona que entre aún más calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. Al igual que con la insulina al incrementarse significativamente

los niveles de Ca^{2+} se produce la fusión de las vesículas con la membrana celular ocasionando la exocitosis del glucagón (Gaisano et al., 2012; Habegger et al., 2010).

Adicionalmente la secreción de glucagón es inhibida por la secreción de factores paracrin secretados por las células β y δ . Las células δ secretan somatostatina y las células β secretan insulina (Gaisano et al., 2012). La Figura 2.16 ejemplifica la regulación de la secreción de glucagón en altas y bajas concentraciones de glucosa.

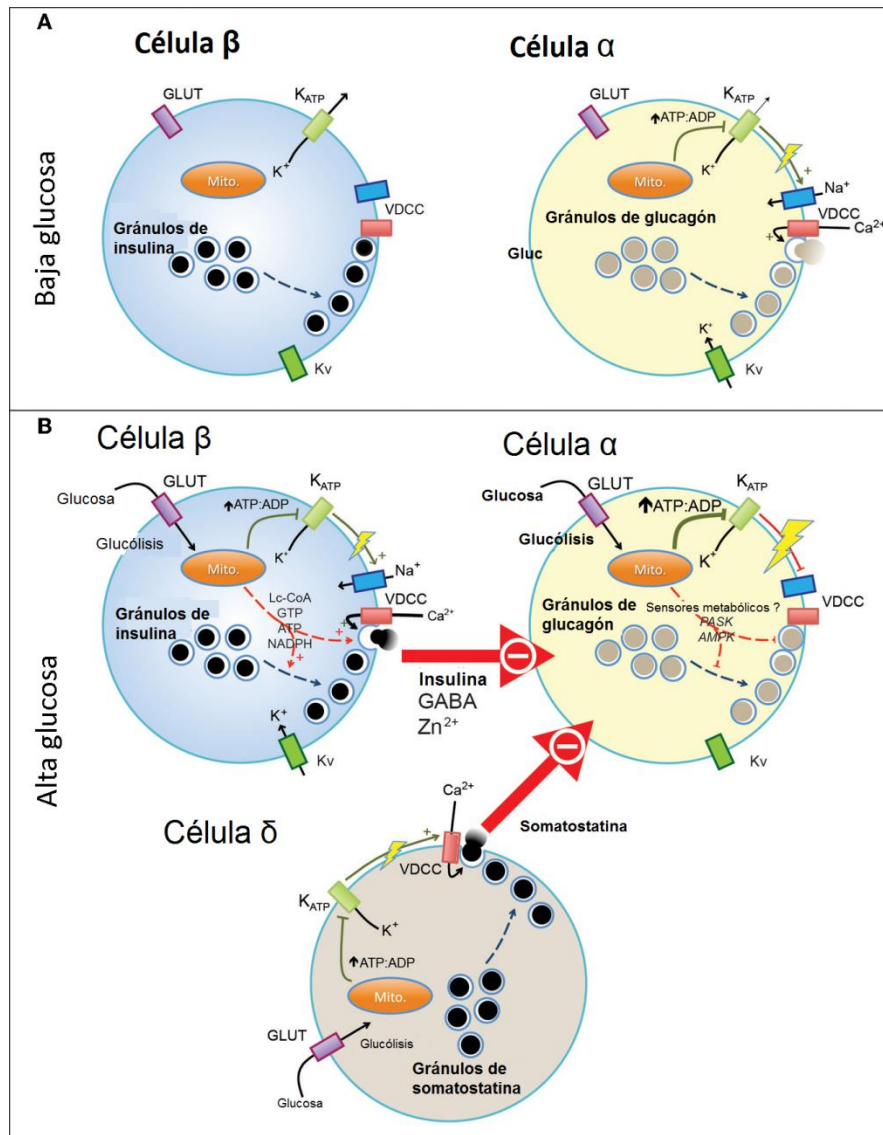


Figura 2.16. Regulación de la liberación de glucagón. A. En bajas concentraciones de glucosa se produce la liberación de glucagón por el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la polarización de la membrana por la actividad de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} y Na^+ . B. Bajo altas concentraciones de glucosa se bloquean los canales K_{ATP} necesarios para que los canales dependientes del voltaje se encuentren abiertos, disminuyéndose entonces los niveles de Ca^{2+} . Para altos niveles de glucosa se libera la insulina de las células β y somatostatina de las células δ , ambas inhibitoras de la secreción de glucagón (Gaisano et al., 2012)

Otros nutrientes que también regulan la liberación del glucagón son los aminoácidos, los ácidos grasos y algunas vitaminas. Los aminoácidos arginina, alanina, glicina, glutamina y leucina estimulan la secreción. Aún no se sabe exactamente el mecanismo de regulación de los aminoácidos, pero se cree que en general estimulan la secreción de glucagón para prevenir la hipoglucemia, después de la ingesta de proteínas, ya que los aminoácidos también estimulan la secreción de insulina. Los posibles mecanismos incluyen la despolarización de la membrana y una mayor entrada de Ca^{2+} (Marroquí et al., 2014).

2.8 TRANSPORTADOR DE GLUCOSA DE DIFUSIÓN FACILITADA TIPO 2 (*GLUT-2*)

La familia de transportadores de glucosa de difusión facilitada (*GLUTs* en inglés) está conformada por al menos 14 isoformas. El *GLUT-2* está conformado por 522 aminoácidos y es codificado por el gen *SLC2A2* (en inglés). Es un transportador de glucosa de baja afinidad y su K_m es de 17mM. Puede además transportar manosa, galactosa y fructosa. Se expresa principalmente en la membrana basolateral del intestino delgado, en los riñones, en el hígado y en las células pancreáticas (Thorens, 2001, 2015).

Gracias a su elevada K_m transporta glucosa de manera proporcional a su concentración, por lo que se le atribuyen propiedades de ser un glucosensor en aquellas células que lo poseen. Esto se observa claramente en las células pancreáticas β , en donde si las concentraciones de glucosa son muy bajas, el transportador no es capaz de transportar la glucosa al interior de la célula y por ende no ocurre la secreción de insulina. En cambio, después de la ingesta de alimentos los niveles de glucosa aumentan, por lo que el transportador ya es capaz de transportar la glucosa al interior de la célula, originando ATP y desencadenando finalmente la secreción de insulina (Bermúdez et al., 2007).

El *GLUT-2* (en inglés) es un transportador de glucosa bidireccional, es decir, es capaz de transportar glucosa extracelular al interior de la célula y viceversa. Lo anterior se muestra claramente en los hepatocitos, ya que después de la alimentación el hígado es capaz de incorporar la glucosa para ser convertida en glucógeno. De manera inversa durante el periodo post-prandrial

tardío, el glucógeno sufre degradación generando moléculas de glucosa que salen de los hepatocitos hacia el torrente sanguíneo (Bermúdez et al., 2007).

De acuerdo con Thorens (2015), “el *GLUT-2* es necesario en los hepatocitos para la captación de glucosa, pero es prescindible para la liberación de la misma. Probablemente existe otro mecanismo no identificado que permite la exportación de glucosa del hepatocito al torrente sanguíneo. A pesar de esto, el *GLUT-2* se requiere para equilibrar las concentraciones intra y extra celulares de glucosa”.

2.9 COTRANSPORTADOR DE SODIO/GLUCOSA TIPO 1 (*SGLT-1*)

Los cotransportadores de sodio/glucosa funcionan como transportadores simporte², es decir, transportan el sodio y la glucosa a la vez (Fig. 2.17). Hasta el momento se han identificado seis isoformas de SGLT. El cotransportador SGLT-1 se encuentra principalmente en los enterocitos y en el riñón, pero de acuerdo con Vrhovac et al. (2015) también es posible encontrarlo en el hígado, el corazón y los pulmones.

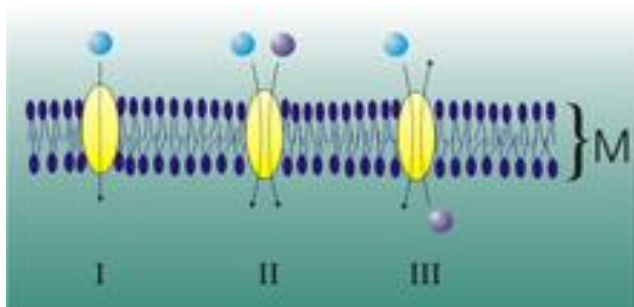


Figura 2.17. Transportadores I. Uniporte, II simporte y III antiporte de moléculas a través de una membrana M (Lodish et al., 2016)

² El **transporte de membrana biológica** es el conjunto de mecanismos que regulan el paso de solutos, como iones y pequeñas moléculas, a través de membranas plasmáticas, esto es, bicapas lipídicas que poseen proteínas embebidas en ellas. Dicha propiedad se debe a la selectividad de membrana, una característica de las membranas celulares que las faculta como agentes de separación específica de sustancias de distinta índole química; es decir, la posibilidad de permitir la permeabilidad de ciertas sustancias pero no de otras (Lodish et al., 2016). Un transportador puede movilizar diversos iones y moléculas. Según la direccionalidad, se distinguen: El transporte por medio de proteínas llamado simporte es también llamado cotransporte, mueve un ion a favor de su gradiente de concentración y otro en contra de su gradiente pero en el mismo sentido, este transporte gasta un ATP de energía pero lo obtiene al momento en que mueve al ion a favor de su gradiente. Este transporte es característico de varios procesos fisiológicos muy importantes, especialmente en el epitelio absorbente del intestino delgado y el túbulo renal. Ejemplo de este transporte es el denominado *SGLUT 1*. El transporte por medio de proteínas llamado antiporte es también denominado contratransporte, mueve dos moléculas o dos iones en sentidos opuestos también con un gasto de energía de un ATP (Lodish et al., 2016)

El cotransportador *SGLT-1* cotransporta dos iones Na^+ por una molécula de glucosa o galactosa. Margolskee et al. (2007) sugiere que los sensores de glucosa *T1R2/T1R3*, en inglés, así como *GLUT-2*, podrían estar relacionados con la regulación de la expresión de *SGLT-1*. Se sabe que *SGLT-1* es el principal responsable del ingreso de glucosa del lumen intestinal al enterocito. Lo anterior es apoyado por Poulsen et al. (2015), quienes indican que las dietas ricas en glucosa estimulan una mayor expresión de *SGLT-1*. Sin embargo, los mecanismos de regulación aún no son claros. Ducroc et al. (2005) encontraron que al suministrar leptina a ratas macho se disminuyó la expresión de *SGLT-1* en los enterocitos. Lo anterior fue apoyado por Poulsen et al. (2015), quienes identificaron una gran disminución en la abundancia de *SGLT-1* en las células intestinales de ratones con hiperleptinemia inducida. Esto indica que la leptina juega un rol en la regulación de la expresión de *SGLT-1*.

Los estudios de Margolskee et al. (2007) demostraron, en ratones, que la sucralosa, el acesulfame K y la sacarina incrementaban la expresión de *SGLT-1*. Aunque en estudios realizados en humanos por Ma et al. (2010), no encontraron diferencias en los niveles de absorción de glucosa al realizar una infusión de sucralosa. Por lo tanto, no existe todavía suficiente evidencia para conocer los posibles efectos que tiene el edulcorante artificial sobre la absorción de glucosa a nivel intestinal.

A continuación, con base en estos fundamentos teóricos, se presenta la hipótesis de esta investigación así como sus objetivos.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS, OBJETIVOS, ALCANCES Y JUSTIFICACIÓN

3.1 HIPÓTESIS

El consumo crónico de edulcorantes calóricos e hipocalóricos durante 120 días ocasionará diferencias en las concentraciones séricas de *GIP*, *GLP-1*, glucosa, triglicéridos, colesterol, insulina, glucagón, grelina y leptina con respecto al grupo control que no los ingiere y además se verá afectada la expresión de *FAS*, *SREBP-1* y *ChREBP* (reguladores de la lipogénesis) en el hígado. Así mismo, existirán diferencias en las ganancias de masa corporal dependiendo si se ingieren edulcorantes calóricos o hipocalóricos.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 General

Evaluar el efecto de la ingesta crónica (120 días) de edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa) e hipocalóricos (acesulfamo K, aspartamo, sacarina, sucralosa, “stevia” y la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo K) en un modelo animal (ratas macho y hembra de la cepa HsdHan: Wistar recién destetadas) en la liberación de las hormonas incretinas (*GIP* y *GLP-1*) y la expresión de genes y factores de transcripción relacionados con la lipogénesis.

3.2.2 Objetivos particulares

- Evaluar las concentraciones de *GIP*, *GLP-1*, insulina, glucagón, leptina y grelina.
- Evaluar el efecto de la ingesta crónica de los edulcorantes calóricos e hipocalóricos sobre la expresión de los genes relacionados con la lipogénesis, *FAS*, *SREBP-1* y *ChREBP* en hígado
- Evaluar el efecto del consumo crónico de diversos edulcorantes clóricos e hipocalóricos sobre la ganancia de masa corporal
- Cuantificar la cantidad de alimento ingerida por las ratas y observar si existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos
- Cuantificar la ingesta energética por cada grupo y relacionarla con su masa corporal y grupo de edulcorante

- Evaluar los parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol y su posible relación con el edulcorante suministrado
- Observar si existen diferencias histológicas en los diversos órganos de estudio (hígado, páncreas, riñones, corazón y tejido adiposo retroperitoneal)
- Relacionar los cambios observados en función del sexo de las ratas.

3.3 ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN

Los procesos metabólicos involucrados en la lipogénesis son mediados y modulados por una gran cantidad de genes y hormonas, pero en la presente investigación solamente se evaluarán las hormonas insulínótropas *GIP* y *GLP-1*, las hormonas leptina, grelina e insulina, así como los genes *FAS*, *ChREBP* y *SREBP-1* en hígado.

3.4 JUSTIFICACIÓN

El consumo crónico excesivo de edulcorantes calóricos junto con dietas ricas en grasas es uno de los factores que han promovido la cada vez más alarmante prevalencia de sobrepeso y obesidad. Los edulcorantes hipocalóricos surgieron como resultado de juegos geopolíticos para conservar el sabor dulce de diversos productos alimentarios y se ofertaron considerando su menor ingestión para dar una equidulzura con el azúcar de caña o remolacha con una menor ingestión calórica al disminuir su cantidad con respecto de los glúcidos simples. En esta investigación se estudió el efecto de diferentes edulcorantes calóricos e hipocalóricos sobre la liberación de diversas hormonas y factores de transcripción relacionados con la lipogénesis. Para reforzar el estudio se realizó un seguimiento de su efecto sobre la ganancia de masa corporal considerando el consumo energético proporcionado por la dieta y el edulcorante adicionado en el agua potable que ingerían así como las características histológicas de algunos órganos.

A continuación se presenta la metodología seguida.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, en la Figura 4.1 se muestra el diagrama de bloques del desarrollo general de la presente investigación.

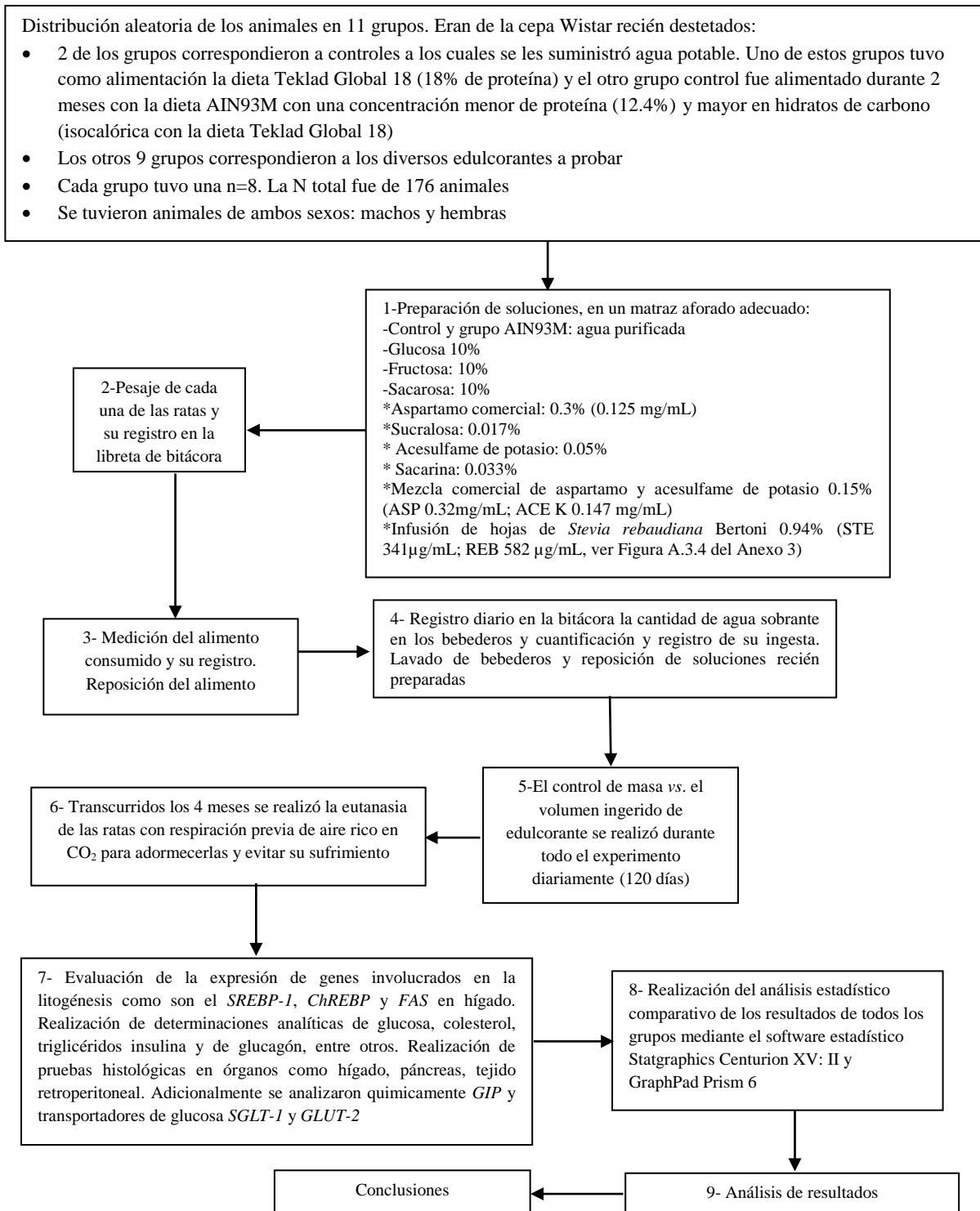


Figura 4.1 Diagrama general del desarrollo experimental

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental realizado fue de tipo multifactorial involucrando dos factores de tipo categórico: a) el factor edulcorante y b) el sexo de la rata. El factor edulcorante contó con 11 niveles, que corresponden a los nueve grupos que ingirieron algún edulcorante en su bebida: sacarosa, glucosa, fructosa, aspartamo, acesulfamo, mezcla de aspartamo con acesulfamo, infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, sacarina con las concentraciones descritas en el apartado 3.2.4 y los otros dos grupos a los cuales se les suministró agua potable, corresponden al grupo control con la dieta normal Teklad 18 y al grupo control que ingirió la dieta *AIN93M*. El factor sexo tuvo dos niveles: macho y hembra. En todos los grupos se tuvo una $n=8$ dando un total de 176 ratas ($N=176$).

4.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANDEVA) de una o dos vías según fuera el caso. Para que esta prueba pudiera ser llevada a cabo deben cumplirse ciertas condiciones:

- Independencia de las muestras
- Los datos debían seguir distribuciones normales en todos los niveles de todos los factores
- Todas las distribuciones normales debían tener igualdad de varianzas (homocedasticidad³) (Walpole et al., 2012)

Por ello, los tratamientos estadísticos que se llevaron a cabo para cada grupo de datos en este trabajo fueron:

1. Identificación de datos atípicos o aberrantes por estimación de sigma basada en la desviación absoluta de la mediana, *MAD* en inglés, empleando el Software Statgraphics Centurion XVI.I
2. Comprobación de la normalidad a través del test de Shapiro-Wilk empleando el Software Statgraphics Centurion XVI.I
3. Verificación de homocedasticidad a través del *test* de Levene empleando el Software Statgraphics Centurion XVI.I

³ En estadística se dice que un modelo predictivo presenta **homocedasticidad** cuando la varianza del error condicional a las variables explicativas es constante a lo largo de las observaciones (Damodar N. Gujarati. 2004 "Econometría". EE.UU. New York: McGraw-Hill)

4. Análisis de variación (*ANDEVA*) (Statgraphics Centurion XV).
5. Prueba de rangos múltiples *post hoc* por el *test* de Duncan (Statgraphics Centurion XV.I).
6. En aquellos casos en donde no existió homocedasticidad, se realizó en lugar de la *ANDEVA* el *test* de Welch y como prueba de rangos múltiples el *test* de Games-Howell, ya que estos están diseñados cuando hay heterocedasticidad. Para ello se empleó el paquete estadístico Minitab 17.

4.3 METODOLOGÍA

4.3.1 Modelo animal

La fase experimental se llevó a cabo en dos fases, las 176 ratas fueron distribuidas en 2 bloques, cada bloque con 88 especímenes debido a la disponibilidad de espacio en la UNEXA. El modelo animal consistió en 88 ratas machos y 88 ratas hembras de la cepa HSD: Han Wistar, provistas por la empresa Harlan, recién destetadas con una masa corporal al iniciar el periodo de adaptación de 35 ± 10 g. El protocolo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM (OFICIO/FQ/CICUAL/026/2).

4.3.2 Dietas suministradas

La dieta que se suministró a casi todas las ratas durante los 4 meses de experimento fue la dieta Harlan 2018S Teklad Global con un 18% de proteína (*Protein Rodent Diet Sterilizable*). La información nutricional detallada se encuentra en la Tabla 4.1. Para el grupo control *AIN93M* se utilizó la dieta *AIN93M Purified Diet* con un 12.4% de proteína (Tabla 4.2). La dieta *AIN93M* se suministró al respectivo grupo control a partir del día 60, en el que comenzó a dosificarse paulatinamente un porcentaje hasta lograr un cambio al 100%. Esta dieta en particular tuvo el objetivo de mantener la masa de los roedores más estable, permitiendo observar gráficamente mejor el comportamiento del grupo control en comparación con el resto de los grupos (Reeves et al., 1993). El acceso al alimento fue de manera *ad libitum*.

4.3.3 Concentraciones de las bebidas suministradas

Con la finalidad de evitar algún tipo de contaminación microbiana en las bebidas, cada día estas eran cuantificadas, desechadas y repuestas con soluciones recién preparadas.

Tabla 4.1 Información nutricional de la dieta Teklad Global 2018S (Envigo, 2016a)

Densidad energética	13.0 kJ/g (3.1 kcal/g)
Proteína cruda	18.6 %
Grasa	6.2 %
Carbohidratos	44.2 %
Fibra cruda	3.5 %

Tabla 4.2 Información nutricional de la dieta AIN93M (Envigo, 2016b)

Densidad energética	15.1 kJ/g (3.6 kcal/g)
Proteína cruda	18.6 %
Grasa	6.2 %
Carbohidratos	44.2 %
Fibra cruda	3.5 %

Las concentraciones de los edulcorantes calóricos e hipocalóricos se establecieron tomando como referencia las ingestas diarias admisibles (*ADI* en inglés) de cada edulcorante y las concentraciones presentes en las bebidas endulzadas no alcohólicas disponibles actualmente en el mercado, mientras que las concentraciones de los edulcorantes hipocalóricos se establecieron tomando como referencia las ingestas diarias admisibles (*ADI*) de cada edulcorante y con un cálculo de equidulzura (ver Anexo 2.3), tomando como referencia a la sacarosa como una unidad. Dichas concentraciones se enlistan a continuación:

- Glucosa 10% (m/v)
- Fructosa: 10% (m/v)
- Sacarosa: 10% (m/v)
- Aspartamo comercial: 0.3% (m/v) (0.125 mg/mL determinado por cromatografía de líquidos de alta resolución (*HPLC*, en inglés, ver Anexo 3)
- Sucralosa: 0.1017% (m/v)
- Acesulfamo de potasio: 0.05% (m/v)
- Sacarina: 0.033% (m/v)

- Mezcla comercial de aspartamo y acesulfamo de potasio 0.15%(m/v). 0.32 mg/mL de aspartamo y 0.147 mg/mL de aspartamo. La determinación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución. Los cromatogramas se ubican en el Anexo 3
- Infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni 0.94% (m/v) (ebullición a 94°C durante 5 minutos, después reposo hasta temperatura ambiente). La concentración del esteviósido y rebaudiósido A fueron 341 µg/mL y 582 µg/mL respectivamente, determinados por *HPLC* (Figuras del Anexo 3).

4.3.4 Determinación de la curva de crecimiento e ingesta de los animales de experimentación

El registro del aumento de masa corporal, la cantidad de alimento consumido y la cantidad de bebida ingerida se realizó diariamente a la misma hora de la mañana. Durante la operación de pesaje, los animales tuvieron un espacio temporal de convivencia entre ellos con la finalidad de socializar y así tratar de evitar en la medida de lo posible el desarrollo de estrés en los roedores (bienestar animal). Por ello fue importante su identificación (ID).

4.3.5 Eutanasia de los especímenes

Una vez transcurridos los 4 meses de experimentación se realizó la eutanasia de los roedores cumpliendo con las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 (DOF, 1999). Para ello, cada espécimen era introducido en una cámara cerrada conectada a un cilindro de CO₂ comprimido, logrando un ambiente rico en CO₂ (70% como mínimo tal como lo especifica el apartado 9.4.1.3 de la NOM-062-ZOO-1999) para lograr una pérdida rápida de la conciencia. Posteriormente, cada rata era decapitada mediante el uso de una guillotina para roedores, con la finalidad de poder obtener la mayor cantidad de sangre posible de cada espécimen. La sangre fue recolectada mediante la ayuda de embudos en tubos tipo *vacutainer*, que fueron centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos, con la finalidad de separar el paquete celular del suero sanguíneo. El suero sanguíneo fue recolectado en tubos marca Eppendorf, para después ser congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -70°C, hasta el momento de realizar los análisis bioquímicos pertinentes.

4.3.6 Disección de los órganos de interés

Una vez que se había decapitado a cada espécimen, se procedió a la disección de los órganos de interés. Los órganos de interés recolectados fueron: hígado, riñones, corazón, tejido adiposo

retroperitoneal. Una vez extraídos los órganos, fueron pesados y procesados para poder ser almacenados a -70°C , para los posteriores análisis histológicos. De igual manera una parte de los órganos fue almacenada en una solución de formalina al 10%.

4.3.7 Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron las siguientes: cuantificación de glucosa, colesterol, triglicéridos en plasma sanguíneo; determinación de las hormonas incretinas *GIP* y *GLP-1*. También se realizó la cuantificación de las hormonas grelina, leptina y glucagón.

1. La determinación de la hormona incretina *GIP* se realizó a través de un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*ELISA* en inglés). Se empleó para ello el Milliplex Map Kit ®. Para la lectura de los resultados se utilizó el equipo MAGPIX® con el software xPONET. Para la descripción detallada de esta metodología consultar el Anexo 2
2. La determinación de colesterol y triglicéridos se realizó mediante el uso del equipo *COBAS cIII* de la marca Roche® cuyo principio son reacciones colorimétricas cuyos productos son cuantificados espectrofotométricamente a diferentes longitudes de onda, dependiendo del analito.

4.3.8 Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las muestras de hígado de las ratas. Para ello fracciones de hígado fueron homogeneizadas con el *Tissue Lyser II*®, durante 2 minutos a 30F/s utilizando el reactivo de *TRIzol* (Invitrogen). Posteriormente se añadieron 200µL de cloroformo, reposando 10 minutos, para su posterior centrifugación a 13500 rpm/4°C por 15 minutos para obtener el sobrenadante. Al sobrenadante se le añadieron 700µL de isopropanol para precipitar el ARN. Consecutivamente se centrifugó a 13500 rpm/4°C durante 15 minutos. Se desechó el isopropanol (Anexo 2) y se realizó un lavado con etanol al 70%. Inmediatamente se realizó nuevamente una centrifugación a 13500rpm/4°C durante 15 minutos. Después se desechó el etanol (Anexo 2), conservándose únicamente el “*pellet*” de ARN. La pastilla de ARN se re-suspendió en 300µL de agua grado biología molecular. Para evaluar su concentración y pureza se leyeron las muestras espectrofotométricamente a 280/260nm. Para evaluar la integridad del ARN, se analizaron 15µg de ARN por electroforesis en gel de agarosa al 1% con 2.2M de formaldehído.

4.3.9 Cuantificación de la expresión de genes *PCR* en tiempo real

La determinación de los niveles de expresión del ARNm de los genes involucrados con la lipogénesis (*FAS*, *ChREBP*, *SRBP-1*) así como los transportadores de glucosa (*GLUT-2* y *SGLT-1*) y del receptor de insulina, se realizó mediante *PCR*-cuantitativo en tiempo real. Para ello se realizaron las diluciones adecuadas de cada una de las muestras para crear un “*pool*” para cada uno de los grupos. En total se crearon 22. De ellos, 11 correspondieron a los grupos de machos y 11 a los grupos de hembras. Cada “*pool*” se llevó a una concentración de $250\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$, asegurando que cada una de las 8 muestras que conformaron cada “*pool*” aportara exactamente la misma cantidad de ARNm. A partir de 1000ng de ARNm se sintetizó el ADNc, utilizando para ello la enzima transcriptasa reversa *M-MLV* y oligo *dT* (12-18 cebador) de la marca Invitrogen™.

Para determinar los niveles de expresión de cada gen, se utilizaron 285ng del ADNc, $1\mu\text{L}$ de la sonda TaqMan® del gen correspondiente junto con $2\mu\text{L}$ de agua grado biología molecular y $2\mu\text{L}$ del denominado master mix. Cada mezcla de reacción ($5\mu\text{L}$), fue colocada en placas de 96 pozos ópticos para el equipo LightCycler 480. Cada muestra fue colocada por triplicado. Como gen estructural se utilizó el gen codificante para β -actina. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, después 45 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. La expresión relativa se calculó con base en la eficiencia del gen utilizando para ello las siguientes fórmulas:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \dots \quad (4-1)$$

$$-\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct}_{\text{Estructural}} \dots \quad (4-2)$$

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gen diana en la muestra}} - \text{media Ct}_{\text{gen diana grupo control}} \dots \quad (4-3)$$

$$\Delta\text{Ct}_{\text{estructural}} = \text{Ct}_{\text{gen estructural en la muestra}} - \text{media Ct}_{\text{gen estructural del grupo control}} \dots \quad (4-4)$$

4.3.10 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Para realizar la extracción de proteínas de las muestras de hígado, se preparó la solución amortiguadora de lisis *RIPA* (en inglés), La composición de dicha solución se encuentra en el disco compacto que tiene la información completa de esta investigación. Para ello, en tubos de 1.5mL sobre hielo se “pipetearon” $250\mu\text{L}$ de *buffer* de lisis. Una vez añadida la disolución de lisis se pusieron en cada tubo aproximadamente 200mg de hígado congelado. El tejido se

homogeneizó utilizando el homogeneizador de proteínas marca *PELLET PESTLE® Cordless Motor* y pistilos de teflón. Inmediatamente se sometió a una agitación en un equipo *vórtex* a su máximo nivel para, posteriormente centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue transvasado a unos tubos de 0.6mL donde se almacenaron a -70°C hasta su uso posterior.

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford empleando para ello el kit *RC-DC™* de la marca Biorad. Así mismo se realizó una curva estándar con albúmina sérica bovina con las siguientes concentraciones 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL. Tanto las muestras como la curva estándar se corrieron por triplicado. La lectura se realizó a 750nm. Las concentraciones de proteína de las muestras se obtuvieron por interpolación de sus absorbancias en la curva estándar. Una vez conocida la concentración de las muestras, se procedió a realizar las diluciones necesarias con la finalidad de cada una de las muestras presentara una concentración de 4µg/µL.

4.3.11 Determinación de proteínas mediante *Western blot*

Se realizó el análisis por la metodología conocida como *Western blot* de las siguientes proteínas: *SREBP-1*, *FAS*, *SGLT-1*, *GLUT-2* y actina como gen estructural. Las condiciones de la electroforesis se describen a continuación: Se elaboraron geles de poliacrilamida de 1.5 mm al 10% con 15 pozos. En cada pozo se cargaron 15 µL (30 µg de proteína). Las condiciones de corrida del gel fueron: 75 V durante 30 minutos y 100 V durante 2 horas. La electrotransferencia se realizó bajo las siguientes condiciones: 115 V durante 1 hora 15 minutos. Posterior a la electrotransferencia, se realizó la tinción de la membrana con Rojo de Ponceau S para identificar la correcta transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de *PFVD*. Posteriormente se lavó dicha membrana e inmediatamente se realizó el bloqueo de las mismas, empleándose para ello una solución al 5% (en solución amortiguadora salina de *Tris* con *Tween 20*) de leche sin grasa en polvo grado biología molecular de la marca Biorad. El bloqueo se realizó durante una hora a temperatura ambiente bajo una agitación de 120rpm. La incubación con el anticuerpo primario (*FAS*, *SREBP-1*, *SGLT-1*, *GLUT-2*, actina) se realizó durante toda la noche a 4°C y 120rpm. Posterior a la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados de las membranas con *TBS tween*. Una vez perfectamente lavadas las membranas se

realizó la incubación con el anticuerpo secundario. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas a 120 rpm. Inmediato a esta incubación se realizaron nuevamente tres lavados con *TBS tween*. El revelado de las membranas se realizó añadiendo una mezcla 1:1 de los reactivos de revelado *Immobilon Western* (Merckmillipore). La lectura de la quimioluminiscencia se realizó en el equipo *Chemidoc™ MP system*. El análisis de densidad óptica de las imágenes generadas por el *Chemidoc* se realizó mediante el software *ImageJ*.

4.3.12 Método para la determinación de la curva de tolerancia a la glucosa de los animales de experimentación

Días previos al sacrificio los animales fueron colocados en un ayuno nocturno de 8 horas. Previamente al inicio de la prueba cada rata fue pesada para poder determinar la cantidad de solución de glucosa a administrar. La dosis administrada fue 2g/kg de masa⁴ corporal. Al inicio del método se obtiene una muestra de sangre mediante un pequeño corte en la punta de la cola. Se cuantifica el nivel de glucosa, correspondiendo al tiempo 0 o nivel basal. Posterior a la determinación basal se administró la solución de glucosa (previamente elaborada) por vía intraperitoneal. Se tomaron muestras y se cuantificó la glucosa sanguínea a los 15, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la administración. Se graficó la curva de tolerancia a la glucosa y se calculó el área bajo la curva por el método del trapecioide. Finalmente se analizaron los datos mediante un análisis de varianza.

⁴ Diferencias entre masa y peso (<http://cienciasprimeroeso.blogspot.mx/2015/04/masa-versus-peso.html>):

Características de masa	Características de peso
1. Es la cantidad de materia que tiene un cuerpo.	1. Es la fuerza que ocasiona la caída de los cuerpos.
2. Es una magnitud escalar.	2. Es una magnitud vectorial.
3. Se mide con la balanza.	3. Se mide con el dinamómetro.
4. Su valor es constante, es decir, independiente de la altitud y latitud.	4. Varía según su posición, es decir, depende de la altitud y latitud.
5. Sus unidades de medida son el gramo (g) y el kilogramo (kg).	5. Sus unidades de medida en el Sistema Internacional son la dina y el Newton.
6. Sufre aceleraciones	6. Produce aceleraciones.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

5.1.1 Péptido insulínotropo dependiente de glucosa (*GIP*)

Esta hormona se encuentra relacionada con la liberación de insulina, así como con el metabolismo de lípidos, estimulando la lipogénesis (Baggio y Drucker, 2007). Los niveles de dicha hormona se muestran en las Figuras 5.1A y 5.1B. Los resultados estadísticos indicaron diferencias significativas tanto en el factor sexo $P < 0.001$, como en el factor edulcorante $P < 0.001$ y en la interacción de ambos factores $P < 0.001$. Esto indica que las tendencias en los niveles de *GIP* para los machos difirieron de las hembras.

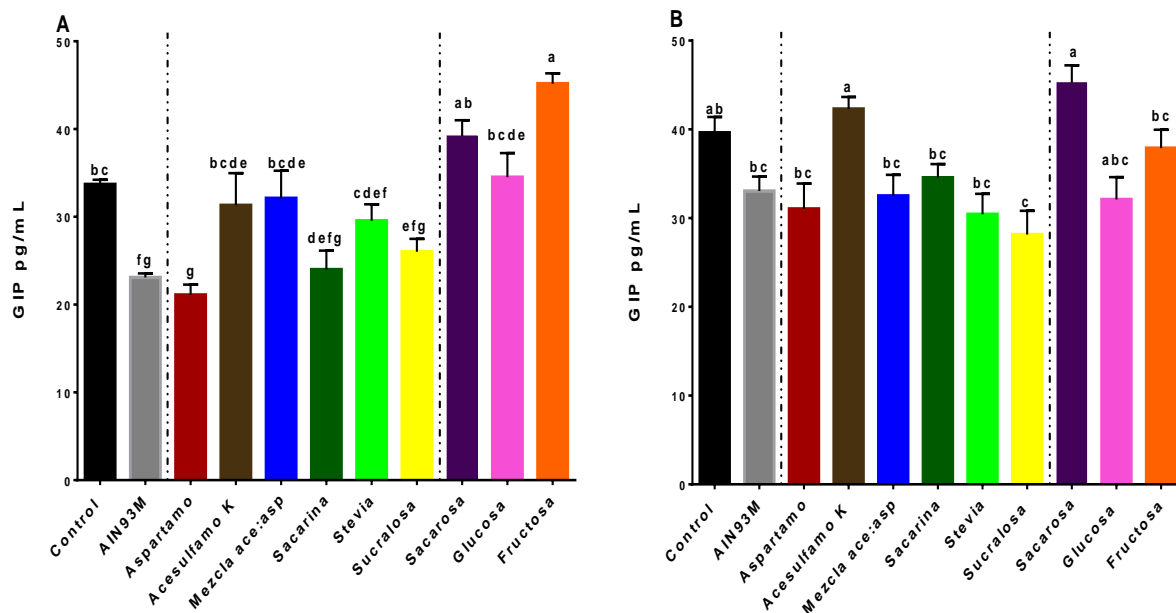


Figura 5.1 Niveles de *GIP* en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de *GIP* ± DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a, b, c, d, e, f, g

Las ratas hembra, en promedio, presentaron niveles ligeramente mayores de *GIP*, 35.2 pg/mL contra 30.89 ng/mL de los machos. Dada esta diferencia y la existencia de interacción se realizaron los análisis de una vía de manera independiente. En ratas macho el grupo que presentó las mayores concentraciones de *GIP* fue el grupo de fructosa (45.18 ng/mL). Esto concuerda con lo reportado por la literatura, donde se indica que la hormona incretina *GIP* es altamente estimulada por los glúcidos simples y de mayor manera por la fructosa, sacarosa y glucosa

(Baggio y Drucker, 2007). Sin embargo, la sacarosa y la glucosa, no difirieron de los niveles presentados por el grupo control a pesar de que se sabe que son estimulantes de su liberación.

Los grupos que bebieron edulcorantes hipocalóricos que presentaron concentraciones inferiores a las del grupo control fueron: Iso grupo que ingerían sucralosa, sacarina y el aspartamo. Esto concuerda con lo reportado por Fujita et al. (2008), quien encontró que ni el aspartamo, ni la sucralosa o la sacarina lograban estimular *in vivo* la liberación de este péptido intestinal.

Nuevamente, las ratas hembra presentaron comportamientos distintos a los observados con las ratas macho. Los grupos que presentaron los mayores niveles de la hormona *GIP* fueron el grupo de sacarosa (45.2 ng/mL) y el grupo de acesulfamo (42.3 ng/mL). La tendencia del grupo de sacarosa era el esperado ya que se sabe que es un estimulador de *GIP* pero, sorprendentemente, el acesulfamo de K a pesar de ser hipocalórico tuvo niveles prácticamente idénticos al grupo de sacarosa. Adicionalmente, el grupo que presentó los menores niveles de *GIP* fue el grupo de sucralosa (28.15 pg/mL) difiriendo del grupo control (39.62pg/mL).

Brown y Rother (2012) relacionaron este péptido con la sensación de saciedad y, de acuerdo con los estudios realizados, los edulcorantes artificiales no dan un estímulo suficiente para lograr la secreción de esta hormona *GIP*. Por tanto, no contribuyen con la sensación de saciedad, a diferencia de lo que ocurre con los edulcorantes calóricos. Se sabe que algunos edulcorantes calóricos e hipocalóricos (sacarosa, glucosa, sucralosa) se unen en los dos dominios del receptor *T1R2/T1R3* (Fernstrom et al., 2012). Se ha sugerido que solamente cuando se da la estimulación de ambas unidades del receptor del gusto dulce es cuando se provoca la liberación de las hormonas incretinas. Es por ello que solamente aquellos edulcorantes calóricos o hipocalóricos que se unen a los dos sitios lograrían estimular a *GIP*.

El hecho de que la sacarosa presentase los mayores niveles de *GIP* contribuye en apoyar la hipótesis de que las hembras son más propensas a efectos adversos por el consumo excesivo de edulcorantes. Tanto en los machos como en las hembras, los cambios observados en los niveles de *GIP* no correspondieron con los cambios observados en los niveles de insulina. Recordando que la regulación de la secreción de esta última es un proceso que involucra muchas rutas de control. Es regulada por los niveles de glucosa, así como por diversas hormonas destacando entre ellas la melatonina, la leptina, la hormona del crecimiento, el glucagón, el polipéptido amiloide

del islote pancreático, entre otras; por lo que los niveles de *GIP* no son un reflejo proporcional de los niveles de insulina.

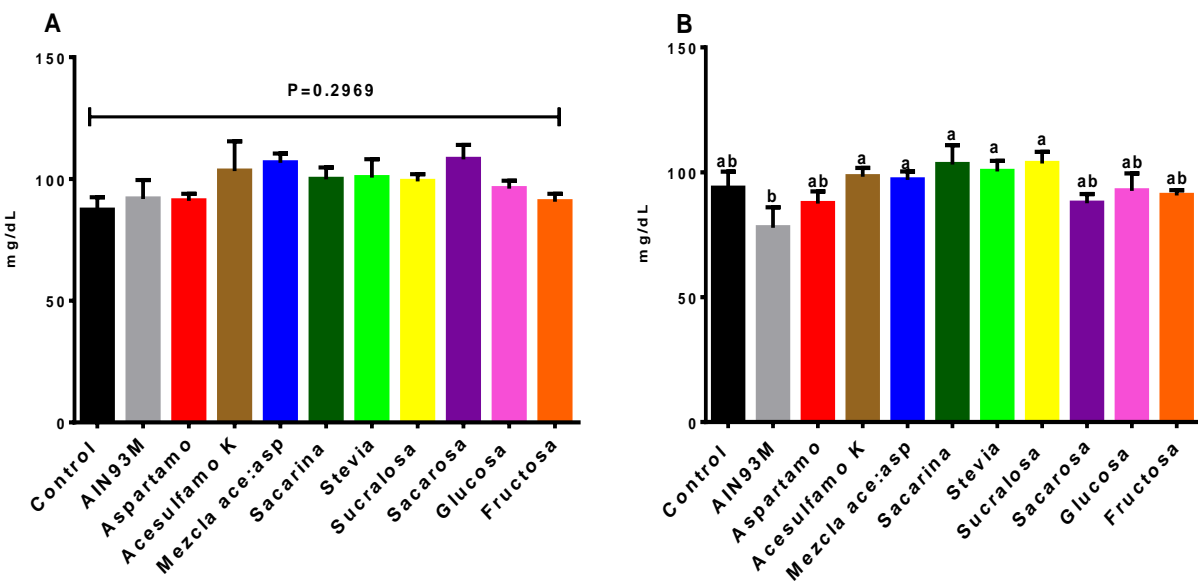
5.1.2 Determinación del péptido similar al glucagón tipo 1 (*GLP-1*)

El *GLP-1* es mucho más lábil que la hormona *GIP*. El *GLP-1* es rápidamente degradado por la dipeptidil peptidasa 4 (*DPP4* en inglés) (Kim y Egan, 2008), por lo que su vida media después de ser secretada es muy corta de 1 a 2 minutos (Kim y Egan, 2008).

Debido a limitaciones técnicas, no fue posible adicionar inmediatamente el inhibidor de *DPP4*, por lo que a pesar de que las muestras de plasma fueron inmediatamente colocadas en nitrógeno líquido, parece que no fue suficiente para evitar la acción degradadora de la enzima *DPP4*. Es por ello que muy probablemente el *GLP-1* haya sido degradado en gran parte. Como probable consecuencia de esta degradación, los niveles cuantificados de esta hormona en las muestras sanguíneas no se consideran confiables.

5.1.3 Determinación de glucosa

Los niveles de glucosa séricos se muestran en las Figuras 5.2 A para el caso de las ratas macho y en la Figura 5.2 B, para el caso de las ratas hembra.



En el caso de las ratas macho no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.2969$). Para las ratas hembra sí se observó la existencia de diferencias significativas ($P = 0.0493$). El grupo A lo conformaron todos los edulcorantes hipocalóricos (excepto el aspartamo) y el control. El segundo grupo (grupo B) estuvo conformado por los edulcorantes calóricos más el aspartamo, el grupo control y el grupo de la dieta *AIN93M*. El grupo que presentó los mayores niveles séricos de glucosa fue el grupo de sacarina (103.1 mg/dL). Es importante mencionar que, aunque tuvo los mayores niveles séricos, está todavía dentro de los rangos normales. A pesar de la existencia de estos dos grupos, ningún edulcorante presentó glucemia estadísticamente distinta al control (93.6 mg/dL). Todos los grupos tienen concentraciones dentro de los valores normales.

Lo anterior indica que en el caso de las ratas macho, el consumo crónico de edulcorantes calóricos o hipocalóricos, acompañados de una dieta balanceada, no modifican los niveles séricos en ayuno de glucosa. Para el caso de las hembras sí existen diferencias, pero de manera general se aprecia que presentan valores muy similares, las dos agrupaciones observadas correspondieron precisamente a la división de edulcorantes calóricos e hipocalóricos. Aunque no difieren entre ellas. Cabe mencionar que, en ninguno de los grupos, tanto en machos como en hembras, se presentaron niveles de glucemia anormales en el lapso de estudio (120 días después del destete).

5.1.3.1 Curva de tolerancia a la glucosa

Esta prueba se realizó una semana antes de concluir los 120 días de experimentación animal, con 88 de las ratas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.3. En la Figura 5.3A se observa que tanto en machos como en hembras los que ingirieron sacarosa al 10 % presentaron intolerancia a la glucosa. Es decir, los niveles séricos de glucosa incrementan entre los minutos 15 y 30 y no retornaron a niveles cercanos a los basales después de 2 horas. En la Figura 5.3B se muestran el área bajo la curva de los grupos experimentales.

El grupo que ingirió sacarosa al 10 % el presentó las mayores áreas bajo la curva. Otro grupo que presentó diferencias en el área bajo la curva con respecto del control fue el grupo que ingirió sacarina al 0.033% aunque en menor medida que el grupo de sacarosa y sin provocar intolerancia a la glucosa ya que regresó a los niveles basales de glucosa. De lo anterior se puede deducir que el consumo crónico excesivo de sacarosa condujo a la intolerancia a la glucosa elevando el riesgo

de padecer diabetes. La sacarina si bien eleva los niveles de área bajo la curva después de las 2 horas logran regresar a niveles basales. Tod esto en el lapso de estudio (120 días después del destete).

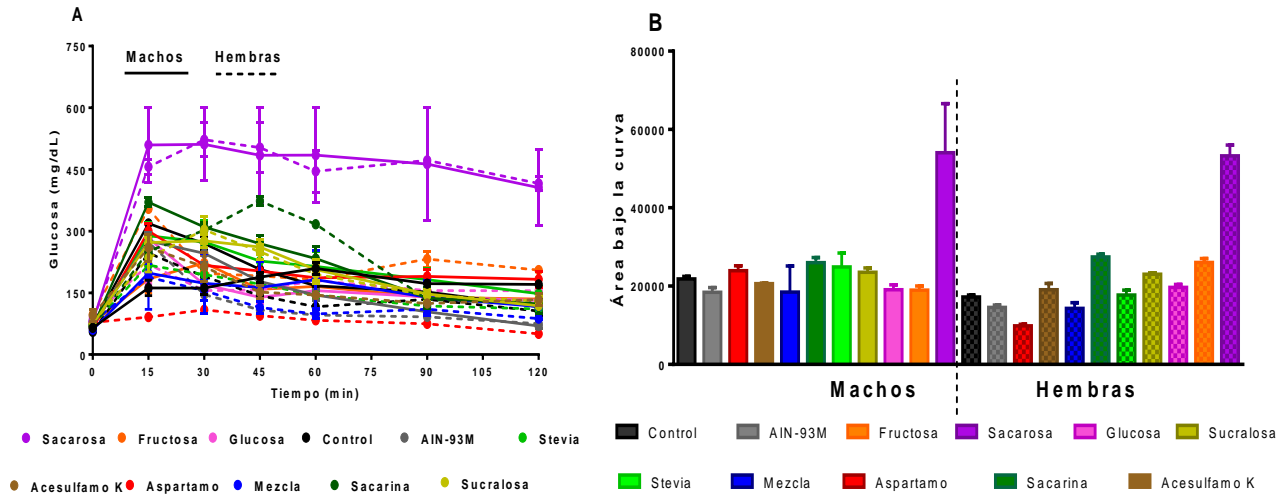


Figura 5.3 Curva de tolerancia a la glucosa. A) determinación de curva de intolerancia a la glucosa. B) Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa

5.1.4 Determinación de triglicéridos

En las Figuras 5.4A y 5.4B se muestran las concentraciones séricas de triglicéridos, de machos y hembras respectivamente. No existió diferencia entre los niveles de triglicéridos entre los machos y las hembras ($P = 0.7952$). Sin embargo, indicó que sí hubo diferencia entre los grupos de edulcorantes ($P < 0.001$) y que fue significativa la interacción de los dos factores ($P = 0.002$). Es decir, en los niveles de triglicéridos no se presentó la misma tendencia en las ratas macho que en las hembras, lo cual se muestra claramente en las Figuras 5.4A y 5.4B.

En las ratas macho los grupos que tuvieron concentraciones mayores estadísticamente al grupo control fueron los siguientes: fructosa, glucosa, dieta *AIN93M*, sacarosa y sucralosa. Destaca el caso de la glucosa y la fructosa, ya que los niveles de triglicéridos se elevaron hasta 219.7 mg/dL y 216.8 mg/dL, respectivamente, duplicando los niveles del grupo control que presentó el valor de 89 mg/dL. Recordando que estos dos glúcidos, pasan por el proceso de la glucólisis originando precursores necesarios para la lipogénesis lo cual explica la elevación observada de los triglicéridos.

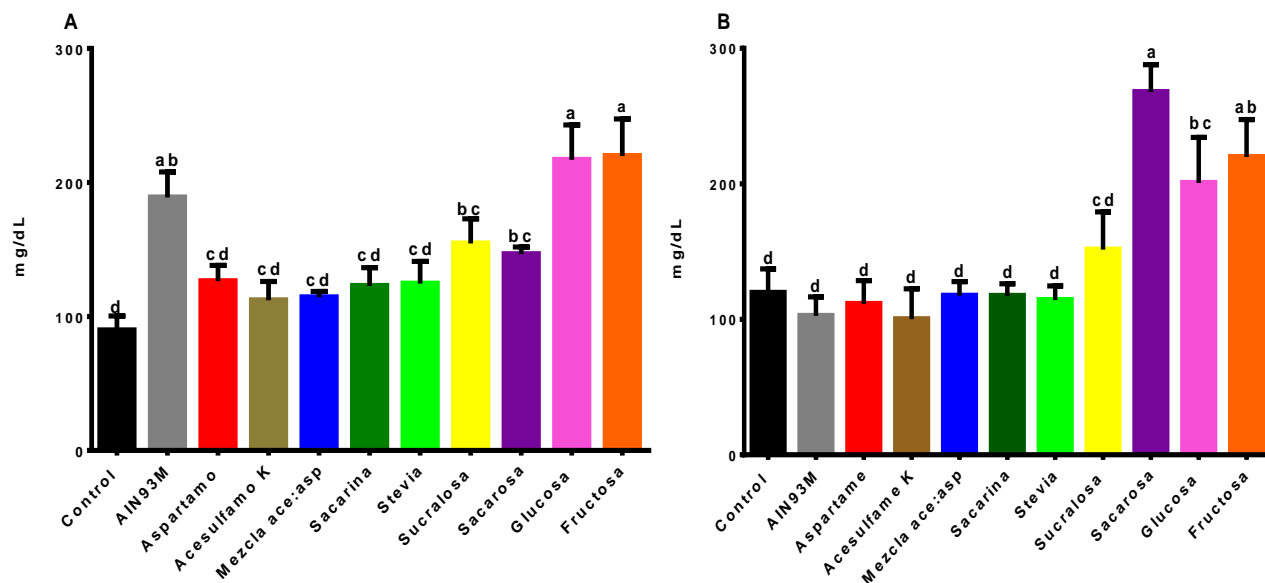


Figura 5.4 Niveles de triglicéridos en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de triglicéridos en ayuno \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

La sacarosa a pesar de que también sigue las rutas metabólicas que aportan precursores para la lipogénesis, en las ratas macho que la ingerieron no mostraron una elevación tan marcada de los niveles séricos de triglicéridos (146.1 mg/dL). Lo anterior a pesar de que no existió una diferencia en la cantidad de alimento, en la cantidad de bebida ingerida, ni en la cantidad de energía consumida con respecto al grupo de glucosa, por lo que se esperaban niveles similares a los que presentó este grupo.

La fructosa a pesar de que fue ingerida en menor medida que la glucosa y que la energía consumida fue también menor (Figuras 5.29A y 5.31A), presentó niveles séricos de triglicéridos muy elevados. Lo anterior concuerda con los reportes que indican que la fructosa sobre-estimula la lipogénesis hepática (Basciano et al., 2005; Rutledge y Adeli, 2007; Tappy et al., 2010; Verman, 2011), lo cual explicaría que a pesar de ser consumida en menor medida que la glucosa elevó los niveles al mismo grado que este glúcido. De acuerdo con Tappy et al. (2010), “*el consumo excesivo de fructosa conlleva al desarrollo de esteatosis hepática, favorece la acumulación visceral de grasa y desarrolla la hipertrigliceridemia*”.

En cuanto a los edulcorantes hipocalóricos, destacó el comportamiento del grupo de sucralosa presentando niveles de 154.5 mg/dL. Estos niveles resultan similares a los presentados por la sacarosa, pero cabe mencionar que la sucralosa, según sus fabricantes y algunos autores

(Goldsmith y Merkel, 2011; Molinary y Quinlan, 2011), no es metabolizada por el cuerpo y no debería aportar ningún precursor de la lipogénesis. Además, la cantidad de alimento ingerida por el grupo de sucralosa no difirió de la cantidad consumida por el grupo control, por lo que este incremento no es justificado por el alimento ingerido, por lo que se deberá seguir indagando más acerca de los posibles mecanismos fisiológicos que expliquen este incremento observado en los niveles séricos de triglicéridos. Para el resto de los edulcorantes hipocalóricos no se presentó ninguna diferencia con respecto del control.

Para el caso de las ratas hembra, únicamente los grupos que consumieron edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa) presentaron diferencias con respecto del control. El grupo de ratas hembra que ingirió sacarosa fue el que presentó los mayores niveles de triglicéridos (267.2 mg/dL), seguido del grupo de fructosa (218.6 mg/dL) y, finalmente, por el grupo de glucosa (204.4 mg/dL). Resalta el hecho de que parece ser que las ratas hembra son más susceptibles a los efectos adversos del consumo excesivo de sacarosa. De los tres edulcorantes calóricos el grupo de sacarosa fue el que presentó la mayor ganancia de masa como se verá después en los resultados complementarios obtenidos.

De los edulcorantes hipocalóricos el grupo de ratas hembra que presentó los mayores niveles fue el de sucralosa con niveles de 151.5 mg/dL, valor muy similar al presentado por los machos. Sin embargo, en este caso no existió diferencia estadística con respecto del grupo control (100.1mg/dL), aunque la tendencia fue muy similar a la observada en los machos.

5.1.5 Colesterol total

Los niveles séricos de colesterol se muestran en las Figuras 5.5A y 5.5B, de las ratas macho y hembra, respectivamente. Existieron diferencias con respecto al sexo, las concentraciones de colesterol fueron 79.6 mg/dL en los machos contra 93.3 mg/dL en las hembras y respecto del grupo de edulcorante ($P = 0.0014$) y no así para la interacción ($P = 0.1706$); es decir, las concentraciones de colesterol son diferentes en ratas macho y ratas hembra, pero la tendencia de cuáles grupos presentaron los mayores y menores niveles fue la misma.

En las ratas macho el grupo que presentó niveles estadísticamente distintos al grupo control fue el grupo de fructosa, siendo los niveles en este grupo en promedio de 96.5mg/dL contra los 70.1

mg/dL del grupo control. Lo anterior concuerda con lo reportado por Guzmán (2012) quien reportó que, tras 197 días, las ratas que ingirieron fructosa tuvieron niveles séricos de colesterol de 101.9 mg/dL. Los otros dos edulcorantes calóricos (sacarosa y glucosa) no difirieron del grupo control. Respecto de los edulcorantes hipocalóricos ningún grupo presentó diferencias con respecto del grupo control. Cabe resaltar que todos los grupos tuvieron concentraciones de colesterol total dentro del rango normal.

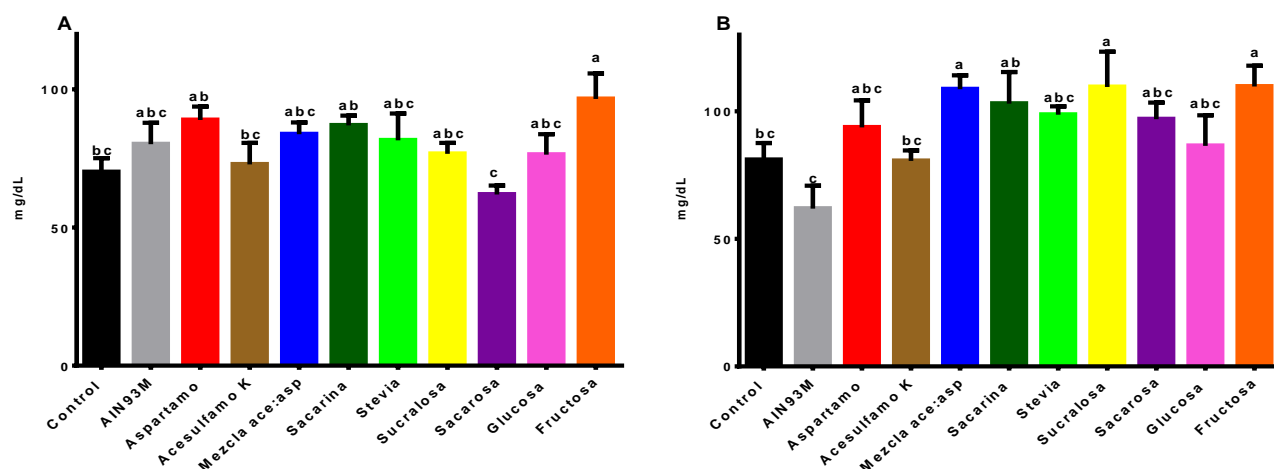


Figura 5.5 Niveles de colesterol en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de colesterol total \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

En las ratas macho, el grupo que presentó niveles estadísticamente distintos al grupo control fue el grupo de fructosa, siendo los niveles en este grupo en promedio de 96.5mg/dL contra los 70.1 mg/dL del grupo control. Lo anterior concuerda con lo reportado por Guzmán (2012) quien reportó que, tras 197 días, las ratas que ingirieron fructosa tuvieron niveles séricos de colesterol de 101.9 mg/dL. Los otros dos edulcorantes calóricos (sacarosa y glucosa) no difirieron del grupo control. Respecto de los edulcorantes hipocalóricos ningún grupo presentó diferencias respecto del grupo control. Nuevamente, debe señalarse que en el lapso de estudio, 120 días después del destete, todos los ejemplares de los grupos tuvieron concentraciones de colesterol total en plasma sanguíneo dentro del rango normal.

Para las ratas hembra, existieron tres grupos cuyos niveles de colesterol difirieron estadísticamente del control. Estos grupos fueron la fructosa, la sucralosa y la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K. Pero ningún grupo presentó niveles fuera del rango normal.

Respecto de la fructosa, investigaciones en humanos han indicado que el consumo de fructosa incrementa los niveles de colesterol total y de colesterol LDL, tanto en hombres como en mujeres (Jameel et al., 2014; Stanhope et al., 2011; Zhang et al., 2013). Esta tendencia parece ser la misma observada en la presente investigación para las ratas, ya que tanto machos como hembras, que consumieron fructosa presentaron los mayores niveles de colesterol total.

En el caso del incremento de colesterol observado en las hembras que consumieron sucralosa no existe mucha información al respecto. Por ejemplo, Saada et al. (2013) realizaron experimentos con ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con diabetes inducida. A estas ratas se les suministró sucralosa en el agua potable a una dosis de 11mg/kg de masa corporal. Sus resultados indicaron que los niveles de colesterol total incrementaron en aproximadamente un 20% con respecto de aquellas ratas a las cuales no se les suministró la sucralosa. El mecanismo por el cual la sucralosa conlleva a estos incrementos en los niveles de colesterol aún no están elucidados.

En lo referente a la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K, Reyes y Pérez (2010) y Guzmán (2012) reportaron niveles de colesterol significativamente mayores a los de los especímenes del grupo control aunque aún están dentro del rango considerado como normal. Estos experimentos solamente se realizaron con ratas macho. Lo interesante es que en la presente investigación se observó esta tendencia para las ratas hembra. Por ello, con base en estos hallazgos deben planearse nuevas investigaciones.

5.1.6 Determinación de insulina

La determinación de insulina se realizó mediante los ensayos *Milliplex®* en el *Magpix® System*. Los resultados de dicha determinación se encuentran representados en las Figuras 5.6A en el caso de los machos y 5.6B para el caso de las hembras. En ambos casos el test de Welch correspondiente indicó la presencia de diferencias entre los grupos de edulcorantes para una $P < 0.001$. En el caso de los machos existieron 3 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c. Para las ratas hembra el análisis estadístico definió la existencia de 4 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c y d.

Respecto de las ratas macho, el grupo que presentó los mayores niveles de insulina fue el grupo de sacarina, teniendo niveles de 1,276.6 pg/mL. Este valor no difirió de forma significativa del grupo control (1,029.3 pg/mL). Lo anterior concuerda con lo reportado por Carraro et al. (2016), quienes encontraron que, aunque la sacarina indujo una mayor ganancia de masa corporal en ratas macho Wistar, esta no alteraba los niveles de insulina. Ningún edulcorante calórico o hipocalórico tuvo niveles de insulina significativamente diferentes a los del grupo control.

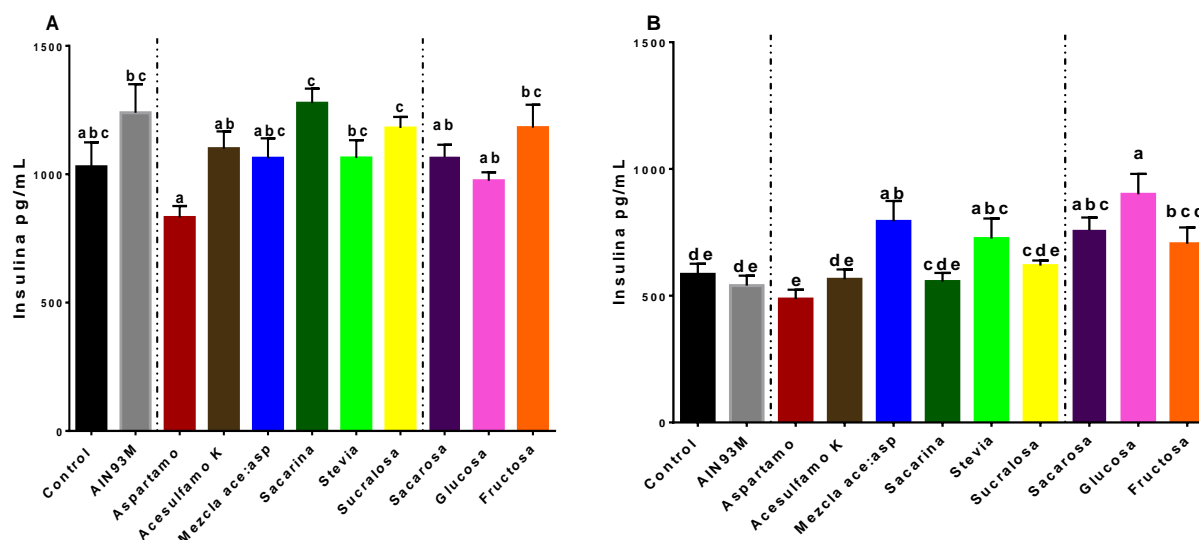


Figura 5.6 Niveles de insulina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de insulina \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e

Respecto de las hembras se observa que el grupo que presentó los mayores niveles de insulina fue el grupo que bebió glucosa, mientras que los menores niveles los presentaron las ratas hembra que bebieron aspartamo. Estadísticamente solamente difirieron respecto al grupo control 4 grupos; estos fueron: glucosa, mezcla comercial aspartamo con acesulfamo de potasio, infusión de *Stevia rebaudiana* y sacarosa, presentando cada uno concentraciones de insulina de 900.4pg/mL, 793.2pg/mL, 785.3 pg/mL y 758.2 pg/mL, respectivamente, contra 584.4pg/mL del grupo control. Lo anterior sugiere la hipótesis de que las hembras son mucho más susceptibles a las alteraciones fisiológicas ocasionadas por edulcorantes, tanto calóricos (especialmente la glucosa y sacarosa), como hipocalóricos (mezcla comercial aspartamo con acesulfamo de potasio, infusión de *Stevia rebaudiana*). Como se verá en los datos complementarios presentaron una tendencia de masa corporal distinta a la observada en ratas macho.

Resalta que la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* (793.2pg/mL) y la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K (785.3 pg/mL) elevaran los niveles de insulina si bien no a niveles como los ocasionados por la ingesta de glucosa (900.4pg/mL), contra el grupo control que bebió agua potable sin edulcorantes (584.4pg/mL).

5.1.7 Determinación de glucagón

Al igual que la insulina, el glucagón fue determinado empleando el equipo *Magpix*®. Los niveles de glucagón se ilustran en la Figura 5.7A y 5.7B, correspondiendo a los niveles de las ratas macho y hembra, respectivamente.

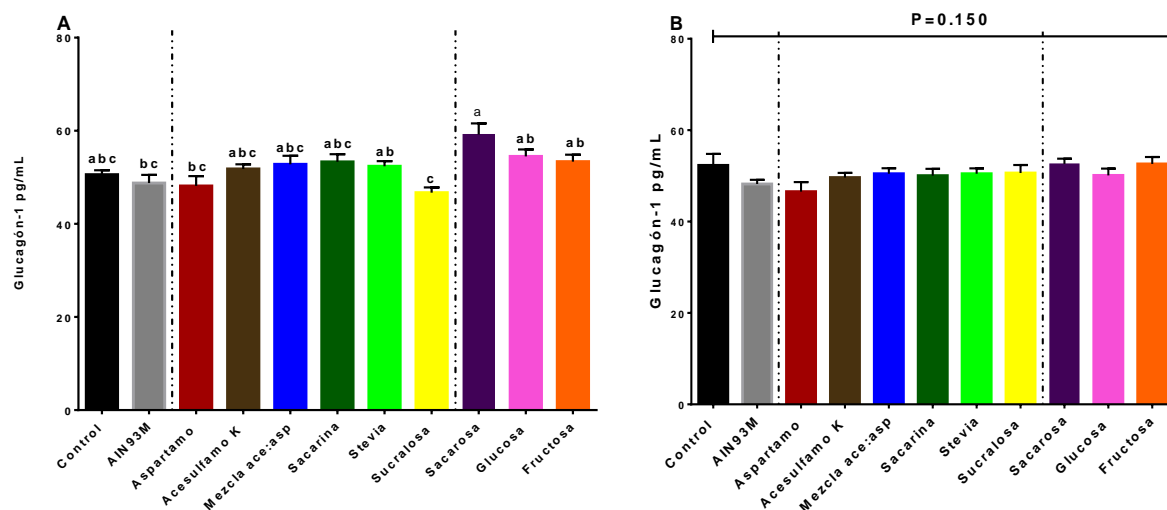


Figura 5.7 Niveles de glucagón en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de glucagón \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c

Para el caso de las ratas hembra no se encontró diferencia significativa alguna ($P = 0.150$). En las ratas macho la prueba de comparaciones múltiples indicó la presencia de tres grupos homogéneos (grupos que no difirieron estadísticamente entre sí), designados por las letras a, b, c que se encuentran en la Figura 5.7A. El edulcorante que presentó los mayores niveles de glucagón fue el grupo de sacarosa (59.2 pg/mL), mientras que el grupo de sucralosa (46.7 pg/mL) presentó el menor valor. Los valores máximo y mínimo no fueron estadísticamente distintos al control (50.6 pg/mL).

El glucagón tiene efectos contrarios a la insulina, ya que es secretado cuando los niveles de glucosa disminuyen. En estado de ayuno los niveles de glucosa disminuyen, lo cual promueve la secreción de glucagón. Al presentar todas las ratas niveles muy similares de glucosa al momento del ayuno era de esperarse que los niveles de glucagón fuesen similares entre sí, tal y como ocurrió. Lo anterior parece indicar que el estado energético al momento del ayuno fue muy similar entre todos los grupos e independientes del edulcorante que ingirieron.

5.1.8 Determinación de grelina

En las Figuras 5.8A y 5.8B se muestran los niveles de grelina de las ratas macho y hembra de los distintos grupos de edulcorantes. Destaca a simple vista el hecho de que todos los niveles de grelina fueron similares y no hubo diferencia. La observación anterior fue corroborada por los análisis estadísticos, siendo en el caso de los machos el valor de significancia de $P = 0.2127$, mientras que el respectivo valor para las hembras fue de $P = 0.1285$.

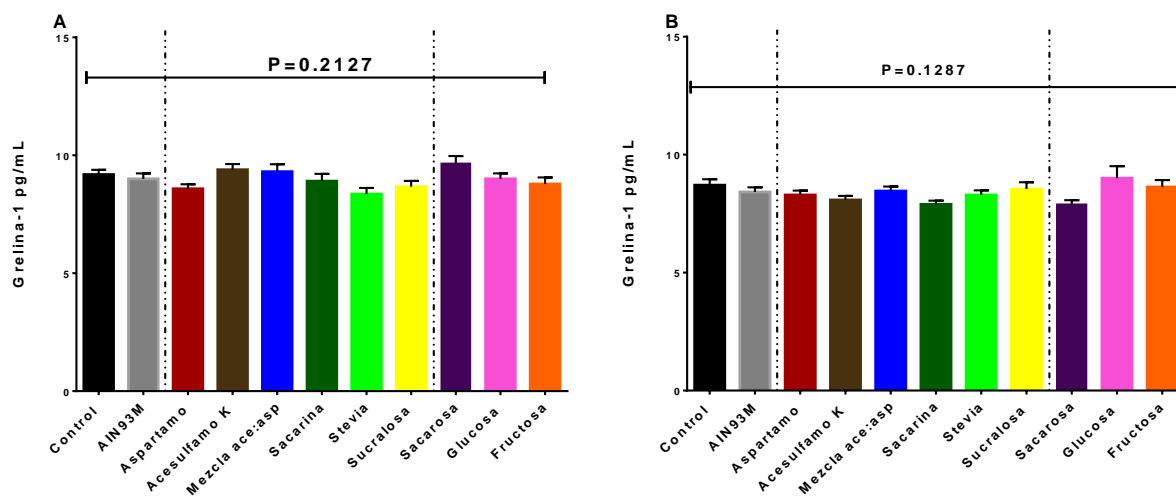


Figura 5.8 Niveles de grelina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de grelina \pm DEM

La grelina regresa a sus niveles basales a partir de las 4 horas de realizar la ingesta de alimentos (Overduin et al., 2012). Recordando que las muestras sanguíneas fueron tomadas con un ayuno de 12 horas, es normal que no existan diferencias significativas en los niveles de grelina. La grelina es una hormona íntimamente relacionada con el apetito y los cambios en los niveles de grelina son cíclicos. Disminuyen con la ingesta de alimentos y aumentan en los momentos de

ayuno. Es decir, los cambios se observan a corto plazo. Por lo tanto, al tener todas las ratas el mismo tiempo de ayuno, se esperaba que el nivel de apetito fuese el mismo independientemente del grupo de edulcorante.

5.1.9 Determinación de leptina

Los niveles de leptina de las ratas macho y hembra se muestran a continuación en las Figuras 5.9A y 5.9B. La primera de ellas corresponde a los machos y la segunda de ellas a las hembras. Destaca el hecho de que las hembras presentaron niveles inferiores a los observados en machos, prácticamente de la mitad. Lo anterior concuerda con lo reportado por Mulet et al. (2003) y Priego et al. (2009), quienes indican que contrario a lo observado en humanos, fueron las ratas hembras las que presentaron los menores niveles de leptina. En esta investigación se tuvieron en promedio 2.24 ng/mL para las hembras contra 4.77 ng/mL de los machos.

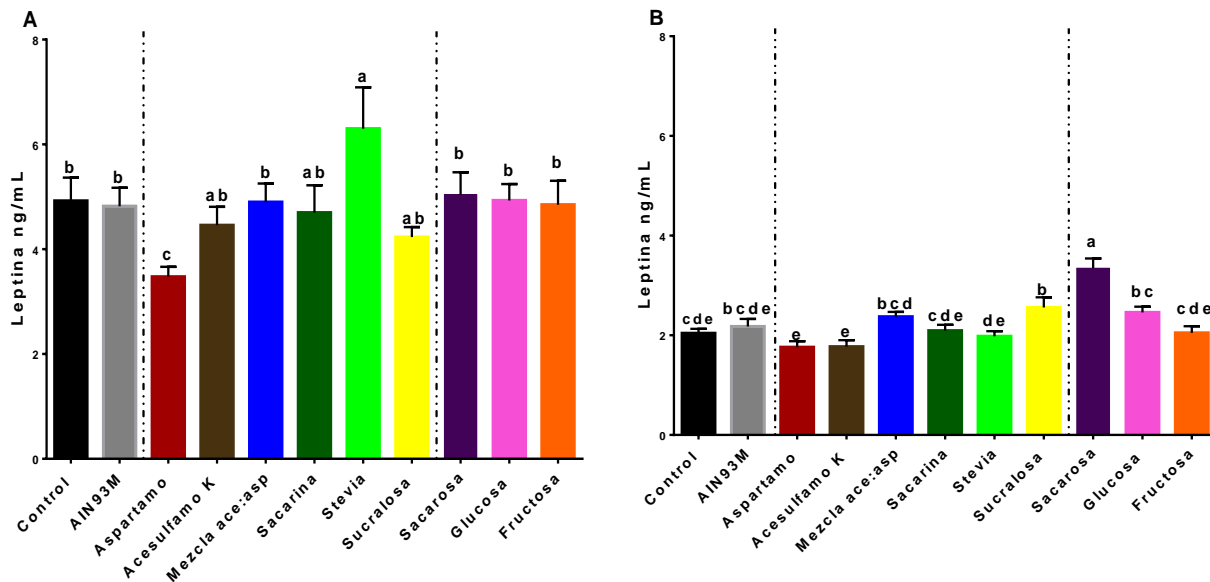


Figura 5.9 Niveles de leptina en ayuno de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de leptina ± DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a P<0.05: a,b,c,d,e

Los resultados estadísticos indicaron una $P < 0.001$ para el factor sexo. Esto indica que fueron estadísticamente distintos los niveles de leptina en ratas macho y en ratas hembras. Con respecto del factor edulcorante se tuvo una $P < 0.001$, es decir, al menos algún grupo de edulcorante presentó diferencias significativas con respecto del otro. Finalmente, la interacción de ambos

factores tuvo un valor de significancia de $P = 0.0036$, indicando que el comportamiento de los niveles de leptina frente a los edulcorantes cambió de machos a hembras de manera significativa.

Dada la existencia de diferencias entre machos y hembras se realizó el análisis de varianza de una vía para cada uno de ellos. Los resultados de las pruebas de rangos múltiples corresponden a las letras minúsculas que designan a los grupos homogéneos en las Figuras 5.9A y 5.9 B.

En las ratas macho se encontró la existencia de 3 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c. El grupo que presentó los mayores niveles de leptina fue el grupo de infusión de *Stevia rebaudiana* (6.3ng/mL). Los menores niveles se presentaron en el grupo de aspartamo (3.4 ng/mL). Precisamente, solamente estos dos grupos fueron estadísticamente diferentes al grupo control (4.9 ng/mL). Ningún otro edulcorante calórico o hipocalórico presentó diferencias con respecto del grupo control. Todos los grupos tuvieron concentraciones de leptina dentro de los valores normales.

La leptina circulante es un indicador indirecto de la cantidad de energía almacenada (tejido adiposo) (Myers et al., 2008). Además, para sustentar esta idea fue importante hacer el seguimiento de la masa corporal, como se verá más adelante, corroborando que los especímenes del grupo que ingirió la infusión de *Stevia rebaudiana* fueron los que presentaron una mayor ganancia de masa corporal con respecto de los del control. En futuras investigaciones mediante la determinación de la composición corporal tendrá que corroborarse esta hipótesis. En el caso del grupo de aspartamo los bajos niveles de leptina concuerdan con los bajos incrementos de masa corporal.

Ningún otro grupo de edulcorante para las ratas macho presentó diferencias, respecto del grupo control, inclusive los calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa). Si bien estos últimos elevaron los triglicéridos circulantes, parece que su efecto fue menor en la cantidad de tejido adiposo producido. Hay que recordar que esto es solamente una asociación indirecta, por lo que para conocer exactamente la cantidad de tejido adiposo será necesario realizar análisis de composición corporal.

Respecto de las hembras, estas tuvieron una tendencia distinta a la observada con las ratas macho. En el caso de las hembras el grupo que presentó los mayores niveles de leptina fue el de la sacarosa (3.34 ng/mL).

En las ratas hembra los grupos que fueron distintos al control (2.04 ng/mL) fueron la sacarosa (3.34 ng/mL) y la sucralosa (2.56 ng/mL). A pesar de esto, todos los grupos tuvieron concentraciones dentro del rango normal. Los sutilmente elevados niveles de leptina en el grupo de sacarosa son concordantes con una mayor ganancia de masa corporal como se verá después. Sin embargo, en el caso de la sucralosa, esta asociación no se observa, ya que la sucralosa fue el grupo que tuvo la menor ganancia de masa corporal. Solamente el análisis de composición corporal resolverá estas incógnitas.

5.2 EXPRESIÓN RELATIVA DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA LIPOGÉNESIS

5.2.1 Expresión relativa de *SREBP-1*

La determinación de la expresión relativa se realizó en el termociclador *Light Cycler 480* de Roche®. Se utilizó como gen estructural el gen codificante para actina. Los resultados se muestran en las Figuras 5.10A, para los machos y 5.10B para el caso de las hembras.

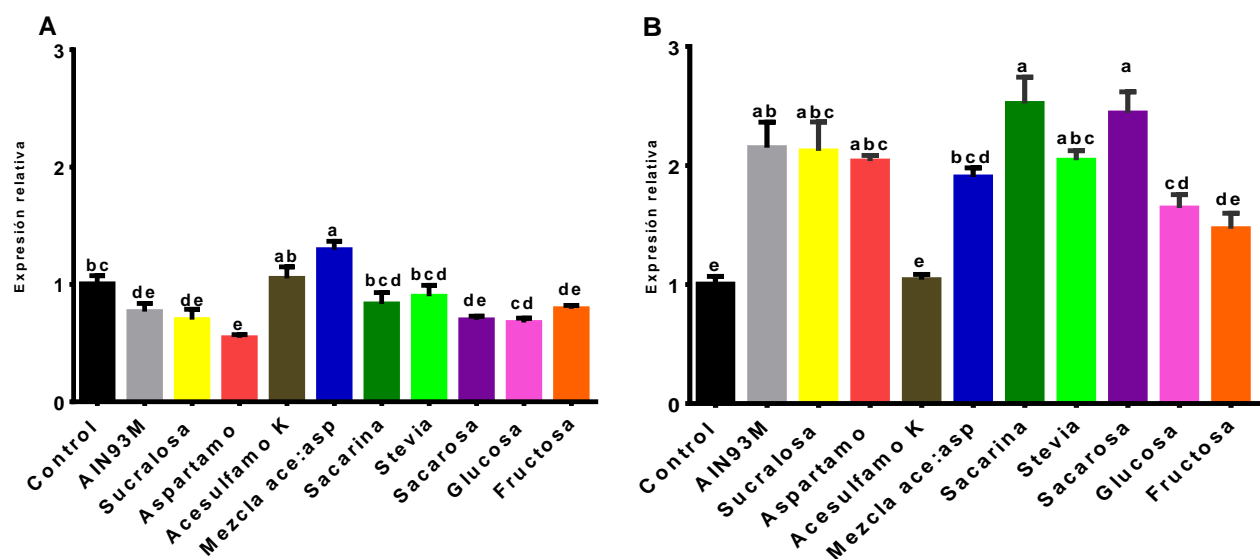


Figura 5.10 Niveles de expresión relativa de SREBP-1 en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d,e

Los resultados de los análisis estadísticos indicaron la presencia de diferencias significativas tanto en machos ($P < 0.001$) como en hembras ($P < 0.001$). Las pruebas de rangos múltiples mostraron la existencia de 5 grupos homogéneos en ambos casos. Al observar las Figuras 5.10A y 5.10B se ve que los niveles de expresión relativa de *SREBP-1* en hígado fueron mayores en las ratas hembra. En el caso de las ratas macho, el grupo de ratas que bebía la mezcla de aspartamo con acesulfamo de K, presentó los mayores niveles de expresión relativa (1.3). Por otro lado, el grupo que presentó la menor expresión fue el que ingirió aspartamo (0.54). Asimismo, los grupos de sucralosa, dieta *AIN93M*, sacarosa y glucosa fueron distintos al grupo control, presentando menores niveles de expresión. Destaca el hecho de que solamente la mezcla de aspartamo con acesulfamo, un edulcorante hipocalórico haya logrado una mayor expresión de *SREBP-1*. Esto concuerda con lo reportado por Guzmán (2012) quien señaló que, en ratas macho tras 104 días de experimentación, el grupo de mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K, fue el grupo que presentó la mayor expresión de *SREBP-1*.

Con respecto de las hembras se apreció que todos los grupos a excepción de acesulfamo de K y fructosa presentaron niveles de expresión significativamente mayores al grupo control. La mayor expresión se dio en los grupos de sacarosa y sacarina, donde se expresa 2.5 y 2.4 veces más *SREBP-1*, respectivamente, la cual está involucrada en una mayor lipogénesis. Destaca que el grupo que bebió sacarosa presentó una mayor estimulación de *SREBP-1* que la glucosa y la fructosa.

En las ratas hembras, respecto de los edulcorantes hipocalóricos se destaca que 4 de ellos (la sacarina, la sucralosa, el aspartamo y la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana*) estimularan la expresión de *SREBP-1* (2.4, 2.1, 2.0, 2.0, respectivamente) a niveles estadísticamente similares a los ocasionados por la sacarosa, que es de 2.4.

El factor de transcripción *SREBP-1* está involucrado en la estimulación de la transcripción de distintas enzimas ligadas con la litogénesis y se sabe que es regulado por los niveles de insulina. Los factores de transcripción *LXR* y los *USF*, entre otros factores, están involucrados, por lo que en futuras investigaciones será necesario indagar acerca de ellos y esclarecer cómo es que estos edulcorantes hipocalóricos lograron estimular su expresión a niveles similares a los de la sacarosa.

5.2.2 Expresión relativa de *ChREBP*

Los niveles de expresión del gen codificante para *ChREBP* en hígado se muestran en las Figuras 5.11A y 5.11B, siendo la primera para los machos y la segunda la correspondiente para las hembras. En los resultados para los machos se encontró que no existió diferencia en los niveles de expresión con un valor de significancia $P = 0.0504$. Lo anterior tiene coherencia con el hecho de que no se encontró diferencia significativa en los niveles de glucosa en las ratas macho (Figura 5.2A en la sección 5.1.3). Es importante recordar que *ChREBP* es estimulado por los derivados de la glucosa y la fructosa como son la glucosa-6-fosfato, la fructosa-2, 6-bifosfato, la xilulosa-5-fosfato, etc. Por lo tanto, al ser los niveles de glucosa iguales estadísticamente, se supondría que los niveles de sus derivados fueron los mismos y, por ende, la estimulación de *ChREBP* fue la misma en todos los casos.

En las ratas hembras sí se observaron diferencias estadísticamente significativas $P = 0.0373$ en los niveles de expresión de *ChREBP*, ya que todos los grupos difirieron del grupo control. Sin embargo, los niveles plasmáticos de glucosa (Figura 5.2B) parecen no explicar estas diferencias observadas, ya que los niveles séricos de glucosa no difirieron del grupo control.

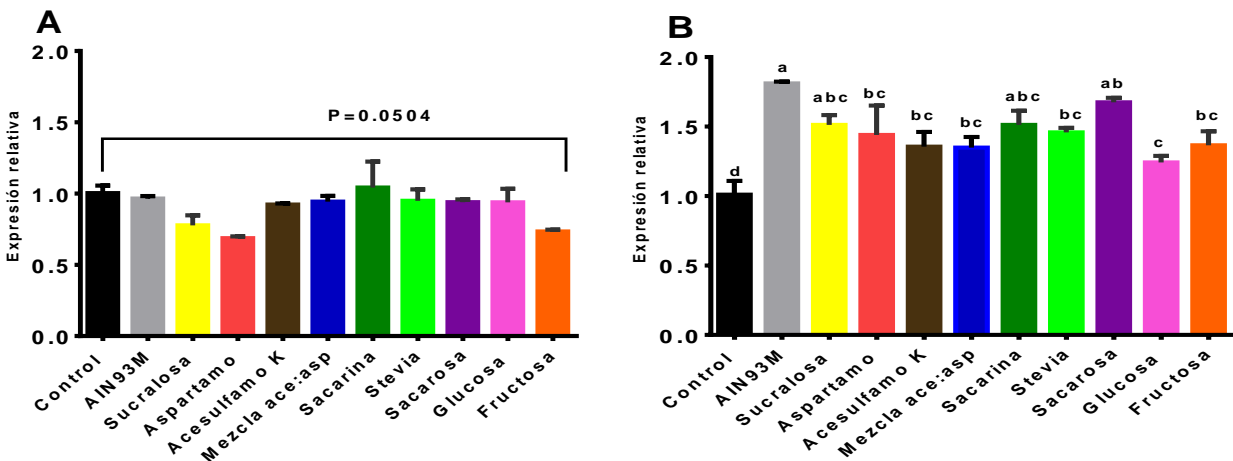


Figura 5.11 Niveles de expresión relativa de *ChREBP* en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c

Hay que recordar que *ChREBP* es regulado a nivel transcripcional por el receptor X hepático (*LXR*), por lo que probablemente cambios en este receptor podrían explicar los resultados

observados. Es por ello que en futuras investigaciones se tendrá que estudiar este otro factor de transcripción con más detalle y estudiar cómo los edulcorantes calóricos e hipocalóricos estimulan a estos factores de transcripción.

En las ratas hembra los dos grupos que presentaron la mayor expresión de *ChREBP*, fueron el de sacarosa y el de la dieta control *AIN93M*, expresando 1.67 y 1.81 veces, respectivamente. Sin embargo, estos dos no difirieron del resto de edulcorantes hipocalóricos. Lo anterior muestra que *ChREBP* en ratas hembra es estimulado tanto por edulcorantes calóricos como hipocalóricos, aunque de forma moderada.

5.3 EXPRESIÓN RELATIVA DE *SGLT-1*

Las Figuras 5.12A y 5.12B muestran los niveles de expresión relativa del ARNm de *SGLT-1*. Tanto en machos como en hembras se aprecia que existieron diferencias significativas con respecto del grupo control. Sin embargo, la tendencia difiere en machos y hembras.

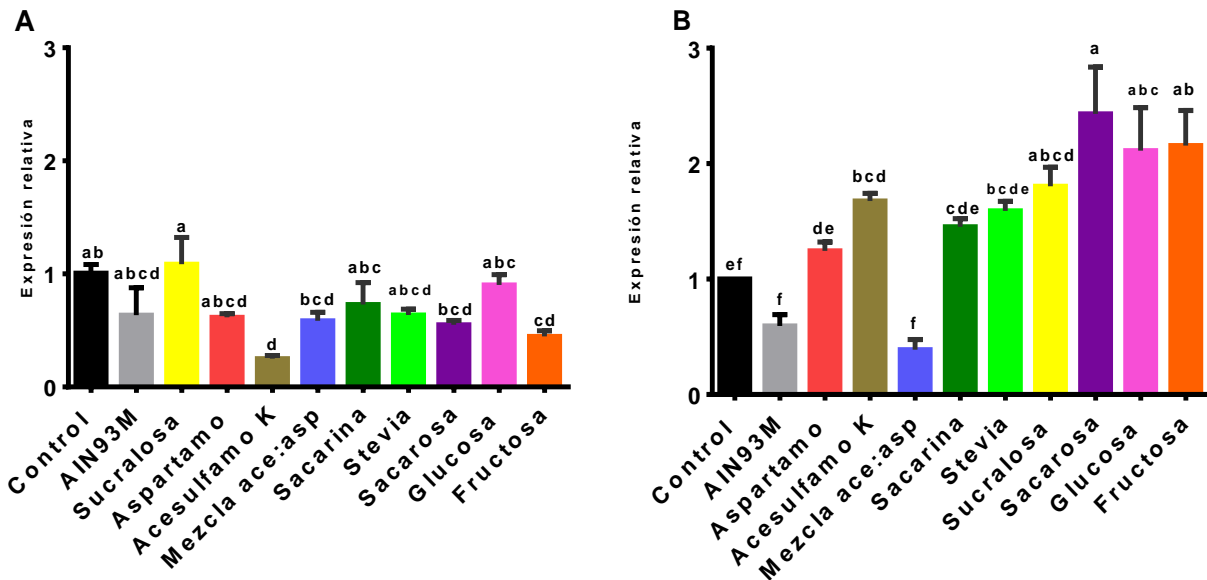


Figura 5.12 Niveles de expresión relativa de *SGLT-1* en hígado de ratas por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de los niveles de expresión relativa \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

Mientras que en los machos no existió una sobre-estimulación de la transcripción del ARNm de *SGLT-1*, en las hembras sí, tanto para los grupos de edulcorantes calóricos como para los hipocalóricos. Los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas tanto en machos ($P =$

0.0185), como en hembras ($P < 0.001$). Las pruebas de rangos múltiples indicaron en el caso de los machos la presencia de 4 grupos homogéneos. Respecto de las hembras, se encontró la existencia de 6 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c, d, e, f.

En el caso de los machos se aprecia que exclusivamente los grupos de acesulfamo de K y sacarosa disminuyeron la expresión con respecto del grupo control y, en ambos casos, la expresión fue de 0.25 y 0.55, respectivamente. Aún no existe mucha información acerca de cómo es regulada la expresión de este transportador en los hepatocitos, por lo que será importante seguir indagando al respecto.

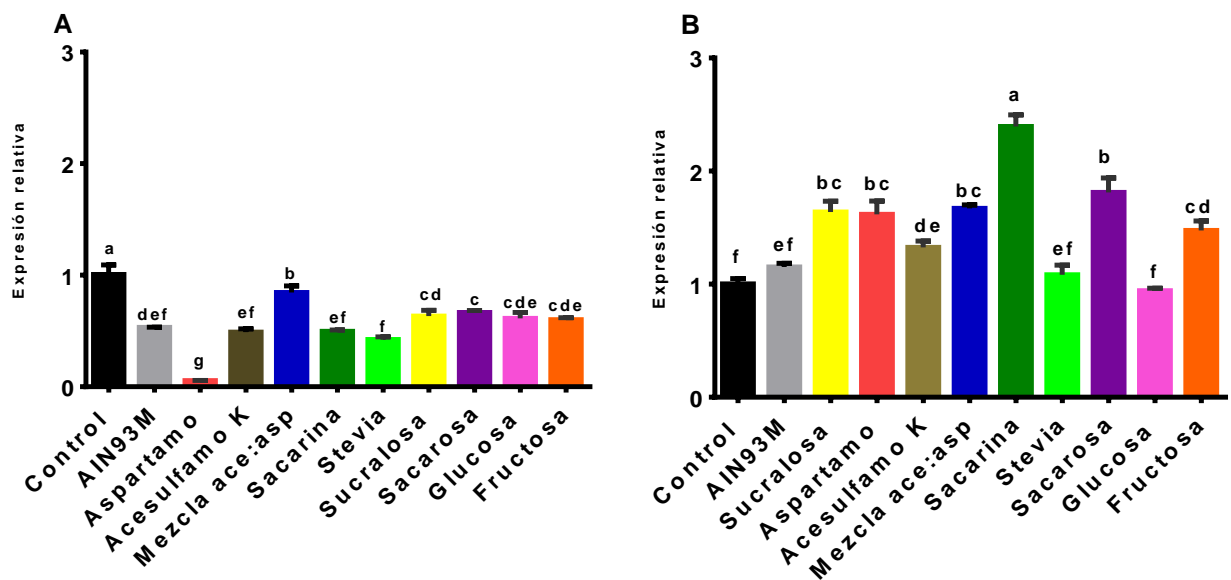
Sin embargo, de acuerdo con Steinert et al. (2011) si bien se ha demostrado que “*in vitro*” en enterocitos los edulcorantes artificiales logran la estimulación de los péptidos *GIP* y *GLP-1* así como una mayor expresión de *SGLT-1*, “*in vivo*” parece ser que los edulcorantes por sí solos no son un estímulo suficiente que logre una mayor secreción de estos péptidos intestinales ni una mayor expresión del cotransportador de sodio/glucosa *SGLT-1*.

El ARNm del transportador activo de sodio-glucosa presentó un comportamiento diferente en las hembras. En este caso, varios grupos difirieron del grupo control excepto los grupos de aspartamo, dieta control *AIN93M* y la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo K. Los grupos que presentaron la mayor expresión fueron los grupos de edulcorantes calóricos: sacarosa, glucosa y fructosa, lo cual es lógico ya que debe recordarse que este transportador, junto con *GLUT-2*, son los encargados del transporte de glucosa en el hepatocito. Respecto de los edulcorantes hipocalóricos destacó que el acesulfamo K, la sacarina, la sucralosa e infusión de *Stevia rebaudiana* sobre-expresaran este transportador, sin ser estos sustratos del mismo.

Estos resultados fueron similares a los reportados por Margolskee et al. (2007), quienes observaron que en enterocitos de ratones a los cuales les suministraron acesulfamo de K, sucralosa y sacarina, existió una mayor expresión de *SGLT-1*. Margolskee et al. (2007) sugirieron que probablemente los receptores *TIR2/TIR3* pudieran estar relacionados con la regulación de la expresión de *SGLT-1*. De acuerdo con su hipótesis, los edulcorantes artificiales estimulan estos receptores que, a su vez, regulan la expresión de *SGLT-1*. Sin embargo, los mecanismos de regulación de *SGLT-1* siguen sin ser del todo claros.

5.4 EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN CODIFICANTE DEL RECEPTOR DE INSULINA

Se determinó la expresión relativa del ARNm del receptor de insulina. Los niveles de los distintos grupos de ratas macho se muestran en la Figura 5.13A, los niveles de expresión de las ratas hembra se muestran en la Figura 5.13B. El análisis de varianza indicó la existencia de diferencias significativas ($P < 0.001$) en los niveles de expresión del receptor de insulina en hígado de ratas macho. La prueba de rangos múltiples indicó la existencia de 6 grupos homogéneos, designados por las letras a, b, c, d, e, f. Todos los grupos fueron diferentes del grupo control, ya que todos subexpresaron al receptor de insulina, especialmente el grupo del aspartamo. Esto es sorprendente, ya que ni los niveles de glucosa en ayuno o los niveles de insulina concuerdan con esta tendencia.



Caso contrario fue lo ocurrido con las hembras. El análisis estadístico mostró la presencia de diferencias significativas $P < 0.001$. En el caso de las ratas hembra existieron 6 grupos homogéneos, siendo mayores los grupos de sucralosa, aspartamo, acesulfamo K, mezcla de aspartamo con acesulfamo K, sacarina, sacarosa y fructosa. No se sabe cuáles son los mecanismos que provocaron estos niveles de expresión del receptor de insulina, sobre todo cuando ya se ha mencionado que estos niveles no corresponden ni con los niveles séricos de

glucosa, ni con los niveles circulantes de insulina. Lo destacable es el hecho de que algunos edulcorantes artificiales provocaron una expresión del receptor de insulina semejante a la ocasionada por el consumo crónico de sacarosa, e incluso la sacarina expresó en mayor medida que la sacarosa.

5.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE *Western blot*

5.5.1 Análisis de la proteína de unión al elemento regulador del estero (SREBP-1)

Los niveles de densidad óptica relativa de la proteína de unión al elemento regulador del estero en las muestras de hígado se muestran en las Figuras 5.14 en el caso de los machos y en la Figura 5.15 para las hembras.

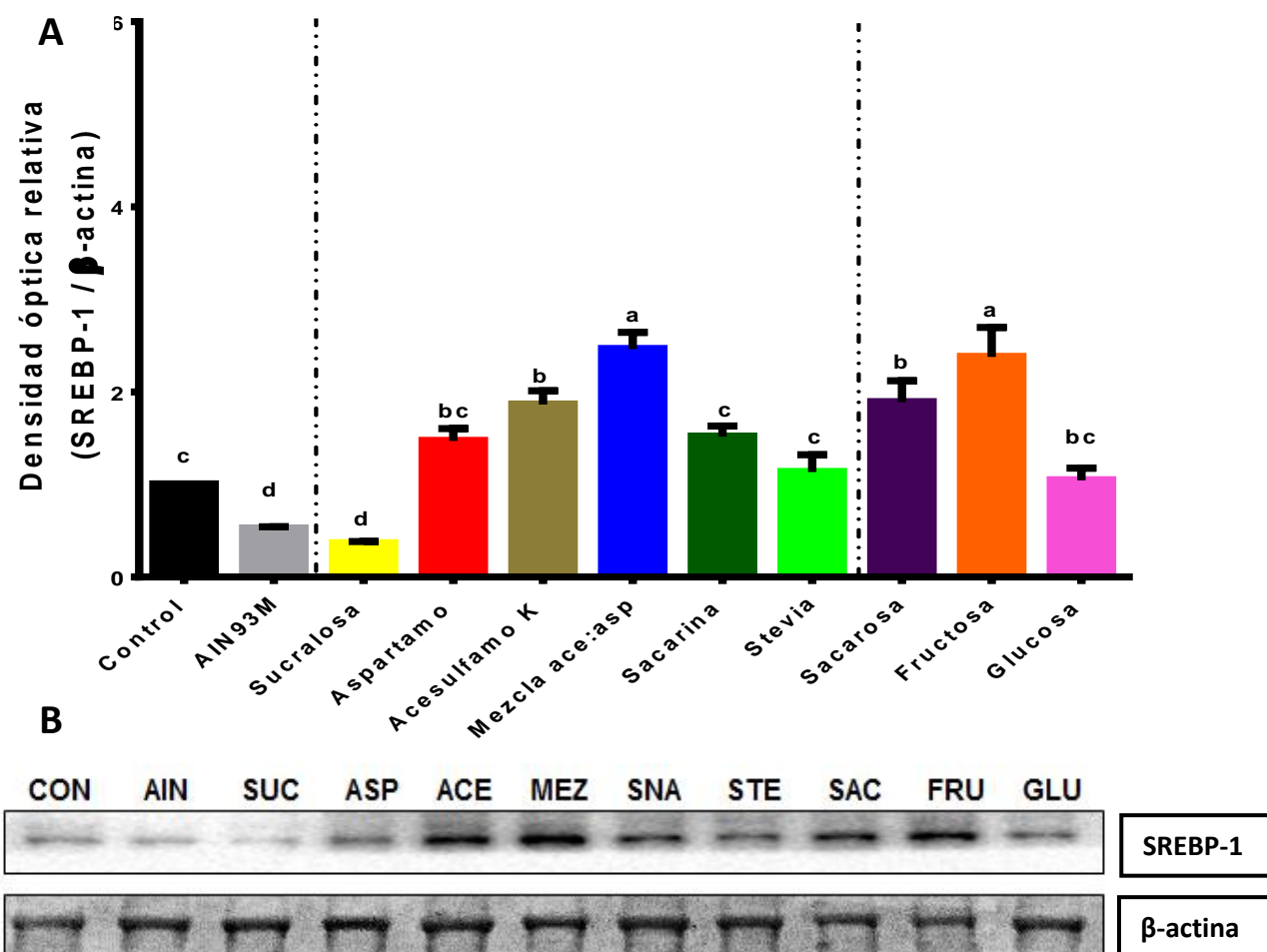


Figura 5.14 A. Expresión de *SREBP-1* en hígado de ratas macho. Media \pm DEM, B Expresión de *SREBP-1* determinada por *Western blot*

Para las ratas macho el análisis estadístico indicó la presencia de diferencias significativas ($P < 0.001$) en los niveles de expresión de *SRBP-1*. La prueba de rangos múltiples indicó la presencia de 4 grupos homogéneos. Los grupos que presentaron los mayores niveles de *SREBP-1* fueron la mezcla de aspartamo con acesulfamo de potasio y el grupo de fructosa. Por otro lado, los dos grupos que fueron menores al grupo control fueron los grupos de la dieta control *AIN93M* y el grupo de sucralosa.

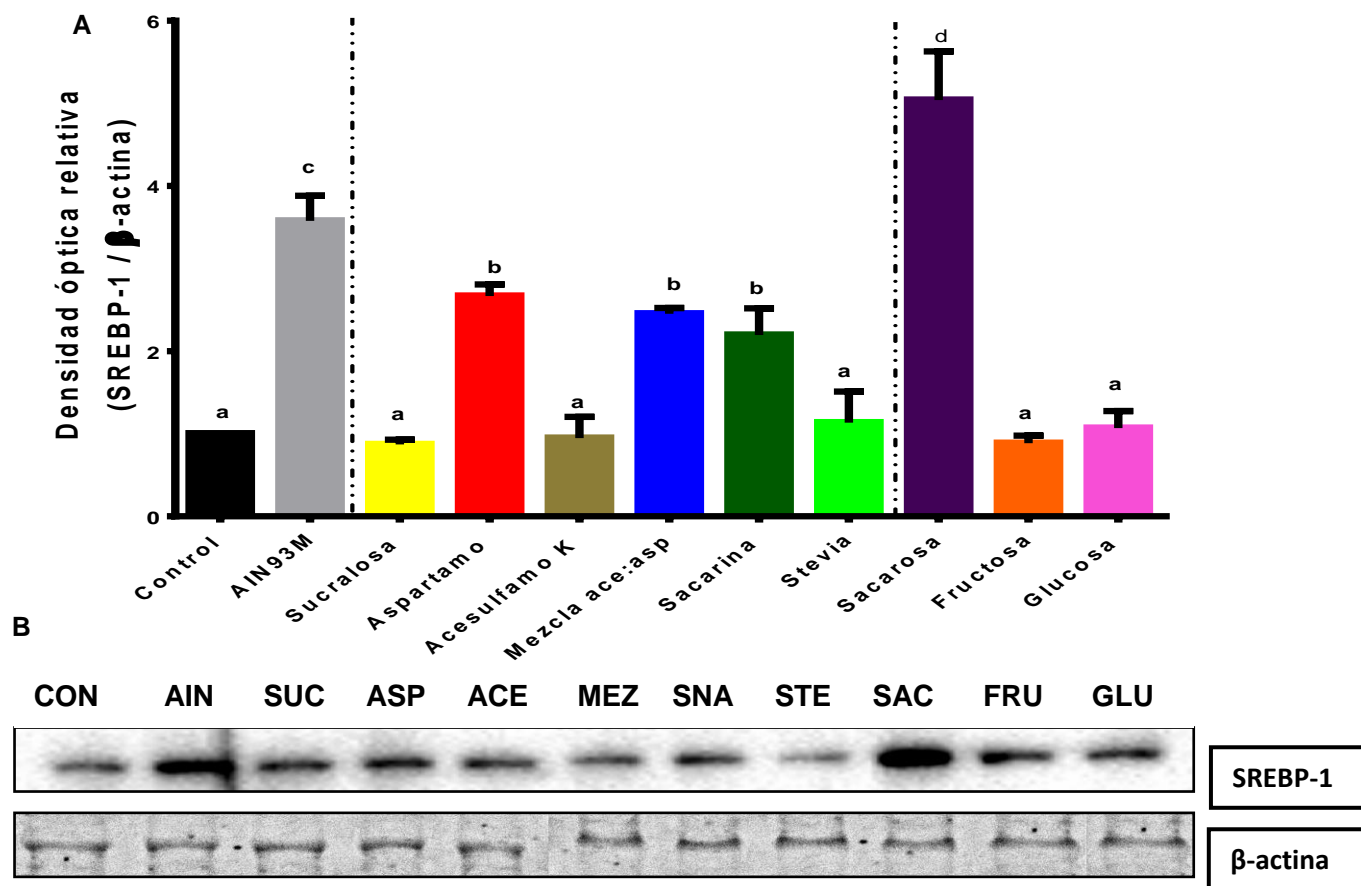


Figura 5.15. A. Expresión de SREBP-1 en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM. B Expresión de SREBP-1 determinada por Western blot

Los elevados niveles encontrados de la proteína *SREBP-1* en el grupo de mezcla de aspartamo con acesulfamo de potasio concuerda con los altos niveles de expresión del ARNm (ver Figura 5.10A). Así mismo, los niveles de la proteína de unión al elemento regulador del estero se encuentran elevados en el grupo de acesulfamo de potasio, lo cual no concuerda con los niveles de expresión relativa del ARNm encontrado en el hígado.

Respecto de los edulcorantes calóricos el grupo que tuvo las mayores cantidades de *SREBP-1* fue el grupo de fructosa, seguido del grupo de sacarosa. Por otra parte, el grupo de glucosa no difirió del grupo control; por lo que todo parece indicar que es la fructosa la que estimula a *SREBP-1* y no el grupo de la glucosa. Hay que recordar que la sacarosa es un disacárido que es hidrolizada por la sacarasa cuyos productos son la glucosa y fructosa. Por lo que si la glucosa por sí sola no logra estimular a *SREBP-1*, luego entonces la ligera sobreexpresión observada en la sacarosa probablemente sea a causa de la fructosa (metabolito de su hidrólisis)

Igualmente, en las hembras existió diferencia estadística significativa (Figura 5.15 A y B) con un valor de significancia $P < 0.001$. La prueba de rangos múltiples al igual que con los machos encontró la existencia de 4 grupos homogéneos, siendo el grupo de la sacarosa el que presentó los mayores niveles de manera muy notoria. Esto concuerda con los niveles de expresión del ARNm, donde la sacarosa junto con la sacarina presentó los mayores niveles de expresión relativa. En este caso la fructosa no difirió del grupo control, contrariamente a lo ocurrido con los machos donde presentaba los mayores niveles de *SREBP-1*. Lo anterior vuelve a apoyar la hipótesis de que el consumo crónico excesivo de sacarosa tiene mayores repercusiones metabólicas en las ratas hembra.

Los grupos de edulcorantes hipocalóricos para las ratas hembra presentaron comportamientos repartidos en dos tendencias, la primera tendencia fue a no presentar discrepancias respecto del grupo control. Esta tendencia se observó en los grupos de sucralosa, acesulfamo de potasio y de la infusión de *Stevia rebaudiana*. La segunda tendencia fueron los niveles ligeramente mayores al grupo control y la presentaron los grupos de aspartamo, la mezcla de acesulfamo de potasio con aspartamo y la sacarina; aunque no a niveles tan elevados como los ocasionados por la sacarosa.

Los niveles de insulina, uno de los reguladores de *SREBP-1*, no explican lo observado en los niveles de ARNm, ni en la proteína transcrita, por lo que se deberán estudiar los otros factores involucrados en la litogénesis en investigaciones posteriores.

5.5.2 Sintasa de ácidos grasos (FAS)

La sintasa de ácidos grasos es la enzima clave de la lipogénesis. Es la encargada de ir adicionando carbonos a la malonil-Coenzima A, hasta que después de varios ciclos de reacciones

se genere el palmitato (Nelson y Cox, 2009). La Figura 5.16A muestra los niveles de esta enzima en hepatocitos de las ratas macho. El tejido hepático junto con el tejido adiposo son los principales sitios en donde ocurre la lipogénesis. En la Figura 5.16 A se observa claramente que el grupo de sacarosa presentó la mayor expresión de la sintasa de ácidos grasos. A pesar de que *SREBP-1* es uno de los factores de transcripción que estimula a *FAS* y se elevó en el grupo de fructosa, así como en el grupo de la mezcla de aspartamo con acesulfamo K, no presentaron elevados niveles de la sintasa de ácidos grasos. El análisis de varianza corroboró la presencia de diferencias significativas $P < 0.001$. Todos los grupos de edulcorantes hipocalóricos excepto los grupos que ingirieron sacarina y la infusión de *Stevia rebaudiana*, presentaron niveles inferiores a los del grupo control.

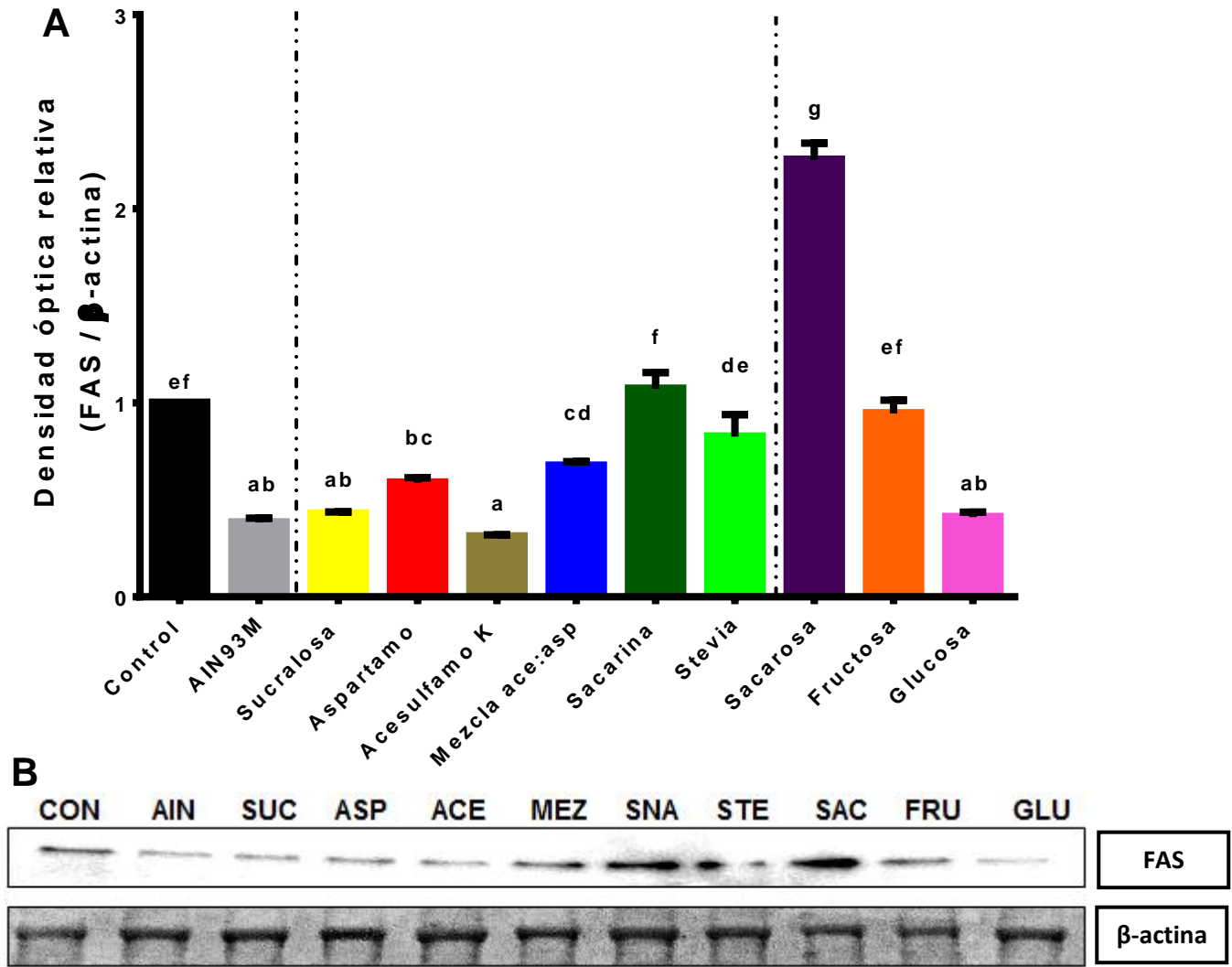


Figura 5.16. A. Expresión de FAS en hígado de ratas macho. Media \pm DEM. B. Expresión de FAS determinada por Western blot

Todo lo anterior sugiere que una elevación en los niveles de *SREBP-1* y de *ChREBP* no necesariamente refleja un incremento de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*). Considerando que *FAS* también es controlada a nivel hormonal por la insulina, el glucagón y la leptina, su regulación se convierte en un proceso complejo. Además, *FAS* es regulada por los nutrientes, especialmente por la glucosa la cual proporciona los precursores necesarios para la lipogénesis. Lo interesante es que si bien todos los edulcorantes calóricos, sacarosa, glucosa y fructosa, proporcionan precursores para la lipogénesis, únicamente el grupo de sacarosa presentó los mayores niveles de *FAS*. Este hallazgo deberá estudiarse posteriormente en una nueva investigación.

Respecto de las hembras, el análisis de varianza indicó una diferencia significativa ($P < 0.001$). La prueba de rangos múltiples indicó la existencia de 7 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c, d, e, f y g, las cuales están colocadas en la Figura 5.17.

Los grupos que presentaron los niveles mayores de sintasa de ácidos grasos (*FAS*) fueron el grupo de la dieta control *AIN93M*, con menor contenido de proteína y mayor de hidratos de carbono, el grupo de aspartamo, el grupo de sacarosa y el grupo de glucosa. Únicamente el grupo que ingirió la infusión de *Stevia rebaudiana* fue significativamente inferior al grupo control.

Destaca entre ellos el grupo de sacarosa ya que fue el que presentó los mayores niveles de *FAS*. Esto es concordante con los niveles de *SREBP-1* observados, así como con los niveles de expresión del *ARNm* de *SREBP-1* y *ChREBP*, lo cual armoniza con lo esperado. Es sabido que tanto *SREBP-1* como *ChREBP* son factores de transcripción que estimulan enzimas relacionadas con la lipogénesis entre ellas a la sintasa de ácidos grasos (*FAS*). Lo anterior indica que el consumo crónico excesivo de sacarosa induce significativamente la lipogénesis mediada por *SREBP-1* y *ChREBP*. *FAS* es responsable de la lipogénesis y, por tanto, aquellos grupos que presentaron niveles elevados posiblemente presenten condiciones favorables para el desarrollo de esteatosis hepática, lo que se verá en los estudios complementarios al final de este capítulo. Como se mostrará en la sección 5.11.2, los grupos con altos niveles de *FAS* presentaron degeneración vacuolar moderada. Sorprendentemente, el grupo de sucralosa presentó degeneración vacuolar grave a pesar de tener niveles de *FAS* similares al control.

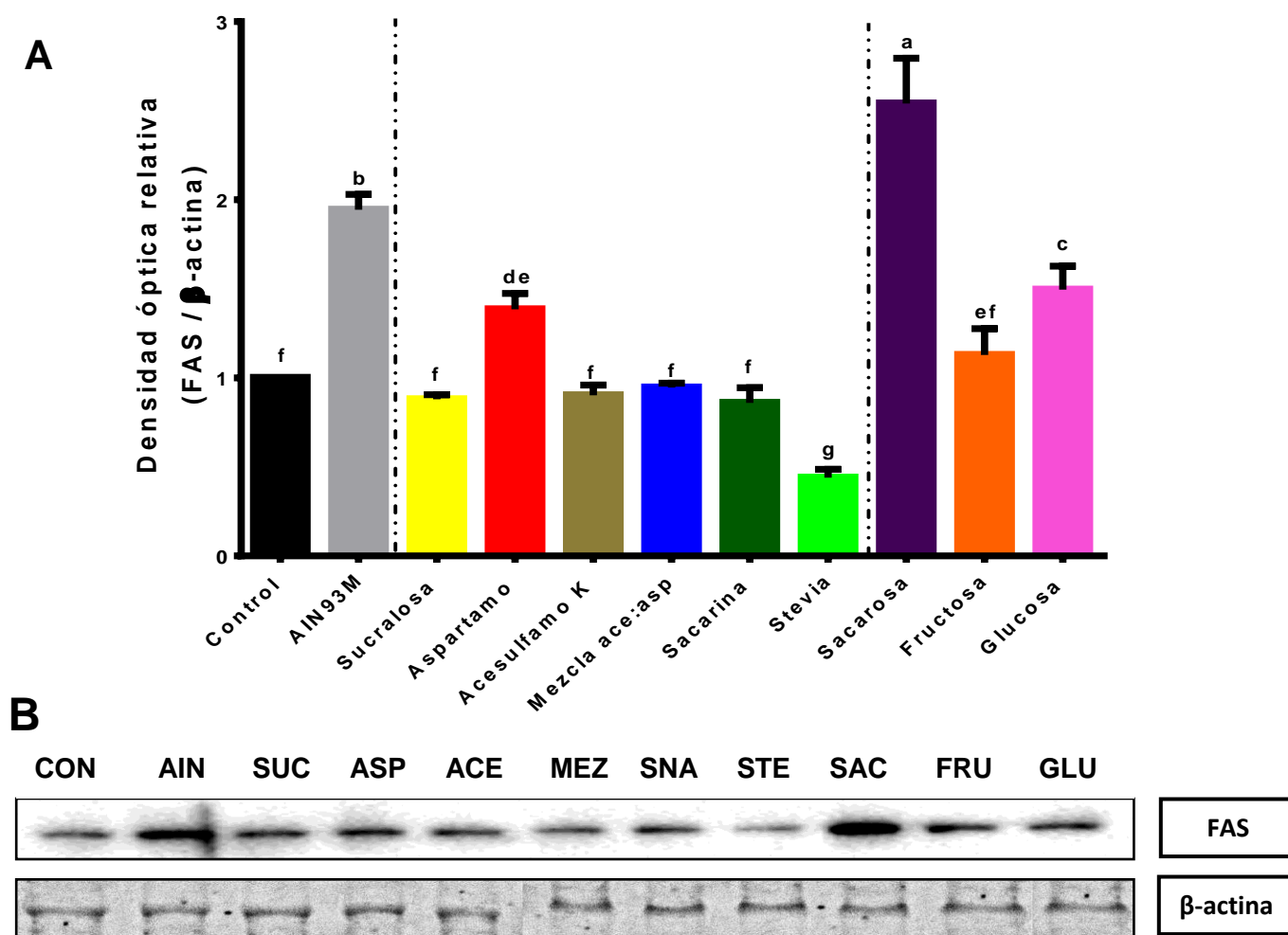


Figura 5.17. A. Expresión de FAS en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM.
 B. Expresión de FAS determinada por *Western blot*

5.5.3 Análisis del cotransportador de sodio-glucosa (*SGLT-1*)

No se conoce totalmente el papel que desempeña *SGLT-1* en la homeostasis de glucosa en los hepatocitos; sin embargo, se ha relacionado que si bien *GLUT-2* es el mayor responsable de esta regulación, *SGLT-1* también podría estar desempeñando un rol importante. En la Figura 5.18 se muestran los niveles de *SGLT-1* en hepatocitos de ratas macho.

De manera general se observa que los cambios fueron muy sutiles. A pesar de esto, el análisis estadístico indicó diferencias significativas $P = 0.0001$. Sin embargo, ningún grupo presentó niveles mayores a los del grupo control de manera estadísticamente significativa.

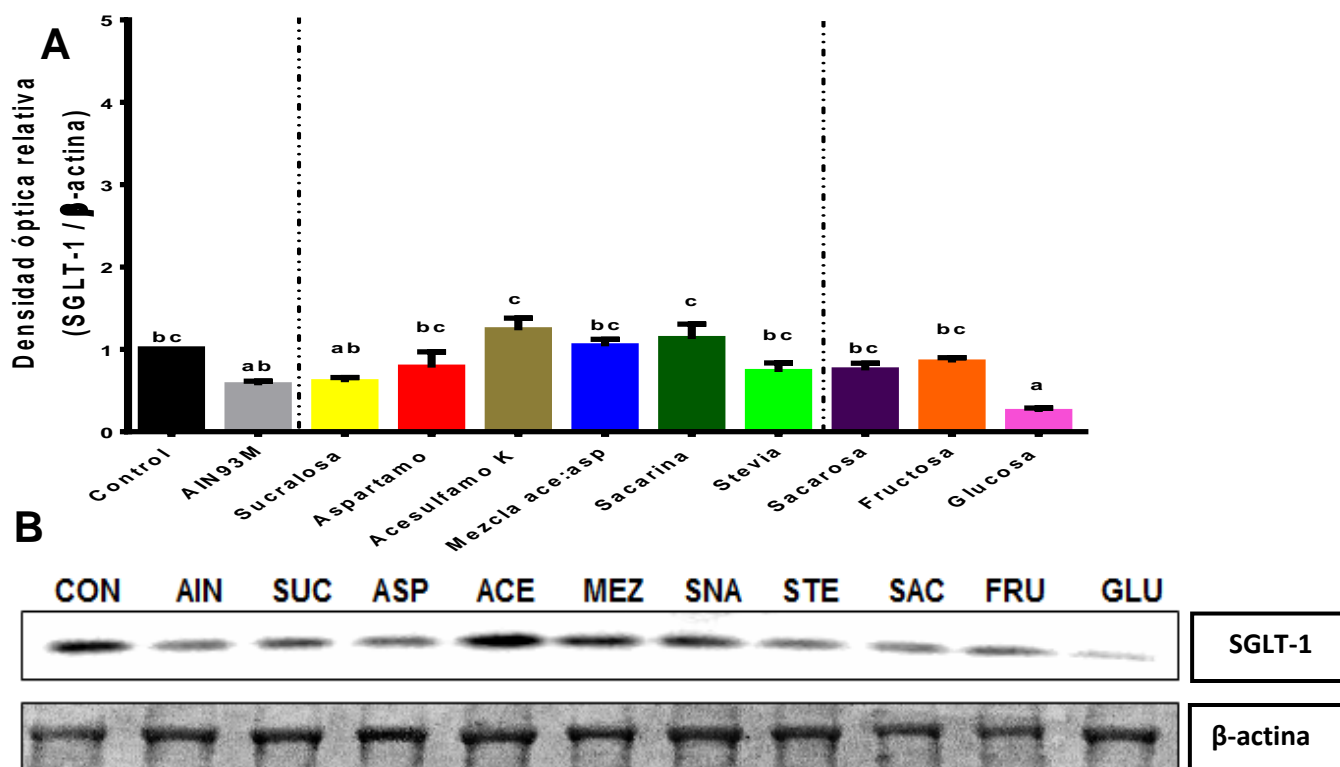


Figura 5.18. A. Expresión de SGLT-1 en hígado de ratas macho. Media ± DEM. B. Expresión de SGLT-1 determinada por Western blot

Respecto de las hembras, el comportamiento fue distinto, como es notorio en la Figura 5.19. El análisis de varianza indicó la presencia de diferencias significativas $P < 0.001$. El análisis de rangos múltiples mostró la existencia de 5 grupos homogéneos designados bajo las letras a, b, c, d y e. Los tres glúcidos simples (sacarosa, glucosa y fructosa) fueron los únicos que presentaron niveles significativamente mayores al grupo control. Lo anterior es una tendencia esperada, ya que *SGLT-1* se encarga de cotransportar glucosa al interior del hepatocito. Aunque *SGLT-1* únicamente reconoce a la glucosa o a la galactosa (Margolskee et al., 2007). Se observa que la fructosa fue capaz de sobreestimar la producción de este transportador. Esto puede deberse quizás, como señalan Margolskee et al. (2007), a la estimulación que causa la fructosa a los receptores del gusto dulce T1R2/T1R3 los cuales pudiesen estar regulando la producción de *SGLT-1*. Respecto a los edulcorantes hipocalóricos, si bien existe una mayor producción de *SGLT-1* en los grupos de sucralosa e infusión de *Stevia rebaudiana*, no fueron diferentes estadísticamente del grupo control. Sin embargo, Margolskee et al. (2007) reportaron que en enterocitos los edulcorantes artificiales estimulaban una mayor expresión del transportador *SGLT-1*, lo que conllevaba a una mayor captación de glucosa.

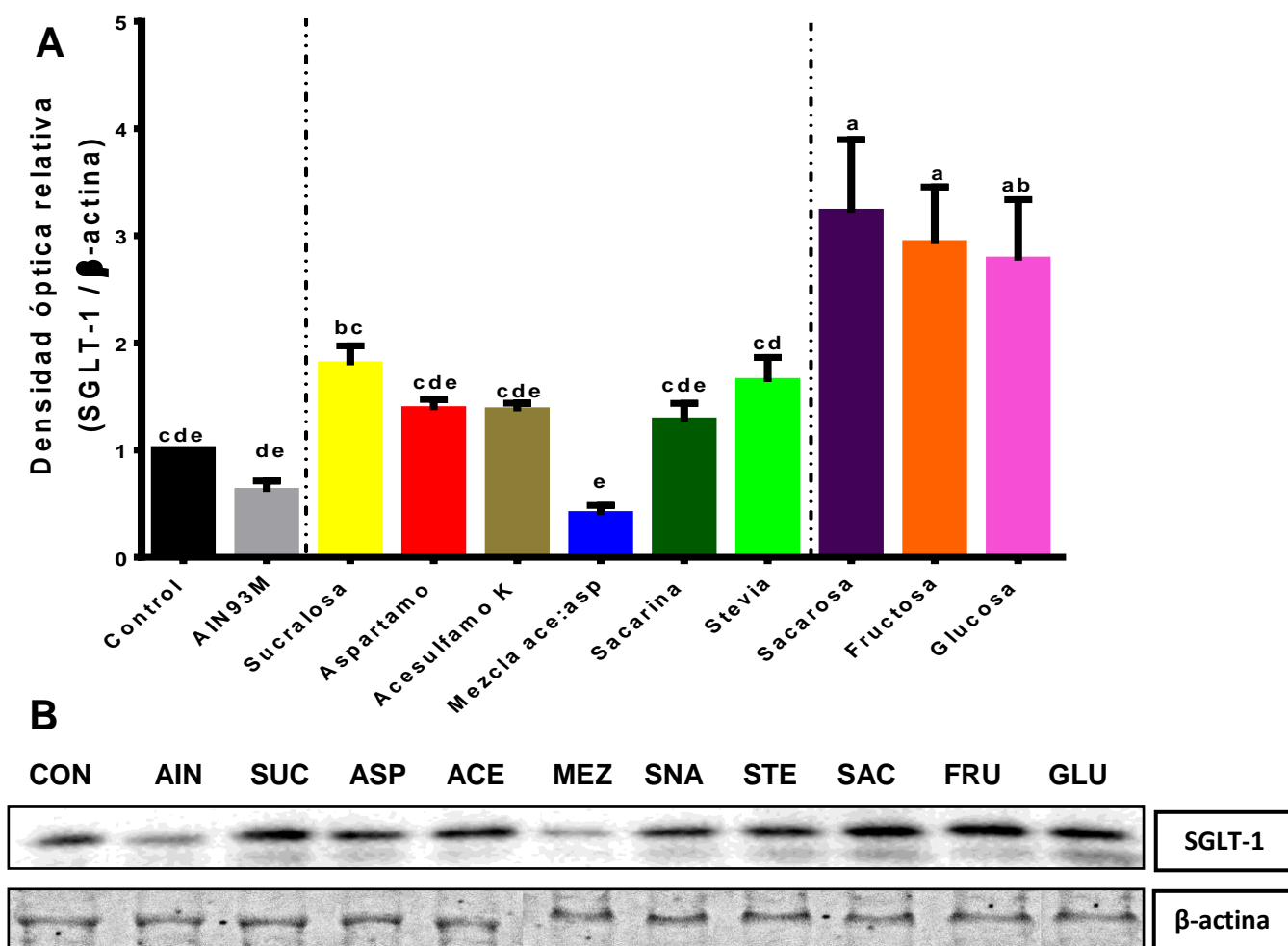


Figura 5.19. A. Expresión de *SGLT-1* en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM.
 B. Expresión de *SGLT-1* determinada por *Western blot*

5.5.4 Transportador de glucosa *GLUT-2*

El *GLUT-2* al ser un transportador de glucosa bidireccional es capaz de transportar glucosa del exterior al interior de la célula y viceversa. Es por ello que es el principal transportador encargado de la homeostasis de glucosa en los hepatocitos.

Los niveles de expresión de este transportador de glucosa en los hígados de ratas macho se muestran en las Figuras 5.20A y B. Destaca a simple vista que la fructosa fue el único grupo que presentó niveles superiores estadísticamente al grupo control.

Recordando que los volúmenes totales ingeridos de las soluciones de sacarosa (10 %) y glucosa (10 %) fueron considerablemente mayores que los ingeridos de fructosa (10 %) (9,007 mL, 9,421 mL y 6662 mL, respectivamente), destaca precisamente que la fructosa presentó los mayores niveles de *GLUT-2*. Si bien es cierto que *GLUT-2* es capaz de transportar tanto a glucosa como fructosa, se esperaba que la expresión de *GLUT-2* siguiera la misma tendencia que la observada en la ingesta de bebida. Lo anterior plantea la hipótesis de que si bien *GLUT-2* es capaz de transportar tanto a la glucosa como la fructosa, esta última provoque una mayor estimulación de su producción en los hepatocitos de las ratas macho, por mecanismos que todavía no están elucidados. Esta es una línea abierta de investigación.

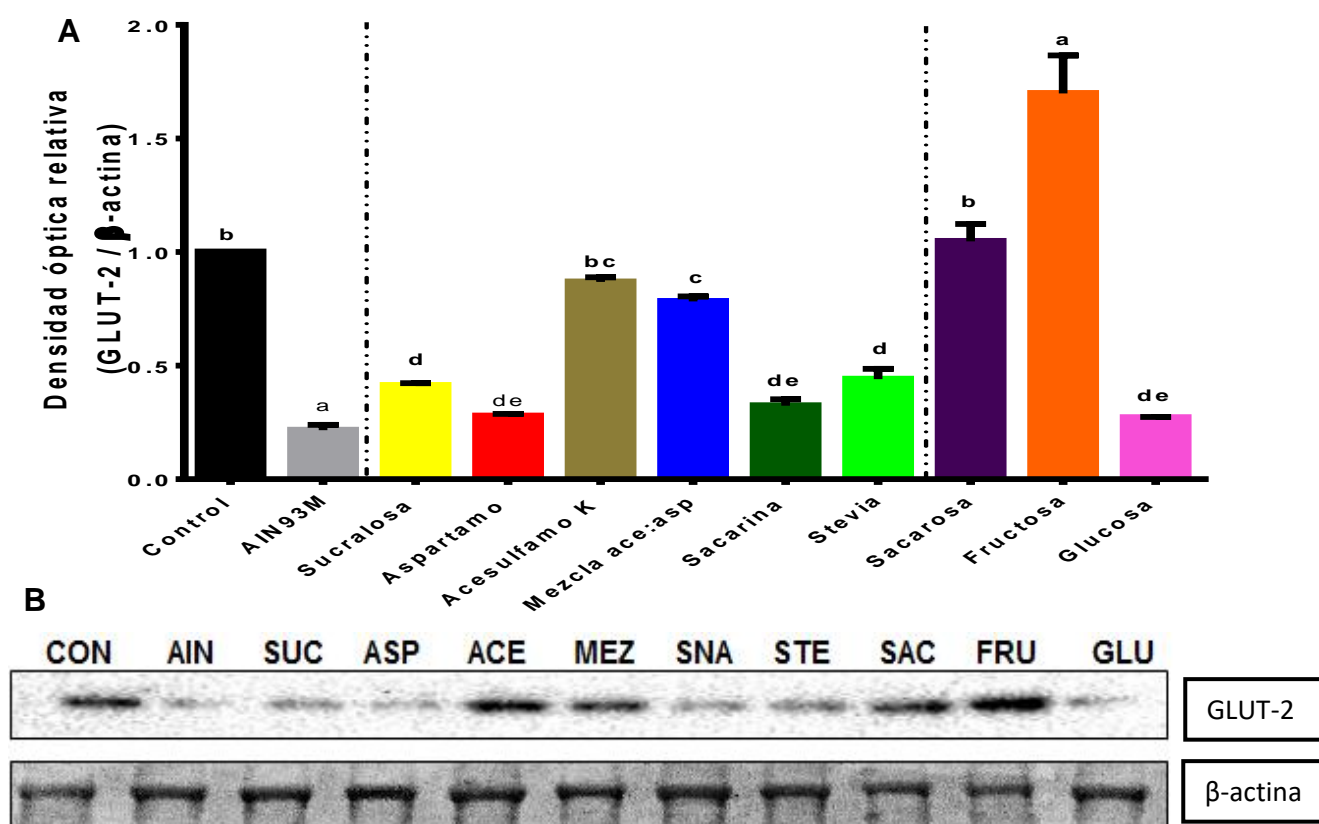


Figura 5.20. A. Expresión de GLUT-2 en hígado de ratas macho. Media \pm DEM.
B. Expresión de GLUT-2 determinada por Western blot

Dado que existió una mayor cantidad de *GLUT-2* en las membranas de los hepatocitos del grupo de fructosa probablemente existió una mayor captación de glucosa y fructosa al interior de estos. Lo anterior da como resultado una estimulación de la lipogénesis y los elevados niveles de triglicéridos en plasma es un indicador indirecto de ello.

En la Figura 5.21 A destacan impresionantemente los niveles de expresión de *GLUT-2*, los cuales son hasta 10 veces mayores a los observados en los hepatocitos de las ratas macho.

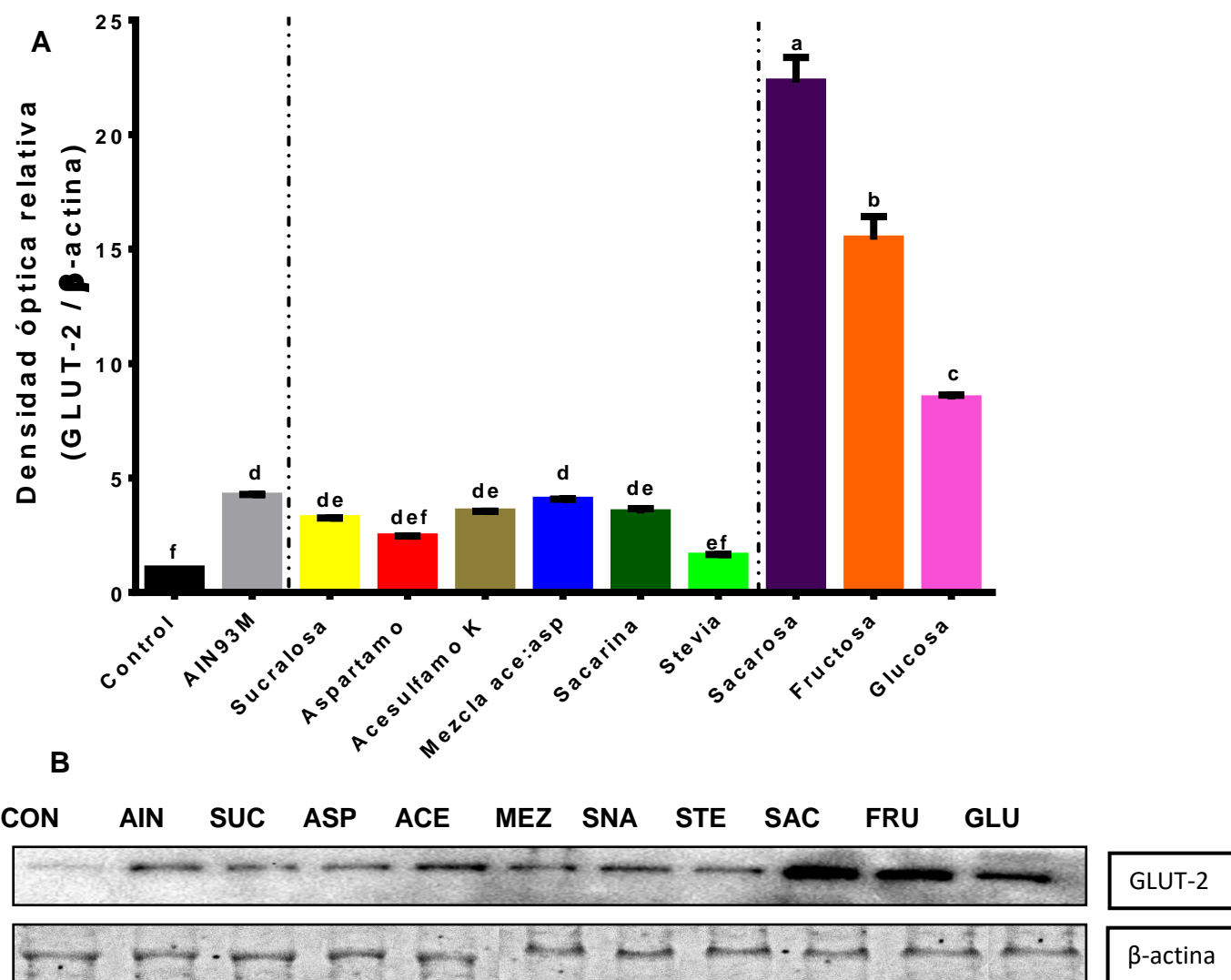


Figura 5.21. A. Expresión de *GLUT-2* en hígado de ratas hembra. Media \pm DEM.
B. Expresión de *GLUT-2* determinada por *Western blot*

El análisis de varianza indicó diferencias significativas $P < 0.001$. Por su parte la prueba de rangos múltiples por el método de Duncan, indicó la presencia de 6 grupos homogéneos designados bajo las letras a, b, c, d, e y f en la Figura 5.21A. A diferencia de los machos todos los grupos presentaron mayores niveles de *GLUT-2*, excepto el grupo que ingirió la infusión de las hojas de *Stevia rebaudiana*.

Los edulcorantes calóricos presentaron los mayores niveles de *GLUT-2* hasta 22 veces más. Recordando que *GLUT-2* se encarga de transportar tanto glucosa como fructosa, son normales estos niveles si se considera que fueron los grupos que precisamente ingirieron mayor cantidad de estos glúcidos simples, al estar adicionados en su bebida. Nuevamente no se cumple completamente lo esperado de acuerdo con el volumen de bebida ingerido.

Si bien el grupo de sacarosa fue el que más bebió, lo cual explica el por qué presentó los mayores niveles de *GLUT-2*. El siguiente grupo respecto a la cantidad de bebida ingerida fue el grupo de la glucosa, lo cual es discrepante con los niveles de *GLUT-2*, ya que si bien es mucho más elevado que el grupo control (8 veces aproximadamente) es menor que el grupo de fructosa que presentó una expresión de *GLUT-2* 15.4 veces mayor que el grupo control. A pesar de que el grupo de fructosa ingirió mucho menos que el grupo de glucosa (9,725 mL en el caso de la glucosa y 6,505 mL en el caso de la fructosa), éste expresó mayor cantidad de *GLUT-2*. Lo anterior, junto con lo observado en las ratas macho, sugiere la hipótesis de que probablemente la fructosa estimule en mayor medida la síntesis de este transportador *GLUT-2* en los hepatocitos. Otro hallazgo que deberá ser estudiado en nuevas investigaciones.

Respecto de la sacarosa, la sorprendentemente mayor estimulación de *GLUT-2* en los hepatocitos de las ratas hembra probablemente sea uno de los factores determinantes que provocan que sean más susceptibles a los efectos adversos del consumo excesivo de sacarosa. Este fenómeno posiblemente conllevó a una mayor ganancia de masa corporal, mayor expresión de los factores de transcripción *SREBP-1*, *ChREBP*, mayores niveles de triglicéridos, etc. La anterior hipótesis deberá corroborarse en futuras investigaciones, pero lo que queda claro es que la sacarosa provoca una mayor síntesis de *GLUT-2* en los hepatocitos de las ratas hembra, el cual como se ha mencionado previamente es un transportador de vital importancia para la homeostasis de glucosa en los hepatocitos.

Respecto de los edulcorantes hipocalóricos destaca el hecho de que al menos en los hepatocitos de las ratas hembra presentaran mayores niveles que el grupo control, excepto el grupo de *Stevia rebaudiana*. Este hecho evidencia que los edulcorantes hipocalóricos estimulan su producción, aunque no al mismo grado que los edulcorantes calóricos, pero sí significativamente mayores que el grupo control. Recordando que los edulcorantes hipocalóricos y el grupo control no difirieron

de la cantidad de energía consumida, ni de la cantidad de alimento ingerido y dado que consumieron la misma dieta que el grupo control, se deduce que la cantidad de glucosa consumida fue la misma en estos casos. Por tanto, la cantidad de alimento ingerido no fue la responsable de las diferencias observadas entre el grupo control y los grupos de edulcorantes hipocalóricos.

El hecho de que los edulcorantes hipocalóricos estimulen la expresión de *GLUT-2* es de vital importancia, ya que podrían ocasionar una mayor captación de glucosa por parte de los hepatocitos, lo cual a su vez podrían proporcionar mayores precursores para la lipogénesis. Los mecanismos que regulan la expresión de *GLUT-2* aún no están completamente elucidados, por lo que se deberá tener especial atención en ello.

5.6 RESUMEN DE LOS RESULTADOS BIOQUÍMICOS, EXPRESIÓN GÉNICA Y *Western blot*

En la Tabla 5.1 se muestra un resumen de las pruebas realizadas. Se indica con un símbolo ↑ aquellos grupos que presentaron un incremento significativo con respecto del grupo control. El símbolo ↓ indica aquellos grupos que presentaron niveles inferiores del parámetro evaluado respecto del grupo control. Finalmente, el símbolo NS indica que para ese parámetro no existió diferencia significativa con respecto del grupo control. Aunque cabe recordar que ningún edulcorante calórico o hipocalórico presentó algún parámetro fuera de los rangos considerados como normales.

Tabla 5.1 Resumen del resultado de las pruebas bioquímicas, genéticas y de Western blot

Parámetro	Machos	Hembras
<i>GIP</i>	<i>AIN</i> ↓ <i>Asp</i> ↓ <i>Sna</i> ↓ <i>Suc</i> ↓ <i>Fru</i> ↑	<i>Suc</i> ↓
<i>GLP-1</i>	NS	NS
Glucosa	NS	NS
Triglicéridos	<i>AIN</i> ↑ <i>Suc</i> ↑ <i>Sac</i> ↑ <i>Glu</i> ↑ <i>Fru</i> ↑	<i>Sac</i> ↑ <i>Glu</i> ↑ <i>Fru</i> ↑
Colesterol	<i>Fru</i> ↑	<i>Mez</i> ↑ <i>Suc</i> ↑ <i>Fru</i> ↑
Insulina	NS	<i>Mez</i> ↑ <i>Ste</i> ↑ <i>Glu</i> ↑ <i>Sac</i> ↑
Glucagón	NS	NS

↑ grupos con incremento significativo con respecto del grupo control

↓ grupos con niveles inferiores con respecto del grupo control

NS no existió diferencia significativa con respecto del grupo control

Tabla 5.1 Resumen del resultado de las pruebas bioquímicas, genéticas y de Western blot (cont.)

Parámetro	Machos	Hembras
Leptina	Asp↓ Ste↑	Suc↑ Sac↑
Grelina	NS	NS
SREBP-1 (ARNm)	AIN↓ Suc↓ Asp↓ Mez↑ Fru↓ Sac↓	AIN↑ Suc↑ Asp↑ Mez↑ Sna↑ Ste↑ Glu↑
ChREBP (ARNm)	NS	AIN↑ Suc↑ Asp↑ Ace↑Mez↑ Sna↑ Ste↑ Fru↑ Glu↑ Sac↑
SGLT-1 (ARNm)	Ace↓ Sac↓	Ace↑ Suc↑ Glu↑ Fru↑ Sac↑
Receptor de insulina (ARNm)	AIN↓ Asp↓ Ace↓ Mez↓ Sna↓ Ste↓ Suc↓ Fru↓ Glu↓ Sac↓	Suc↑ Asp↑ Ace↑ Mez↑ Sna↑ Sac↑ Fru↑
SREBP-1 (proteína)	AIN↓ Suc↓ Ace↑ Mez↑ Sac↑ Fru↑	AIN↑ Asp↑ Mez↑ Sna↑ Sac↑
FAS (proteína)	AIN↓ Suc↓ Asp↓ Ace↓ Mez↓Sac↑ Glu↓	AIN↑ Asp↑ Ste↓ Sac↑ Glu↑
SGLT-1 (proteína)	Glu↓	Sac↑ Fru↑ Glu↑
GLUT-2 (proteína)	AIN↓ Suc↓ Asp↓ Sac↓ Ste↓ Fru↑	AIN↑ Suc↑ Ace↑ Mez↑ Sna↑ Sac↑ Fru↑ Glu↑

↑ grupos con incremento significativo con respecto del grupo control

↓ grupos con niveles inferiores con respecto del grupo control

NS no existió diferencia significativa con respecto del grupo control

5.7 INCREMENTO EN MASA CORPORAL

Como se puede observar en la Figura 5.22, a lo largo de los 120 días de experimentación después del destete, la tendencia fue que las ratas macho pertenecientes a los grupos de edulcorantes calóricos (fructosa, glucosa y sacarosa) presentaron los menores incrementos en masa corporal. Por su parte, los grupos correspondientes a la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni al 0.94%, que se denominó como grupo “stevia”, fueron junto con las ratas macho pertenecientes al grupo que bebió sucralosa al 0.017%, las que presentaron los mayores incrementos durante los 120 días. La ganancia de masa final se muestra en la Figura 5.23. Aunque los cambios en los incrementos de masa corporal son muy sutiles el análisis de varianza indicó diferencias significativas (P=0.047).

Los resultados indican que solamente existen dos grupos homogéneos y que únicamente las ratas que ingirieron sacarosa al 10%, presentaron una ganancia de masa estadísticamente menor que el grupo control. Esto corrobora resultados obtenidos previamente en varios experimentos (González, 2007; Reyes y Pérez, 2010, Guzmán, 2012). El grupo de sacarosa presentó un

incremento de 320.5g contra 355.9 g del grupo control. Sin embargo, el grupo que ingirió sacarosa fue similar a los grupos que ingerían: aspartamo, acesulfamo, glucosa, fructosa, la mezcla comercial de acesulfamo de K con aspartamo y sacarina.

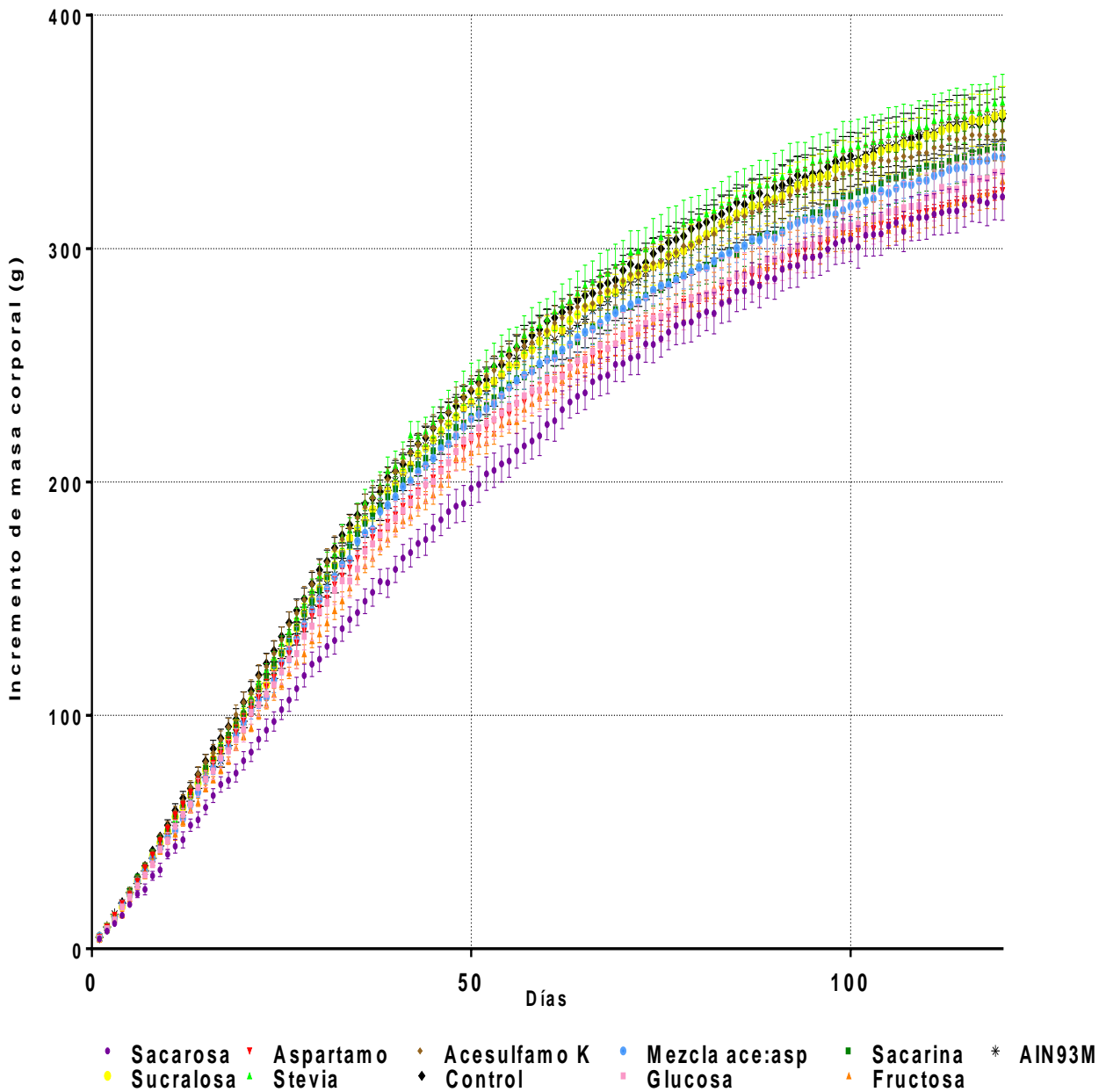


Figura 5.22 Gráfica de la ganancia de masa corporal por parte de las ratas macho a lo largo de 120 días después del destete (Media± DEM, n=8)

De los grupos de edulcorantes hipocalóricos, aquellos que presentaron el menor incremento fue el grupo de aspartamo, con un incremento de 324.8 g, mientras que el mayor incremento lo presentó el grupo que ingirió la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana*, presentando una ganancia de masa

corporal de 362.7 g. No hubo diferencias significativas en ninguno de los dos casos con respecto del grupo control.

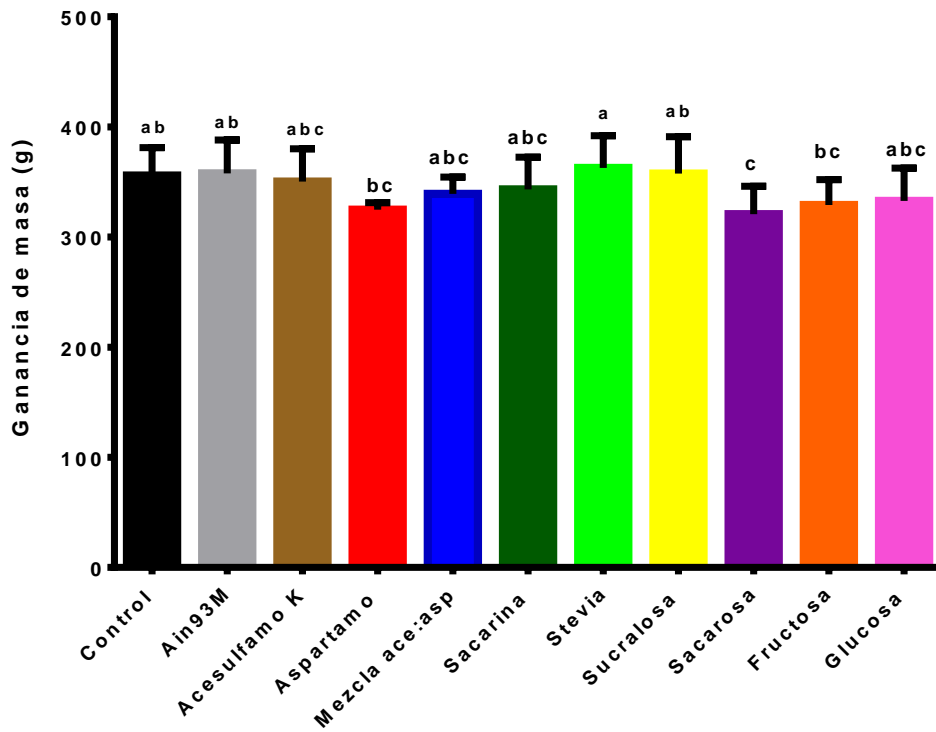


Figura 5.23 Ganancia final de masa en ratas macho a 120 días después del destete (Media ± DEM, n=8)

Como se dijo antes, estos resultados anteriores concuerdan con lo reportado en estudios previos, todos para ratas macho (González, 2007; Guzmán, 2012; Martínez et al., 2010; Reyes y Pérez, 2010), donde se indicó que las ratas que bebían soluciones de sacarosa presentaban los menores incrementos de masa corporal a pesar de la mayor ingesta calórica. De igual manera, De Matos *et al.* (2013) realizaron estudios donde emplearon ratas machos de la cepa Wistar, estudiando el efecto sobre la ganancia de masa corporal entre grupos que consumieron sacarina, sucralosa y aspartamo (edulcorantes no calóricos) en comparación con el grupo de la sacarosa (calórico), con ingestas isocalóricas, encontrando que hubo un aumento significativo de masa corporal en las ratas Wistar que bebieron edulcorantes no calóricos (aspartamo, sucralosa y sacarina) en comparación con las que bebieron sacarosa. Los presentes resultados solamente corroboran esta tendencia para la sucralosa y la *Stevia rebaudiana*, ya que la ganancia de masa fue estadísticamente mayor con respecto del grupo que ingería sacarosa. Además, Carraro et al. (2016), reportaron resultados similares a los de De Matos et al. (2013): Carraro et al. (2016) suministraron sacarina en el agua potable a 16 ratas macho de la cepa Wistar y compararon los

resultados con los de un grupo que ingería sacarosa. Encontraron que las ratas del grupo de sacarina presentaban ganancias de masa corporal mayores a las del grupo de sacarosa a pesar de no incrementar la ingesta calórica. Si bien en la presente investigación el grupo de sacarina presentó un incremento de masa de 343.4 g, que es mayor al presentado por el grupo que ingirió sacarosa (322.2 g), el análisis estadístico indicó que no existió diferencia significativa entre ellos ($P > 0.05$).

La tendencia de ganancia de masa corporal de las ratas hembra que ingirieron edulcorantes calóricos o hipocalóricos es distinta a la observada en las ratas macho. La Figura 5.24 muestra la ganancia de masa corporal de las ratas a lo largo de los 120 días de experimentación después del destete. Aquí claramente la tendencia es diferente a la descrita para las ratas macho.

En el caso de las hembras, el grupo que presentó el menor incremento fue el de sucralosa. Los grupos de control, tanto la dieta “normal”, como el grupo de la dieta *AIN93M*, con menos proteína y más carbohidratos, fueron los que presentaron los mayores incrementos. De igual manera, no existió una tendencia definida como lo sucedido con las ratas macho. El grupo de la glucosa fue uno de los grupos que presentó menor ganancia en masa corporal, no así el de la sacarosa, que fue el tercer grupo con la mayor ganancia de masa corporal.

Asimismo, la sucralosa presentó un comportamiento diametralmente opuesto. En los machos fue el grupo que mayor ganancia en masa corporal presentó, mientras que en las hembras fue el de la menor ganancia de masa corporal. Es decir, no se observó la misma tendencia de menor ganancia de masa al ingerir edulcorantes calóricos.

La Figura 5.25 muestra la ganancia de masa corporal final por parte de las ratas hembra después de los 120 días de experimentación, el cual fue muy homogéneo. Sin embargo, el análisis de varianza indicó diferencias significativas obteniéndose un valor $P= 0.0055$.

Como se ha mencionado con anterioridad, solamente los grupos que ingerían de sucralosa, stevia y glucosa presentaron menores ganancias de masa corporal con respecto del grupo control, mientras que el resto de los edulcorantes no difirió de los especímenes del grupo control.

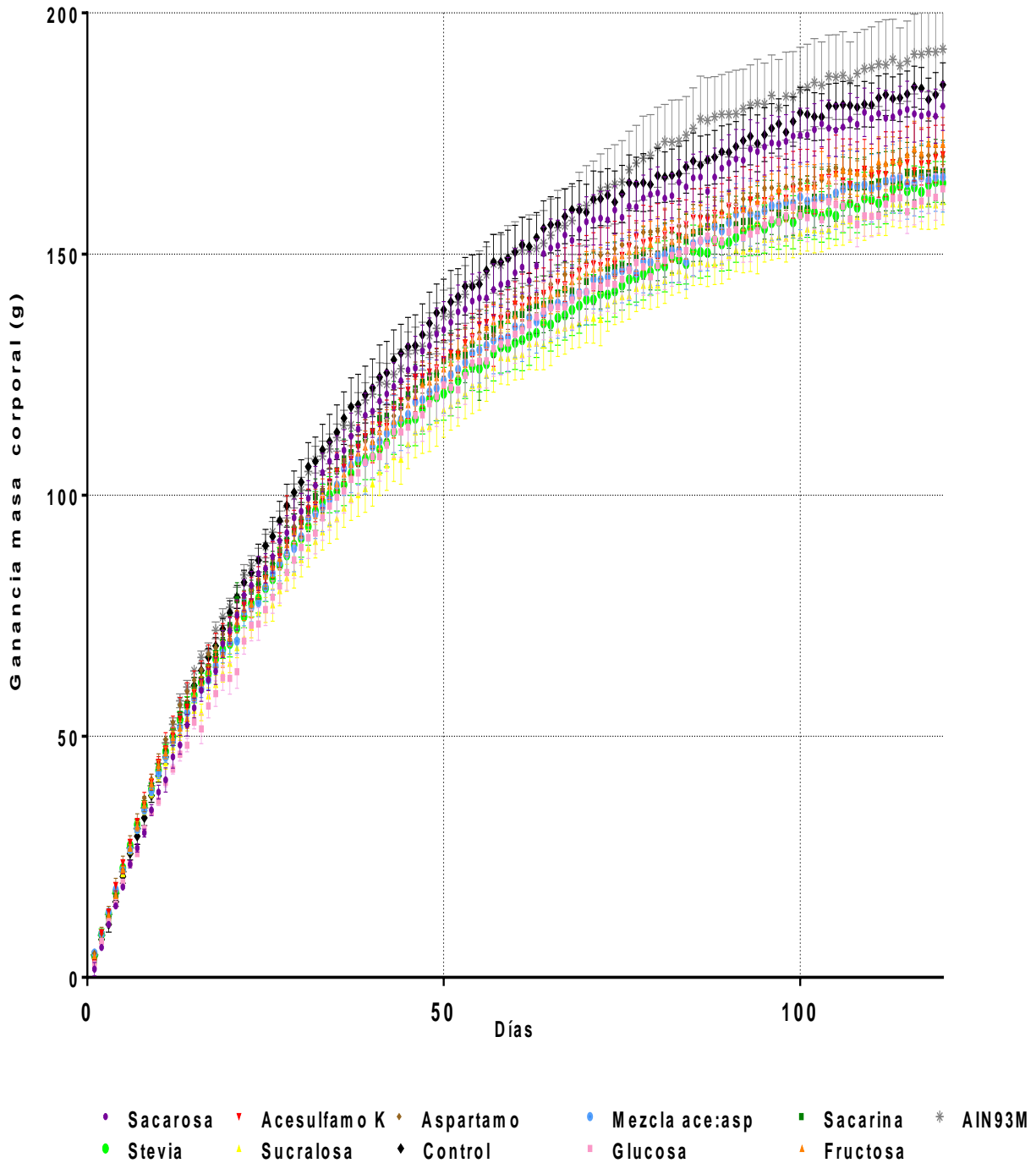
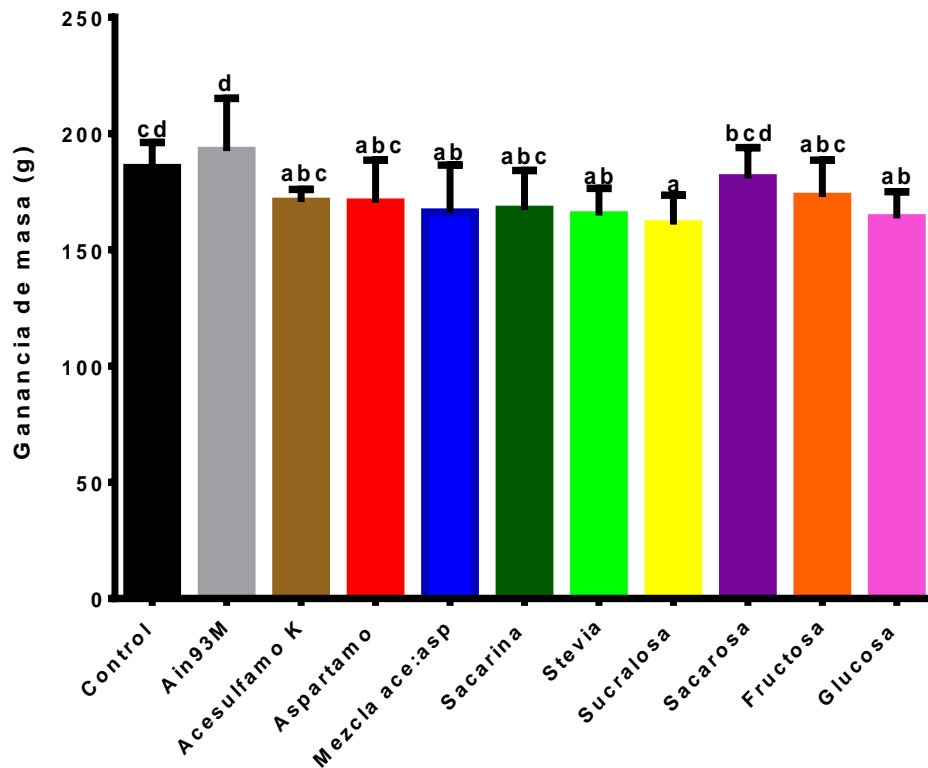


Figura 5.24 Ganancia de masa corporal de las ratas hembra a lo largo de 120 días después del destete (media \pm DEM, n=8)

El grupo de ratas hembra que presentó la menor ganancia de masa fue el grupo de ratas que ingirieron sucralosa, ganando en promedio 160.8g. En contraste, las ratas del grupo que presentó la mayor ganancia de masa corporal fueron aquellas que consumieron la dieta control *AIN93M* con agua potable presentando un incremento de su masa promedio de 192.5 g

Las ratas macho presentaron ganancias de masa corporal mucho mayores que las hembras, lo cual concuerda con las curvas de crecimiento reportadas por el proveedor Envigo (2016c). Respecto del factor edulcorante, este tuvo un valor de $P = 0.0146$, volviéndose a corroborar la existencia de diferencias estadísticas en la ganancia de masa corporal entre los diversos grupos de edulcorantes.



5.25 Ganancia final de masa en ratas hembra a 120 días después del destete (Media ± DEM, n=8)

Finalmente, respecto de la interacción de ambos factores de sexo y edulcorantes, se tuvo un valor de $P = 0.0418$ indicando que la interacción fue significativa, es decir el comportamiento de la ganancia de masa corporal es dependiente del edulcorante y del sexo. La ganancia de masa corporal debida a la ingesta de los edulcorantes no fue igual en los machos que en las hembras.

La Tabla 5.2 indica el porcentaje de cambio de masa corporal de las ratas macho. En ellas, el grupo control tuvo un porcentaje de cambio de 619%. El grupo que presentó el mayor porcentaje de cambio fue el grupo de acesulfamo K con un 659.9% de incremento de masa corporal. Por

otro lado, el grupo que presentó el menor % de incremento de masa corporal fue el grupo de sacarosa con solamente 554.1%. Los únicos grupos que presentaron niveles superiores al grupo control fueron los grupos de acesulfamo K y stevia, el resto de los grupos presentó niveles inferiores de % de cambio de masa corporal. Pero se percibe de manera clara que los menores % de cambio los presentaron los edulcorantes calóricos (sacarosa, fructosa y glucosa).

Tabla 5.2 Porcentaje de cambio de masa corporal de ratas macho tras 120 días de consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos

Edulcorante	Masa inicial	Masa final	% de cambio de masa corporal
Control	49.5	355.9	619.0
<i>AIN93M</i>	50.4	357.7	609.7
Acesulfamo K	46.1	350.3	659.9
Aspartamo	51.2	324.8	534.4
Mezcla comercial de aspartamo: acesulfamo de potasio	48.9	339.2	593.7
Sacarina	50.9	343.3	574.5
Stevia	48.6	362.7	646.3
Sucralosa	50.1	357.6	613.8
Fructosa	50.2	329.1	555.6
Glucosa	50.7	332.8	556.4
Sacarosa	49.0	320.5	554.1

En lo concerniente a las ratas hembra los valores de porcentaje de cambio de masa corporal se ubican en la Tabla 5.3 y el grupo que presentó el mayor % de cambio de masa corporal fue el grupo control seguido de cerca por el grupo que ingirió la dieta control *AIN93M*, con 283.2 y 281.9%, respectivamente. Los grupos que presentaron los menores % de cambio fueron los grupos de fructosa y sucralosa con 200.6% y 200.3%, respectivamente. Contrario a los machos no existe una tendencia definida entre los % de cambio de masa de los grupos que ingirieron edulcorantes calóricos o hipocalóricos.

Tabla 5.3 Porcentaje de cambio de masa corporal de ratas hembra tras 120 días de consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos

Edulcorante	Masa inicial	Masa final	% de cambio de masa corporal
Control	48.3	185.1	283.2
<i>AIN93M</i>	50.4	192.5	281.9
Acesulfamo K	50.3	170.6	239.2

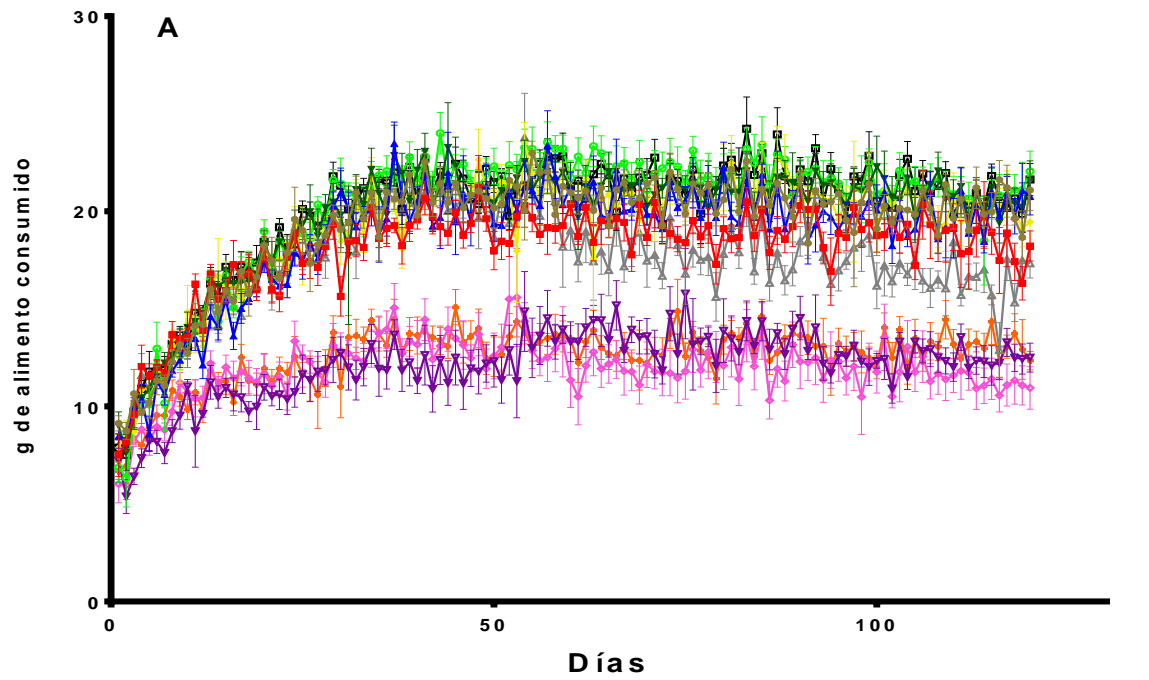
Tabla 5.3 Porcentaje de cambio de masa corporal de ratas hembra tras 120 días de consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos (cont.)

Edulcorante	Masa inicial	Masa final	% de cambio de masa corporal
Aspartamo	52.2	170.2	226.1
Mezcla comercial de aspartamo:acesulfamo de potasio	50.9	165.9	225.9
Sacarina	52.3	167.1	219.5
Stevia	51.4	164.7	220.4
Sucralosa	53.5	160.8	200.6
Fructosa	57.5	172.7	200.3
Glucosa	51.6	163.5	216.9
Sacarosa	52.3	180.6	245.3

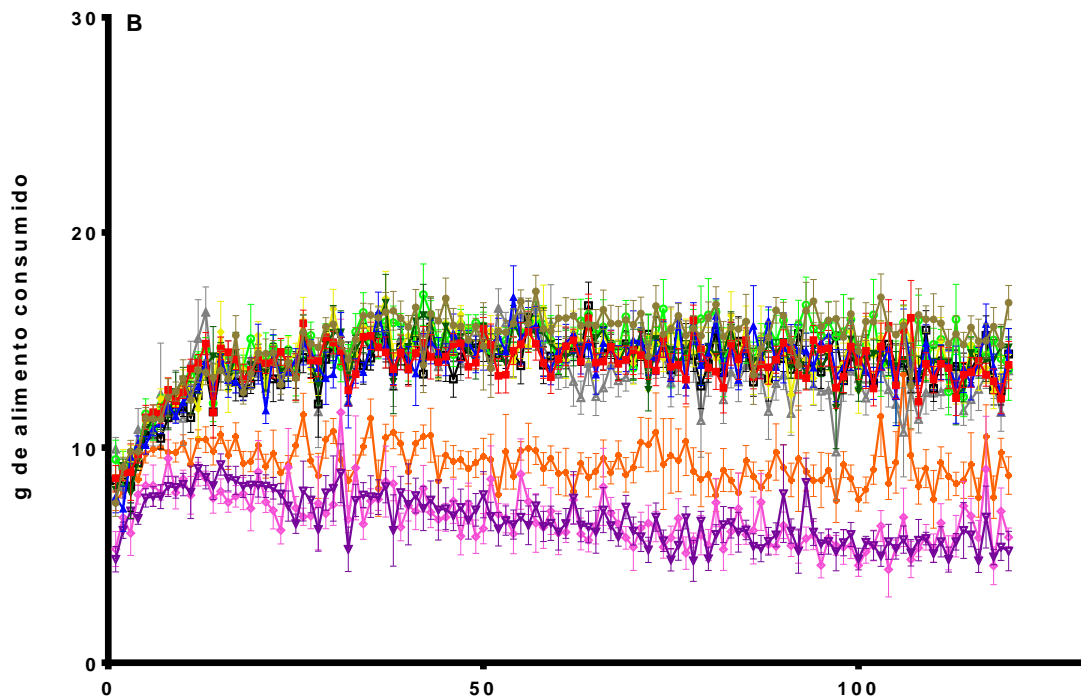
5.8 CONSUMO DE ALIMENTO

En la Figura 5.26 se muestra el consumo de alimento por los diversos grupos de ratas macho y hembra. El consumo de alimento en los grupos a los cuales se les suministraron edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa) fue mucho menor que aquellos grupos cuyas bebidas contenían edulcorantes no calóricos de alta intensidad. La misma tendencia es observada en el consumo de alimento por parte de las ratas hembra. Aquellas que bebieron edulcorantes calóricos fueron las que consumieron las menores cantidades de alimento. Como se muestra en las Figuras 5.26A y 5.26B, el consumo de alimento cambia de un día a otro y es por ello que el análisis estadístico se realizó con el alimento consumido acumulado. Es decir, el promedio de la suma de todo el alimento que consumió cada grupo a lo largo de 120 días. Estos datos se muestran en la Figura 5.27.

Existió diferencia significativa en relación con el factor sexo ($P < 0.001$), que era lo esperado, como para los diversos grupos de edulcorantes. Pero al no existir interacción significativa se indica que los patrones de consumo de alimento fueron los mismos en machos y hembras. Esto se muestra muy claramente en las Figuras 5.27A y 5.27B, ya que tanto en machos como en hembras los grupos que muestran una tendencia similar en la ingesta de la cantidad de alimento de forma estadísticamente significativa fueron los grupos de edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa). Lo anterior debido a que fueron los grupos que consumieron la mayor cantidad de bebida adicionada con edulcorante para mantener un equilibrio energético.



— Acesulfamo K — Aspartamo — Mezcla ace:asp — Sacarina — Sucralosa — Stevia
 — AIN93M — Control — Glucosa — Sacarosa — Fructosa



— Acesulfamo K — Aspartamo — Mezcla ace:asp — Sacarina — Sucralosa — Stevia
 — AIN93M — Control — Glucosa — Sacarosa — Fructosa

Figura 5.26 Alimento consumido por ratas que ingerían diversos grupos de edulcorantes hasta el día 120 después del destete (Media \pm DEM, n = 8). A. Machos. B. Hembras

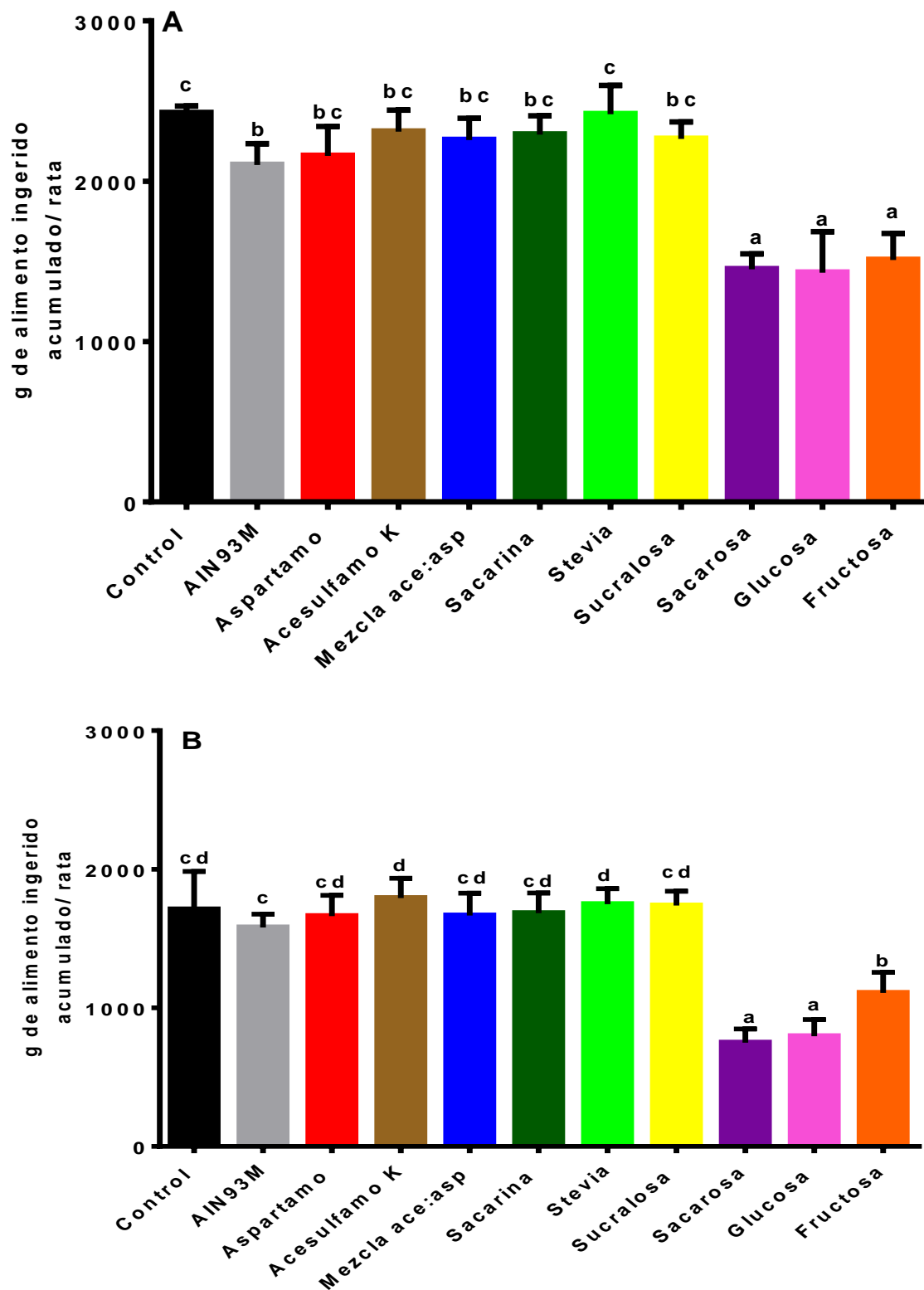


Figura 5.27 Alimento ingerido por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de alimento ingerido \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

La cantidad de alimento promedio ingerido por las ratas macho difirió de la cantidad ingerida en promedio por las ratas hembra, 2063g vs. 1494g, respectivamente. En las ratas macho el grupo que consumió la mayor cantidad de alimento fue el grupo de stevia, pero no hubo diferencia significativa con respecto al control. En cuanto a las hembras el grupo que mayor ingesta tuvo fue el grupo de acesulfamo de K, pero de igual manera no fue estadísticamente diferente del grupo control.

Para el caso de los machos, los únicos grupos que ingirieron una cantidad menor de alimento de forma significativa con respecto del grupo control fueron los grupos de sacarosa, glucosa, fructosa y el grupo de dieta control *AIN93M* con menor contenido de proteína y mayor de carbohidratos. Para el caso de las ratas hembra solamente fueron sacarosa, glucosa y fructosa. El grupo de ratas hembra que ingirió fructosa presentó un aumento en los valores de ingesta con respecto a aquellos grupos que ingirieron glucosa y sacarosa pero menor al resto de los edulcorantes, teniendo una respuesta intermedia. Sin embargo, siendo más parecido a los edulcorantes calóricos (glucosa y sacarosa).

Estos resultados concuerdan con experimentos previos realizados a largo plazo por Guzmán (2012) y Reyes y Pérez (2010), donde se reportó que los edulcorantes energéticos que fueron suministrados en el agua potable en sus experimentos, sacarosa y fructosa, hicieron que los animales modelo consumieran una menor cantidad de alimento en forma estadísticamente significativa con respecto de los edulcorantes hipocalóricos debido a un gran consumo de edulcorantes en el agua.

5.9 INGESTA DE AGUA POTABLE CON Y SIN EDULCORANTES

En las Figuras 5.28A y 5.28B se muestran de manera clara la existencia de diferentes tendencias en el consumo de bebida por parte de los diversos grupos de animales modelo ingiriendo edulcorantes. De manera general, los grupos con bebidas endulzadas con edulcorantes calóricos ingirieron una mayor cantidad de ellos indicando su preferencia por ellos. De manera natural, eran los que menos alimento consumían. Cabe destacar que los grupos que consumieron una menor cantidad de bebida fueron los del grupo control, que solamente ingirieron agua potable. Este comportamiento se apreció tanto en las ratas macho (Figura 5.28A) como en las ratas hembra (Figura 5.28B) a lo largo de los 120 días después del destete.

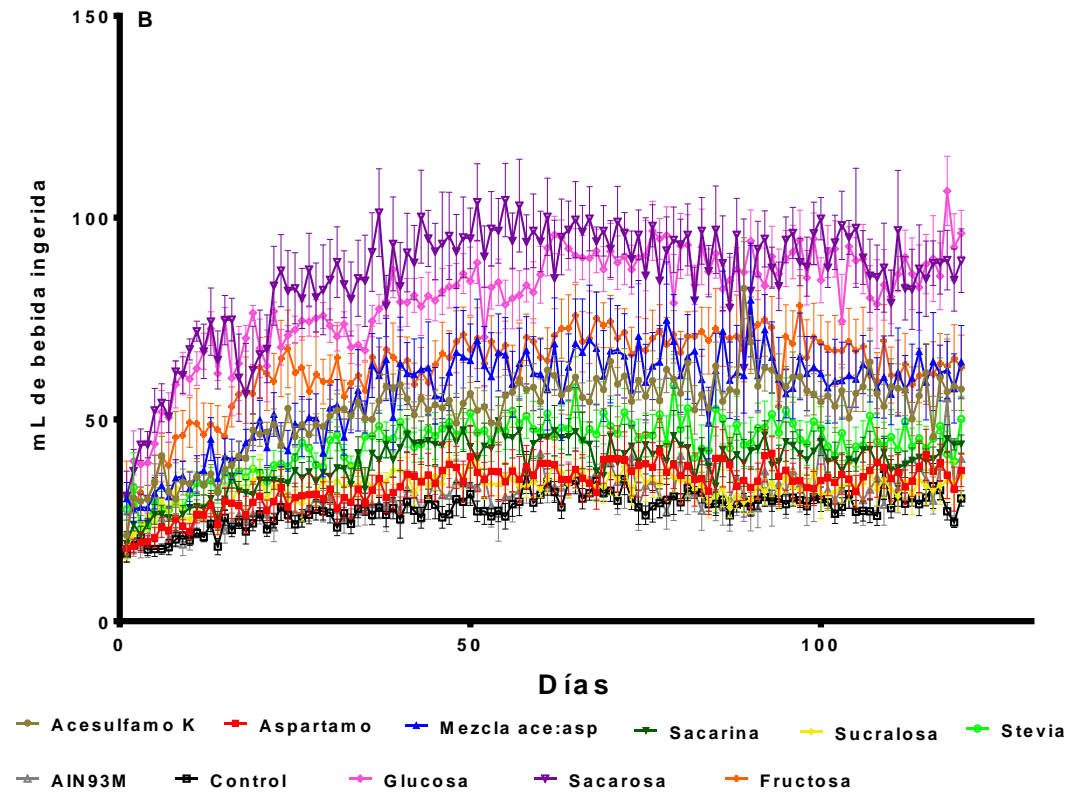
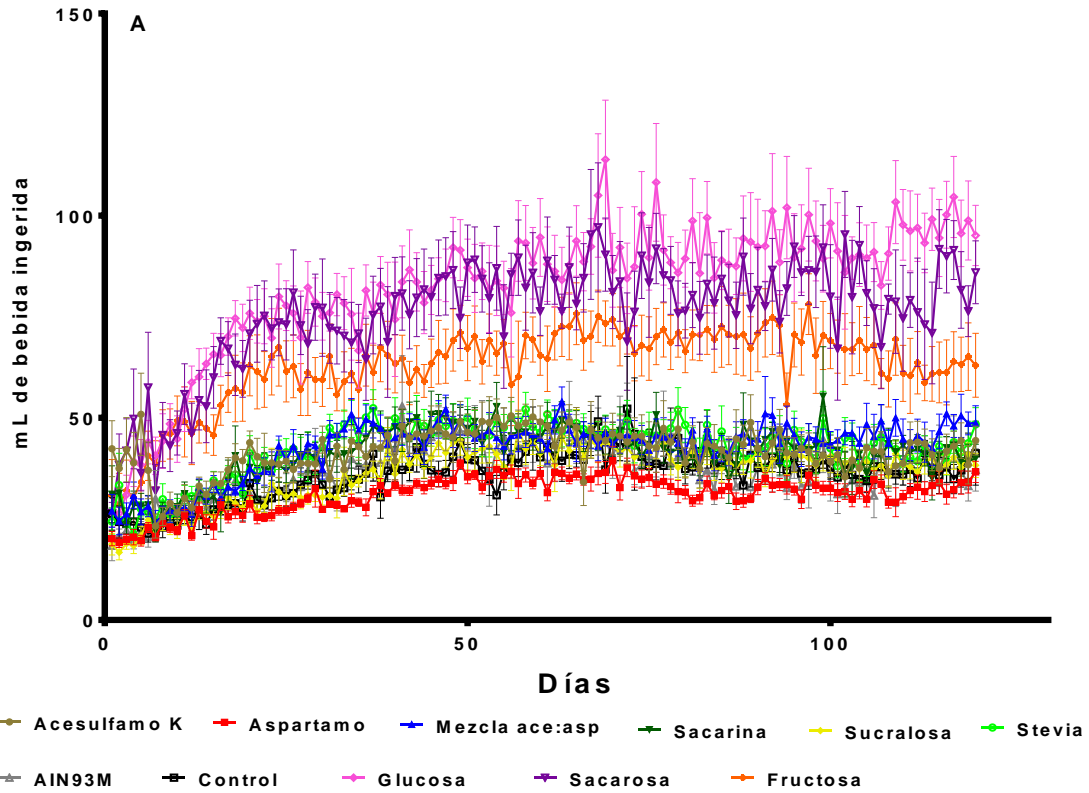


Figura 5.28 Consumo de bebidas (mL) en un periodo de 120 días en función del sexo por tratamiento. A) Ratas macho. B) Ratas hembra. Cada línea representa la tendencia en el periodo evaluado donde cada punto comprende al promedio de bebida \pm DEM

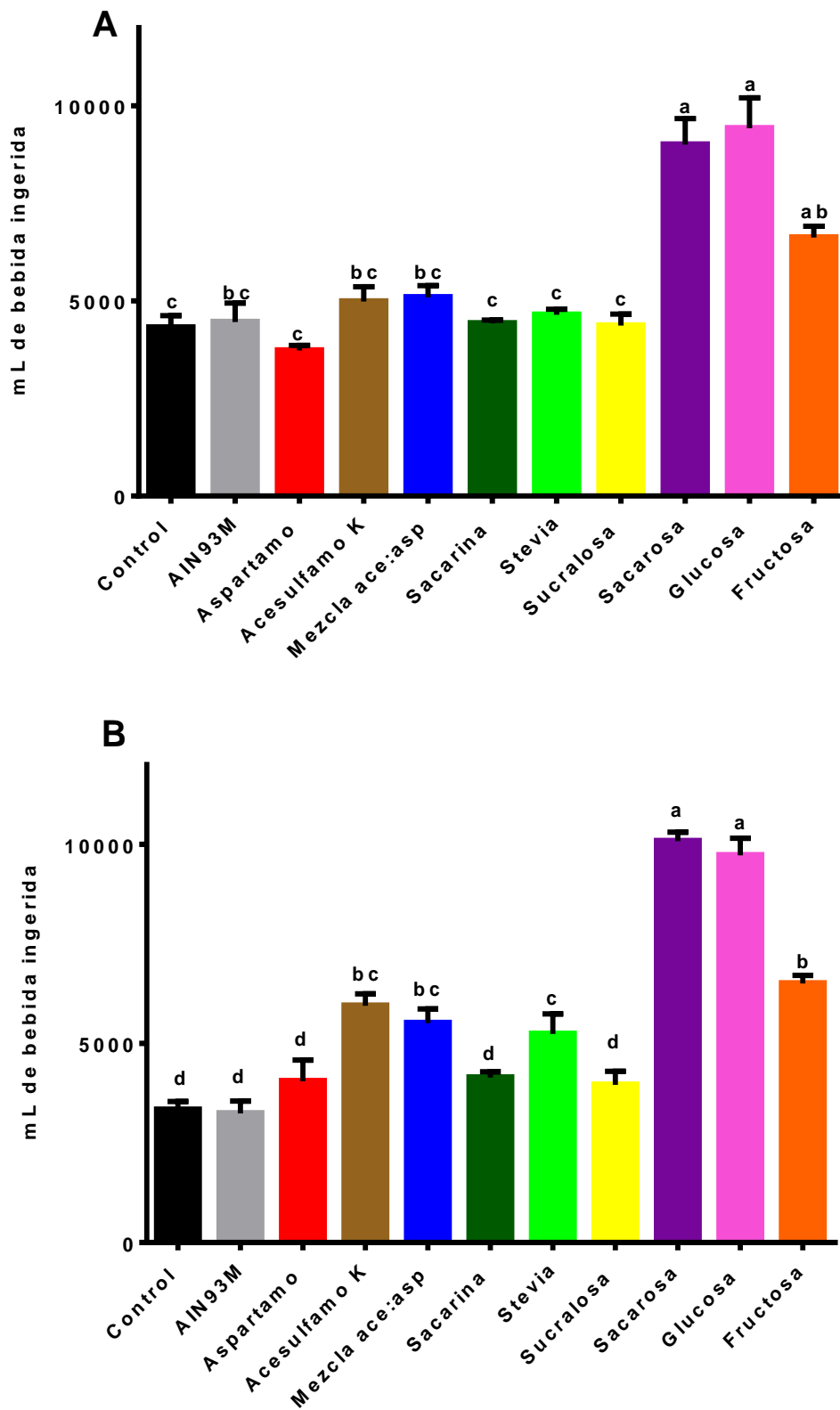


Figura 5.29 Bebida ingerida por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de la ingesta energética \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

Como se muestra en las Figuras 5.29A y 5.29B las ratas machos y hembras presentaron una tendencia mayor por beber edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa), casi el doble. De estos tres grupos, tanto los de los machos como los de las hembras, prefirieron en primer lugar y sin que existiera una diferencia significativa a la sacarosa y a la glucosa y, en segundo término, las preferencias se tornaron hacia la fructosa. Relativo a los edulcorantes hipocalóricos, en el caso de las ratas macho no existió ninguna diferencia en la cantidad de bebida con respecto de los grupos que bebieron agua potable. Para el caso de las hembras, en el caso de los edulcorantes hipocalóricos existió una ligera mayor preferencia por las bebidas endulzadas con el acesulfamo de K, la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K y la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana*; pero no tan notable como la preferencia por sacarosa, glucosa y fructosa.

5.10 INGESTA ENERGÉTICA

Es de destacarse el hecho de que aquellos grupos que ingirieron una mayor cantidad de bebida correspondieron a aquellos que consumieron la menor cantidad de alimento indicando que, de manera natural, mientras mayor era la energía proveniente de la bebida los especímenes reducían su ingesta de alimento.

Se dio seguimiento a la cantidad de alimento y bebida calculando la ingesta energética a lo largo de los 120 días de estudio. Estos resultados se muestran en las Figura 5.30A y 5.30B, correspondientes a la ingesta energética diaria promedio de cada grupo de las ratas macho y hembra, respectivamente. Se puede apreciar que las diferencias en la energía ingerida no se encuentran muy marcadas como lo fue en el caso de la bebida y del alimento. A pesar de ello, el análisis de varianza indicó la presencia de diferencia para ambos factores: el sexo del espécimen y el tipo de edulcorante. Se puede señalar que existió diferencia para el factor sexo, el factor edulcorante y la interacción entre ambos. El valor de significancia fue $P < 0.001$ en los tres casos.

Los machos ingirieron energía de manera diferente que las hembras (los machos ingirieron en promedio de manera acumulada $30,411 \pm 204$ kJ y las hembras $23,381 \pm 202$ kJ). También existió diferencia en la cantidad de energía ingerida dependiendo del tipo de edulcorante y, finalmente, que los patrones de ingesta energética difirieron entre machos y hembras, es decir la cantidad de energía ingerida dependió del sexo y del grupo de edulcorante al cual pertenecían.

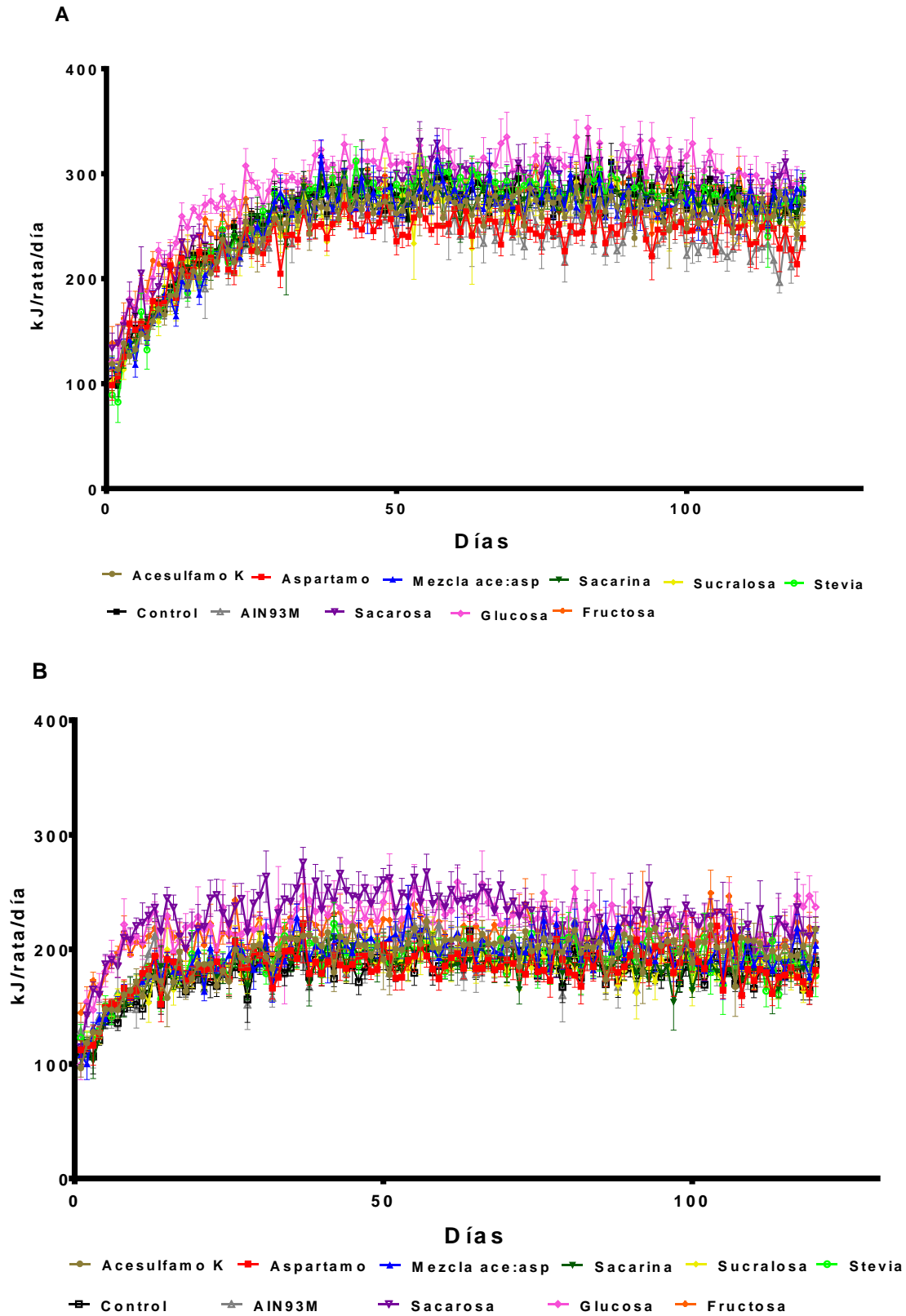


Figura 5.30 Ingesta energética (kJ) en un periodo de 120 días en función del sexo por tratamiento. A) Ratitas macho. B) Ratitas hembra. Cada línea representa la tendencia en el periodo evaluado donde cada punto comprende al promedio de la ingesta energética \pm DEM

La energía teórica ingerida consumida acumulada a lo largo de los 120 días se muestra en las Figuras 5.31A y 5.31B. Así mismo en ellas se resume el resultado de las pruebas de rangos múltiples correspondientes.

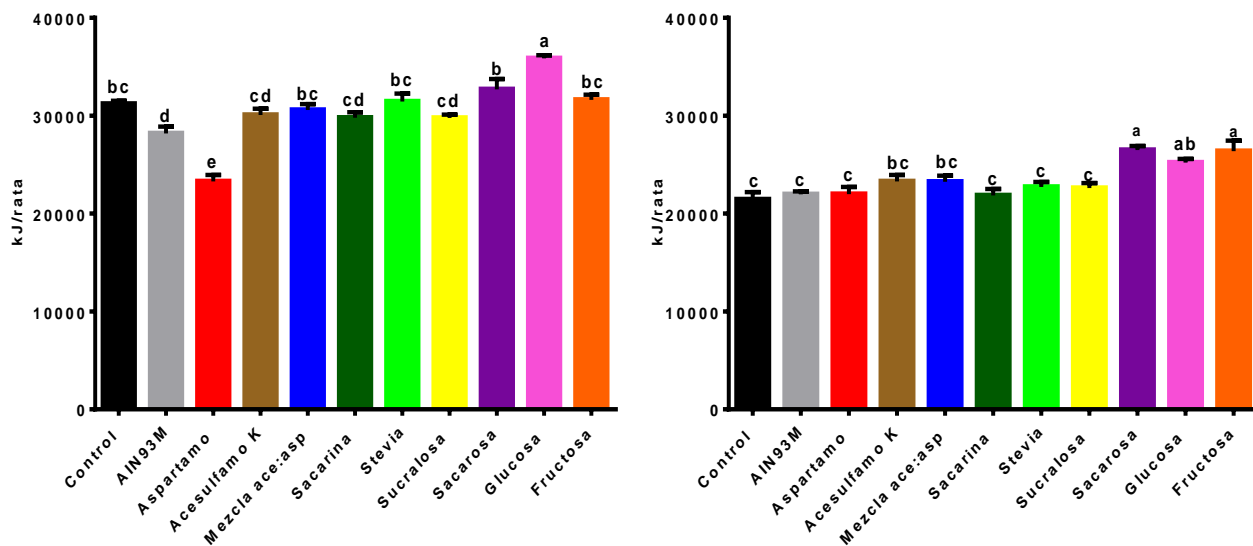


Figura 5.31. Ingesta energética acumulada por ratas en 120 días por tratamiento. A) Machos. B) Hembras. Donde cada barra representa el promedio de la bebida ingerida \pm DEM. Las siguientes letras indica diferencias significativas a $P < 0.05$: a,b,c,d

El grupo que presentó la mayor ingesta de energía fue el grupo de ratas que ingirieron glucosa, mientras que el grupo que ingirió la menor cantidad de energía fue el grupo de aspartamo. Aquellos grupos que difirieron significativamente del grupo control fueron únicamente los grupos de glucosa, el grupo de aspartamo y el grupo que consumió la dieta control *AIN93M*.

En la Tabla 5.4 se muestran los porcentajes de cambio en la ingesta de energía respecto al grupo control. Destaca el caso de la glucosa, ya que a pesar de ser el grupo que presentó una mayor ingesta energética (27.2% más que el control) no presentó diferencias estadísticas respecto del grupo control en la ganancia de masa. En el otro extremo, el grupo que ingirió aspartamo presentó la menor ingesta energética (26.1% menos que el grupo control). En este caso la ingesta tampoco presenta concordancia con la ganancia de masa corporal, ya que a pesar de que la ingesta energética fue menor estadísticamente respecto del grupo control, no fue así la ganancia de masa corporal. Esto fue encontrado en un estudio anterior (Martinez et al., 2010). En el caso de la sacarosa, a pesar de que fue el único grupo que presentó un incremento menor en masa corporal de manera significativa, la cantidad de energía ingerida no fue estadísticamente diferente

a la ingerida por el grupo control. En general se observa que los cambios presentados en la ingesta energética no son concordantes con la ganancia de masa corporal, indicando la importancia de realizar estudios metabólicos y el efecto de la microbiota (Campos, 2017).

Tabla 5.4 Porcentaje de cambio en la ingesta energética respecto del grupo control de ratas macho

Grupo	% de cambio en la ingesta energética respecto al control
Control	0.0
<i>AIN93M</i>	-10.6
Aspartamo	-26.1
Acesulfamo K	-4.5
Mezcla ace:asp	8.5
Sacarina	5.7
Stevia	11.6
Sucralosa	5.7
Sacarosa	16.0
Glucosa	27.2
Fructosa	12.2

En el caso de las ratas hembra se encontraron únicamente tres grupos homogéneos respecto de la ingesta energética, designados por las letras a, b y c en la Figura 5.31B. La tendencia difirió ligeramente al observado en los machos. Para las hembras, el grupo que presentó la mayor ingesta energética fue el grupo que bebió sacarosa, en cambio el grupo control fue el que presentó la menor ingesta calórica. Los únicos grupos cuya ingesta energética fue estadísticamente diferente al control fueron: sacarosa, glucosa y fructosa. Sin embargo, únicamente las ratas que ingirieron glucosa, presentaron ganancias de masa menores estadísticamente con respecto al grupo control ($P < 0.005$). Respecto de los edulcorantes hipocalóricos, ninguno grupo difirió de forma estadística con respecto de la energía consumida por el grupo control. A pesar de lo anterior, el grupo de ratas que bebió agua con sucralosa, presentó una ganancia de masa menor al grupo control. Al igual que con los machos, no existe una correlación entre la ingesta energética y la ganancia de masa corporal. El porcentaje de diferencia en la ingesta energética de las ratas hembra se muestra en la Tabla 5.5.

El consumo de edulcorantes hipocalóricos junto con la dieta Teklad global 18S, no produjo alteraciones significativas en la ingesta de energía. Los edulcorantes hipocalóricos pueden promover una excesiva ingesta de energía, ganancia de masa corporal y una débil relación

predictiva entre el sabor dulce y las consecuencias calóricas de ingerir alimentos ricos en carbohidratos simples (Davidson et al, 2011).

Tabla 5.5 Porcentaje de cambio en la ingesta energética respecto al grupo control en ratas hembra

Grupo	% de cambio en la ingesta energética con respecto del control
Control	0
Sacarina	1.9
<i>AIN93M</i>	2.5
Aspartamo	2.5
Sucralosa	5.4
Stevia	6.0
Mezcla ace:asp	8.4
Acesulfamo K	8.6
Glucosa	17.6
Fructosa	23
Sacarosa	23.5

Lo anterior es apoyado por las investigaciones de Wang et al. (2016) quienes indican que el consumo crónico de un desbalance sabor dulce/calorías, desencadena respuestas neurales que aumentan la motivación para comer a través de la estimulación del neuropéptido Y. Es muy probable que los receptores del gusto dulce asocian su estimulación a un gran contenido energético, dado que los edulcorantes estimulan estos receptores del gusto dulce, lo que hace necesario realizar un reajuste en la ingesta calórica para compensar la energía asociada al sabor dulce, pero como esta compensación no es realizada de manera adecuada, se incurre en una mayor ingesta calórica.

5.11 ANÁLISIS HISTOLÓGICOS

5.11.1 Análisis del tejido adiposo retroperitoneal

En la Tabla 5.6 se muestra el diámetro promedio de los adipocitos de las ratas macho. La determinación se realizó midiendo el diámetro de 5 adipocitos por muestra. Se observa que el grupo que presentó el mayor diámetro promedio fue el grupo que ingirió aspartamo (105.02 μm). Por otro lado, el grupo que presentó el menor diámetro promedio de adipocitos fue el grupo de sacarosa (72.23 μm). El grupo control tuvo un diámetro promedio de 82.32 μm .

Sin embargo, al realizar el análisis estadístico se obtuvo una $P = 0.3021$, indicando que no existió diferencia significativa alguna. Lo anterior es sorprendente, considerando que la sacarosa presentó niveles significativamente mayores de la sintasa de ácidos grasos en hígado. Esto sugiere que el incremento de la actividad de esta enzima probablemente se limite a los hepatocitos.

Tabla 5.6 Diámetro de los adipocitos (μm) de ratas macho

<i>Edulcorante</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>AIN93M</i>	98.81	15.81	77.76	116.73
Acesulfamo	85.48	22.61	47.80	104.81
Aspartamo	105.02	10.20	91.84	118.56
Control	82.32	34.75	27.14	124.17
Fructosa	92.05	24.12	57.03	125.77
Glucosa	86.73	24.75	44.5	123.27
Mezcla	90.19	14.80	64.02	107.0
Sacarina	85.34	36.00	25.77	134.92
Sacarosa	72.23	20.53	40.94	101.62
Stevia	75.91	24.90	35.72	98.65
Sucralosa	93.55	16.90	63.34	120.73
Total	87.96	24.06	25.77	134.92

En la Figura 5.32 se encuentran imágenes representativas de los cortes histológicos (hepatocitos) de cada uno de los grupos que ingirieron edulcorantes calóricos e hipocalóricos en ratas machos. Se observa que ningún grupo presentó hipertrofia, lo cual corrobora los resultados estadísticos que indicaron que no existió diferencia significativa en el tamaño de los adipocitos en el tejido adiposo retroperitoneal (visceral) de ratas macho.

Respecto de las ratas hembra, los promedios de los diámetros de los adipocitos de los distintos grupos de edulcorantes se muestran en la Tabla 5.7. Se observa que el grupo que presentó el mayor diámetro promedio fue el grupo de fructosa (90.31 μm). Por otra parte, el menor diámetro de adipocitos se presentó en el grupo de la dieta control *AIN93M* (63.40 μm) y el grupo control de la dieta Teklad presentó un diámetro promedio de 86.71 μm . Al igual que para las ratas macho, en las ratas hembras no existió diferencia estadística alguna ($P = 0.2148$)

El diámetro de los adipocitos en las ratas hembras, no resultó ser un reflejo de las diferencias observadas en los niveles de leptina circulante, ni de los elevados niveles encontrados de sintasa de ácidos grasos (*FAS*) en hígado.

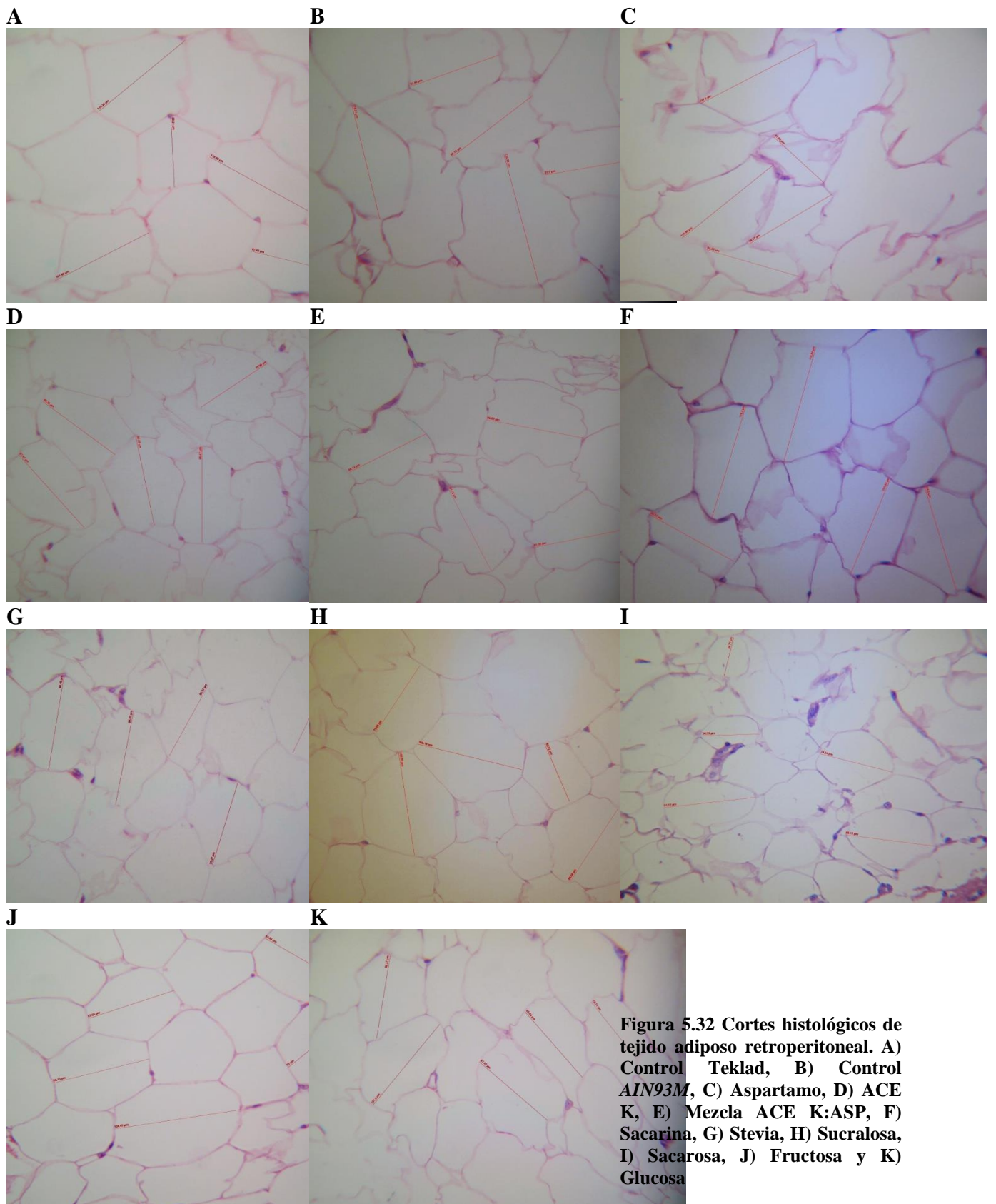


Figura 5.32 Cortes histológicos de tejido adiposo retroperitoneal. A) Control Teklad, B) Control AIN93M, C) Aspartamo, D) ACE K, E) Mezcla ACE K:ASP, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa y K) Glucosa

Tabla 5.7 Diámetro de los adipocitos (μm) de ratas hembra

<i>Edulcorante</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
<i>AIN93M</i>	63.40	21.00	24.92	83.16
Acesulfamo	87.13	10.13	69.61	101.93
Aspartamo	88.94	31.23	47.90	132.79
Control	86.71	10.61	69.48	104.23
Fructosa	90.31	29.00	55.74	133.76
Glucosa	73.64	9.33	59.59	85.45
Mezcla	72.98	28.28	35.13	106.76
Sacarina	89.52	19.46	57.16	114.63
Sacarosa	87.08	16.17	62.13	111.22
Stevia	89.70	20.31	49.10	105.79
Sucralosa	88.10	22.70	67.50	134.57

En la Figura 5.33 se encuentran imágenes representativas de los hepatocitos de cada uno de los grupos de edulcorantes para las ratas hembra.

5.11.2 Análisis histológico del tejido hepático

En el tejido hepático se realizó la tinción de hematoxilina-eosina, para la evaluación de la degeneración vacuolar presente en las muestras de hepatocitos. En la Figura 5.34 muestran los cortes de tejido hepático.

En ratas macho el grupo que no presentó degeneración vacuolar fue el grupo control (Figura 5.34A). En los grupos de aspartamo (Figura 5.34C), infusión de *Stevia rebaudiana* (Figura 5.34 G), y sacarina (Figura 5.34F) presentó degeneración micro vesicular (gran cantidad de pequeñas vesículas en el citoplasma) leve. Por otro lado, los grupos de acesulfamo de K (Figura 5.34D), mezcla comercial de acesulfamo de potasio con aspartamo (Figura 5.34E), sucralosa (Figura 5.34H), glucosa (Figura 5.34K), fructosa (Figura 5.34J) y sacarosa (Figura 5.34I) presentaron esteatosis micro vesicular vacuolar moderada. De los grupos que presentaron degeneración vacuolar moderada, únicamente el grupo de sacarosa concuerda con los elevados niveles de sintasa de ácidos grasos (FAS). Aunque no presentaron niveles elevados de sintasa de ácidos grasos (FAS), los grupos de acesulfamo K y de mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo presentaron elevados niveles de *SREBP-1*, un factor de transcripción estimulante de la lipogénesis, lo cual podría explicar por qué se presentó la degeneración vacuolar. En el caso de la sucralosa, ni los niveles de FAS, ni de *SREBP-1* o *ChREBP*, explican la degeneración vacuolar (esteatosis micro vesicular) sufrida en los hepatocitos de este grupo.

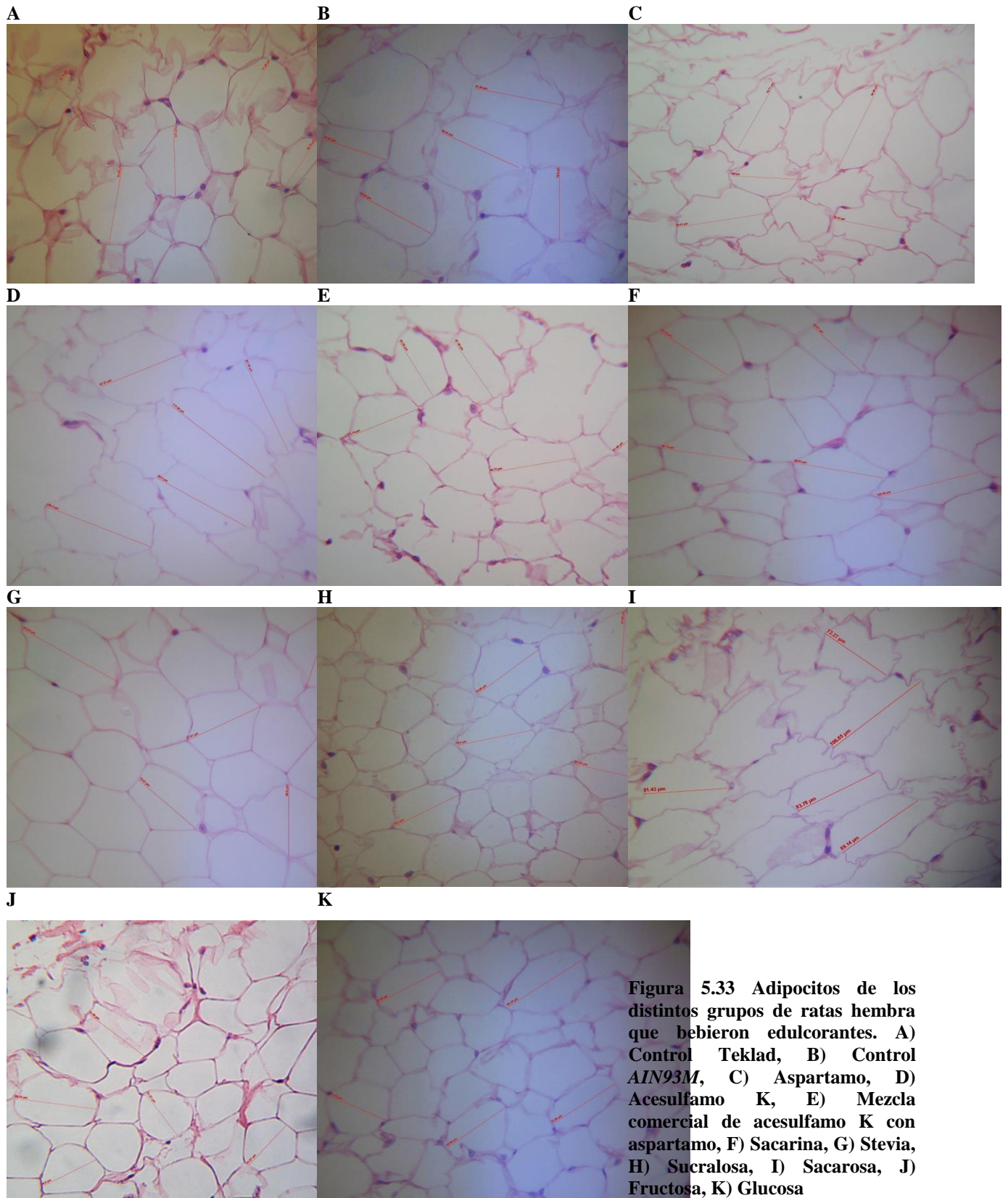
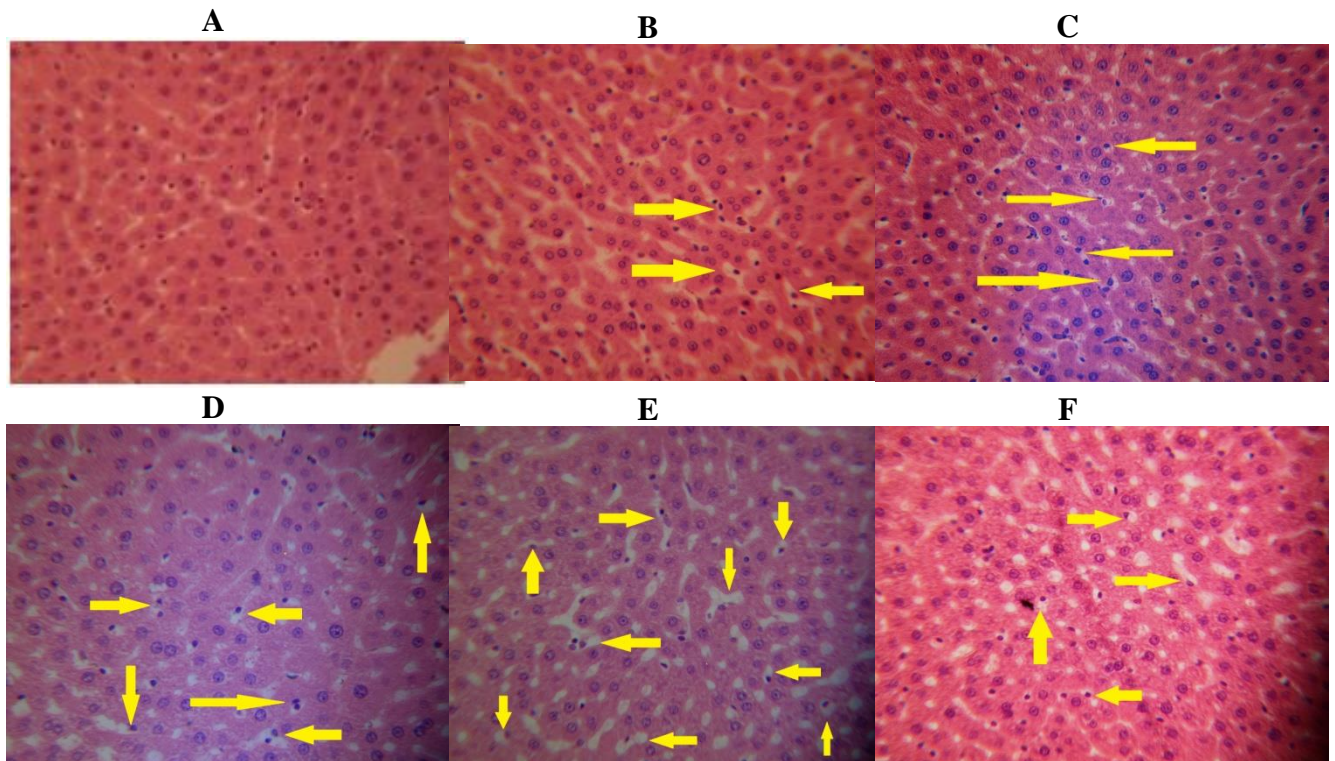


Figura 5.33 Adipocitos de los distintos grupos de ratas hembra que bebieron edulcorantes. A) Control Teklad, B) Control AIN93M, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

En el caso de las ratas hembra, la Figura 5.35 muestra los grados de degeneración vacuolar observados en los hepatocitos. El grupo control (Figura 5.35A) no tuvo degeneración vacuolar (esteatosis micro o macro vesicular). Una degeneración vacuolar micro vesicular moderada estuvo en los siguientes grupos: Control *AIN93M* (Figura 5.35B), aspartamo (Figura 5.35C), acesulfamo de K (Figura 5.35D), mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K (Figura 5.35E), sacarina (Figura 5.35F), infusión de *Stevia rebaudiana* (Figura 5.35G), sacarosa, fructosa y glucosa. El único grupo que presentó degeneración vacuolar grave (esteatosis micro vesicular) fue el grupo de sucralosa (Figura 5.35H), muchas vacuolas pequeñas dentro del citoplasma, a pesar de que los niveles de la enzima sintasa de ácidos grasos (*FAS*) fueron bajos. Todos los grupos que ingirieron edulcorantes calóricos (sacarosa, glucosa o fructosa) presentaron degeneración vacuolar moderada. Así mismo, todos los grupos de edulcorantes hipocalóricos presentaron degeneración vacuolar leve a pesar de no haber presentado niveles elevados de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*). Se deberá seguir indagando acerca de las posibles causas que conllevan a esta vacuolización leve en los hepatocitos a causa del consumo de los edulcorantes hipocalóricos.



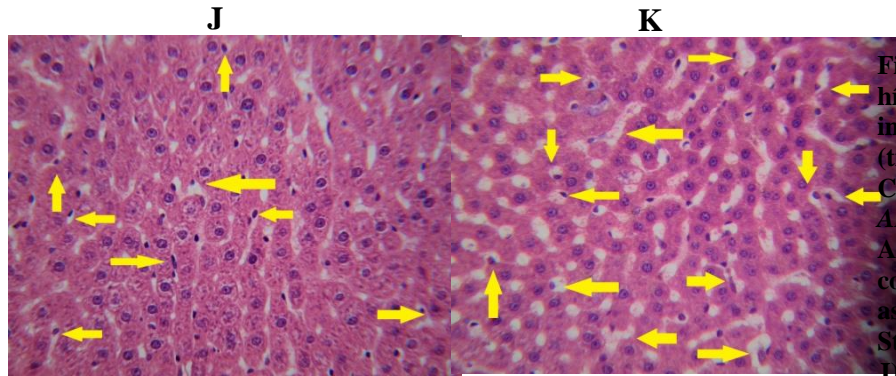
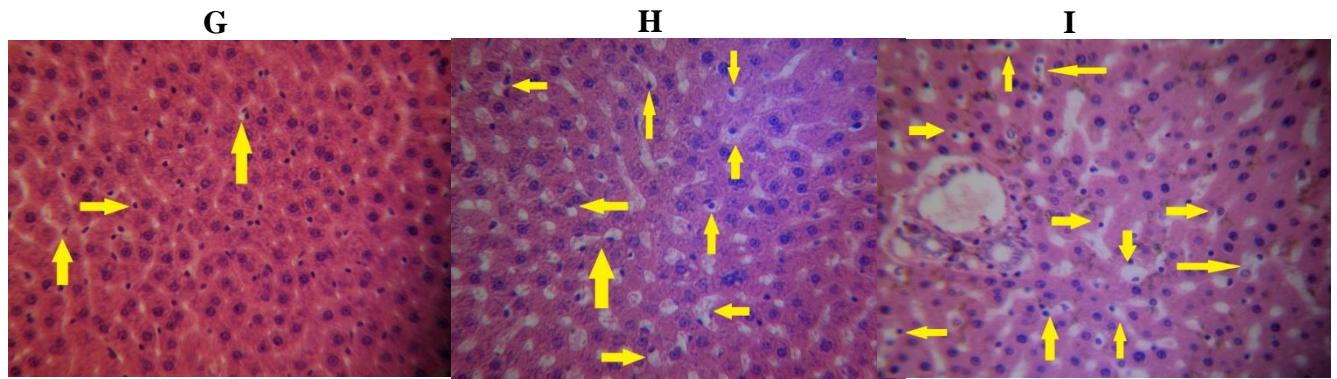
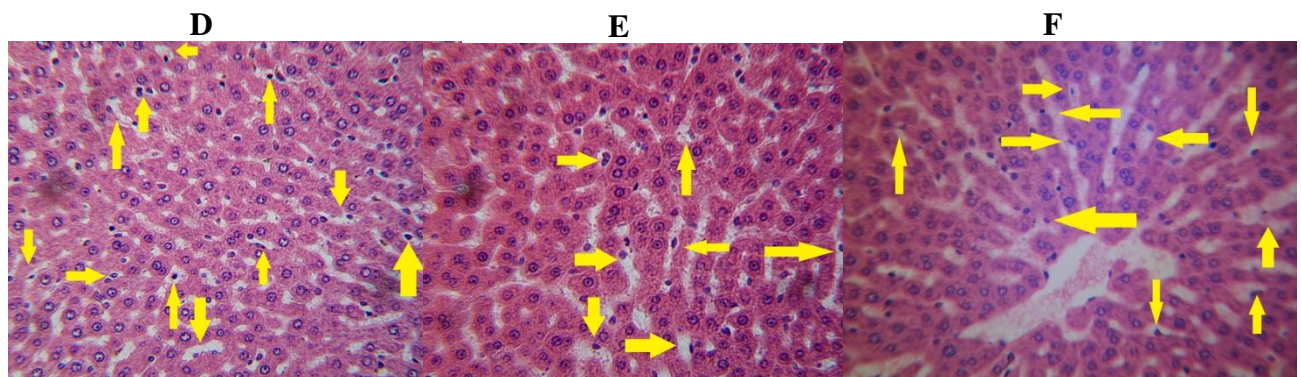
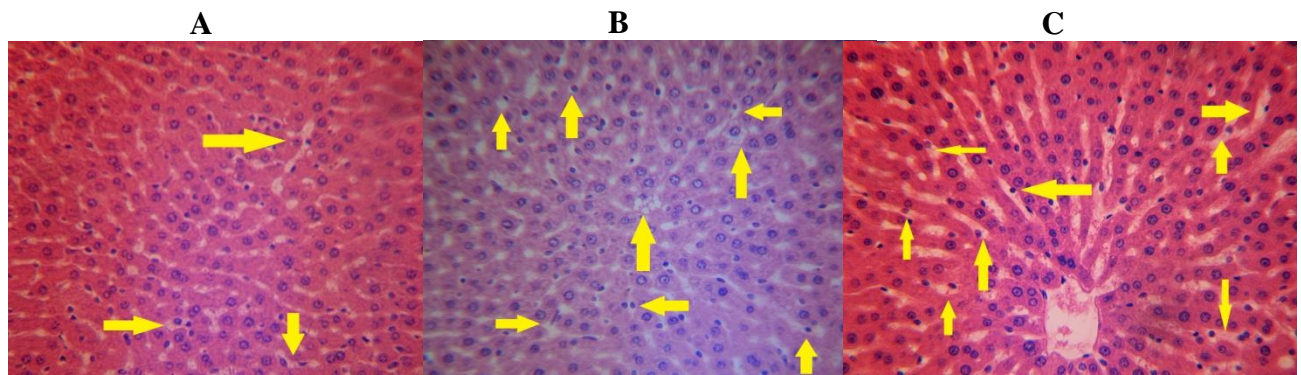


Figura 5.34 Cortes histológicos de hígado de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control *AIN93M*, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa



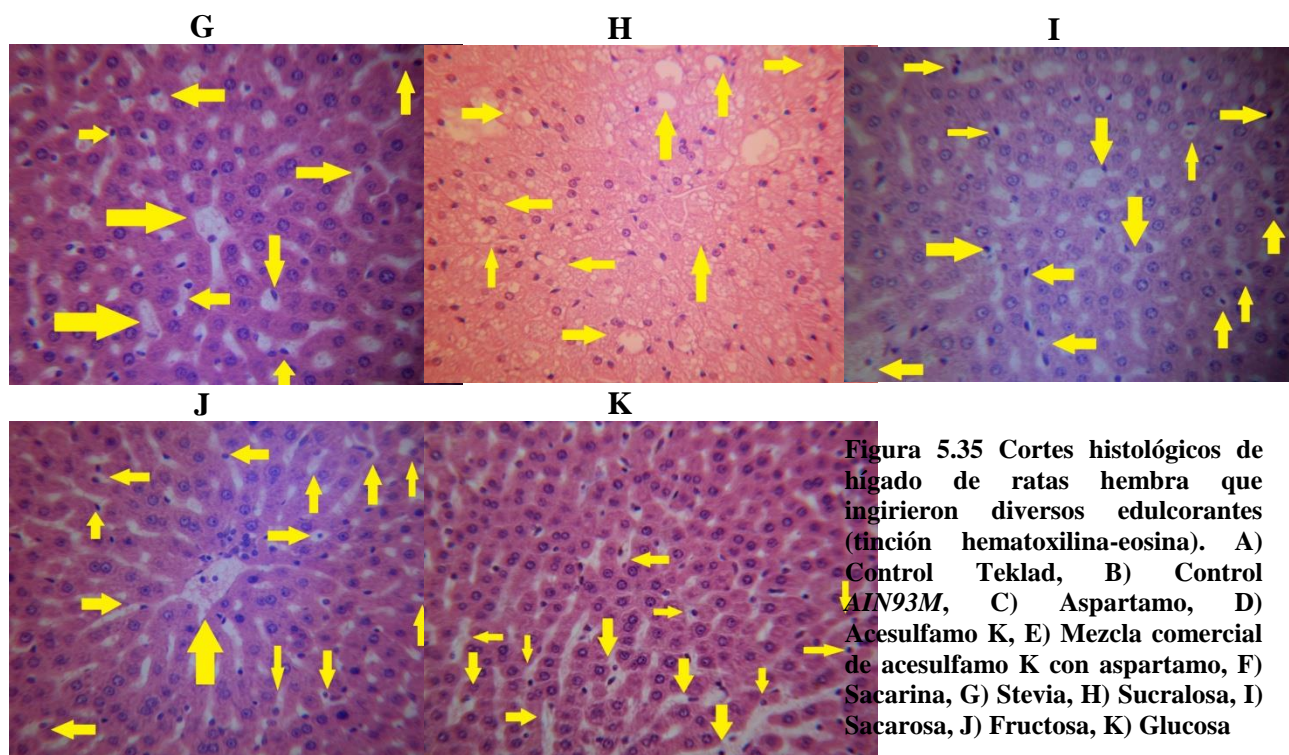


Figura 5.35 Cortes histológicos de hígado de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control AIN93M, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

5.11.3 Análisis histológico de tejido cardíaco

Las muestras de tejido muscular cardíaco fueron teñidas mediante la técnica de hematoxilina-eosina. En la Figura 5.36 se muestran las imágenes representativas de músculo cardíaco pertenecientes a ratas macho de cada uno de los grupos de edulcorantes calóricos e hipocalóricos. Se evaluó el cambio vacuolar y la presencia de lipofucsina. En ratas macho en ningún grupo se observó alguna diferencia.

En el caso de las ratas hembras, tampoco se observaron diferencias histológicas en los cortes de tejido muscular estriado cardíaco, es decir los edulcorantes ingeridos no comprometieron la integridad del tejido, ni se presentó ningún daño que pueda ser considerado patológico. La Figura 5.37 contiene las imágenes representativas de los cortes de tejido cardíaco teñidos mediante la técnica de hematoxilina-eosina.

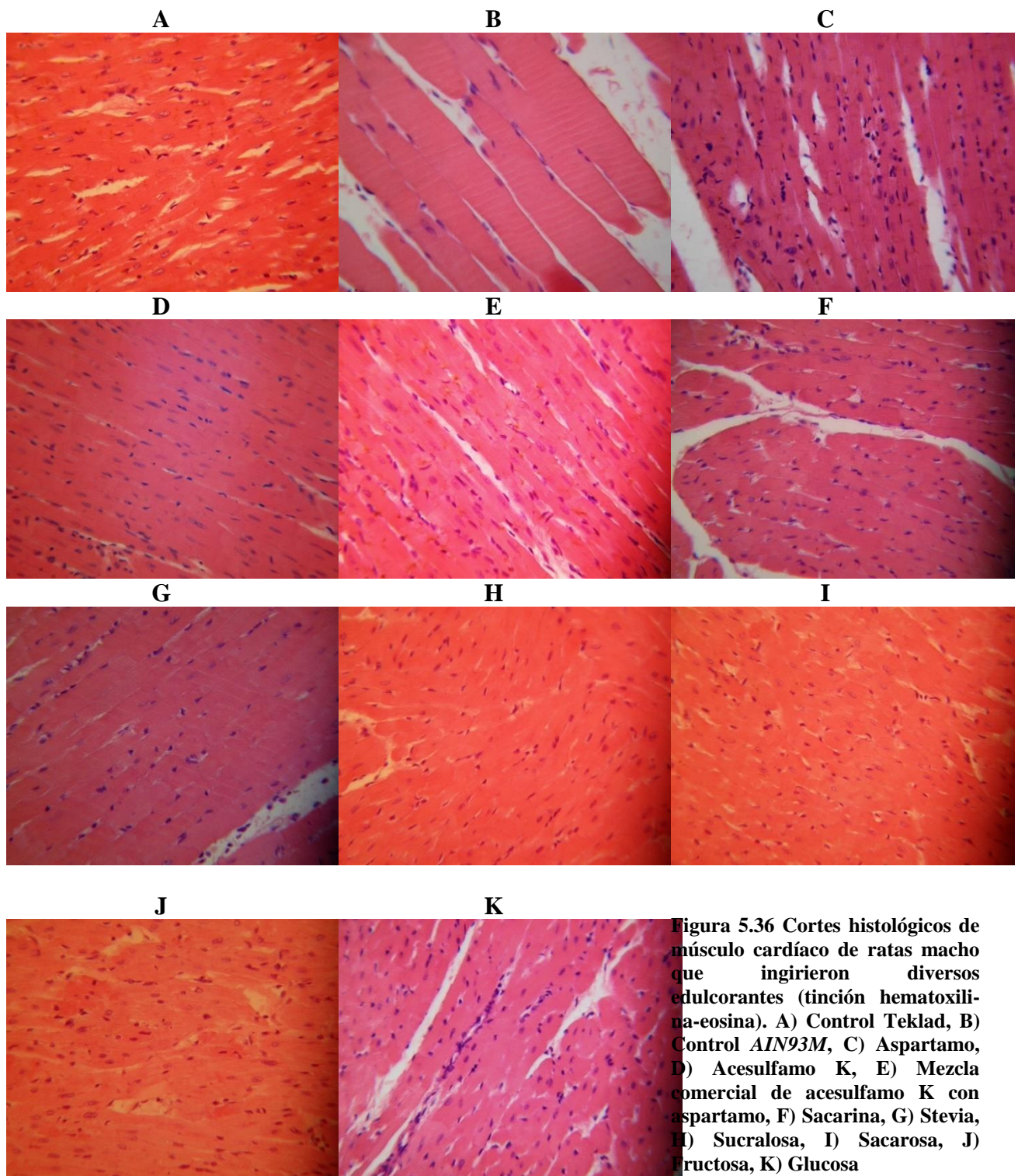


Figura 5.36 Cortes histológicos de músculo cardíaco de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control AIN93M, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

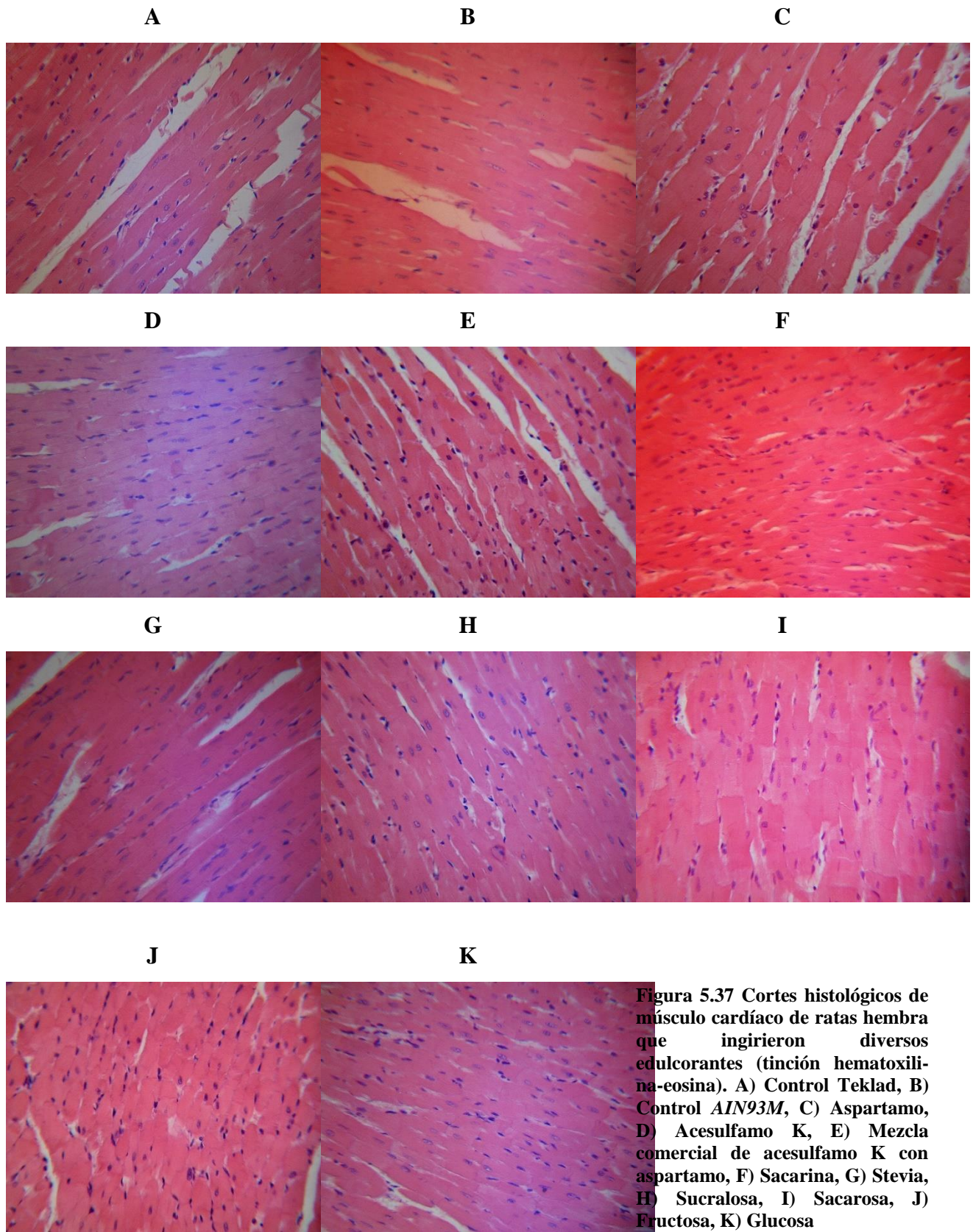


Figura 5.37 Cortes histológicos de músculo cardíaco de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control *AIN93M*, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

5.11.4 Análisis histológico del tejido renal

Las muestras de tejido renal fueron sometidas a la tinción de hematoxilina-eosina. En la Figura 5.38 se muestran las imágenes de la zona cortical de los riñones pertenecientes a algunas de las ratas macho. La histología se realizó con la tinción hematoxilina-eosina. Se visualizan los corpúsculos renales con los glomérulos u ovillos vasculares, la cápsula de Bowman y el mesangio intraglomerular. Se evaluó el daño glomerular en tres niveles: daño leve, daño moderado y daño severo.

Se observa que los grupos control Teklad (Figura 5.38A) y control *AIN93M* (Figura 5.38B) no presentaron aparente daño glomerular. Los grupos que presentaron daño glomerular leve fueron los de sucralosa (Figura 5.38H) y glucosa (Figura 5.38K). El daño glomerular moderado fue observado en los grupos de aspartamo (Figura 5.38C), acesulfamo de potasio (Figura 5.38D), mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de potasio (Figura 5.38E), sacarina (Figura 5.38F), sacarosa (Figura 5.38I) y fructosa (Figura 5.38J). Estos últimos dos probablemente debido a la alta carga de trabajo, ya que los especímenes de los grupos ingiriendo edulcorantes calóricos bebían más del doble que los de los grupos de edulcorantes hipocalóricos o que el grupo control. El único grupo que presentó daño glomerular grave fue el grupo de ratas macho que bebió la infusión al 0.94% de hojas de *Stevia rebaudiana* (Figura 4.39G). Esta planta es rica en una gran cantidad de metabolitos secundarios y probablemente algunos de ellos sean dañinos para el riñón. Respecto a esto, cabe destacar que la *FDA* no aprueba el uso de los extractos de estas plantas, debido a que no se ha garantizado la inocuidad de todos sus componentes. Solamente está aprobado el uso de los rebaudiósidos o esteviósidos con un 95% de pureza (*FDA*, 2015a). Sin embargo, la planta sigue siendo comercializada en distintos lugares, lo cual supone un probable riesgo, por lo que debe seguirse indagando acerca de las consecuencias del consumo de estos extractos e infusiones.

Respecto de las ratas hembra que ingirieron igualmente los distintos edulcorantes, las imágenes representativas de la zona cortical de los riñones donde se muestran los glomérulos, se localizan en la Figura 5.38. Los grupos que no presentaron aparente daño glomerular fueron, al igual que para las ratas macho, los grupos control Teklad (Figura 5.38A) y control *AIN93M* (Figura 5.38 B). El grupo que presentó daño glomerular leve fue el grupo de sucralosa (Figura 5.38H).

Asimismo, existió daño glomerular moderado en los siguientes grupos: aspartamo (Figura 5.39C), acesulfamo de potasio (Figura 5.39D), sacarina (Figura 5.39F), mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de potasio (Figura 5.39E), sacarosa (Figura 5.39I), fructosa (Figura 5.39J) y glucosa (Figura 5.39K). Al igual que lo ocurrido con las ratas macho, el único grupo donde existió daño glomerular severo fue el grupo de infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* (Figura 5.39G). Los daños en el grupo que bebió la infusión de *Stevia rebaudiana* probablemente sea efecto de alguno de los diversos metabolitos secundarios presentes en las hojas.

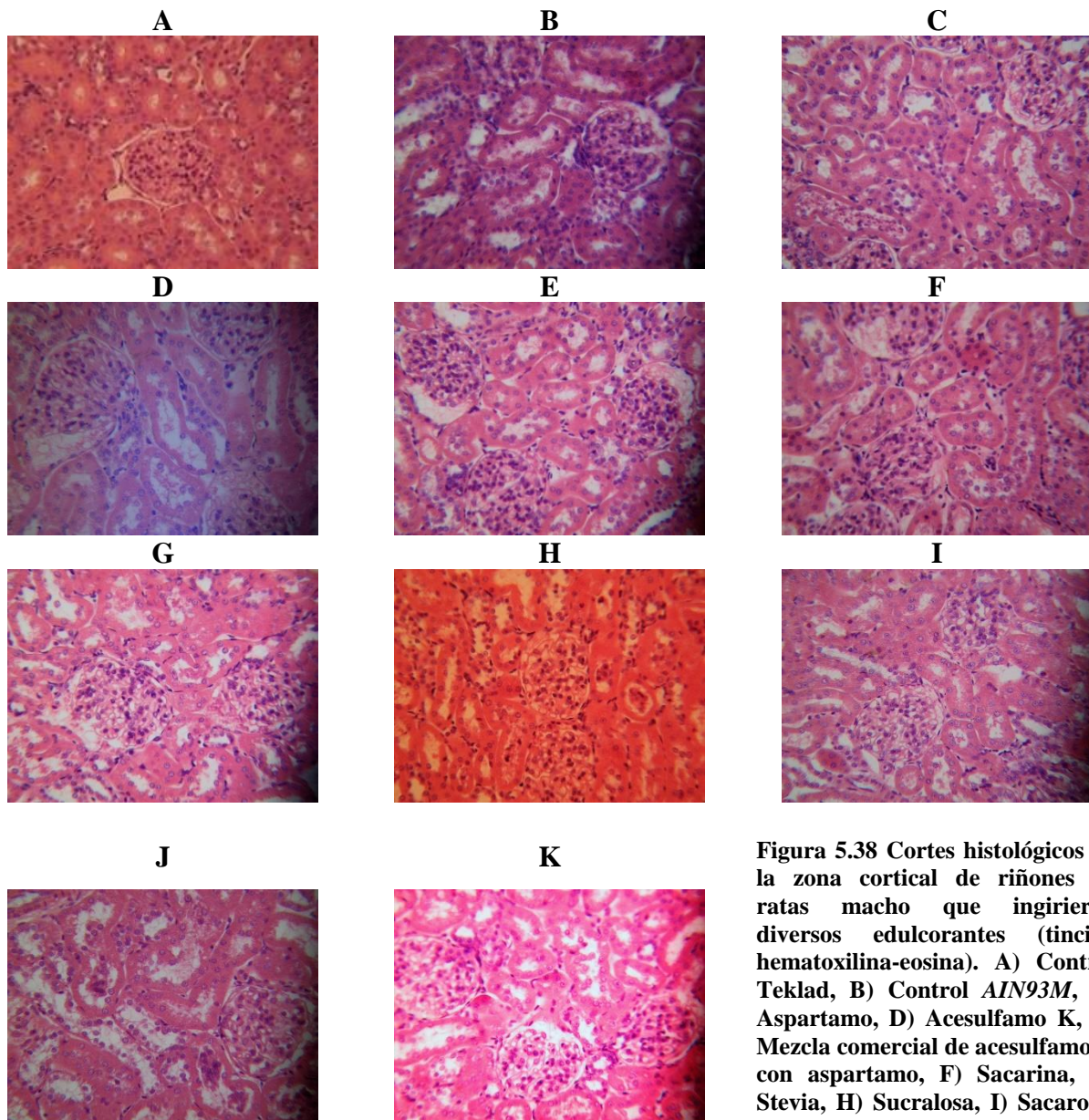


Figura 5.38 Cortes histológicos de la zona cortical de riñones de ratas macho que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control Teklad, B) Control AIN93M, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

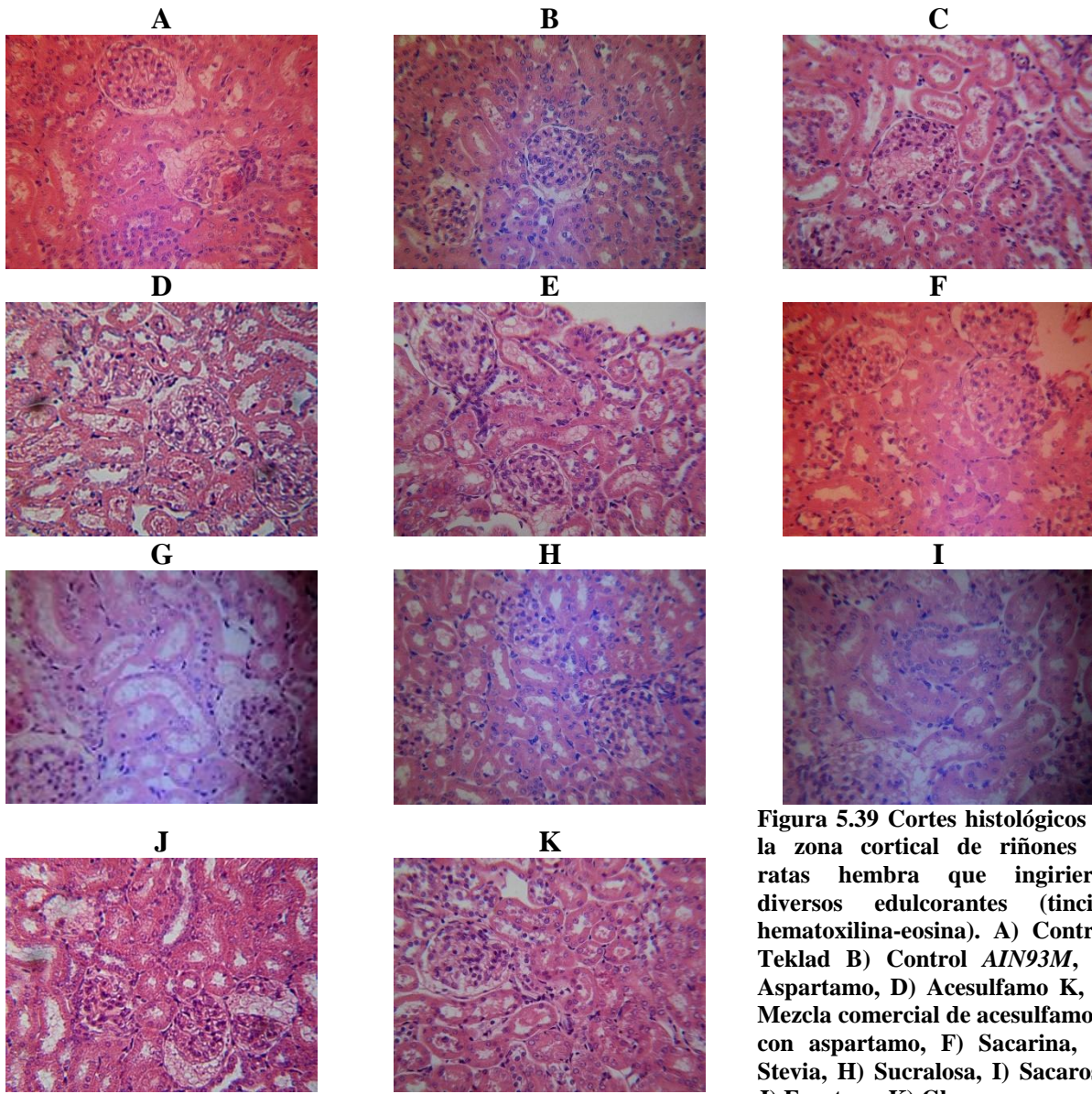


Figura 5.39 Cortes histológicos de la zona cortical de riñones de ratas hembra que ingirieron diversos edulcorantes (tinción hematoxilina-eosina). A) Control, Teklad B) Control *AIN93M*, C) Aspartamo, D) Acesulfamo K, E) Mezcla comercial de acesulfamo K con aspartamo, F) Sacarina, G) Stevia, H) Sucralosa, I) Sacarosa, J) Fructosa, K) Glucosa

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSIONES

De acuerdo con la hipótesis y los objetivos, el consumo crónico desde el destete hasta la adultez (120 días) de edulcorantes calóricos e hipocalóricos provocó cambios fisiológicos en el organismo tanto de ratas macho como de ratas hembra. En algunos parámetros estos cambios dependieron del sexo de la rata. En ninguno de los dos casos superaron los rangos considerados como normales ni estas alteraciones metabólicas condujeron al desarrollo de alguna patología durante el tiempo de experimentación. Los cambios fisiológicos más importantes se exponen a continuación.

- Los niveles séricos de *GIP*, tanto en ratas macho como en ratas hembra, diferían dependiendo del edulcorante ingerido. En ratas macho los mayores niveles los presentó el grupo de especímenes que ingería fructosa al 10%. Respecto de las ratas hembra las mayores concentraciones las presentó el grupo que ingirió sacarosa al 10%.
- Las concentraciones de glucosa en ratas macho y hembra no difirieron estadísticamente de los demás grupos de edulcorantes calóricos e hipocalóricos.
- En ratas macho las mayores concentraciones de triglicéridos las presentaron los grupos que ingirieron: fructosa, glucosa y sacarosa al 10%. Para las ratas hembra fueron los grupos que ingirieron: sacarosa, fructosa y glucosa.
- Todos los grupos presentaron concentraciones de colesterol total dentro de los rangos normales.
- En ratas macho todos los grupos presentaron niveles normales de insulina. En las hembras las mayores concentraciones las tuvieron los grupos que ingirieron glucosa al 10% y mezcla de aspartamo con acesulfamo de potasio al 0.15%.
- El grupo de ratas macho que ingirió sacarosa fue el que presentó los mayores niveles de glucagón
- Los niveles de leptina de las ratas hembra fueron inferiores a los niveles de las ratas macho. En machos los mayores niveles los tuvo el grupo que ingirió la infusión de *Stevia rebaudiana* al 0.94%. En ratas hembra el grupo que ingirió sacarosa al 10% fue el que presentó los mayores niveles. Todos los grupos estuvieron dentro del rango normal.

- En machos los mayores niveles de *SREBP-1* los presentó el grupo que ingirió acesulfamo de potasio. En ratas hembra se trato de los grupos que ingerían sacarosa al 10% y sacarina al 0.033%.
- Todos los grupos que ingirieron edulcorantes calóricos e hipocalóricos tuvieron una ligera expresión de *ChREBP*.
- Los mayores niveles del gen de *SGLT-1* se presentó en las ratas hembra que ingirieron acesulfamo de potasio, sucralosa, glucosa, fructosa y sacarosa.
- Los mayores niveles de la proteína de unión al elemento regulador del estero (*SREBP-1*) en ratas macho los presentaron los grupos que ingirieron acesulfamo de potasio al 0.05% y aspartamo 0.3%. Para las ratas hembra fue el grupo que ingirió sacarosa al 10%.
- Las ratas hembra y ratas macho presentaron los mayores niveles de sintasa de ácidos grasos (FAS) en el grupo que ingirió sacarosa al 10%.
- Respecto del transportador hepático de sodio y glucosa (*SGLT-1*) de las ratas macho los mayores niveles se presentaron en los grupos que ingirieron sacarina al 0.033% y acesulfamo de potasio al 0.05%. En las ratas hembra los mayores niveles se presentaron en los tres grupos que ingirieron edulcorantes calóricos: glucosa, fructosa y sacarosa..
- El consumo crónico de sacarosa al 10% indujo una mayor expresión del transportador de glucosa GLUT-2 en las ratas hembra. En ratas macho la expresión de GLUT-2 fue mayor en el grupo que ingirió fructosa al 10%.
- Respecto de los análisis histológicos se encontró el desarrollo de esteatosis micro vesicular leve en los grupos que ingirieron sacarosa, glucosa y fructosa. Adicionalmente, en ratas hembra el grupo que ingirió sucralosa desarrolló esteatosis micro vesicular moderada.
- Tanto en ratas macho como en rata hembra se presentó degeneración vacuolar en los grupos que ingirieron la infusión de *Stevia rebaudiana* al 0.94%.
- Respecto de los patrones de ingesta de alimento y bebida, se encontró que los grupos de edulcorantes calóricos consumieron la menor cantidad de alimento debido a la mayor ingesta de bebida.
- Finalmente, en cuanto a la ganancia de masa corporal, en las ratas macho el grupo que presentó el menor incremento de masa fue el grupo de sacarosa. En ratas hembras el menor incremento de masa lo presentó el grupo que ingirió sucralosa.

5.2 RECOMENDACIONES

Al cabo de estos experimentos y del análisis de los datos, las nuevas incógnitas derivadas de esta investigación son múltiples, por lo que se propone continuar, principalmente con las siguientes recomendaciones:

- Evaluar la expresión de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACC) en respuesta a la ingesta de edulcorantes calóricos e hipocalóricos.
- Para evaluar las posibles implicaciones sobre el metabolismo de las ratas hembras y machos, se recomienda evaluar la microbiota intestinal a través de su excremento a lo largo del periodo experimental, pues artículos recientes dictan la modificación de ésta debido al consumo de los edulcorantes (Palrnäs et al., 2014; Suez et al., 2014)
- Observar la respuesta de la ganancia corporal ante el consumo de edulcorantes artificiales con dietas no balanceadas o en diferentes matrices alimentarias.
- Continuar con los estudios en hembras pues los cambios hormonales propios del sexo pueden continuar generando resultados distintos al de los machos, que se correlacionarían con una tendencia ligeramente mayor de sobrepeso y obesidad en la población femenina en México.
- Continuar las pruebas de consumo crónico de edulcorantes artificiales hasta que los especímenes alcancen el climaterio (período de la vida en que cesa la función reproductora), debido a que el metabolismo se va modificando a lo largo de la vida (Soffritti *et al.*, 2016).
- Evaluar los posibles efectos adversos sobre la descendencia de ratas hembras que hayan consumido de manera crónica los edulcorantes ya que empiezan a haber investigaciones al respecto (Araujo et al., 2014; Reid et al., 2016; Soffritti et al., 2010; Soffritti et al., 2016).
- Evaluar los niveles de los transportadores de glucosa *SGLT-1* y *GLUT-2* en los enterocitos, ya que son los responsables de la absorción intestinal de glucosa tanto en ratas macho como en ratas hembra.

- Determinar el neuropéptido Y, otra hormona relacionada con la regulación del apetito y que recientes investigaciones han mostrado que es alterado por los edulcorantes artificiales (Wang et al., 2016).
- Determinar otros factores de transcripción involucrados en la lipogénesis como son *LXR* y *RXR* para evaluar la estimulación de enzimas clave en la lipogénesis y glucólisis.

ANEXOS

ANEXO 1. CÁLCULOS DE EQUIDULZURA

En todos aquellos casos en donde el poder edulcorante ya se encontraba reportado, el cálculo de las concentraciones de las soluciones de edulcorantes hipocalóricos se realizó aplicando la siguiente fórmula.

$$\text{Concentración de edulcorante} = \frac{\text{Concentración de sacarosa a igualar}}{\text{Poder edulcorante}}$$

El poder edulcorante empleado correspondiente a cada edulcorante hipocalórico es:

- Sucralosa 600 veces la sacarosa
- Sacarina 300 veces la sacarosa
- Aspartamo comercial 33.3 veces la sacarosa
- Acesulfamo K 200 veces la sacarosa
- Mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo

Ejemplo de cálculo. Cálculo para sucralosa

$$\frac{10\% \text{ sacarosa}}{600} = 0.01666667 \approx 0.017\% \text{ sucralosa}$$

En el caso de las hojas de *Stevia rebaudiana* no existe un valor teórico de su poder edulcorante, es por ello que la determinación de equidulzura se realizó de manera experimental. Para ello se llevó a cabo una evaluación sensorial empleando 20 jueces no entrenados.

La evaluación sensorial consistió en una prueba de decisión forzada donde se debía determinar en 6 pares distintos de soluciones, cuál de ellas presentaba el mayor dulzor. Cada par estaba compuesto de una solución de sacarosa al 10% y otra de una infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* a distintas concentraciones en cada par (0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1%). De cada par el

juer debió determinar cual presentaba el mayor dulzor. La Tabla A.2.3.1 contiene los resultados de la prueba de equidulzura.

Tabla A.1.1. Resumen de datos de prueba de equidulzura

Concentración % stevia (m/v)	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
	Par 1	Par 2	Par 3	Par 4	Par 5	Par 6
Total S	18	16	15	14	15	10
Total V	2	4	5	6	8	10
%S	90	80	75	70	60	50
%V	10	20	25	30	40	50

La S indica que el juez percibió como más dulce la solución de sacarosa al 10% y la V que percibió más dulce la infusión de *Stevia rebaudiana*

Con los datos de la Tabla A.1 se realizó un gráfico (Figura A.1) relacionando el % de jueces que percibe más dulce la infusión de hojas de *Stevia rebaudiana* y se realizó una regresión lineal.

De esta gráfica se obtiene la ecuación de la recta:

$$Y = 75X - 27$$

La determinación del punto de equidulzura de acuerdo al método gráfico de Larson-Powers y Pangborn (1978) se realiza al interpolar a que concentración del edulcorante de prueba se tendrá un 50% de jueces que indiquen que es más dulce que la solución de referencia.

$$X = \frac{Y + 27}{75}$$

$$X = \frac{50 + 27}{75}$$

Equidulzura= 1.03%

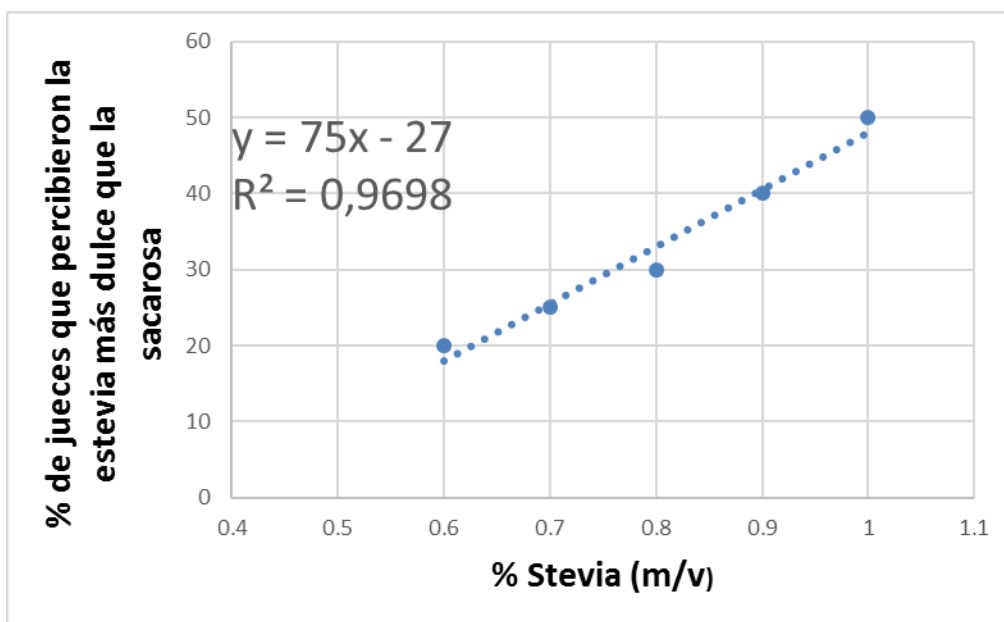


Figura A.1.1. Gráfica para el cálculo de equidulzura

Posteriormente se procedió a realizar el cálculo aplicando la ecuación de Cameron (1947)

$$z = \frac{(\sum \% \text{ respuesta del edulcorante})(\Delta \text{ concentración de edulcorante})}{\sum \% n}$$

$$z = \frac{(10 + 20 + 25 + 30 + 40 + 50)(1 - 0.4)}{600} = 0.1167$$

$$\text{Equidulzura} = [\text{mayor concentración del edulcorante}] - z$$

$$\text{Equidulzura} = 1\% - 0.1167 = 0.8833\%$$

Finalmente para sacar el valor de equidulzura se obtuvo un promedio entre el valor obtenido a través del gráfico y el valor obtenido mediante la ecuación de Cameron (1947):

$$\text{Equidulzura} = \frac{\text{Equidulzura de Larson} + \text{Equidulzura Cameron}}{2}$$

$$\text{Equidulzura} = \frac{1.03\% + 0.8833\%}{2}$$

$$\text{Equidulzura} = 0.94\%$$

Se concluyó que una infusión del 0.94 % (m/V) de hojas de *Stevia rebaudiana* tiene el mismo dulzor que una solución de sacarosa al 10%.

ANEXO 2. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DETERMINACIÓN DE GIP, GLP-1, LEPTINA, GRELINA, INSULINA Y GLUCAGÓN

Para realizar la determinación de las hormonas se descongelaron por completo las muestras de suero sanguíneo de las 90 ratas. Una vez descongeladas se agitó en un equipo vortex durante 30s a una velocidad de 3200rpm y posteriormente se centrifugaron a 3000rpm durante cinco minutos antes de la realización de las pruebas de *GIP*. Todas las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1.5mL a 4°C durante el desarrollo de la determinación.

a) Preparación de los reactivos para la técnica de fluoroinmunoensayo

1. Preparación de las perlas con anticuerpos inmovilizados

Para la preparación de las perlas con anticuerpos inmovilizados cada vial de perlas con anticuerpos fue sometido a un baño de sonicación durante 30 segundos y se agitó en un *vórtex* a 3200rpm durante 1 minuto. Se añadieron 150µL de cada vial de perlas con anticuerpos a la botella de mezclado (incluida en el MILLIPLEX® MAP Kit) y se llevó a un volumen final de 3.0mL con diluyente para perlas (reactivo suministrado por el proveedor). Una vez mezcladas las perlas se agitaron muy bien en un *vórtex* a 3200rpm durante 30 segundos.

2. Preparación de los controles de calidad

Antes de su uso para la determinación de las hormonas, se reconstituyó el control de calidad 1 y el control de calidad 2 (los cuales consisten en hormonas liofilizadas de rata en concentraciones de 33-68pg/mL y 105-219pg/mL) con 250µL de agua desionizada. Se invirtió el frasco varias veces de manera manual para mezclar y se agitó en un vortex a 3200rpm durante 1 minuto.

Se dejó el vial a reposo durante 10 minutos. Posterior a este tiempo de reposo, se volvió a agitar en el *vórtex* a 3200rpm y luego se transfirieron los controles a tubos Eppendorf debidamente etiquetados.

3. Preparación de la solución amortiguadora (*buffer*) de lavado

Se diluyó el *buffer* de lavado 10X con 270mL de agua desionizada para alcanzar un volumen final de 300mL.

4. Preparación de la matriz de suero

Se añadió 1 mL de agua desionizada a la botella que contiene una matriz de suero liofilizado (reactivo suministrado por el proveedor). Se mezcló bien y se dejó reposar por lo menos 10 minutos para su completa reconstitución.

5. Preparación del estándar de la hormona metabólica de rata

Para la preparación del estándar se reconstituyó los estándares de las hormonas de rata con 250µL de agua desionizada y se agitó el vial en un equipo *vórtex* a 3200rpm durante 30 segundos. Se dejó que el vial reposara durante 10 minutos. Posteriormente, se volvió a agitar en el *vórtex* para

luego transferir el estándar a un tubo Eppendorf de 1.5mL. Éste fue utilizado como el estándar No. 7.

6. Preparación de los estándares de trabajo

Para la preparación de los estándares de trabajo se etiquetaron 6 tubos Eppendorf y se les adicionaron 200µL de *buffer* de ensayo a cada uno de los seis tubos. Se realizaron diluciones seriadas mediante la adición de 100 µL del "estándar No. 7" al tubo del "*estándar No. 6*", mezclándolo bien y así sucesivamente hasta llegar al "*estándar No. 1*". El "*estándar No. 0*" (blanco) se considera el *buffer* de ensayo. La concentración de cada estándar se muestra en la Tabla A.2.1.

Tabla A.2.1. Concentración de los estándares de las hormonas

Estándar No.	<i>GIP</i> (pg/mL)	Grelina (pg/mL)	Glucagón (pg/mL)	<i>GLP-1</i> (pg/mL)	Insulina, leptina (pg/mL)
1	2.7	6.9	14	41	69
2	8.2	21	41	124	206
3	25	62	124	370	617
4	74	185	370	1111	1852
5	222	556	1111	3333	5556
6	667	1667	3333	10000	16667
7	2000	5000	10000	30000	50000

Procedimiento del fluoroinmunoensayo

Para realizar el fluoroinmunoensayo se siguen los pasos siguientes:

1. Se añadieron 200 µL de *buffer* de ensayo en cada pocillo de la placa de ensayo. Se selló y se mezcló con un agitador de placas a 50rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se decantó el *buffer* de ensayo y se eliminó la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola sobre toallas absorbentes varias veces.
3. Se colocaron 25 µL de la solución matriz a los blancos, los estándares, y los pocillos de control.
4. Se adicionaron 25µL de *buffer* de ensayo al blanco (0pg/mL estándar) y a los pocillos de las muestras.
5. Se añadieron 25µL de cada estándar en los pocillos correspondientes en la placa de ensayo y se incorporaron 25µL de muestra en los pocillos apropiados. Posteriormente se agitó en un equipo *vórtex* a 3200rpm la botella de mezclado y se añadió 25µL a cada pocillo.
7. Se selló la placa con un sellador de placas (proporcionado en el MILLIPLEX® MAP Kit) y posteriormente se envolvió la placa con papel aluminio y se incubó con agitación en un agitador de placas a 50rpm durante toda la noche (20 horas) a 4°C.

8. Pasadas las 20 horas los reactivos y la placa de ensayo se atemperaron a 20-25°C. Se retiró el contenido de los pocillos y se lavó la placa por 3 veces, con el *buffer* de lavado.
9. Después de los lavados se añadieron 50µL de anticuerpos de detección en cada pocillo.
10. Se selló y se cubrió la placa con papel de aluminio incubándose en un agitador de placas a 50rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
11. Se añadieron 50µL de estreptavidina-ficoeritrina a cada uno de los pocillos que contienen los 50µL de anticuerpos de detección.
12. Se selló y se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó incubar con agitación en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y se lavó la placa con el *buffer* de lavado.
14. Posteriormente a los lavados se les añadieron 100µL de *sheath fluid* (reactivo suministrado por el proveedor) a todos los pocillos y se re-suspendieron las perlas en un agitador de placas a 50rpm durante 5 minutos.
15. Después de la resuspensión de las perlas se leyó la placa en un equipo Luminex 200™, empleando el software FLEXMAP 3D™ para cuantificar el nivel de fluorescencia emitido por cada una de las muestras.
16. Una vez leídas las muestras se analizaron los datos de intensidad media de fluorescencia (*MFI* en inglés) utilizando un método empleado en el Laboratorio de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMMyNSZ, México) denominado “de ranuras curvas-ajuste” para el cálculo de las concentraciones de *GIP* en las muestras. Una vez obtenidos los datos se procedió a su análisis estadístico con ayuda del software STATGRAPHICS CENTURION versión XV.II.

ANEXO 3. CROMATOGRAMAS DE LAS DETERMINACIONES DE LOS EDULCORANTES EN LAS BEBIDAS SUMINISTRADAS A LAS RATAS

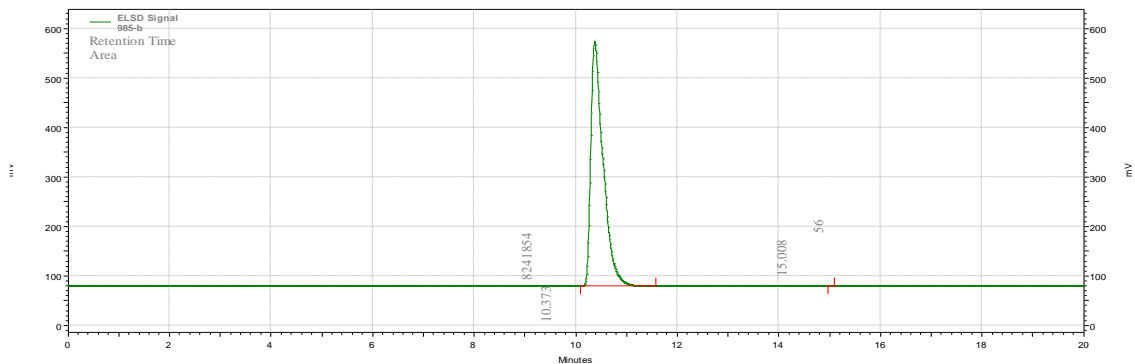


Figura A.3.1 Cromatograma correspondiente a la fructosa

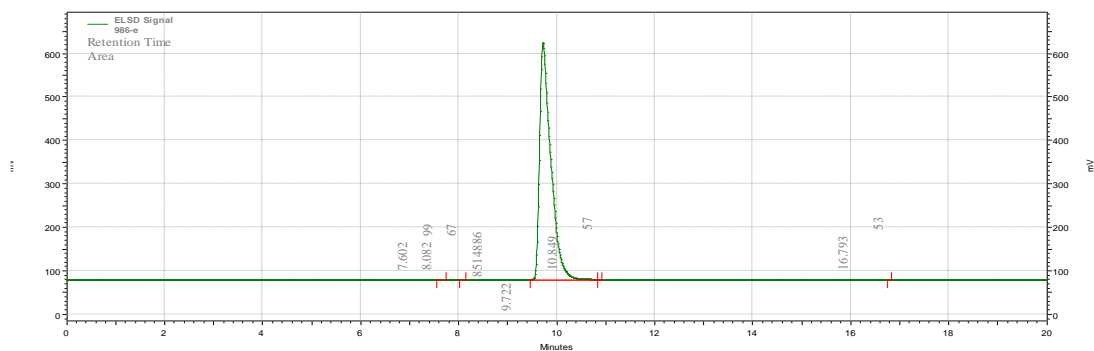


Figura A.3. 2 Cromatograma correspondiente a la glucosa

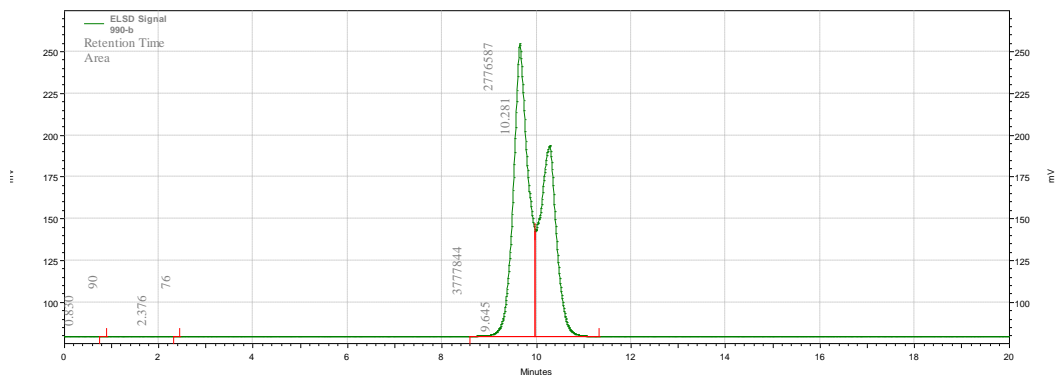


Figura A.3.3 Cromatograma correspondiente de la sacarosa

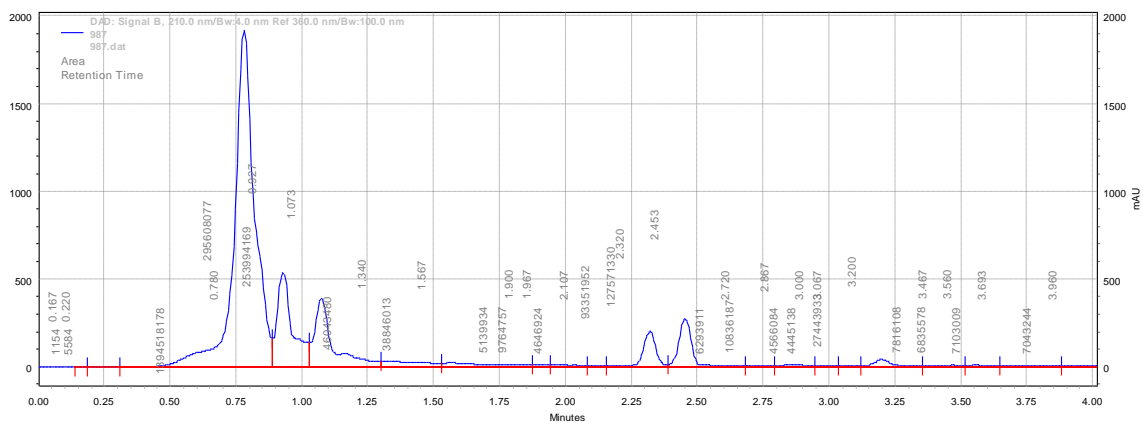


Figura A.3.4 Cromatograma del estevósido (TR=2.32 min) y del Rebaudiósido A (TR=2.453 min). Las concentraciones son 341µg/mL para el estevósido y 582µg/mL para el Rebaudiósido A

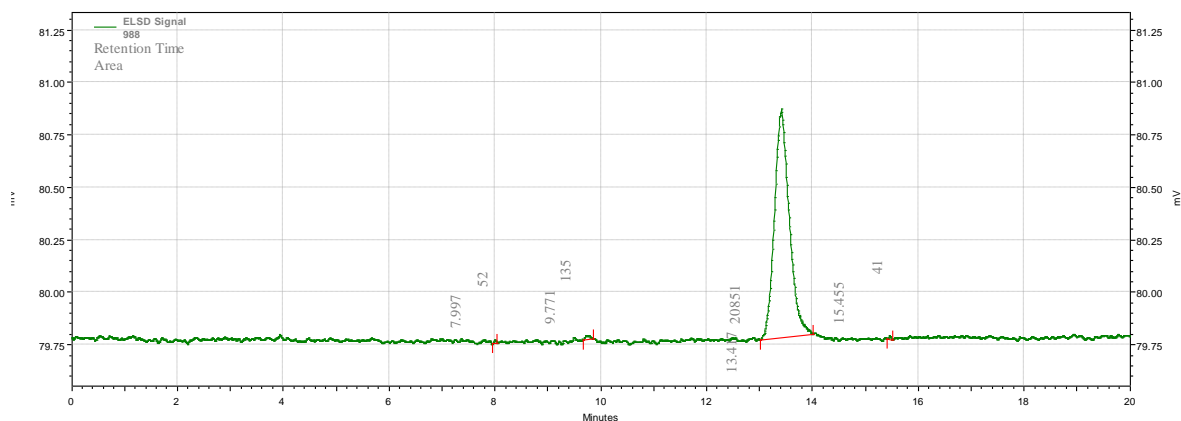


Figura A.3.5 Cromatograma de la sucralosa

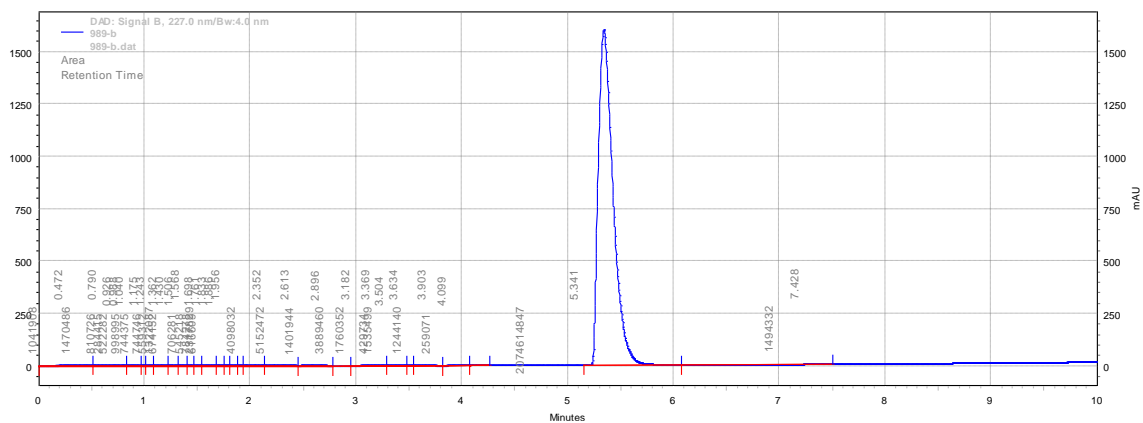


Figura A.3.6 Cromatograma del acesulfamo K

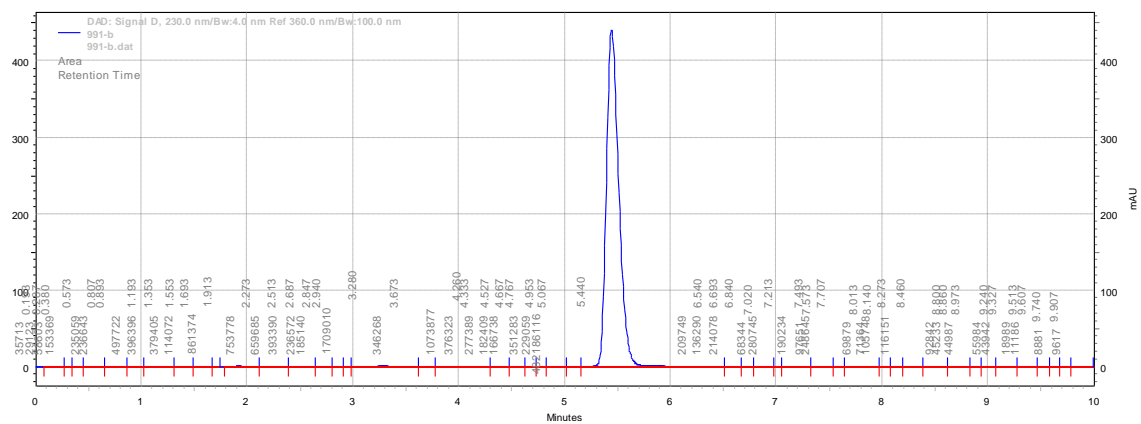


Figura A.3.7 Cromatograma de la sacarina

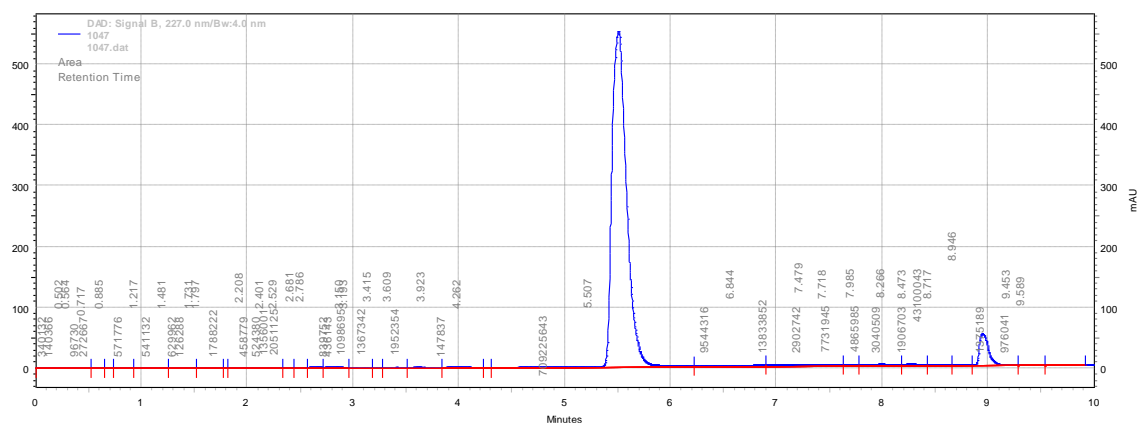


Figura A.3.8 Cromatograma de la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo K. Contenido de aspartamo 0.32 mg/mL, contenido de acesulfamo K 0.147mg/mL

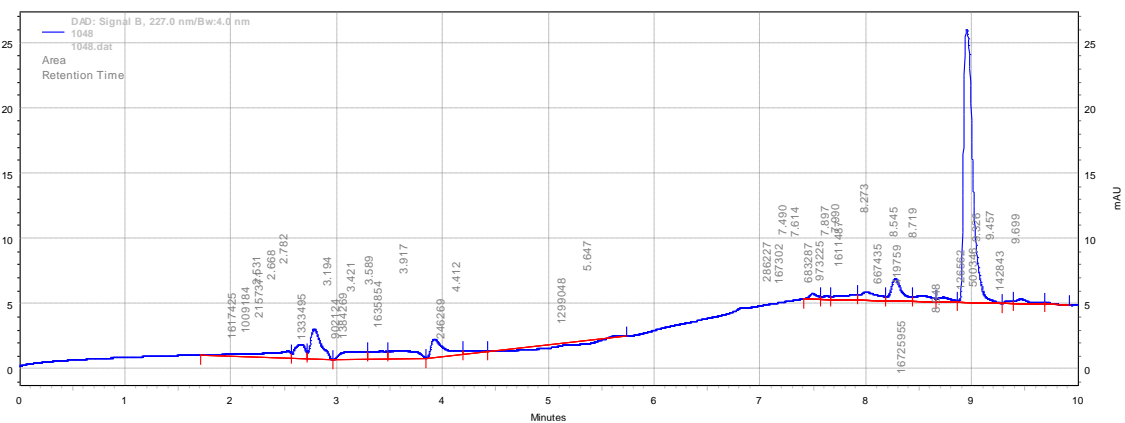


Figura A.3.3.9 Cromatograma de la solución de aspartamo comercial. Concentración de aspartamo 0.125mg/mL

ANEXO 4. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS DE LA INVESTIGACIÓN

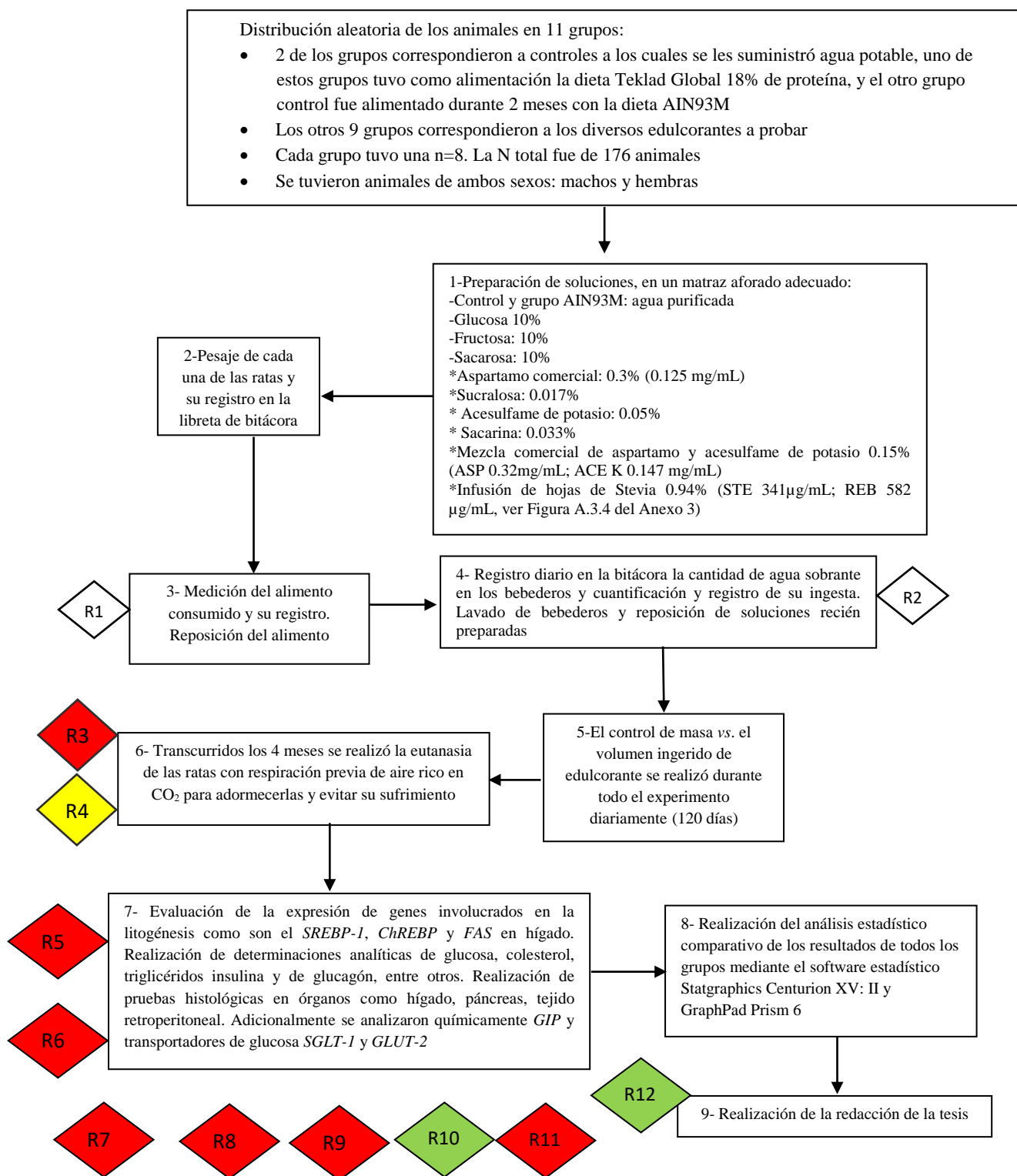


Figura A.4.1. Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación

R1: Residuos orgánicos no peligrosos. Se desechan de forma adecuada en la basura orgánica.

R2: Resto de soluciones de aspartamo, acesulfamo K, fructosa, glucosa, infusión de *Stevia rebaudiana*, mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo, sacarina, sacarosa y sucralosa. Residuos no peligrosos que se desechan en la tarja.

R3: Tubos tipo *vacutainer* con derivados de sangre. Paquete celular sanguíneo. Torundas con sangre de los roedores. Se almacena en bolsas rojas de residuos biológico infecciosos y son colocados en los contenedores adecuados en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA). Se almacena temporalmente hasta que una compañía recolectora, a través de la Facultad de Química de la UNAM, los lleva a incineración.

R4: Partes de tejido y restos anatómicos. Se almacenan en bolsas amarillas para residuos biológico infecciosos y se almacenan temporalmente a -20°C en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA). Son recolectados por una compañía de disposición de residuos biológicos infecciosos, a través de la Facultad de Química de la UNAM, para su incineración.

R5: Mezcla de cloroformo y trizol. Se almacena en un recipiente adecuado. Se etiqueta con todos los datos requeridos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMyNSZ).

R6: Etanol e isopropanol. Se almacena en un recipiente adecuado. Se etiqueta con todos los datos requeridos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

R7: Octilfenoxino poli(etileneoxi)etano, desoxicolato de sodio, azida de sodio, NaF, Na₃VO₄, NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Se almacena en un recipiente adecuado. Se etiqueta con todos los datos requeridos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

R8: Rojo de Ponceau y ácido acético 5%. Se almacena en un recipiente adecuado. Se etiqueta con todos los datos requeridos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

R9: Gel de poliacrilamida. Se desecha en el contenedor de residuos peligrosos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

R10: Membrana de PVFD. Se desecha en el contenedor de basura inorgánica.

R11: Pipetas serológicas y tubos con residuos de poliacrilamida. Se eliminan en el recipiente de residuos peligrosos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

R12: Solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ y Tween 20. Residuo no peligroso que se desecha a la tarja del Laboratorio de Fisiología de la Nutrición del INCMyNSZ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abhilash, M., Varghese, M.V., Paul, M.V.S, Alex, M., Nair, R.H. (2015). Effect of long-term intake of aspartame on serum biochemical parameters and erythrocyte oxidative stress biomarkers in rats. *Comparative Clinical Pathology*, 24(4):927-933.
- Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N. (2014). *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63:895-902.
- Araujo, J.R., Martel, F., Keating, E. (2014). Exposure to non-nutritive sweeteners during pregnancy and lactation: Impact in programming of metabolic diseases in the progeny later in life. *Reproductive Toxicology*, 49:196-201.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Nijima, A., Fujino, M.A., Kasuga, M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, 120:337-345.
- Asmar, M., Holst, J.J. (2010). Glucagon-like peptide 1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide: new advances. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity*, 17:57-62.
- Ashok, I., Sheeladevi, R., Wankhar, D. (2015). Acute effect of aspartame-induced oxidative stress in Wistar albino rat brain. *The Journal of Biomedical Research*, 29(5):390-396.
- Badu, S. (2006). *Química de los alimentos*. 4ta edición. México D.F. Pearson Education, pp. 528-531.
- Baggio, L., Drucker, D. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132:2131-2157.
- Bakal, A.I., O'Brien-Nabors, L. (2011). Saccharin. En O'Brien-Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker. Pp. 151-170.
- Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., Postic, C. (2015). Integration of ChREBP-mediated glucose sensing into whole body metabolism. *Physiology*, 30:428-437.
- Basciano, H., Federico, L., Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutrition & Metabolism*, 2(5):1-14.
- Bermúdez, V., Bermúdez, F., Arraiz, N., Leal, E., Linares, S., Mengual, E., Valdelamar, L., Rodríguez, M., Seyfi, H., Amell, A., Carrillo, M., Silva, C., Acosta, A., Añez, J., Andara, C., Angulo, V., Martins, G. (2007). Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 26(2):76-86.
- Brown, R., Rother, K.I. (2012). Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 97(8):2597-2605.
- Buchko, H., Stargel, W., Comer, C.P., Mayhew, D., Andress, S. (2011). Aspartame. En O'Brien Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker, pp. 45-54.
- Cai, H., Cong, W.N., Daimon, C.M., Wang, R., Tschop, M.H., Seigny, J., Martin, B., Maudsley, S. (2013). Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice. *PLoS One* 8(10):e76553.

- Campos, N.P. (2017). Alteración de la microbiota intestinal causada por los edulcorantes artificiales hipocalóricos. Tesis Profesional. México. México, D.F.: Facultad de Química. UNAM.
- Cameron, A. T.(1947). The taste sense and the relative sweetness of sugar and other sweet substances. *Sugar Research Foundation Report Series*, 9: 1-72.
- Carraro, K., Melo, B. A., Magagni, A., de Matos, F., Reis, C., Marques, M. F., Casaccia, M. (2016). Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*, 96:604-610.
- Chen, T.S., Chen, S., Chan, P., Chu, Y., Yang, H., Cheng, J. (2005). Mechanism of the hypoglycemic effect of stevioside, a glycoside of *Stevia rebaudiana*. *Planta Med.*, 71(2):108-113.
- Cummings, D.E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiology & Behavior*, 89:71-84.
- Davidson, T.L., Martin, A.A., Clark, K., Swithers, S.E. (2011). Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: Implication for the learned control of energy and body weight regulation. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 64(7):1430-1441.
- De Matos, F., Reis, C., Carraro, K., Melo, B., Magagnin, A., Marques, M., Casaccia, M. (2013). Saccharin and aspartamo, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 60:203-207.
- DOF. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. Estados Unidos Mexicanos. A los nueve días del mes de agosto de dos mil uno.
- Druce, M.R., Wren, A.M., Park, A.J., Milton, J.E., Patterson, M., Frost, G., Ghatei, A., Small, C., Bloom, S.R. (2005). Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *International Journal of Obesity*, 29:1130-1136.
- Dubois, G.E. (2012). Saccharin and cyclamate. En Mitchell, H. (Ed.), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, 4ta edición. EE.UU. New York: Blackwell Publishing, pp. 137-164.
- Ducroc, R., Guilmeau, S., Akasbi, K., Devaud, H., Buyse, M., Bado, A. (2005). Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes*, 54:348-354.
- Dupre, J., Ross, S.A., Watson, D., Brown, J.C. (1973). Stimulation of insulin secretion by gastric inhibitory polypeptide in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 37:826-828.
- EFSA. (2011). Sweeteners. European Food Safety Authority. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/sweeteners>
- ENVIGO. (2016a). Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable) Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.envigo.com/resources/data-sheets/2018s-datasheet-0915.pdf>
- ENVIGO (2016b). AIN93M Purified diet. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.envigo.com/resources/data-sheets/94048.pdf>
- ENVIGO. (2016c). Wistar Han® outbreed rat. Growth curve. Recuperado el 9 de febrero de 2016 de <http://www.envigo.com/resources/growth-curves/wis-jr.pdf>
- EU. (2011). La Comisión Europea, Comisión de Regulación (EU) No. 1131/2011 del 11 de noviembre de 2011 Modificación del Anexo II del Reglamento (EC) No. 1333/2008

del Parlamento y Consejo Europeo respecto a los glucósidos de esteviol. Oficial Journal of the European Union L 295/205, 12.11.2011.

- FAO. (2010). Steviol glycosides. Roma, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/monograph10/additive-442-m10.pdf>
- FDA. (2014). High-Intensity sweeteners. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397716.htmv>
- FDA. (2015a). Additional information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the United States. Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/ucm397725.htm>
- FDA. (2015b). Is Stevia a 'FDA approved' sweetener? Recuperado el 5 de enero de 2015 de <http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm214864.htm>
- Fernstrom, J., Munger, S., Sclafani, A., de Araujo, I., Roberts, A., Molinary, S. (2012). Mechanisms for sweetness. *The Journal of Nutrition*, 142:1134S–1141S.
- Foster-Schubert, K.E., Weigle, D.S., Callahan, H.S., Cummings, D.E. (2004). Lipids suppress human plasma ghrelin levels less effectively than do carbohydrates or proteins. En Endocrine Society 86th Annual Meeting, EE.UU. New Orleans, LA.
- Fox, S.I. (2011). *Fisiología humana*. 12a edición. México. México, D.F.: McGraw-Hill, pp. 106-108.
- Fu, Z., Gilbert, E.R., Liu, D. (2013). Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Currents Diabetes Review*, 9:25-53.
- Fujita, Y., Widemna, R.D., Speck, M., Asadi, A., King, D.S., Webber, T.D., Haneda, M., Kieffer, T.J. (2008). Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners *in vivo*. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 296:E-473-477.
- Gaisano, H.Y., MacDonald, P., Vranic, M. (2012). Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Frontiers in Physiology*, 3(349):1-12.
- Gardana, C., Scaglianti, M., Simonetti, P. (2010). Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra highperformance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217:1463-1470.
- Goldsmith, L.A., Merkel C.M. (2011). XXX Sucralose?. En O'Brien Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker, pp.185-209.
- González, E. (2007). Efecto biológico de la adición de fructosa, sacarosa, sucralosa o aspartamo al agua de beber mediante su suministro a ratas de laboratorio. Tesis Profesional. México. México, D.F.: Facultad de Química. UNAM.
- Gujarati, D.N. (2004). *Econometría*. EE.UU. New York: McGraw-Hill.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. México. Cuernavaca, Mor.: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Guzmán, M.B. (2012). Efecto de la ingesta crónica de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo animal en la ganancia de masa corporal a lo largo de 270 días. Tesis profesional. México. México, D.F.: Facultad de Química. UNAM.

- Habegger, K., Heppner, K.M., Geary, N., Bartness, T.J., DiMarchi, R., Tschöp, M.H. (2010). The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews. Endocrinology*, 6(12):689-697.
- Haber, B., Lipinski, G., Rathjen, S. (2012). Acesulfamo K. En Mitchell, H. (Ed.), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, 4ta edición. EE.UU. New York: Blackwell Publishing, pp. 65-83.
- Hotta, M., Ohwada, R., Akamizu, T., Shibasaki, T., Takano, K., Kangawa, K. (2009). Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: A pilot study. *Endocrine Journal*, 56 (9): 1119-1128.
- Hui, Y.S., Bin, W.L., Fong, C.F. (2014). Metabolism of hexoses. En Goran M.I., Tappy, L., Lê, K. (Eds.) *Dietary Sugars and Health*.
- Iizuka, K., Horikawa, Y. (2008). ChREBP: A glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocrine Journal*, 55(4):617-624.
- Jameel, F., Phang, M., Wood, L.G., Garg, M.L. (2014). Acute effects of feeding fructose, glucose and sucrose on blood lipid levels and systemic inflammation. *Lipids in Health and Disease*, 13(195):1-7.
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., Mantzoros, C.S. (2010). Narrative review: The role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. *Annals of International Medicine*, 152(2):93-100.
- Kim, J., Egan, J.M. (2008). The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*, 60(4):470-502.
- Klug, C., von Rymon-Lipinski, G.-W. (2011). Acesulfame Potassium. En O'Brien-Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 4th ed., Florida, Estados Unidos: CRC Press, pp. 13-30.
- Larson-Powers, N., Pangborn, R.M. (1978). Paired comparison and time-intensity measurements of the sensory properties of beverages and gelatins containing sucrose or synthetic sweeteners. *Journal of Food Science*, 43: 41-46.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*.132:1121-1132.
- Lipinski, G., Hanger, L. (2011). Acesulfamo K. En O'Brien-Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker, pp. 13-31
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., Scott, M.P. (2016). *Biología celular y molecular*. República Argentina. Buenos Aires: Médica Panamericana. 7ª edición. ISBN 950-06-1974-3.
- López-Oliva, E., Muñoz, E. (2014). SREBP-1c, ChREBP y LXR: Su influencia en el desarrollo de hígado graso no alcohólico. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 80(1):14-48.
- Ma, J., Chang, J., Checklin, H.L., Young, R.L., Jones, K.L., Horowitz, M., Rayner, C.K. (2010). Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104:803-806.
- Marathe, C., Rayner, C.K., Jones, K.L., Horowitz, M. (2013). Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: A review. *Peptides*, 44:75-86.
- Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104(38):15075-15080.

- Marroquí, L., Alonso-Magdalena, P., Merino, B., Fuentes, E., Nadal, A., Quesada, I. (2014). Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutrition Reserch Reviews*, 27:48-62.
- Martínez, C., González. E., García R., Salas, G., Fernando C.-Casas, Macías. L., Gracia I., Tovar, C., Durán-de-Bazúa C. (2010). Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartamo, and sucralose additives. *The Open Obesity Journal*. 2:116-124.
- Mayer, J.P., Zhnag, F., DiMarchi, R.D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers (Peptide Science)*, 88(5):687-713.
- Meeran, K., O’Shea, D., Edwards, C.M., Turton, M.D., Heath, M.M., Gunn,I., Abusnana, S., Rossi, M., Small, C.J., Goldstone, A.P., Taylor, G.M., Sunter, D., Steere, J., Choi, S.J., Ghatei, M.A., Bloom, S.R.(1999) . Repeated intracerebroventricular administration of glucagon-like peptide-1-(7-36) amide or exendin-(9-39) alters body weight in the rat. *Endocrinology*, 140:244–250.
- Melis, M.S. (1992). Stevioside effect on renal function of normal and hypertensive rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(3):213-217.
- Melis, M.S. (1995). Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 47(3):129-134.
- Melis, M.S. (1996). A crude extract of *Stevia rebaudiana* increases the renal plasma flow of normal and hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medizal and Biological Research*, 29(5):669-675.
- Melis, MS. (1999a). Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2):157-161.
- Melis, M.S. (1999b). Effect of crude extract of *Stevia rebaudiana* on renal water and electrolytes excretion. *Phytomedicine*, 6(4):247-250.
- Melis, M.S., Rocha, S.T., Augusto, A. (2009). Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats. *Brazilian Journal of Biology*, 69(2):371-374.
- Molinary, S.V., Quinlan, M.E. (2011). XXX Sucralose?. En O’Brien-Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker, pp.130-145.
- Mulet, T., Picó, C., Oliver, P., Palou, A. (2003). Blood leptin homeostasis: sex-associated differences in circulating leptin levels in rats are independent of tissue leptin expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35:104-110.
- Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., Casanueva, F.F.,D’Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P.A., Cowley, M., Cummings, D.E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S.L., Diéguez, C., Granata, R., Grill, H.J., Grove, K., Habegger, K.M., Heppner, K., Heiman, M.L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J.A., Kirchner, H., Kornbonits, M., Laferrèrere, B., LeRoux, C.W., Lopez, M., Morin, S., Nakazato,M., Nass, R., Pérez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Schwartz, T.W. Seeley, R.J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M.O., van der Lely, A.J., van der Ploeg, L.H.T., Zigman, J.M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R.G., Horvath, T., Tschöp, M.H. (2015). Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4:437-460.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., Münzberg, H. (2008). Mechanism of leptin action and leptin resistance. *The Annual Review of Physiology*, 70:537-556.
- Nagaya, N., Moriya, J., Yasumura, Y., Uematsu, M., Ono, F., Shimizu, W., Ueno, K., Kitakaze, M., Miyatake, K., Kangawa, K. (2004). Effects of ghrelin administration on left

- ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 110:3674-3679.
- Nelson, D., Cox, M. (2009). Leningher. Principios de bioquímica. 5ª edición. Ediciones Omega. Pp. 527-569; 805-851.
 - Nyberg, J., Anderson, M.F., Meister, B., Alborn, A.M., Strom, A.K., Brederlau, A., Illerskog, A.C., Nilsson, O., Kieffer, T.J., Hietala, M.A., Ricksten, A., Eriksson, P.S. (2005). Glucose-dependent insulintropic polypeptide is expressed in adult hippocampus and induces progenitor cell proliferation. *Journal of Neuroscience*, 25:1816-1825.
 - O'Donnell, K. (2012). Aspartamo and neotame. En Mitchell, H. (Ed.), *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, 4ta edición. EE.UU. New York: Blackwell Publishing, pp. 86-95.
 - Okumura, H., Nagaya, N., Enomoto, M., Nakagawa, E., Oya, H., Kangawa, K. (2002). Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39:779-783.
 - Olivares, J.A., Arellano, A. (2008). Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1):9-18.
 - Oliveira-Filho, R.M., Uehara, O.A., Minetti, C.A.S.A., Valle, L.B.S. (1989). Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni in rats: Endocrine effects. *General Pharmacology: The Vascular System*, 20(2):187-191.
 - Oswal, A., Yeo, G. (2010). Leptin and the control of body weight: A review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity*, 18:221-229.
 - Overduin, J., Figlewicz, D.P., Bennett-Jay, J., Kittleson, S., Cummings, D.E. (2012). Ghrelin increases the motivation to eat, but does not alter food palatability. *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303:R259-R269.
 - Overduin, J., Frayo, S., Grill, J.H., Kaplan, J.M., Cummings, D.E. (2005). Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology*, 146(2):845-850.
 - Palmnäs, M.S.A., Cowan, T.E., Bomhof, M.R., Su, J., Reimer, R.A., Vogel, H.J., Hittel, D.S., Shearer, J. (2014). Low-dose aspartamo consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLOS ONE*, 9(10):e109481.
 - Planas, G.M., Kuc, J. (1968). Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science*, 162(3857):1007.
 - Poulsen, S.B., Fenton, R.A., Rieg, T. (2015). Sodium-glucose cotransport. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 24(5):463-469.
 - Priego, T., Sánchez, J., Picó, C., Palou, A. (2009). Sex-associate differences in the leptin and ghrelin systems related with the induction of hyperphagia under high-fat diet exposure in rats. *Hormones and Behavior*, 55:33-40.
 - Raghov, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E., Elam, M.E. (2007). SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(2):65-73.
 - Ramírez-Gómez, M.M. y Orozco-Sánchez, N.E. (2011). Confitería. De lo artesanal a la tecnología. México. Aguascalientes, Ags.: Universidad Autónoma de Aguascalientes. Primera edición, pp. 100-120.
 - Reed, J.A., Benoit, S.C., Pfluger, P.T., Tschop, M.H., D'Alessio, D.A., Seeley, R.J. (2008). Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose

- intolerance. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 294:E752-E760.
- Reid, A.E., Chauhan, B.F., Rabbani, R., Lys, J., Copstein, L., Mann, A., Abou-Setta, A.M., Fiander, M., MacKay, D.S., McGavock, J., Wicklow, B., Zarychanski, R., Azad, M.B., (2016). Early exposure to nonnutritive sweeteners and long-term metabolic health: A systematic review. *Pediatrics*, 137(3). e20153603.
 - Reeves, P.G., Nielsen, F.H., Fahey, G.C. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*, 123(11):1939-1951.
 - Renner, S., Blutke, A., Streckel, E., Wanke, R., Wolf, E. (2016). Incretin actions and consequences of incretin-based therapies: lessons from complementary animal models. *Journal of Pathology*, 238:345-358.
 - Reyes, C.A., Pérez, J.M. (2010). Efecto de la ingesta crónica de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo animal en la ganancia de masa corporal. México. México, D.F.; Tesis profesional. Facultad de Química. UNAM.
 - Rutledge, A., Adeli, K. (2007). Fructose and the metabolic syndrome: pathophysiology and molecular mechanisms. *Nutrition Reviews*, 65(6):S13-S16.
 - Saada, H.N., Mekky, N.H., Eldawy, H.A., Abdelaal, A.F. (2013). Biological effect of sucralose in diabetic rats. *Food and Nutrition Sciences*, 4:82-89.
 - Schmidt, W.E., Siegel, E.G., Creutzfeldt, W. (1985). Glucagon-like peptide-1 but not glucagon-like peptide-2 stimulates insulin release from isolated rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 28:704-707.
 - Soffritti, M., Belpoggi, F., Esposti, D., Lambertini, L., Tibaldi, E., Rigano, A. (2006). First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. *Environmental Health Perspectives*, 114(3):379-385.
 - Soffritti, M., Belpoggi, F., Manservigi, M., Tibaldi, E., Lauriola, M., Falcioni, L., Bua, L. (2010). Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male swiss mice. *American Journal of Industrial Medicine*, 53(12):1197-1206.
 - Soffritti, M., Padovani, M., Tibaldi, E., Falcioni, L., Manservigi, F., Lauriola, M., Bua, L., Manservigi, M., Belpoggi, F. (2016). Sucralose administered in feed, beginning prenatally through lifespan, induces hematopoietic neoplasias in male swiss mice. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 22(1):7-17.
 - Spencer, S.J., Xu, L., Clarke, M.A., Lemus, M., Reichenbach, A., Geenen, B., Kozicz, T., Andrews, Z.B. (2012). Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biological Psychiatry*, 72:457-465.
 - Stanhope, K.L., Bremer, A. A., Medici, V., Nakajima, K., Ito, Y., Nakano, T., Chen, G., Fong, T. H., Lee, V., Menorca, R. I., Kein, N. L., Havel, P.J. (2011). Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-b in young men and women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96(10):E1596-E1605.
 - Steinert, R.E., Frey, F., Töpner, A., Drewe, J., Beglinger, C. (2011). Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *British Journal of Nutrition*, 105:1320-1328.
 - Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Elinav,

- E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, 514(7521):181-186.
- Swithers, S.E., Baker, C.R., Davidson, T.L. (2009). General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*. 123(4):772-780.
 - Swithers, S.E., Sample, C.H., Davidson, T.L. (2013). Adverse effects of high-intensity sweeteners on energy intake and weight control in male and obesity-prone female rats. *Behavioral Neuroscience*. 127(2):262-274.
 - Szayna, M., Doyle, M.E., Betkey, J.A., Holloway, H.W., Spencer, R.G., Greig, N.H., Egan, J.M. (2000). Exendin-4 decelerates food intake, weight gain, and fat deposition in Zucker rats. *Endocrinology*, 141:1936-1941.
 - Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Goke, R., Fink-Jensen, A., Jessop, D.S., Moller, M., Sheikh, S.P. (1996). Central administration of GLP-1-(7-36) amide inhibits food and water intake in rats. *American Journal of Physiology*, 271:R848-R856.
 - Tappy, L., Le, K., Tran, C., Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. *Nutrition*, 26:1044-1049.
 - Thorens, B. (2001). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection. *Molecular Membrane Biology*, 18(4):265-273.
 - Thorens, B. (2015). GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58:221-232.
 - Tolle, V., Bassant, M.H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J., Blue-Pajot, M.T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143:1353-1361.
 - Tsubone, T., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., Yoshimatsu, H. (2005). Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regulatory Peptides*, 130:97-103.
 - Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J., Bloom, S.R. (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature*, 379:69-72.
 - Ugleholdt, R., Poulsen, M.L., Holst, P.J., Irminger, J.C., Orskov, C., Pedersen, J., Rosenkilde, M.M., Zhu, X., Steiner, D.F., Holst, J.J. (2006). Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:11050-11057.
 - Valdés-Martínez, S.E. (2006). Hidratos de carbono. En Baduí, S., *Química de los Alimentos*, 4ta edición, México. México, D.F.: Pearson Education, pp 48-50.
 - Varzakas, T. (2012). Low Calorie Nonnutritive Sweeteners. En Varzakas T., Labropoulos, A., Anestis, S. Eds. *Sweeteners. Nutritional Aspects, Application and Production*. 1era edición. EE.UU. Boca Raton, FL; Editorial CRC Press, pp. 79-118.
 - Verman, T.S. (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 22(2):60-65
 - Vrhovac, I., Eror, D.B., Klessen, D., Burger, C., Breljak, D., Kraus, O., Radović, N., Jadrijević, S., Aleksie, I., Walles, T., Sauvant, C., Sabolić, I., Koepsell, H. (2015). Localizations of Na⁺-D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2 in human kidney and of SGLT1 in human small intestine, liver, lung, and heart. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 467:1881-1898.

- Walker, J.N., Ramracheya, R., Zhang, Q., Jhonson, P.R.V., BrAún, M., Rorsman, P. (2011). Regulation of glucagon secretion by glucose: paracrine, intrinsic or both? *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(Suppl.1):95-105.
- Walpole, R.E., Myers, R.H., Myers, S.L. (2012). Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. Novena edición. México. México, D.F.: Pearson Educación, pp. 507-550.
- Wang, Q., Lin, Y., Zhang, L., Wilson, Y., Oyston, L., Cotterell, J., Qi, Y., Khuong, T., Bakhshi, N., Planchenault, Y., Browman, D., Lau, M., Cole, T., Wong, A., Simpson, S., Cole, A., Penninger, J., Herzog, H. (2016). Sucralose promotes food intake through NPY and a neuronal fasting response. *Cell Metabolism*, 24(1):75-79.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S., Sul, H.S. (2015). Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(11):678-689.
- Weikel, J.C., Wichniak, A., Ising, M., Brunner, H., Friess, E., Held, K., Mathias, S., Schmid, D.A., Uhr, M., Steiger, A. (2003). Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 284:E407-E415.
- White, J.S., Osberger, T.F. (2011). Crystalline fructose. En O'Brien Nabors, L. (Ed.), *Alternative Sweeteners*. 3ra edición. EE.UU. New York: Editorial Marcel Dekker, pp. 367-390.
- Wilcox, G. (2005). Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26:19-39.
- Zhang, Y.H., An, T., Zhang, R. C., Zhou, Q., Huang, Y., Zhang, J. (2013). Very high fructose intake increases serum ldl-cholesterol and total cholesterol: A meta-analysis of controlled feeding trials. *The Journal of Nutrition*, 143:1391-1398.
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M., Serrano Ríos, M. 2005. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. *Rev. Esp. Cardiol.*, 58(12):1371-1376. DOI: 10.1016/S0300-8932(05)74065-3. Recuperado el 4 de enero del 2015 de <http://www.revespcardiol.org/es/una-nueva-definicion-mundial-del/articulo/13082533/>

ANEXO RESULTADOS ESTADISTICOS

ANEXO 1 Verificación de la normalidad, homocedasticidad y presencia de datos atípicos

Determinación de valores atípicos. Ganancia de masa corporal (g)

Tabla A.4.1.1 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Aspartame. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	232,8	-9,00311
6	315,5	-0,918884
3	320,0	-0,478993
1	324,9	0,0
8	324,9	0,0
2	330,7	0,566971
7	332,9	0,782029
5	360,6	3,4898

Tabla A.4.1.2 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Aspartame. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	148.3	-1.02409
7	148.6	-1.01175
6	153.4	-0.814335
1	169.1	-0.168625
5	177.3	0.168625
2	184.3	0.456521
3	186.2	0.534665
4	194.9	0.892479

Tabla A.4.1.3 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Acesulfame K. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	309,1	-1,08474
2	312,475	-0,999795
4	333,6	-0,468123
3	352,0	-0,00503358
6	352,4	0,00503358
5	378,6	0,664433
1	379,4	0,684567
7	384,8	0,820474

Tabla A.4.1.4 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Acesulfame K. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
3	164,85	-0,725342
7	165,6	-0,623658
8	167,7	-0,338945
5	169,7	-0,0677889
6	170,7	0,0677889
1	176,2	0,813467
4	179,4	1,24732
2	212,0	5,66716

Tabla A.4.1.5 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Mezcla de aspartame: acesulfame de K. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	327,05	-0,689114
8	327,7	-0,659886
6	329,6	-0,574449
7	336,5	-0,264179
5	348,25	0,264179
3	365,8	1,05334

1	394,45	2,34164
2	401,65	2,6654

Tabla A.4.1.6 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas hembra

		<i>Modificados</i>
<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	138,8	-1,01724
6	142,7	-0,854227
5	160,3	-0,118599
2	162,275	-0,03605
8	164,0	0,03605
1	175,65	0,522986
3	182,9	0,826014
4	200,9	1,57836

Tabla A.4.1.7 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sacarina. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	297,0	-1,5975
5	322,4	-0,846083
2	334,5	-0,488125
8	335,8	-0,449667
7	366,2	0,449667
4	372,1	0,624208
6	375,5	0,724792
3	460,0	3,22458

Tabla A.4.1.8 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sacarina. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
6	143,0	-1,26413
8	153,5	-0,798195
7	158,3	-0,585195
4	163,25	-0,365539
1	179,725	0,365539
5	183,3	0,52418
3	188,7	0,763805
2	203,7	1,42943

Tabla A.4.1.9 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Stevia. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	317,8	-0,735182
6	320,4	-0,613818
8	327,8	-0,2684
7	331,9	-0,077019
1	335,2	0,077019
5	380,9	2,21021
4	381,5	2,23822
2	428,7	4,44143

Tabla A.4.1.10 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Stevia. Ratas hembra

4	142,1	-2,92098
5	159,4	-0,99224
6	165,1	-0,35676
8	166,6	-0,189529
7	170,0	0,189529
2	170,8	0,278719
3	179,3	1,22636
1	192,6	2,70915

Tabla A.4.1.11 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sucralosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
2	313,5	-1,06092
1	317,25	-0,974149
8	334,8	-0,568061
5	352,4	-0,160816

6	366,3	0,160816
7	385,7	0,609711
4	391,3	0,739289
3	399,5	0,929028

Tabla A.4.1.12 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sucralosa. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	145,3	-1,0393
5	148,2	-0,866576
2	155,25	-0,446689
7	160,0	-0,163786
6	165,5	0,163786
1	170,85	0,482424
8	180,9	1,08099
3	204,45	2,48359

Tabla A.4.1.13 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Control. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	312,1	-1,0792
6	328,2	-0,330272
8	328,6	-0,311666
1	329,0	-0,293059
7	341,6	0,293059
4	357,2	1,01873
5	366,3	1,44203
3	379,8	2,07002

Tabla A.4.1.14 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Control .Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	18196,1	-1,48726
8	18872,1	-1,19589
5	20704,5	-0,406101
6	21447,4	-0,0858709
1	21845,8	0,0858709
2	22557,0	0,392373
4	23834,2	0,942899
3	24076,0	1,04712

Tabla A.4.1.15 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. AIN93M. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	262,2	-1,98476
5	317,9	-0,715517
1	328,1	-0,483088
3	343,3	-0,136723
8	355,3	0,136723
7	378,7	0,669943
4	379,1	0,679057
2	401,9	1,1986

Tabla A.4.1.16 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. AIN93M. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	136,8	-1,51914
3	162,9	-0,726151
2	171,05	-0,47853
6	174,5	-0,373709
4	199,1	0,373709
5	207,3	0,622849
7	213,1	0,79907
1	219,525	0,99428

Tabla A.4.1.17 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Glucosa. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
------	-------	-------------

1	293,9	-0,895991
2	304,45	-0,676193
5	318,6	-0,381392
8	332,8	-0,0855495
4	341,012	0,0855495
6	369,2	0,672807
7	370,1	0,691558
3	385,25	1,00719

Tabla A.4.1.18 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Glucosa. Ratasa hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	150,5	-1,00939
1	150,7	-0,990524
2	157,4	-0,358476
7	160,5	-0,066035
6	161,9	0,066035
8	161,9	0,066035
5	184,2	2,16972
4	192,3	2,93384

Tabla A.4.1.19 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Fructosa. Ratasa macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	301,3	-0,711318
2	303,8	-0,637682
8	313,2	-0,360813
3	325,2	-0,00736354
1	325,7	0,00736354
6	352,3	0,790844
4	353,0	0,811462
5	358,8	0,982296

Tabla A.4.1.20 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Fructosa. ratasa hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	150,2	-1,16164
5	158,3	-0,769994
6	161,2	-0,629775
1	164,475	-0,471425
2	183,975	0,471425
7	184,1	0,477469
4	189,1	0,719225
8	190,4	0,782082

Tabla A.4.1.21 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sacarosa. Ratasa macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	264,7	-1,90229
3	284,9	-1,11244
5	306,6	-0,263935
2	311,8	-0,0606072
6	314,9	0,0606072
8	324,9	0,451622
4	336,3	0,897378
7	387,1	2,88373

Tabla A.4.1.22 Determinación de valores atípicos para la ganancia de masa corporal. Sacarosa. Ratasa hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	158,6	-2,22762
5	160,8	-2,03237
8	181,1	-0,23075
7	181,1	-0,23075
3	186,3	0,23075
4	189,9	0,55025

2	192,7	0,79875
6	215,2	2,79562

Determinación de valores atípicos Alimento Ingerido (g)

Tabla A.4.1.23 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Aspartame. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	1911,3	-1,21812
3	1990,4	-0,804855
7	2047,6	-0,506006
6	2052,1	-0,482495
8	2236,8	0,482495
1	2248,6	0,544145
2	2355,1	1,10057
5	2421,9	1,44957

Tabla A.4.1.24 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Aspartame. Ratas. hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	1395,9	-1,64363
6	1532,4	-0,867985
1	1627,4	-0,328158
8	1674,0	-0,0633587
4	1696,3	0,0633587
5	1790,2	0,596935
3	1817,5	0,752065
2	1882,8	1,12312

Tabla A.4.1.25 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Acesulfame K. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	2087,0	-2,4686
4	2184,9	-1,60315
2	2195,95	-1,50547
5	2345,6	-0,182548
6	2386,9	0,182548
1	2390,25	0,212163
3	2439,3	0,64577
7	2445,8	0,70323

Tabla A.4.1.26 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Acesulfame K. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
5	1542,2	-1,37456
3	1644,7	-0,822909
7	1746,2	-0,276635
8	1787,0	-0,0570493
4	1808,2	0,0570493
6	1905,9	0,582871
1	1939,95	0,766129
2	1953,6	0,839593

Tabla A.4.1.27 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	2065,1	-1,10314
7	2138,9	-0,679948
4	2140,8	-0,669052
6	2228,5	-0,166152
1	2286,45	0,166152
2	2354,3	0,555226
5	2399,1	0,812124
3	2439,6	1,04436

Tabla A.4.1.28 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	1446,3	-1,73747
5	1547,0	-0,841401
2	1585,28	-0,500814
7	1591,0	-0,449871
1	1692,11	0,449871
8	1698,6	0,507599
3	1813,1	1,52647
4	1955,0	2,78915

Tabla A.4.1.29 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sacarina. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
5	2132,8	-1,05576
1	2214,25	-0,534399
8	2232,9	-0,415022
2	2237,97	-0,382537
6	2357,5	0,382537
7	2425,0	0,814601
4	2439,1	0,904854
3	2884,6	3,75648

Tabla A.4.1.30 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sacarina. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	1474,8	-1,74158
4	1537,0	-1,28728
8	1575,9	-1,00317
7	1706,7	-0,0478395
3	1719,8	0,0478395
5	1757,69	0,32456
1	1760,6	0,345832
2	1928,2	1,56994

Tabla A.4.1.31 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Stevia. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	2177,4	-1,57582
6	2245,7	-1,15769
1	2299,65	-0,827399
3	2393,5	-0,252842
4	2476,1	0,252842
8	2504,5	0,426709
5	2520,0	0,521601
2	2734,3	1,83356

Tabla A.4.1.32 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Stevia. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	1571,2	-2,12978
2	1611,9	-1,70151
3	1716,1	-0,605051
7	1770,9	-0,0284111
6	1776,3	0,0284111
8	1780,0	0,0673448
1	1844,3	0,743949
5	1910,7	1,44265

Tabla A.4.1.33 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sucralosa. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	2074,2	-2,56307
2	2172,11	-1,49766
1	2256,93	-0,574801
5	2309,4	-0,00380843
4	2310,1	0,00380843
6	2343,5	0,367241
7	2380,9	0,774199
3	2646,0	3,65881

Tabla A.4.1.34 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sucralosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	1379,2	-3,17758
2	1632,8	-0,730467
6	1644,4	-0,618533
4	1705,4	-0,0299134
5	1711,6	0,0299134
8	1744,5	0,347382
1	1794,75	0,832269
3	1936,65	2,20153

Tabla A.4.1.35 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Control. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
2	2278,85	-4,21079
6	2356,8	-1,88949
7	2399,3	-0,623875
3	2410,9	-0,278436
4	2429,6	0,278436
5	2436,4	0,480935
8	2444,6	0,725125
1	2498,93	2,34288

Tabla A.4.1.36 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Control. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	1399,7	-1,48726
8	1451,7	-1,19589
5	1592,65	-0,406101
6	1649,8	-0,0858709
1	1680,45	0,0858709
2	1735,15	0,392373
4	1833,4	0,942899
3	1852,0	1,04712

Tabla A.4.1.37 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. AIN93M. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
6	1887,0	-1,36329
3	2011,9	-0,496796
1	2029,4	-0,375389
5	2029,4	-0,375389
8	2137,62	0,375389
2	2206,35	0,852204
4	2236,4	1,06068
7	2272,06	1,30807

Tabla A.4.1.38 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. AIN93M. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	1438,3	-1,83435
3	1534,05	-0,69794
5	1538,0	-0,65106
4	1586,05	-0,0807798
2	1599,66	0,0807798
6	1607,6	0,174986
7	1756,1	1,93745
1	1824,45	2,74866

Tabla A.4.1.39 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Glucosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	1078,45	-1,05236
8	1204,3	-0,685911
4	1212,14	-0,663089
5	1340,9	-0,288159
2	1538,83	0,288159
6	1573,7	0,389708

7	1705,5	0,773483
3	1781,65	0,995216

Tabla A.4.1.40 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Glucosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	625,0	-1,00939
7	670,2	-0,654061
1	704,6	-0,383632
3	749,6	-0,029873
4	757,2	0,029873
6	841,8	0,694939
5	933,8	1,41818
2	940,1	1,46771

Tabla A.4.1.41 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Fructosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	1231,5	-2,2677
7	1299,6	-1,78654
1	1470,58	-0,578496
6	1543,4	-0,0639437
3	1561,5	0,0639437
2	1622,85	0,497418
8	1661,5	0,770504
5	1680,3	0,903337

Tabla A.4.1.42 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Fructosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	881,95	-1,70414
5	1001,7	-0,788777
3	1031,6	-0,560223
7	1097,68	-0,0551127
4	1112,1	0,0551127
6	1146,8	0,320357
2	1219,13	0,873204
8	1375,2	2,06623

Tabla A.4.1.43 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sacarosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	1046,44	-3,92382
5	1160,5	-2,66262
3	1356,65	-0,493712
2	1360,53	-0,450865
1	1442,08	0,450865
6	1457,5	0,621425
7	1467,1	0,727575
4	1621,16	2,4311

Tabla A.4.1.44 Determinación de valores atípicos para el alimento ingerido. Sacarosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	603,9	-1,04658
5	645,6	-0,745595
2	695,4	-0,38615
6	720,5	-0,204984
1	777,3	0,204984
7	832,5	0,603405
4	866,1	0,845922
8	1104,05	2,56339

Determinación de valores atípicos. Bebida consumida (mL)

Tabla A.4.1.45 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida Acesulfame K. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
5	3712,0	-0,958565
6	3864,0	-0,822411

1	4431,0	-0,31452
3	4559,0	-0,199864
2	5005,25	0,199864
7	5370,0	0,526589
4	6217,0	1,28529
8	6715,0	1,73137

Tabla A.4.1.46 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida Acesulfame K. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	4527,0	-1,69283
3	5445,0	-0,67547
7	5951,0	-0,114702
5	5973,0	-0,0903212
6	6136,0	0,0903212
1	6662,25	0,67353
2	6938,0	0,979126
8	8824,0	3,06926

Tabla A.4.1.47 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida Aspartame. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	3097,0	-1,99862
2	3268,0	-1,52592
6	3613,0	-0,572219
5	3808,0	-0,0331721
7	3832,0	0,0331721
4	3986,0	0,458881
8	4101,0	0,776781
1	4115,0	0,815482

Tabla A.4.1.48 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Aspartame. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	2585,0	-0,81569
3	2606,0	-0,801332
7	3023,0	-0,516216
6	3659,0	-0,0813639
4	3897,0	0,0813639
8	4655,0	0,599632
2	4874,0	0,749368
5	7116,0	2,28229

Tabla A.4.1.49 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Mezcla de aspartame: acesulfame K Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	4116,0	-0,969274
5	4189,0	-0,894557
2	4474,0	-0,602854
8	5045,0	-0,0184234
3	5081,0	0,0184234
1	5375,5	0,31985
6	5792,0	0,746146
7	6651,0	1,62535

Tabla A.4.1.50 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
2	4627,5	-0,744644
8	4674,0	-0,716251
4	5199,0	-0,395678
3	5615,0	-0,141663
6	6079,0	0,141663
1	6883,25	0,632749
7	9578,0	2,2782
5	11693,0	3,56965

Tabla A.4.1.51 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sacarina. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	4217,0	-0,759713

2	4246,0	-0,690102
6	4259,0	-0,658898
7	4479,0	-0,130819
1	4588,0	0,130819
4	4746,0	0,510076
3	6393,0	4,46346
5	6565,0	4,87632

Tabla A.4.1.52 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sacarina. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	3725,0	-0,856408
4	3912,5	-0,552214
5	3966,5	-0,464606
3	4163,0	-0,14581
1	4342,75	0,14581
6	4744,0	0,796786
2	5316,0	1,72478
7	7322,0	4,97925

Tabla A.4.1.53 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Stevia. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	4122,0	-1,5425
5	4445,0	-0,836293
1	4600,0	-0,497403
3	4690,0	-0,300628
8	4965,0	0,300628
4	5062,0	0,512707
2	6153,0	2,89805
6	6744,0	4,19021

Tabla A.4.1.54 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Stevia. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
6	3676,0	-0,75902
2	3855,0	-0,640361
3	4378,0	-0,293664
7	4525,0	-0,196218
4	5117,0	0,196218
1	5890,0	0,708639
5	6844,0	1,34105
8	7611,0	1,84949

Tabla A.4.1.55 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sucralosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	3386,0	-0,866285
2	3630,75	-0,626032
6	3646,0	-0,611062
8	3928,0	-0,334244
3	4609,0	0,334244
7	5005,0	0,722968
5	5323,0	1,03512
1	5433,25	1,14335

Tabla A.4.1.56 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sucralosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	2507,0	-1,65155
8	3287,0	-0,714159
6	3353,0	-0,634841
1	3803,5	-0,0934385
2	3959,0	0,0934385
3	4324,0	0,532089
5	5075,0	1,43463
4	5400,0	1,82521

Tabla A.4.1.57 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Control. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
-------------	--------------	--------------------

2	3280,0	-1,1306
4	3352,0	-1,05554
3	3642,0	-0,753209
6	4232,0	-0,138132
5	4497,0	0,138132
7	4775,0	0,427948
1	4936,0	0,595791
8	5817,0	1,51424

Tabla A.4.1.58 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Control. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
1	2653,5	-0,903311
2	2722,0	-0,807154
4	2911,0	-0,541846
8	3182,0	-0,161431
5	3412,0	0,161431
7	3433,0	0,190909
6	4088,0	1,11036
3	4252,0	1,34058

Tabla A.4.1.59 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. AIN93M. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	3112,0	-0,685213
3	3139,0	-0,663787
1	3425,0	-0,436838
4	3838,0	-0,10911
8	4113,0	0,10911
7	5319,0	1,06611
5	6172,0	1,74299
6	6565,0	2,05484

Tabla A.4.1.60 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. AIN93M. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
3	2497,5	-0,709618
2	2555,5	-0,639382
4	2709,0	-0,453501
8	3050,0	-0,0405669
5	3117,0	0,0405669
1	4049,0	1,16917
6	4710,0	1,96961
7	7067,0	4,82383

Tabla A.4.1.61 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Glucosa. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	7199,0	-1,2349
7	8195,0	-0,735653
3	8439,0	-0,613347
4	9580,25	-0,0412908
6	9745,0	0,0412908
5	10377,0	0,358083
8	12575,0	1,45984
1	12938,0	1,6418

Tabla A.4.1.62 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Glucosa. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
1	7860,0	-1,2433
5	7929,0	-1,19055
2	8853,0	-0,484134
3	9331,0	-0,118692
7	9641,5	0,118692
8	10287,0	0,612191
6	10450,0	0,736809
4	11091,0	1,22687

Tabla A.4.1.63 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Fructosa. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	6012,0	-0,741022
8	6083,0	-0,686103
3	6113,0	-0,662897
5	6480,0	-0,379019
7	7460,0	0,379019
6	7586,0	0,476482
1	8344,0	1,0628
4	12362,0	4,17076

Tabla A.4.1.64 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Fructosa. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	4260,0	-3,04364
2	5781,0	-1,00202
3	6138,0	-0,522821
8	6370,0	-0,21141
4	6685,0	0,21141
5	6954,0	0,572486
7	7106,0	0,776514
1	8442,5	2,57048

Tabla A.4.1.65 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sacarosa. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
3	6995,5	-0,822193
1	7089,5	-0,786296
4	7095,5	-0,784005
5	8552,0	-0,227793
2	9745,0	0,227793
6	9873,0	0,276674
7	10628,0	0,564995
8	12080,0	1,11949

Tabla A.4.1.66 Determinación de valores atípicos para la bebida consumida. Sacarosa. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	6754,0	-3,92565
4	9239,0	-0,717745
7	9306,0	-0,631255
1	9592,0	-0,262055
5	9998,0	0,262055
2	10119,0	0,418255
3	10711,0	1,18247
6	13901,0	5,30047

Determinación de valores atípicos. Energía ingerida (kJ)

Tabla A.4.1.67 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Acesulfame K. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	27131,0	-2,4686
4	28403,7	-1,60315
2	28547,3	-1,50547
5	30492,8	-0,182548
6	31029,7	0,182548
1	31540,0	0,529522
3	31710,9	0,64577
7	31795,4	0,70323

Tabla A.4.1.68 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Acesulfame K. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
5	20048,6	-1,37456
3	21381,1	-0,822909
7	22700,6	-0,276635
8	23231,0	-0,0570493
4	23506,6	0,0570493
6	24776,7	0,582871
1	25219,3	0,766129

2	25396,8	0,839593
---	---------	----------

Tabla A.4.1.69 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Aspartame. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	25027,9	-1,19926
3	26015,8	-0,807602
7	26792,8	-0,499583
6	26841,3	-0,480333
8	29264,6	0,480333
1	29418,6	0,541398
2	30764,7	1,07502
5	31657,6	1,429

Tabla A.4.1.70 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Aspartame. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	18283,9	-1,64792
6	20087,3	-0,869372
1	21273,6	-0,357254
8	21973,3	-0,0551488
4	22228,8	0,0551488
5	23595,7	0,645236
3	23731,2	0,703764

Tabla A.4.1.71 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
8	28107,5	-1,23381
4	28859,4	-0,867269
7	29468,5	-0,570349
6	30209,0	-0,20932
1	31067,7	0,20932
2	31724,4	0,529458
5	32235,5	0,778651
3	32985,1	1,14404

Tabla A.4.1.72 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	20321,7	-1,96341
2	21765,5	-0,966041
5	23034,3	-0,0895615
7	23077,5	-0,0596846
8	23250,3	0,0596846
1	23718,3	0,382959
3	24772,3	1,11107
4	26078,0	2,01304

Tabla A.4.1.73 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sacarina. Ratas macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
5	27726,4	-1,05576
1	28785,3	-0,534399
8	29027,7	-0,415022
2	29093,7	-0,382537
6	30647,5	0,382537
7	31525,0	0,814601
4	31708,3	0,904854
3	37499,8	3,75648

Tabla A.4.1.74 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sacarina. Ratas hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
6	19172,4	-1,69733
4	19981,0	-1,24304
8	20486,7	-0,958922
7	22187,1	-0,00359288
3	22199,9	0,00359288
5	22849,9	0,368806
1	22887,8	0,390078

2	25066,6	1,61418
---	---------	---------

Tabla A.4.1.75 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Stevia. Ratras macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	28306,2	-1,57582
6	29194,1	-1,15769
1	29895,5	-0,827399
3	31115,5	-0,252842
4	32189,3	0,252842
8	32558,5	0,426709
5	32760,0	0,521601
2	35545,9	1,83356

Tabla A.4.1.76 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Stevia. Ratras hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
4	20425,6	-2,12978
2	20954,7	-1,70151
3	22309,3	-0,605051
7	23021,7	-0,0284111
6	23091,9	0,0284111
8	23140,0	0,0673448
1	23975,9	0,743949
5	24839,1	1,44265

Tabla A.4.1.77 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sucralosa. Ratras macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	28237,5	-1,84486
1	29340,0	-0,708055
8	29405,1	-0,640945
5	30022,2	-0,00469133
4	30031,3	0,00469133
6	30465,5	0,452378
7	30951,7	0,95368
3	34398,0	4,50702

Tabla A.4.1.78 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sucralosa. Ratras hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	17929,6	-3,17758
2	21226,4	-0,730467
6	21377,2	-0,618533
4	22170,2	-0,0299134
5	22250,8	0,0299134
8	22678,5	0,347382
1	23331,8	0,832269
3	25176,5	2,20153

Tabla A.4.1.79 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Control. Ratras macho

Fila	Valor	Valor-Z MAD
2	29625,0	-4,21079
6	30638,4	-1,88949
7	31190,9	-0,623875
3	31341,7	-0,278436
4	31584,8	0,278436
5	31673,2	0,480935
8	31779,8	0,725125
1	32486,0	2,34288

Tabla A.4.1.80 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Control. Ratras hembra

Fila	Valor	Valor-Z MAD
7	18196,1	-1,48726
8	18872,1	-1,19589
5	20704,5	-0,406101
6	21447,4	-0,0858709
1	21845,8	0,0858709
2	22557,0	0,392373
4	23834,2	0,942899
3	24076,0	1,04712

Tabla A.4.1.81 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. AIN93M. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
6	24531,0	-3,10051
5	26382,2	-1,67163
8	27789,1	-0,585732
3	28385,1	-0,125652
1	28710,7	0,125652
4	29073,2	0,405448
7	29536,8	0,763268
2	31084,0	1,95748

Tabla A.4.1.82 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. AIN93M. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	18697,9	-3,19157
6	20898,8	-1,05246
3	21632,2	-0,339692
5	21662,3	-0,31038
4	22301,0	0,31038
2	22522,0	0,525153
7	22829,3	0,823847
1	25785,9	3,69744

Tabla A.4.1.83 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Glucosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
4	31798,0	-2,62878
2	32058,0	-2,44459
5	34805,9	-0,497998
3	35335,9	-0,122577
1	35681,9	0,122577
7	35892,4	0,271655
8	36710,2	0,851002
6	36774,2	0,89629

Tabla A.4.1.84 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Glucosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
1	22319,8	-0,885338
5	22392,8	-0,862103
3	24684,6	-0,132814
7	24855,4	-0,0784671
8	25348,5	0,0784671
2	26632,0	0,486897
4	28413,3	1,05373
6	28439,8	1,06219

Tabla A.4.1.85 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Fructosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
7	29385,1	-1,99995
3	30534,5	-1,19442
2	31162,9	-0,753992
8	31784,3	-0,318556
5	32693,4	0,318556
6	32765,4	0,369068
1	33087,8	0,595008
4	36707,2	3,13152

Tabla A.4.1.86 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Fructosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
6	22040,9	-3,16389
3	23687,7	-1,68512
5	24665,2	-0,807306
2	25527,8	-0,0327205
1	25600,6	0,0327205
4	25650,0	0,0770525
7	26167,4	0,541694

8	28542,9	2,67486
---	---------	---------

Tabla A.4.1.87 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sacarosa. Ratas macho

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
3	28353,5	-1,39833
5	29405,1	-1,10649
1	30616,9	-0,770186
4	32955,1	-0,121297
8	33829,3	0,121297
2	34002,9	0,169478
6	35477,9	0,578814
7	36866,8	0,964258

Tabla A.4.1.88 Determinación de valores atípicos para la energía consumida. Sacarosa. Ratas hembra

<i>Fila</i>	<i>Valor</i>	<i>Valor-Z MAD</i>
8	6754,0	-3,92565
4	9239,0	-0,717745
7	9306,0	-0,631255
1	9592,0	-0,262055
5	9998,0	0,262055
2	10119,0	0,418255
3	10711,0	1,18247
6	13901,0	5,30047

Pruebas de normalidad. Incremento de masa (g)

Tabla A.4.1.89 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,898168	0,282368

Tabla A.4.1.90 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Acesulfame K. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,913863	0,43991

Tabla A.4.1.91 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Aspartame. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,959302	0,82301

Tabla A.4.1.92 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Aspartame hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,967489	0,875439

Tabla A.4.1.93 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Mezcla machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,831609	0,0840811

Tabla A.4.1.94 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Mezcla hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,967489	0,875439

Tabla A.4.1.95 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sacarina machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,915481	0,452075

Tabla A.4.1.96 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sacarina hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,969501	0,891422

Tabla A.4.1.97 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Stevia machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,810981	0,0526596

Tabla A.4.1.98 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Stevia hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>

0,911838	0,424971
----------	----------

Tabla A.4.1.99 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sucralosa machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,92226	0,453387

Tabla A.4.1.100 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sucralosa hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,922868	0,458473

Tabla A.4.1.101 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Control machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,962477	0,832461

Tabla A.4.1.102 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Control hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,850727	0,127917

Tabla A.4.1.103 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. AIN93M machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,951742	0,730613

Tabla A.4.1.104 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. AIN93M. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,937806	0,593752

Tabla A.4.1.105 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Glucosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,947099	0,684747

Tabla A.4.1.106 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Glucosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,811767	0,0688634

Tabla A.4.1.107 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Fructosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,877113	0,179887

Tabla A.4.1.108 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Fructosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,890593	0,240856

Tabla A.4.1.109 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sacarosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,877818	0,255747

Tabla A.4.1.110 Prueba de Shapiro-Wilk. Ganancia de masa. Sacarosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,847755	0,119965

Pruebas de normalidad. Alimento consumido

Tabla A.4.1.111 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,877898	0,183024

Tabla A.4.1.112 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Acesulfame K. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,936627	0,582477

Tabla A.4.1.113 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Aspartame. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,939681	0,611861

Tabla A.4.1.114 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Aspartame. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,967489	0,875439

Tabla A.4.1.115 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Mezcla de aspartame:acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,948735	0,700939

Tabla A.4.1.116 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Mezcla de aspartame. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,960489	0,814401

Tabla A.4.1.117 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sacarina. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,907985	0,397468

Tabla A.4.1.118 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sacarina. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,952296	0,73605

Tabla A.4.1.119 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Stevia. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,964583	0,851019

Tabla A.4.1.120 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Stevia. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,949014	0,703692

Tabla A.4.1.121 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sucralosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,913313	0,435817

Tabla A.4.1.122 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sucralosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,899042	0,338395

Tabla A.4.1.123 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Control. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,976256	0,938825

Tabla A.4.1.124 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Control. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,944745	0,661469

Tabla A.4.1.125 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. AIN93M. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,938849	0,603808

Tabla A.4.1.126 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. AIN93M. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,925443	0,480431

Tabla A.4.1.127 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Glucosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,939839	0,61339

Tabla A.4.1.128 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Glucosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,926548	0,490045

Tabla A.4.1.129 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Fructosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,893061	0,253776

Tabla A.4.1.130 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Fructosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,980564	0,961731

Tabla A.4.1.131 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sacarosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,94408	0,692384

Tabla A.4.1.132 Prueba de Shapiro-Wilk. Alimento consumido. Sacarosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,964535	0,863167

Pruebas de normalidad. Bebida ingerida (mL)

Tabla A.4.1.133 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,943851	0,652652

Tabla A.4.1.134 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Acesulfame K. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,948162	0,728297

Tabla A.4.1.135 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Aspartame machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,938924	0,604524

Tabla A.4.1.136 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Aspartame. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,887908	0,227447

Tabla A.4.1.137 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,940324	0,618106

Tabla A.4.1.138 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. ratas hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,838112	0,0971449

Tabla A.4.1.139 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Sacarina. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,881255	0,271775

Tabla A.4.1.140 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Sacarina. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,912304	0,428378

Tabla A.4.1.141 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Stevia. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,877231	0,180355

Tabla A.4.1.142 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Stevia. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,922818	0,458055

Tabla A.4.1.143 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Sucralosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,889917	0,237421

Tabla A.4.1.144 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Sucralosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,971937	0,90962

Tabla A.4.1.145 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Control. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>

0,947413	0,687854
----------	----------

Tabla A.4.1.146 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Control. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,917631	0,415836

Tabla A.4.1.147 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. AIN93M. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,872351	0,161891

Tabla A.4.1.148 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. AIN93M. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,854209	0,13784

Tabla A.4.1.149 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida Glucosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,933172	0,549914

Tabla A.4.1.150 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida Glucosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,947916	0,692833

Tabla A.4.1.151 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida Fructosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,858291	0,150339

Tabla A.4.1.152 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida Fructosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,961149	0,820452

Tabla A.4.1.153 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida. Sacarosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,905273	0,326508

Tabla A.4.1.154 Prueba de Shapiro-Wilk. Bebida ingerida Sacarosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,933974	0,624284

Pruebas de normalidad. Energía consumida (kJ)

Tabla A.4.1.155 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Acesulfame K. Ratas machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,864376	0,135378

Tabla A.4.1.156 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Acesulfame K. Ratas hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,936627	0,582477

Tabla A.4.1.157 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Aspartame. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,899945	0,292924

Tabla A.4.1.158 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Aspartame. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,96409	0,846734

Tabla A.4.1.159 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Mezcla de aspartame: acesulfame K. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,971552	0,906833

Tabla A.4.1.160 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Mezcla de aspartame: acesulfameK. Ratas hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,973089	0,917737

Tabla A.4.1.161 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sacarina. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,907985	0,397468

Tabla A.4.1.162 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sacarina. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,953748	0,75026

Tabla A.4.1.163 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Stevia. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,964583	0,851019

Tabla A.4.1.164 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Stevia. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,949014	0,703692

Tabla A.4.1.165 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sucralosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,96206	0,844386

Tabla A.4.1.166 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sucralosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,930119	0,521875

Tabla A.4.1.167 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Control. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,947413	0,687854

Tabla A.4.1.168 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Control. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,944745	0,661469

Tabla A.4.1.169 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. AIN93M. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,964205	0,847732

Tabla A.4.1.170 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. AIN93M. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,954013	0,787368

Tabla A.4.1.171 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Glucosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,839568	0,100315

Tabla A.4.1.172 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Glucosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,91286	0,379442

Tabla A.4.1.173 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Fructosa. Ratas macho

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,923143	0,460788

Tabla A.4.1.174 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Fructosa. Ratas hembra

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,952692	0,739929

Tabla A.4.1.175 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sacarosa machos

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,957526	0,786661

Tabla A.4.1.176 Prueba de Shapiro-Wilk. Energía consumida. Sacarosa hembras

<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0,963591	0,856093

Pruebas de homocedasticidad

Tabla A.4.177. Verificación de la varianza. Test de Levene. Incremento en masa. Ratas macho

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,12977	0,353628

Tabla A.4.178. Verificación de la varianza. Test de Levene. Incremento en masa. Ratas hembra

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,77533	0,0819725

Tabla A.4.179. Verificación de la varianza. Test de Levene. Alimento consumido. Ratas macho

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,17025	0,32474

Tabla A.4.180. Verificación de la varianza. Test de Levene. Alimento consumido. Ratas hembra

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,78956	0,0773564

Tabla A.4.181. Verificación de la varianza. Test de Levene. Bebida ingerida. Ratas macho

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	3,84355	0,00034819

Tabla A.4.182. Verificación de la varianza. Test de Levene. Bebida ingerida. Ratas hembra

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,64159	0,113868

Tabla A.4.183. Verificación de la varianza. Test de Levene. Energía consumida. Ratas macho

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,82664	0,0715895

Tabla A.4.184. Verificación de la varianza. Test de Levene. Energía consumida. Ratas hembra

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	1,27587	0,260646

ANEXO 4.2 Resultados de los análisis de varianza (ANDEVA) y las pruebas de rangos múltiples

Tabla A 4.2.1 Análisis de varianza para el incremento en masa (g) por edulcorante en ratas macho

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	14338,1	10	1433,81	1,99	0,0475
Intra grupos	48907,8	68	719,232		
Total (Corr.)	63245,9	78			

Tabla A 4.2.2 Prueba de rangos múltiples para el incremento acumulado de masa corporal de ratas macho (g). Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sacarosa	7	320,471	X
Aspartame	6	324,817	XX
Fructosa	8	329,162	XX
Glucosa	7	332,871	XX
Mezcla	6	339,158	XX
Sacarina	7	343,357	XX
Acesulfame K	8	350,3	XX
Control	8	355,9	X
Stevia	7	357,529	X
Sucralosa	8	357,6	X
AIN93M	7	357,757	X

Tabla A.4.2.3 Análisis de varianza para el incremento en masa (g) por edulcorante en ratas hembra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
---------------	--------------------------	-----------	-----------------------	----------------	----------------

Entre grupos	6739,98	10	673,998	2,82	0,0055
Intra grupos	16264,2	68	239,179		
Total (Corr.)	23004,2	78			

Tabla A.4.2.4 Prueba de rangos múltiples para el incremento acumulado de masa corporal de ratas hembra (g). Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sucralosa	7	160,857	X
Glucosa	7	163,529	XX
Stevia	7	164,757	XX
Mezcla	8	165,95	XX
Sacarina	7	167,107	XXX
Aspartame	8	170,262	XXX
Acesulfame K	7	170,6	XXX
Fructosa	8	172,75	XXX
Sacarosa	7	180,643	XXX
Control	6	185,129	XX
AIN93M	7	192,5	X

Tabla A.4.2.5 Análisis de varianza de dos vías para el incremento de masa corporal (g) por la ingesta de edulcorantes en ratas hembra y macho

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	11220,8	10	1122,08	2,33	0,0146
B: Sexo	1,13986E6	1	1,13986E6	2365,09	0,0000
INTERACCIONES					
AB	9466,97	10	946,697	1,96	0,0418
RESIDUOS	65545,3	136	481,95		
TOTAL (CORREGIDO)	1,24658E6	157			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla A.4.2.6 Análisis de varianza de dos vías para el alimento consumido acumulado (g) en ratas hembra y macho que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	2,27112E7	10	2,27112E6	98,21	0,0000
B: Sexo	1,4049E7	1	1,4049E7	607,50	0,0000
INTERACCIONES					
AB	360981,	10	36098,1	1,56	0,1239
RESIDUOS	3,37636E6	146	23125,7		
TOTAL (CORREGIDO)	4,06856E7	167			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Tabla A.4.2.7 Test de Welch para el alimento consumido acumulado (g) en ratas macho que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	28.7380	55.76	0.000

Tabla A.4.2.8 Prueba de rangos múltiples para el consumo de alimento de ratas macho (g). Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Sacarosa	6	1450,84	A
Glucosa	8	1508,9	A
Fructosa	8	1508,9	A
AIN93M	8	2101,27	Ab
Aspartame	8	2157,97	Ab

Mezcla	8	2256,59	Ab
Sucralosa	7	2263,88	Ab
Sacarina	7	2291,36	ab
Acesulfame K	8	2309,46	ab
Control	8	2406,92	C
Stevia	8	2418,89	C

Tabla A.4.2.9 Análisis de varianza de para el alimento consumido acumulado (g) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,25808E7	10	1,25808E6	39,71	0,0000
Intra grupos	2,34448E6	74	31682,2		
Total (Corr.)	1,49253E7	84			

Tabla A.4.2.10 Prueba de rangos múltiples para el consumo de alimento de ratas hembra (g). Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Sacarosa	7	749,059	X
Glucosa	8	795,175	X
Fructosa	8	1108,27	X
AIN93M	7	1579,97	X
Aspartame	8	1662,4	XX
Mezcla	8	1666,05	XX
Sacarina	8	1682,59	XX
Control	8	1709,99	XX
Sucralosa	7	1738,59	XX
Stevia	8	1747,68	XX
Acesulfame K	8	1792,42	X

Tabla A.4.2.11 Análisis de varianza de dos vías para la cantidad de bebida ingerida (mL) por ratas macho y ratas hembra

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	7,11218E8	10	7,11218E7	61,61	0,0000
B: Sexo	14443,3	1	14443,3	0,01	0,9111
INTERACCIONES					
AB	2,01028E7	10	2,01028E6	1,74	0,0774
RESIDUOS	1,59318E8	138	1,15448E6		
TOTAL (CORREGIDO)	8,84601E8	159			

Tabla A.4.2.12 Test de Welch para la bebida ingerida acumulada (mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Gl	Grados de libertad denominador	Razón-F	Valor-P
Edulcorante	10	29.7297	12.49	0.000

Tabla A.4.2.13 Prueba de rangos múltiples para la bebida ingerida acumulada (mL) de ratas macho (mL). Método de Games-Howell al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Aspartame	8	3727,5	C
Control	8	4316,38	C
Sucralosa	8	4370,13	C

Sacarina	6	4422,5	C
AIN93M	8	4460,38	BC
Stevia	6	4647,33	C
Acesulfame K	8	4984,16	BC
Mezcla	8	5090,44	BC
Fructosa	6	6622,33	AB
Sacarosa	8	9007,31	A
Glucosa	6	9421,67	A

Tabla A.4.2.14 Análisis de varianza para la bebida ingerida acumulada (mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3,96705E8	10	3,96705E7	41,27	0,0000
Intra grupos	6,44009E7	67	961208,		
Total (Corr.)	4,61105E8	77			

Tabla A.4.2.15 Prueba de rangos múltiples para la ingesta de bebida de ratas hembra (mL). Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
AIN93M	7	3241,14	X
Control	8	3331,69	X
Sucralosa	8	3963,56	X
Aspartame	8	4051,88	X
Sacarina	6	4142,29	X
Stevia	8	5237,0	X
Mezcla	6	5512,96	XX
Acesulfame K	7	5947,46	XX
Fructosa	6	6505,67	X
Glucosa	8	9725,78	X
Sacarosa	6	10080,9	X

Tabla A.4.2.16 Análisis de varianza de dos vías para la cantidad de energía ingerida (kJ/rata) por ratas macho y ratas hembra

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	7,48965E8	10	7,48965E7	22,45	0,0000
B: Sexo	1,98963E9	1	1,98963E9	596,50	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,98809E8	10	1,98809E7	5,96	0,0000
RESIDUOS	4,70307E8	141	3,33551E6		
TOTAL (CORREGIDO)	3,35658E9	162			

Tabla A.4.2.17 Análisis de varianza para la energía ingerida acumulada (kJ) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6,93613E8	10	6,93613E7	20,94	0,0000
Intra grupos	2,31817E8	70	3,31167E6		
Total (Corr.)	9,2543E8	80			

Tabla A.4.2.18 Prueba de rangos múltiples para la ingesta de energía de ratas macho (kJ). Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Aspartame	8	23282,6	X
AIN93M	8	28186,5	X

Sucralosa	7	29779,0	XX
Sacarina	7	29787,7	XX
Acesulfame K	8	30081,3	XX
Mezcla	8	30582,1	XX
Control	6	31199,2	XX
Stevia	8	31445,6	XX
Fructosa	7	31630,5	XX
Sacarosa	8	32688,4	X
Glucosa	6	35866,7	X

Tabla A.4.2.19 Análisis de varianza para la energía ingerida acumulada (kJ) en ratas hembras que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,43815E8	10	2,43815E7	7,26	0,0000
Intra grupos	2,38491E8	71	3,35902E6		
Total (Corr.)	4,82306E8	81			

Tabla A.4.2.20 Prueba de rangos múltiples para la ingesta de energía de ratas hembra (kJ). Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Control	8	21441,6	X
Sacarina	8	21853,9	X
AIN93M	6	21974,3	X
Aspartame	8	21983,9	X
Sucralosa	7	22601,6	X
Stevia	8	22719,8	X
Mezcla	8	23252,2	XX
Acesulfame K	8	23282,6	XX
Glucosa	6	25216,4	XX
Fructosa	8	26378,7	X
Sacarosa	7	26489,6	X

Tabla A.4.2.21 Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3548,6	10	354,86	1,21	0,2969
Intra grupos	21045,6	72	292,3		
Total (Corr.)	24594,2	82			

Tabla A.4.2.22 Análisis de varianza de los niveles de glucosa (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4372,14	10	437,214	1,97	0,0493
Intra grupos	15977,4	72	221,908		
Total (Corr.)	20349,5	82			

Tabla A.4.2.23 Prueba de rangos múltiples para los niveles de glucosa en ayuno (mg/dL) de ratas hembra. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos Homogéneos
AIN93M	7	77,82	X
Aspartame	8	87,4962	XX
Sacarosa	8	87,5913	XX
Fructosa	7	90,71	XX
Glucosa	7	92,5814	XX
Control	8	93,64	XX

Mezcla	8	96,9225	X
Acesulfame	8	98,1875	X
Stevia	7	100,321	X
Sacarina	8	103,111	X
Sucralosa	7	103,494	X

Tabla A.4.2.24 Análisis de varianza de dos vías para los niveles de triglicéridos (mg/dL) en ratas macho y ratas hembra

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	293221,	10	29322,1	12,39	0,0000
B: Sexo	160,063	1	160,063	0,07	0,7952
INTERACCIONES					
AB	87616,7	10	8761,67	3,70	0,0002
RESIDUOS	331195,	140	2365,68		
TOTAL (CORREGIDO)	712668,	161			

Tabla A.4.2.25 Test de Welch para los niveles de triglicéridos (mg/dL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Gl	Grados de libertad denominador	Razón-F	Valor-P
Edulcorante	10	28.4798	7.51	0.000

Tabla A.4.2.24 Prueba de rangos múltiples para los niveles de triglicéridos (mg/dL) en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Control	8	89,6613	D
Acesulfame	8	112,144	CD
Mezcla	6	114,288	CD
Sacarina	8	122,87	CD
Stevia	7	124,513	CD
Aspartame	8	126,304	CD
Sucralosa	8	154,507	BC
Sacarosa	7	157,414	BC
AIN93M	7	204,38	AB
Glucosa	8	216,886	A
Fructosa	8	219,771	A

Tabla A.4.2.25 Test de Welch para los niveles de triglicéridos (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

Fuente	Gl	Grados de libertad denominador	Razón-F	Valor-P
Edulcorante	10	27.0753	18.17	0.000

Tabla A.4.2.26 Prueba de rangos múltiples para los niveles de triglicéridos (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Acesulfame	7	100,131	D
AIN93M	8	102,499	D
Aspartame	7	111,369	D
Stevia	7	114,191	D
Sacarina	7	117,274	D
Mezcla	7	117,424	D
Control	8	119,509	D
Sucralosa	7	151,471	CD
Glucosa	8	200,626	BC
Fructosa	6	218,582	AB
Sacarosa	7	267,706	A

Tabla A.4.2.27 Análisis de varianza de dos vías para los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas macho y ratas hembra

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	15667,5	10	1566,75	3,08	0,0014
B: Sexo	7586,78	1	7586,78	14,92	0,0002
INTERACCIONES					
AB	7299,89	10	729,989	1,44	0,1706
RESIDUOS	72217,4	142	508,573		
TOTAL (CORREGIDO)	102121,	163			

Tabla A.4.2.28 Análisis de varianza de los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	6929,06	10	692,906	2,02	0,0428
Intra grupos	24995,8	73	342,408		
Total (Corr.)	31924,9	83			

Tabla A.4.2.29 Prueba de rangos múltiples para los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Sacarosa	7	61,9529	X
Control	8	70,0737	XX
Acesulfame	8	72,8375	XX
Glucosa	8	76,3387	XXX
Sucralosa	6	76,6317	XXX
AIN93M	8	80,1437	XXX
Stevia	8	81,525	XXX
Mezcla	8	83,745	XXX
Sacarina	7	86,9171	XX
Aspartame	8	88,8838	XX
Fructosa	8	96,5138	X

Tabla A.4.2.30 Análisis de varianza de los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16297,0	10	1629,7	2,57	0,0106
Intra grupos	43806,7	69	634,88		
Total (Corr.)	60103,7	79			

Tabla A.4.2.31 Prueba de rangos múltiples para los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
AIN93M	7	61,8529	X
Acesulfame	7	80,57	XX
Control	8	80,9587	XX
Glucosa	7	86,4429	XXX
Aspartame	7	93,6857	XXX
Sacarosa	8	96,91	XXX
Stevia	6	98,6483	XXX
Sacarina	8	102,976	XX
Mezcla	6	108,67	X
Sucralosa	8	109,537	X
Fructosa	8	109,726	X

Tabla A.4.2.32 Test de Welch para los niveles de insulina (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

Fuente	Gl	Grados de libertad denominador	Razón-F	Valor-P
--------	----	--------------------------------	---------	---------

Edulcorante	10	91.7301	5.58	0.000
-------------	----	---------	------	-------

Tabla A.4.2.33 Prueba de rangos múltiples para los niveles de insulina (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Aspartame	23	831,502	A
Glucosa	18	974,692	AB
Control	21	1029,26	ABC
Mezcla ace:asp	18	1062,3	BC
Stevia	24	1063,25	BC
Sacarosa	18	1066,59	AB
Acesulfame K	24	1099,82	AB
Sucralosa	21	1180,04	C
Fructosa	24	1181,47	BC
AIN93M	24	1239,34	BC
Sacarina	24	1276,66	C

Tabla A.4.2.34 Test de Welch para los niveles de insulina (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	88.9656	8.74	0.000

Tabla A.4.2.35 Prueba de rangos múltiples para los niveles de insulina (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Aspartame	15	487,136	E
AIN93M	14	539,846	DE
Sacarina	19	556,087	DE
Acesulfame K	21	564,988	DE
Control	24	584,397	DE
Sucralosa	21	618,74	CDE
Fructosa	22	705,203	BCD
Sacarosa	24	758,167	ABC
Stevia	22	785,273	ABC
Mezcla ace:asp	15	793,243	AB
Glucosa	19	900,37	A

Tabla A.4.2.36 Test de Welch para los niveles de glucagón (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	98.1248	3.99	0.000

Tabla A.4.2.37 Prueba de rangos múltiples para los niveles de glucagón (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Sucralosa	21	46.7143	C
Aspartame	24	48.1458	BC
AIN93M	24	48.7708	BC
Control	24	50.5833	ABC
Acesulfame K	24	51.7917	ABC
Stevia	24	52.375	AB
Mezcla ace:asp	24	52.7917	ABC
Sacarina	24	53.3333	ABC
Fructosa	24	53.375	AB
Glucosa	24	54.5	AB
Sacarosa	21	59.1905	A

Tabla A.4.2.38 Test de Welch para los niveles de glucagón (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	100.918	1.50	0.150

Tabla A.4.2.39 Análisis de varianza de los niveles de grelina (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	135,206	10	13,5206	1,33	0,2127
Intra grupos	2534,16	250	10,1366		
Total (Corr.)	2669,36	260			

Tabla A.4.2.40 Análisis de varianza de los niveles de grelina (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15,7965	10	1,57965	1,53	0,1285
Intra grupos	255,808	248	1,03148		
Total (Corr.)	271,604	258			

Tabla A.4.2.41 Análisis de varianza de dos vías para los niveles de leptina (ng/dL) en ratas macho y ratas hembra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Edulcorante	8,68547E7	10	8,68547E6	3,95	0,0000
B: sexo	8,15826E8	1	8,15826E8	370,85	0,0000
INTERACCIONES					
AB	5,84362E7	10	5,84362E6	2,66	0,0036
RESIDUOS	1,05815E9	481	2,19989E6		
TOTAL (CORREGIDO)	2,014E9	502			

Tabla A.4.2.42 Test de Welch para los niveles de leptina (ng/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	93.9130	3.87	0.000

Tabla A.4.2.43 Prueba de rangos múltiples para los niveles de leptina (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Aspartame	21	3473,59	C
Sucralosa	20	4230,49	BC
Acesulfame K	23	4456,62	BC
Sacarina	24	4696,23	BC
AIN93M	24	4818,98	B
Fructosa	24	4847,65	B
Mezcla ace:asp	24	4899,27	B
Control	24	4922,13	B
Glucosa	24	4929,96	B
Sacarosa	20	5039,22	B
Stevia	19	6299,58	A

Tabla A.4.2.44 Test de Welch para los niveles de leptina (ng/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	97.8695	7.42	0.000

Tabla A.4.2.45 Prueba de rangos múltiples para los niveles de leptina (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Aspartame	23	1761,96	E
Acesulfame K	24	1772,48	E
Stevia	23	1979,29	DE
Control	21	2039,94	CDE
Fructosa	24	2047,1	CDE
Sacarina	24	2092,47	CDE
AIN93M	24	2177,1	BCDE
Mezcla ace:asp	21	2372,37	BCD
Glucosa	24	2458,27	BC
Sucralosa	23	2557,36	B
Sacarosa	24	3345,65	A

Tabla A.4.2.46 Análisis de varianza de dos vías para los niveles de GIP (pg/dL) en ratas macho y ratas hembra

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: sexo	2237,79	1	2237,79	20,63	0,0000
B: Edulcorante	13890,5	10	1389,05	12,81	0,0000
INTERACCIONES					
AB	4020,79	10	402,079	3,71	0,0001
RESIDUOS	51085,5	471	108,462		
TOTAL (CORREGIDO)	71189,1	492			

Tabla A.4.2.47 Test de Welch para los niveles de GIP (ng/mL) en ratas macho que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	91.5695	49.75	0.000

Tabla A.4.2.48 Prueba de rangos múltiples para los niveles de GIP (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Aspartame	24	21,0993	G
AIN93M	18	23,0968	BC
Sacarina	24	23,9955	DEFG
Sucralosa	22	26,0136	EFG
Stevia	24	29,5516	CDEF
Acesulfame K	24	31,3213	BCDEFG
Mezcla ace:asp	24	32,1218	BCDEFG
Control	18	33,6949	BC
Glucosa	24	34,513	BCDE
Sacarosa	21	39,2043	AB
Fructosa	19	45,1785	A

Tabla A.4.2.49 Test de Welch para los niveles de GIP (ng/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes

<i>Fuente</i>	<i>Gl</i>	<i>Grados de libertad denominador</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Edulcorante	10	95.7028	6.96	0.000

Tabla A.4.2.50 Prueba de rangos múltiples para los niveles de GIP (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Games-Howell al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Sucralosa	21	28,1536	C
Stevia	24	30,429	BC
Aspartame	23	31,0296	BC

Glucosa	24	32,1045	BC
Mezcla ace:asp	24	32,5001	BC
AIN93M	21	33,0523	BC
Sacarina	21	34,5543	BC
Fructosa	24	37,8856	ABC
Control	24	39,6234	AB
Acesulfame K	21	42,2979	A
Sacarosa	24	45,247	A

Tabla A.4.2.51 Análisis de varianza de los niveles de GLP-1 (pg/mL) en ratas macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2143,9	10	214,39	1,30	0,2314
Intra grupos	39432,4	239	164,989		
Total (Corr.)	41576,3	249			

Tabla A.4.2.52 Análisis de varianza de los niveles de GLP-1 (pg/mL) en ratas hembra que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4735,16	10	473,516	4,05	0,0000
Intra grupos	28511,3	244	116,85		
Total (Corr.)	33246,5	254			

Tabla A.4.2.53 Prueba de rangos múltiples para los niveles de colesterol (mg/dL) en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Control	24	42,5625	D
Aspartame	24	46,625	CD
Sacarina	24	49,0208	BCD
Acesulfame K	24	49,8125	BC
AIN93M	24	50,7292	BC
Stevia	23	51,3261	BC
Fructosa	24	52,3125	BC
Sucralosa	23	53,7391	ABC
Sacarosa	24	53,8542	ABC
Mezcla ace:asp	21	55,3571	AB
Glucosa	20	60,05	A

Tabla A.4.2.54 Análisis de varianza de los niveles de SREBP-1 en ratas macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,33206	10	0,133206	9,11	0,0000
Intra grupos	0,321561	22	0,0146164		
Total (Corr.)	1,65362	32			

Tabla A.4.2.55 Prueba de rangos múltiples para los niveles e expresión relativa de SREBP-1 en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Aspartame	3	0,545667	X
Glucosa	3	0,675667	XX
Sacarosa	3	0,698667	XX
Sucralosa	3	0,7	XX
AIN93M	3	0,769	XX
Fructosa	3	0,793	XX
Sacarina	3	0,834	XXX
Stevia	3	0,9	XXX
Control	3	1,00467	XX

Acesulfame	3	1,052	X
Mezcla asp: ace	3	1,296	X

Tabla A.4.2.56 Análisis de varianza de los niveles de SREBP-1 en ratas hembra que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	55,9501	10	5,59501	24,67	0,0000
Intra grupos	4,99047	22	0,22684		
Total (Corr.)	60,9406	32			

Tabla A.4.2.57 Prueba de rangos múltiples para los niveles e expresión relativa de SREBP-1 en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Control	3	1,00433	X
Acesulfame	3	1,04167	X
Fructosa	3	1,46933	XX
Glucosa	3	1,64333	XX
Mezcla asp: ace	3	1,90367	XXX
Aspartame	3	2,03833	XXX
Stevia	3	2,045	XXX
Sucralosa	3	2,12267	XXX
AIN93M	2	2,161	XX
Sacarosa	3	2,44167	X
Sacarina	3	2,522	X

Tabla A.4.2.58 Análisis de varianza de los niveles de ChREBP en ratas macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,391317	10	0,0391317	2,32	0,0504
Intra grupos	0,354704	21	0,0168907		
Total (Corr.)	0,746021	31			

Tabla A.4.2.59 Análisis de varianza de los niveles de ChREBP en ratas hembra que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,80609	10	0,480609	2,47	0,0373
Intra grupos	4,28801	22	0,194909		
Total (Corr.)	9,0941	32			

Tabla A.4.2.60 Prueba de rangos múltiples para los niveles e expresión relativa de ChREBP en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,00933	X
Glucosa	3	1,24133	XX
Mezcla asp: ace	3	1,34867	XX
Acesulfame	3	1,35567	XX
Fructosa	3	1,36467	XX
Aspartame	3	1,43933	XX
Stevia	3	1,45833	XX
Sucralosa	3	1,512	XXX
Sacarina	3	1,51233	XXX
Sacarosa	3	1,67467	XX
AIN93M	2	1,8105	X

Tabla A.4.2.61 Análisis de varianza de los niveles de SGLT-1 en ratas macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,54191	10	0,154191	3,14	0,0185
Intra grupos	0,836106	17	0,0491827		
Total (Corr.)	2,37802	27			

Tabla A.4.2.62 Prueba de rangos múltiples para los niveles e expresión relativa de SGLT-1 en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Acesulfame	3	0,349	X
Fructosa	2	0,4475	XX
Sacarosa	3	0,55	XXX
Mezcla asp: ace	2	0,5855	XXX
Aspartame	3	0,616	XXXX
AIN93M	3	0,634667	XXXX
Stevia	2	0,637	XXXX
Glucosa	2	0,9025	XXX
Sacarina	2	0,9235	XXX
Control	3	1,00633	XX
Sucralosa	3	1,08567	X

Tabla A.4.2.63 Análisis de varianza de los niveles de SGLT-1 en ratas hembra que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	12,536	10	1,2536	9,96	0,0000
Intra grupos	2,7698	22	0,1259		
Total (Corr.)	15,3058	32			

Tabla A.4.2.64 Prueba de rangos múltiples para los niveles e expresión relativa de SGLT-1 en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control	3	1,00933	X
Glucosa	3	1,24133	XX
Mezcla asp: ace	3	1,34867	XX
Acesulfame	3	1,35567	XX
Fructosa	3	1,36467	XX
Aspartame	3	1,43933	XX
Stevia	3	1,45833	XX
Sucralosa	3	1,512	XXX
Sacarina	3	1,51233	XXX
Sacarosa	3	1,67467	XX
AIN93M	2	1,8105	X

Tabla A.4.2.65 Análisis de varianza de los niveles de receptor de insulina en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,74894	10	0,174894	35,34	0,0000
Intra grupos	0,108868	22	0,00494855		
Total (Corr.)	1,85781	32			

Tabla A.4.2.66 Prueba de rangos múltiples para la expresión relativa del receptor de insulina en ratas macho que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Aspartame	3	0,0546667	X
Stevia	3	0,423	X
Acesulfame	3	0,489	XX
Sacarina	3	0,496667	XX
AIN93M	3	0,532333	XXX
Fructosa	3	0,601667	XXX
Glucosa	3	0,613	XXX
Sucralosa	3	0,634	XX
Sacarosa	3	0,666	X
Mezcla asp: ace	3	0,845333	X
Control	3	1,00733	X

Tabla A.4.2.67 Análisis de varianza de los niveles de receptor de insulina en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	5,47314	10	0,547314	28,46	0,0000
Intra grupos	0,423098	22	0,0192317		
Total (Corr.)	5,89623	32			

Tabla A.4.2.68 Prueba de rangos múltiples para la expresión relativa del receptor de insulina en ratas hembra que consumieron edulcorantes. Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Glucosa	3	0,942333	X
Control	3	1,00233	X
Stevia	3	1,08333	XX
AIN93M	3	1,16	XX
Acesulfame	3	1,32467	XX
Fructosa	3	1,47567	XX
Aspartame	3	1,61767	XX
Sucralosa	3	1,63767	XX
Mezcla asp: ace	3	1,67067	XX
Sacarosa	3	1,81167	X
Sacarina	3	2,394	X

Tabla A.4.2.69 Análisis de varianza de los niveles de densidad óptica relativa (SREBP-1/ β -actina) en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	28.4289	10	2.84289	17.71	0.0000
Intra grupos	8.83041	55	0.160553		
Total (Corr.)	37.2593	65			

Tabla A.4.2.70 Prueba de rangos múltiples los niveles de densidad óptica relativa (SREBP-1/ β -actina) en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante. Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Sucralosa	6	0.364416	X
AIN93M	6	0.524263	X
Control	6	1.015	X
Glucosa	6	1.04588	X
Stevia	6	1.13533	X
Aspartame	6	1.46987	XX
Sacarina	6	1.51728	XX
Acesulfame	6	1.86299	X
Sacarosa	6	1.88813	X
Fructosa	6	2.37866	X
Mezcla ace:asp	6	2.4642	X

Tabla A.4.2.71 Análisis de varianza de los niveles de densidad óptica relativa (SREBP-1/ β -actina) en hígados de hembra macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	55.9501	10	5.59501	24.67	0.0000
Intra grupos	4.99047	22	0.22684		
Total (Corr.)	60.9406	32			

Tabla A.4.2.72 Prueba de rangos múltiples los niveles de densidad óptica relativa (SREBP-1/ β -actina) en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Sucralosa	3	0.871501	X
Fructosa	3	0.884887	X
Acesulfame	3	0.947956	X
Control	3	1.0	X
Glucosa	3	1.06945	X
Stevia	3	1.13396	X
Sacarina	3	2.19573	X
Mezcla ace:asp	3	2.45227	X
AIN93M	3	2.66803	X
Aspartame	3	3.57634	X
Sacarosa	3	5.03952	X

Tabla A.4.2.73 Análisis de varianza de los niveles de densidad óptica relativa (FAS/ β -actina) en hígados de hembra macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.01539	10	0.901539	96.18	0.0000
Intra grupos	0.206224	22	0.0093738		
Total (Corr.)	9.22162	32			

Tabla A.4.2.74 Prueba de rangos múltiples los niveles de densidad óptica relativa (FAS-1/ β -actina) en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante. Método de Duncan al 95% de confianza

Edulcorante	Casos	Media	Grupos homogéneos
Acesulfame	3	0.311391	X
AIN93M	3	0.383623	X
Glucosa	3	0.411243	X
Sucralosa	3	0.428665	XX
Aspartame	3	0.588508	XX
Mezcla ace:asp	3	0.675456	XX
Stevia	3	0.825666	XX
Fructosa	3	0.945893	XX
Control	3	1.0	X
Sacarina	3	1.07226	X
Sacarosa	3	2.25207	X

Tabla A.4.2.75 Análisis de varianza de los niveles de densidad óptica relativa (FAS/ β -actina) en hígados de hembra macho que consumieron edulcorante

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	10.368	10	1.0368	28.62	0.0000
Intra grupos	0.797045	22	0.0362293		

Total (Corr.)	11.1651	32			
---------------	---------	----	--	--	--

Tabla A.4.2.76 Prueba de rangos múltiples los niveles de densidad óptica relativa (FAS-1/ β -actina) en hígados de ratas macho que consumieron edulcorante. Método de Duncan al 95% de confianza

<i>Edulcorante</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Stevia	3	0.440105	X
Sacarina	3	0.859968	X
Sucralosa	3	0.879698	X
Acesulfame	3	0.901886	X
Mezcla ace:asp	3	0.945647	X
Control	3	1.0	X
Fructosa	3	1.12879	XX
Aspartame	3	1.38473	XX
Glucosa	3	1.49485	X
AIN93M	3	1.94352	X
Sacarosa	3	2.54057	X