



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del consumo crónico de edulcorantes sobre la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*) en tejido hepático de modelos animales

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

SÁNCHEZ GONZÁLEZ ANDREA ESTEFANÍA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

VOCAL: M. en C. Agustín Reyo Herrera

SECRETARIO: M en C. Landy Irene Ramírez Burgos

1er SUPLENTE: Dra. Marisela Bernal González Gómez

2do SUPLENTE: M en C. Rolando Salvador García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

- LABORATORIOS E-301, E-302, E-303, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
- UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (UNEXA), CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUSTENTANTE:

Andrea Estefanía Sánchez González

DECLARATORIA

“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 con referencia a, las obras de otros autores aparecen debida y adecuadamente señaladas, así como acreditadas mediante recursos editoriales convencionales”

Andrea Estefanía Sánchez González

RECONOCIMIENTOS

Al Subprograma 127 “Formación básica en investigación”, por todo el apoyo que me brindó para la realización de este proyecto de investigación y su culminación con esta tesis.

Al proyecto PAPIIT IN217619 de la DGAPA de la UNAM “Efecto del consumo de edulcorantes sobre la actividad de las enzimas reguladoras de la glucólisis y lipogénesis en extractos de hepatocitos y sus implicaciones metabólicas sobre el exceso de masa corporal y la obesidad” por el apoyo recibido para la adquisición de los materiales y reactivos conducentes para la realización de esta tesis. Asimismo, se recibió apoyo para la compra de materiales y reactivos por parte de la DGAPA de la UNAM mediante los proyectos PAPIME Claves EN-103704, PE-101709 y PE-1005-14 y del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM (PAIP) Claves 50009065 y 50009067

ÍNDICE

	Pág.
Glosario de términos	15
Resumen	23
Capítulo 1. Problemática	24
1.1. Introducción	24
1.2. Justificación	28
1.3. Hipótesis de trabajo	29
1.4. Objetivos	29
1.4.1. Objetivo general	29
1.4.2. Objetivos particulares	29
Capítulo 2. Fundamentos	
2.1. Edulcorantes	31
2.1.1. Acesulfame de potasio	31
2.1.2. Aspartame	32
2.1.3. Fructosa	33
2.1.4. Glucosa	34
2.1.5. Sacarina	35
2.1.6. Sacarosa	36
2.1.7. Sucralosa	37
2.2. Rutas metabólicas	38
2.2.1. Glucólisis	38
2.2.2. Lipogénesis	39
2.3. Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (<i>CHREBP</i> , en inglés)	39
2.4. Método <i>Western Blot</i>	40
2.5. Conceptos estadísticos empleados en el análisis de este estudio	43
2.5.1. Media	43

	Pág.	
2.5.2.	Variación y desviación estándar	43
2.5.3.	Pruebas de normalidad	44
2.5.4.	Valores atípicos	44
2.5.4.1.	Prueba de Dixon	45
2.5.4.2.	Prueba de Grubbs	45
2.5.4.3.	Gráfica de caja y bigotes	45
2.5.5.	Análisis de varianza (ANDEVA)	46
2.5.6.	Homocedasticidad	46
Capítulo 3.	Metodología	47
3.1.	Obtención de las 90 muestras de hígados	48
3.2.	Obtención de extractos crudos de hepatocitos	48
3.3.	Cuantificación de proteínas en extractos de hepatocitos por el método de Bradford	49
3.4.	Determinación de la prueba de <i>Western Blot</i>	50
3.4.1.	Elaboración de gel de poliacrilamida con <i>SDS</i>	50
3.4.2.	Realización de electroforesis	50
3.4.3.	Realización de la electrotransferencia a la membrana de polifloruro de vinilideno	51
3.4.4.	Bloqueo inespecífico de la membrana de polifloruro de vinilideno	51
3.4.5.	Unión de los anticuerpos primario y secundario	51
3.4.6.	Revelado de las membranas mediante una reacción de quimioluminiscencia	52
3.5.	Análisis estadístico de los datos obtenidos	52
Capítulo 4.	Resultados y discusión	53
4.1.	Cuantificación de proteínas empleando el método de Bradford	53
4.2.	Establecimiento de las condiciones óptimas para realizar la electroforesis	57
4.3.	Electroforesis a los extractos de hepatocitos	59

	Pág.	
4.4.	Expresión relativa de <i>ChREBP</i>	59
4.5.	Expresión relativa normalizada de la proteína <i>ChREBP</i> con la proteína endógena de control positivo	61
Capítulo 5.	Conclusiones y recomendaciones	72
5.1.	Conclusiones	72
5.2.	Recomendaciones	73
Anexos		
Anexo 1.	Análisis estadísticos	75
A.	Estadístico W de Shapiro-Wilk	75
B.	Valores atípicos	76
C.	Prueba de Levene	92
Anexo 2.	Acervo fotográfico	93
Anexo 3.	Disposición controlada de los residuos producidos en esta investigación	95
Anexo 4.	Artículo de los autores de la encuesta ENSANUT 2018 (Romero-Martínez <i>et al.</i>, 2019)	96
	Artículo de Nutall (2015) sobre el índice de masa corporal y su impacto en las mediciones del exceso de masa corporal y la obesidad	105
Bibliografía		116

I. Índice de Tablas

	Pág.	
Tabla 1.	Resultados de absorbancia para la curva patrón con γ -Globulina	54
Tabla 2.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Basal	56
Tabla 3.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del	56

		Pág.
	Grupo Control	
Tabla 4.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Glucosa	57
Tabla 5.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sacarosa	57
Tabla 6.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Fructosa	57
Tabla 7.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sacarina	57
Tabla 8.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Mezcla aspartame:acesulfame	58
Tabla 9.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Acesulfame de potasio	58
Tabla 10.	Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sucralosa	58
Tabla 11.	Resultados de determinación de las condiciones óptimas	59
Tabla 12.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Control	64
Tabla 13.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Basal	64
Tabla 14.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Glucosa	64
Tabla 15.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sacarosa	664
Tabla 16.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Fructosa	64
Tabla 17.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Mezcla Aspartame:Acesulfame	65
Tabla 18.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sucralosa	65
Tabla 19.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sacarina	65
Tabla 20.	Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Acesulfame de potasio	65

		Pág.
Tabla 21.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Control	65
Tabla 22.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Basal	66
Tabla 23.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Glucosa	66
Tabla 24.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sacarosa	66
Tabla 25.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Fructosa	66
Tabla 26.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Mezcla aspartame:acesulfame	66
Tabla 27.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sucralosa	67
Tabla 28.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sacarina	67
Tabla 29.	Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Acesulfame de potasio	67
Tabla 30.	Análisis de varianza para la densidad óptica de <i>ChREBP</i> por grupo de edulcorante en ratas hembra de la estirpe Wistar al 95% de confianza	69
Tabla 31.	Análisis de varianza para la densidad óptica de <i>ChREBP</i> por grupo de edulcorante en ratas macho de la estirpe Wistar al 95% de confianza	70
Tabla 32.	Análisis de varianza multifactorial para la densidad óptica de <i>ChREBP</i> por grupo de edulcorante y por género al 95% de confianza	71
Tabla 33.	Análisis de varianza de un factor para la densidad óptica de <i>ChREBP</i> por grupo de edulcorante al 95% de confianza	72
Tabla 34.	Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de edulcorante en ratas macho	75
Tabla 35.	Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de edulcorante en ratas hembra	75
Tabla 36.	Resultados de la prueba de Levene	92

II. Índice de Figuras

		Pág.
Figura 1.	Estructura química del acesulfame de potasio	32
Figura 2.	Estructura química del aspartame	32
Figura 3.	Estructura química de la fructosa	33
Figura 4.	Estructura química de la glucosa	35
Figura 5.	Estructura química de la sacarina	35
Figura 6.	Estructura química de la sacarosa o azúcar de caña	36
Figura 7.	Estructura química de la sucralosa	37
Figura 8.	Equipo de electroforesis montado y un ejemplo de su funcionamiento	41
Figura 9.	“Sándwich” para electrotransferencia	42
Figura 10.	Equipo <i>BioRad</i> ® para electrotransferencia y ejemplo de su funcionamiento	42
Figura 11.	Principio de quimioluminiscencia en la técnica de <i>Western Blot</i>	42
Figura 12.	Diagrama general del proceso de la investigación.	47
Figura 13.	Curva patrón de γ Globulina por el método de Bradford	53
Figura 14.	Tinción de membrana con Rojo de Ponceau-S después de la electrotransferencia. En ella es posible pueden apreciar 5 carriles de la muestra M33 del Grupo Sacarina	58
Figura 15.	Tinción de membrana con Rojo de Ponceau-S después de la electrotransferencia. Se pueden apreciar 7 carriles, empezando por la izquierda, 6 son de la albúmina sérica bovina (<i>BSA</i> , por sus siglas en inglés) y la última es la muestra M33 del grupo Sacarina	58
Figura 16.	Resultado de <i>Western Blot</i> para ratas hembra de la cepa Wistar en los diferentes grupos de edulcorantes, donde se muestra la proteína en estudio <i>ChREBP</i> (arriba) en un tamaño de 95kb y la proteína endógena actina (abajo) en un tamaño de 42 kb	60
Figura 17.	Resultado de <i>Western Blot</i> para ratas macho de la cepa Wistar en los diferentes grupos de edulcorantes, donde se muestra la proteína en estudio <i>ChREBP</i> (arriba) en un tamaño de 95kb y la proteína endógena actina (abajo) en un tamaño de 42 kb	60

	Pág.
Figura 18.	Gráfica del % de área bajo la curva para cada pico gel #5 con muestras de ratas macho donde se estudia a la proteína actina 61
Figura 19.	Gráfica del % de área bajo la curva para cada pico del gel #5 de machos donde se estudia a la proteína ChREBP 62
Figura 20.	Niveles promedio de densidad óptica relativa para ratas hembra de la estirpe Wistar±DEM. Mezcla=Mezcla acesulfame:aspartame, NS=No hubieron diferencias significativas 67
Figura 21.	Niveles promedio de densidad óptica relativa para ratas macho de la estirpe Wistar±DEM. Mezcla= Mezcla acesulfame:aspartame, NS=No hubieron diferencias significativas 68
Figura 22.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Basal machos 76
Figura 23.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Glucosa machos 77
Figura 24.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sacarosa machos 78
Figura 25.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Fructosa machos 78
Figura 26.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Mezcla aspartame:acesulfame machos 80
Figura 27.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sucralosa machos 81
Figura 28.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sacarina machos 82
Figura 29.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Acesulfame de potasio machos 83
Figura 30.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Basal hembras 84
Figura 31.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Glucosa hembras 85
Figura 32.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sacarosa hembras 86
Figura 33.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Fructosa hembras 87
Figura 34.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Mezcla aspartame:acesulfame hembras 88
Figura 35.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sucralosa hembras 89
Figura 36.	Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sacarina hembras 90
Figura 37.	Gráfica de caja y bigotes para el grupo de Acesulfame de potasio 91

	Pág.
	hembras
Figura 38.	Macho 33 justo antes de eutanasia 93
Figura 39.	Extracción de proteína en hepatocitos 93
Figura 40.	Equipo BioRad® para la elaboración de geles 93
Figura 41.	Geles cargados y sumergidos con la solución amortiguadora de carga en la cámara de electroforesis BioRad® 93
Figura 42.	Tinción de membrana con Rojo de Ponceau 93
Figura 43.	Geles después de electrotransferencia teñidos con Azul de Coomassie 94
Figura 44.	Membranas en agitador orbital para unión con anticuerpos 94
Figura 45.	Cajas con membrana sumergida en solución <i>Blotto</i> para bloqueo 94

III. Índice de ecuaciones

	Pág.
Ecuación 2.1.	Glucólisis (Pratt y Cornely, 2014) 38
Ecuación 2.2.	Media 43
Ecuación 2.3.	Variación y desviación estándar 44
Ecuación 2.4.	Prueba de Shapiro-Wilk 44
Ecuación 3.1.	Determinación de extracto 51,59
Ecuación 4.1.	Ecuación de la recta 54
Ecuación 4.2.	Ecuación de la recta específica para la curva patrón de γ -globulina 54
Ecuación 4.3.	Despeje de concentración 54
Ecuación 4.4.	Factor de dilución 54
Ecuación 4.5.	Normalización de muestras respecto al grupo Control 62
B	Valores atípicos 76
B.1.	Identificación de valores atípicos – Basal machos 76
B.2.	Identificación de valores atípicos – Glucosa machos 77

	Pág.
B.3. Identificación de valores atípicos – Sacarosa machos	78
B.4. Identificación de valores atípicos – Fructosa machos	79
B.5. Identificación de valores atípicos – Mezcla aspartame:acesulfame machos	80
B.6. Identificación de valores atípicos – Sucralosa machos	81
B.7. Identificación de valores atípicos – Sacarina machos	82
B.8. Identificación de valores atípicos – Acesulfame de potasio machos	83
B.9. Identificación de valores atípicos – Basal hembras	84
B.10. Identificación de valores atípicos – Glucosa hembras	85
B.11. Identificación de valores atípicos – Sacarosa hembras	86
B.12. Identificación de valores atípicos – Fructosa hembras	87
B.13. Identificación de valores atípicos – Mezcla aspartame:acesulfame hembras	88
B.14. Identificación de valores atípicos – Sucralosa hembras	89
B.15. Identificación de valores atípicos – Sacarina hembras	90
B.16. Identificación de valores atípicos – Acesulfame de potasio hembras	91

Glosario de términos

Acesulfame de potasio. Edulcorante de alta intensidad que es aproximadamente 200 veces más dulce que la sacarosa. Se emplea en bebidas refrescantes, lácteos, panificación y dulces (Baduí-Dergal, 2006).

Acetil CoA carboxilasa (ACC). Enzima que cataliza la reacción de la acetil-Coenzima A y bicarbonato para formar malonil-Coenzima A (Garrido Pertierra y Teijón Rivera, 2009).

Ácido graso sintasa. Complejo de enzimas que catalizan la síntesis de ácidos grasos. Sus siglas en inglés son *FAS (Fatty Acid Synthase)* (Garrido Pertierra y Teijón Rivera, 2009).

Actina. Proteína globular que forma microfilamentos (Pratt y Cornely, 2012).

Ad libitum. Expresión proveniente del latín que significa “a placer” o “a voluntad”.

Aditivo alimentario. Sustancia que, tenga o no valor nutritivo, cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidos los organolépticos). Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al producto para mantener o mejorar las cualidades nutricionales (DOF, 2016).

AMPK. Proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (por sus siglas en inglés).

AMPc. Adenosín monofosfato cíclico (por sus siglas en inglés).

ANDEVA (ANOVA). Análisis de varianza en español. Por sus siglas en inglés *Analysis of variance*. Técnica que permite calcular la probabilidad de encontrar medias muestrales dispares entre sí (Triola *et al.*, 2018).

Aspartame. Formado por la unión de dos aminoácidos, es de 200 veces más dulce que la sacarosa y no tiene resabio amargo (Sinónimo: aspartamo) (Baduí-Dergal, 2006).

Asumir. Verbo transitivo. Hacerse cargo, responsabilizarse de algo, aceptarlo. Adquirir, tomar una forma mayor. No confundir con el verbo suponer (ver definición), ya que aunque en inglés el verbo *to assume* significa ambas cosas, en español los verbos suponer y asumir NO son sinónimos.

ATP citrato liasa. Enzima que separa el citrato en oxalacetato y acetil coenzima A en el citosol (Pratt y Cornely, 2012).

Azul de Coomasie. Colorante derivado del trifenilmetano que cuenta con la capacidad de unirse a las proteínas.

Azida de sodio 0.006%. Reactivo que sirve para inhibir el crecimiento de bacterias u hongos.

b. Ordenada al origen (Ecuación 4.1).

Blotto. La solución *Blotto* es una mezcla de leche descremada con *TBS* (ver definición) y *TWEEN 20* (ver definición).

Carbohidrato. Anglicismo, ver hidratos de carbono.

ChREBP. Por sus siglas en inglés *Carbohydrate responsive element binding protein*. Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos de la familia bHLH-Lz, siendo una proteína larga de 95 kDa y 864 aminoácidos, conteniendo varios dominios incluyendo una señal de localización nuclear (*NLS*, por sus siglas en inglés) y varios sitios de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de adenosín monofosfato cíclico y proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (*AMPc* y *AMPK*, en inglés) [López-Oliva y Martínez, 2014; Uyeda *et al.*, 2002].

Codex Alimentarius. Colección de normas alimentarias y textos afines aceptados internacionalmente y presentados de modo uniforme con el objetivo de proteger la salud del consumidor y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de alimentos.

CONADESUCA. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la Caña de Azúcar, México.

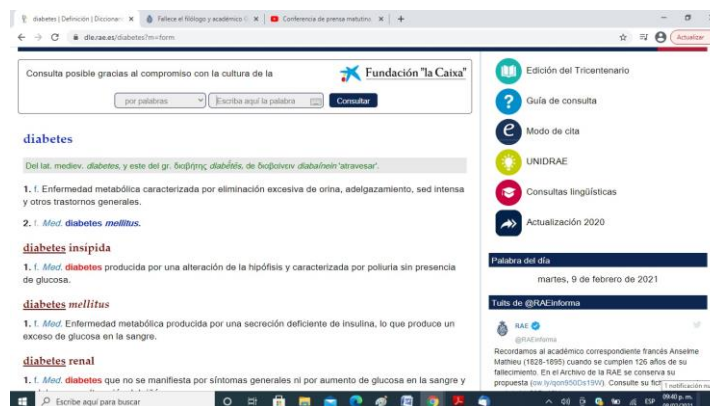
DEM. Desviación estándar de la media de datos.

Deoxicolato de sodio 0.5%. Reactivo que sirve para lisis de la membrana en la célula.

DHAP. Dihidroxiacetona fosfato (por sus siglas en inglés).

Dodecilsulfato de sodio, DSS. Detergente aniónico que sirve para cargar negativamente las proteínas en la muestra y, generalmente, se encuentra con sus siglas en inglés, *SDS*.

Diabetes mellitus. Enfermedad metabólica producida por una secreción deficiente de insulina, lo que produce un exceso de glucosa en la sangre. (<https://dle.rae.es/diabetes#NVwWjiI>)



Generalmente se caracteriza por una insuficiente acción de la insulina endógena, lo que suele provocar hiperglucemia. Se distinguen por lo menos dos enfermedades que parecen tener una naturaleza diferente: La diabetes tipo 1 (DM1) y la diabetes tipo 2 (DM2), también se habla de una diabetes gestacional que corresponde a una hiperglicemia detectada durante el embarazo.¹

Edulcorantes. Compuestos químicos que provocan la sensación de dulzor y desempeñan una función importante hacia la aceptación o rechazo de los alimentos (Baduí-Dergal, 2006).

Electroforesis tipo PAGE-SDS. Electroforesis en gel de poliacrilamida (*PAGE* por sus siglas en inglés) a la cual se le adiciona dodecil sulfato de sodio (*SDS* por sus siglas en inglés) en todos sus componentes para ser cargado negativamente.

Enfermedades cardiovasculares. Son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, tales como hipertensión arterial, cardiopatía coronaria, entre otras.

ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, México.

Enzima. Proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos, disminuyendo el nivel de la "energía de activación" propio de la reacción (<https://www.ecured.cu/Enzimas>).

Estudentizado. Término estadístico que se le da a los valores que miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral.

Factor de transcripción 1 de unión a octamero-1. Proteína nuclear que se expresa en todas las células eucariotas. Está implicado en la regulación transcripcional de la expresión genética relacionada con el ciclo celular y el desarrollo.

Factores LXR y TR-β. Reguladores transcripcionales básicos del factor de transcripción *ChREBP* en el hígado.

Factores de transcripción. Proteínas reguladoras necesarias para la transcripción genética.

Familia bHLH-Lz. Familia de factores de transcripción que se estructuran de dos hélices alfa conectadas por un bucle.

Fructosa. Glúcido reductor que se encuentra de manera natural en las frutas y en las verduras, su concentración en éstas varía según su estado de madurez (Baduí-Dergal, 2006).

Genes. Segmentos cortos del ADN.

¹ En esta tesis se seguirá la forma de escribir diabetes *mellitus* como aparece en el diccionario de la lengua española aprobado por la Real Academia Española (RAE): <https://dle.rae.es/diabetes#DBi3H5j>

Glúcido. Sustancia orgánica que constituye las reservas energéticas de las células animales y vegetales.

Glucocinasa. Enzima que regula la glucólisis. Sus siglas en inglés son *GK (Glucokinase)*.

Glucosa. Es el glúcido más abundante en la naturaleza. Se emplea comercialmente en la elaboración de gran número de alimentos y se obtiene de la hidrólisis controlada del almidón (Baduí-Dergal, 2006).

Hidratos de carbono. Compuestos formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, presentan la fórmula general $C_x(H_2O)_n$, y tienen estructura de polihidroxialdehído o de polihidroxiacetona. Además, todos los carbohidratos presentan grupos C=O, -OH (Baduí-Dergal, 2006).

Hepatocitos. Células propias del tejido hepático.

Homocedasticidad. Implica que en un modelo del análisis de varianza (*ANDEVA*) de dos o más vías todas las distribuciones normales deben tener igualdad de varianzas (Moncho, 2015).

Todas las pruebas de homocedasticidad contrastan la hipótesis nula de que la varianza de una variable en X en los K grupos es la misma, de forma que si el valor de σ asociado al estadístico de contraste es menor que el valor de α se rechazará la hipótesis nula al nivel de significancia del α establecido (Mongay-Fernández, 2005).

Índice de masa corporal (IMC). Es un índice utilizado frecuentemente para clasificar el exceso de masa corporal y la obesidad en adultos. Se obtiene al dividir la masa corporal en kilogramos entre el cuadrado de la talla en metros (kg/m^2). La fórmula para su obtención es la siguiente:

$$IMC = \frac{\text{masa en kg}}{(\text{estatura en metros})^2}$$

(https://en.wikipedia.org/wiki/Body_mass_index)

Ingesta diaria admisible (IDA). Corresponde a la cantidad de una sustancia que pueda ser ingerida diariamente por un individuo durante toda su vida, sin que le produzca un daño a la salud (Valle-Vega y Lucas-Florentino, 2000).

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

K. Variable matemática que se usa para las pruebas de homocedasticidad. En estas definiciones estadísticas representa a los grupos de edulcorantes.

L-piruvatoquinasa. Enzima que cataliza la segunda reacción de la glucólisis. Sus siglas en inglés son *LPK* (*L-type piruvate kinase*) (Garrido Pertierra y Teijón Rivera, 2009).

m. Pendiente (Ecuación 4.1).

Masa. Magnitud física que expresa la cantidad de materia de un cuerpo, medida por su inercia que determina la aceleración producida por una fuerza que actúa sobre él y cuya unidad en el sistema internacional es el kilogramo (kg) (<https://dle.rae.es/masa>).

Masa corporal. Cantidad de masa presente en un cuerpo.

β-mercaptoetanol. Reactivo que reduce los enlaces disulfuro en las proteínas de la muestra.

Normalización. Ajuste de un grupo de medidas usando un estándar.

NP-40. Reactivo cuyas siglas significan nonil-fenol-polietilenglicol éter al 1 % y que sirve para la lisis de las membranas.

Obesidad. Es una enfermedad crónica que se define como una masa corporal desproporcionada con respecto de la talla o altura con una acumulación excesiva de tejido adiposo que generalmente se acompaña de una inflamación leve, crónica, sistémica (González-Muniesa *et al.*, 2017).

PAGE-SDS. Siglas en inglés para el gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio usado para electroforesis y en cuya preparación se requiere tener el gel separador al 10 %, que contiene agua desionizada, solución *Tris* 1.5M con un pH de 8.8, solución de dodecilsulfato de sodio (*SDS*) al 10 %, poliacrilamida 30 %, solución de persulfato de amonio al 10 %, reactivo *TEMED*® (N, N, N', N'-tetrametiletilenoamida) y un gel concentrador al 4 %, que contiene agua desionizada, solución *Tris* 0.5M con un pH 6.8, solución *SDS* al 10 %, poliacrilamida al 30 %, persulfato de amonio al 10 % y reactivo *TEMED*®.

Peso. Fuerza con la que la gravedad atrae un cuerpo a la Tierra. Se mide en Newtons (N). Es incorrecto llamar a la masa usando la palabra peso. Ejemplo: masa molar o molecular y no peso molar o molecular.

Poder edulcorante. Valor que se obtiene al comparar los edulcorantes por su capacidad de causar dulzor en comparación con la sacarosa.

PCR. Siglas en inglés para reacción en cadena de la polimerasa, método usado para determinar *ChREBP* (Mendoza-Pérez, 2017).

PVDF. Siglas en inglés para *polyvinylidene fluoride* (fluoruro de polivinilideno).

Rata Wistar. Línea albina de la rata parda. Fue desarrollada en el Wistar Institute en 1906 para fines de investigación biomédica y se trata de la primera rata empleada como organismo modelo (anteriormente se trabajaba con el ratón).

(<http://web.archive.org/web/20090802191743/http://www.amphilsoc.org/library/mendel/1998.htm>).

Resultante. Adjetivo. Que resulta o se produce a causa de otra. Usado también como sustantivo. (<https://dle.rae.es/resultante>)

RIPA. Acrónimo en inglés de solución amortiguadora para ensayos de radio-inmuno-precipitación (*radioimmunoprecipitation assay buffer*).

Rojo de Ponceau. Colorante sintético de color rojo usado para la tinción reversible de proteínas en la membrana de *PVDF* (ver definición).

Sacarina. Edulcorante hipocalórico, su grado de dulzor es de aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa, con el inconveniente de un resabio amargo metálico, sobre todo en altas concentraciones, comercialmente se encuentra en forma de sacarina de sodio o calcio (Baduí-Dergal, 2006).

Sacarosa. Glúcido llamado comúnmente azúcar o azúcar de caña, está integrada por una molécula de glucosa cuyo carbono aldehídico se une al cetónico de la fructosa por medio de un enlace alfa (Baduí-Dergal, 2006).

Solución amortiguadora Laemmli 2X BioRad®. Sirve para dar una carga negativa a las proteínas en la muestra así como color y contiene solución *Tris-HCl* 65.8 mM a un pH de 6.8, glicerol 26.3 %, *SDS* 2.1 %, así como 0.02 % de azul de bromofenol.

Solución amortiguadora de lisis denominada RIPA. Solución hecha de *TBS*, *NP-40* al 1%, deoxicolato de sodio al 0.5%, *SDS* 0.1%, azida de sodio al 0.006%.

Solución Blotto: Solución hecha de *TBSIX*, *Tween* 0.1 % y leche al 5 % que sirve para bloquear la membrana *PVDF* (ver definición) resultante de la electrotransferencia.

SREBP-1c. En inglés *Sterol regulatory element-binding protein 1*. Proteína de unión al elemento regulador de esteroides.

Sucralosa. Edulcorante hipocalórico que es aproximadamente 600 veces más dulce que el azúcar. Se forma a partir de sacarosa mediante un proceso de modificación química con cloro

lo que lo hace supuestamente no metabolizable por el organismo por la presencia de átomos de cloro, según sus fabricantes.

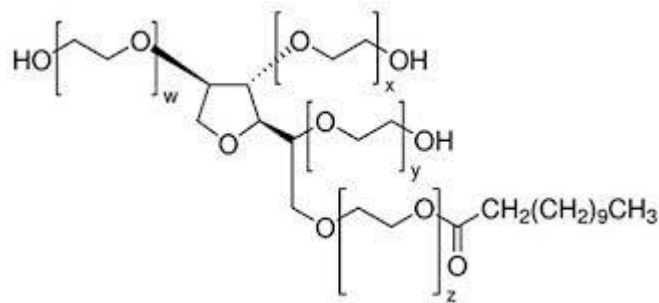
Suponer. Verbo transitivo. Considerar una cosa verdadera o real a partir de ciertos indicios o señales, sin tener certeza completa de ella (www.rae.es).

TBS. Solución de tris base y cloruro de sodio (NaCl) en agua destilada y pH neutro.

TEMED ®. Tetrametiletilendiamina por sus siglas en inglés, reactivo utilizado para catalizar la reacción de polimerización de la poliacrilamida.

TRIS base. Tris(hidroximetil)aminometano, es un compuesto orgánico con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Se usa en biología molecular como un componente de las soluciones amortiguadoras (*buffer* en inglés) especialmente en soluciones para ácidos nucleicos debido a su rango de pH (7-9). Hay *TRIS* base y *TRIS* HCl, los cuales se usan para amortiguar el pH de las proteínas y estabilizarlas.

TWEEN 0.1 %. Nombre comercial de un tensoactivo, también llamado polisorbato 20 N.F. El



polisorbato 20 o **monolaurato de polioxietilen(20)sorbitano**, conocido comercialmente como **Tween 20**, es un tensoactivo tipo polisorbato cuya estabilidad y supuesta ausencia de toxicidad permiten que sea usado como detergente y emulsionante en numerosas aplicaciones domésticas, científicas, alimentarias, industriales y farmacológicas. Es un aditivo alimentario aprobado por la Unión Europea, para uso en alimentos e identificada como E 432.

UGA. Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la UNAM, México.

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Western Blot. Procedimiento de inmunodetección de proteínas, en especial las que se encuentran en una baja concentración, que se fundamenta en la inmovilización de las proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa (Roca y Rodríguez, 2003).

X. Variable matemática que se usa para las pruebas de homocedasticidad. En estas definiciones estadísticas representa un valor en el grupo de edulcorantes.

X. Concentración de proteína (Ecuaciones 4.1 y 4.2).

Y. Absorbancia de la muestra a $\lambda=595\text{nm}$ (Ecuaciones 4.1 y 4.2)

Letras griegas

α . En estadística se le conoce como error de tipo I, su valor está dado por tablas.

σ . Desviación estándar.

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

RESUMEN

En México existen dos grandes problemas de salud pública dado el estilo de vida y la dieta alta en hidratos de carbono o carbohidratos, grasas, sal, así como de sustancias químicas conocidas como aditivos alimentarios, llevada por los mexicanos en el último medio siglo: la obesidad y la diabetes *mellitus*, lo cual ha llevado de manera simplista, a partir de finales del primer decenio de este siglo a culpar al azúcar y a las grasas saturadas y a permitir el ingreso en la dieta de los más conocidos aditivos alimentarios, los edulcorantes hipocalóricos, lo cual ha propiciado la disminución del consumo de azúcar. Por lo anterior es importante el evaluar si estos edulcorantes presentan un efecto benéfico o dañino sobre el metabolismo humano. En este estudio se evaluó la expresión relativa de la proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos, conocida como *ChREBP* por sus siglas en inglés, por medio de la metodología de *Western Blot*, en siete edulcorantes calóricos o nutritivos e hipocalóricos o no nutritivos: Fructosa, glucosa, sacarosa, una mezcla de acesulfame de potasio, aspartame:acesulfame, sacarina y sucralosa usando como controles a un grupo basal y a un grupo denominado control, los cuales, únicamente bebieron agua potable. Para ello, se contó con noventa ratas de la estirpe Wistar de las cuales 45 eran machos y 45 hembras, cada grupo de edulcorante y los grupos controles contaron con cinco especímenes de cada género. El grupo basal fue el único grupo al que se le realizó una eutanasia humanitaria pasados los 3 días del destete para conocer justamente su valor inicial sin ingerir ningún edulcorante. Transcurridos los 170 días de experimentación se procedió la segunda eutanasia humanitaria en donde se recolectaron los hígados para contar con un total de hígados de noventa ratas. Una vez obtenidos los hígados se procedió a la extracción de hepatocitos por medio de una ruptura mecánica, los extractos se cuantificaron por medio del método de Bradford mediante una curva estándar de globulina leída en un espectrofotómetro UV-Vis. Con la finalidad de obtener la expresión de la densidad óptica relativa de la proteína *ChREBP*, se aplicó la técnica de *Western Blot* en donde, en esta etapa de la investigación se observó que el edulcorante con mayor expresión de densidad óptica relativa fue el grupo que ingirió sacarina para ambos géneros. Otro de los edulcorantes calóricos con mayor expresión de densidad óptica relativa fue el Grupo Fructosa. En relación con el edulcorante con menor expresión de densidad óptica relativa difirió para ambos géneros, para las hembras el Grupo Mezcla Aspartame:Acesulfame, mientras que para los machos fue el Grupo Sacarosa, lo cual hace pensar que el género es un factor que influye en la expresión de *ChREBP* o por lo menos para ciertos edulcorantes. Se procedió con un análisis estadístico por medio de una prueba de análisis de varianza (ANDEVA), en el cual no se apreció ninguna diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes estudiados pero sí una diferencia significativa entre ambos géneros de las ratas de la estirpe Wistar.

Palabras clave: Consumo crónico de edulcorantes, fructosa, glucosa, sacarosa, acesulfame de potasio, mezcla acesulfame:aspartame, sacarina, sucralosa, expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*), tejido hepático, modelo animal Wistar, machos, hembras, destete a 170 días

CAPÍTULO 1

PROBLEMÁTICA

1.1 Introducción

En México, la industria azucarera es una de las más importantes debido a su relevancia económica y social en el campo, alcanzando en 2018 el sexto lugar en la producción mundial con 56,841,523.00 toneladas de azúcar de caña y el primer lugar en cuanto a producción nacional en el mismo año (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018). No obstante, hoy en día esta industria enfrenta cambios por una creciente sustitución y consolidación (por volumen y precio) de otros edulcorantes como son las mieles provenientes de los jarabes de maíz hidrolizados para dar las mieles fructosadas y los edulcorantes hipocalóricos, que en recientes años, han logrado penetrar en el consumo industrial y de los hogares (CONADESUCA, 2017; García-Chávez *et al.*, 2019; Secretaría de Economía, 2012).

A la par, existen dos problemas de salud pública que conducen a millones de mexicanos a limitar el consumo de glucosa: La obesidad y la diabetes. En 2018 se llevó a cabo la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) y con los datos encontrados extrapoliéndolos a la población total de México. Los autores encontraron que el 10.3% de la población nacional, 8.6 millones de personas, de veinte años en adelante padecen diabetes *mellitus* teniendo el mayor porcentaje de este padecimiento los estados de Campeche, Tamaulipas, Hidalgo, Ciudad de México y Nuevo León². También se calcularon, usando el índice de masa corporal, IMC, para los diferentes grupos de edad el porcentaje de población con un exceso de masa corporal u obesidad. Aquí es importante mencionar que hay autores que no están de acuerdo con esta manera de medir un parámetro tan importante como el exceso de masa corporal. Nuttal (2015), de hecho, recomienda que no se use por parte de las autoridades gubernamentales para realizar

² Estos datos se basaron en un método de muestreo que se presenta en el Anexo F, por lo que deben ser considerados de acuerdo con esas premisas (Romero-Martínez *et al.*, 2019)

políticas públicas, que es justamente lo que el gobierno mexicano ha estado haciendo desde hace diez años, al modificar la norma sobre etiquetado que en vez de mejorar la salud general la empeoró y, tristemente, la modificación que se acaba de aprobar al inicio de las políticas de sana distancia en marzo de 2020 probablemente tendrá efectos desastrosos, ya que no ataca de raíz a los aditivos alimentarios que, mezclados en los alimentos, sean muy probablemente los que estén causando estos efectos dañinos al metabolismo. Según la encuesta, para el grupo de 0-4 años un 8.2% tiene según su IMC exceso de masa corporal y 22.2% tiene riesgo de padecerla. Para el grupo de 5 a 11 años el 18.1% de población presentó exceso de masa corporal y un 17.5 % con obesidad, nuevamente usando el IMC. En el grupo de los 12 a 19 años, el 23.8% de población se presentó exceso de masa corporal y 14.6% de obesidad, concentrándose la mayor cantidad de población con estos datos en Veracruz para este grupo de edad en específico. Por último , a nivel nacional en el grupo de 20 años en adelante se encontró que el 39.1% padece exceso de masa corporal y el 36.1% de obesidad, nuevamente con base en el IMC. En esta encuesta a un segmento específico de la población, mayoritariamente los que recibieron el apoyo del programa gubernamental PROSPERA, los autores también observaron el consumo de alimentos no recomendables en cualquier grupo de edad, teniendo el mayor porcentaje el consumo de bebidas no-lácteas endulzadas, con un porcentaje de consumo cotidiano promedio de 85.13%. Además, también se reflejó el aumento en el consumo de alimentos procesados y la disminución en el consumo de alimentos recomendables (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018; Romero-Martínez *et al.*, 2019). La asesora de esta tesis escribió recientemente un artículo de divulgación donde señala la problemática social de quinientos años de clasismo reflejado en el deseo de consumir los productos que supuestamente dan “status” (Durán-Domínguez-de-Bazúa, 2020) siendo los alimentos y bebidas no alcohólicas procesadas, bienes que supuestamente lo dan.

Sin realizar estudios socio-económicos paralelos, muchos autores señalan que el consumo de los hidratos de carbono de harinas y otros productos, cuyo monómero es la glucosa, estarían relacionados con enfermedades como la obesidad, la diabetes *mellitus* y las enfermedades cardiovasculares (Navarro, 2006; Flores *et al.*, 2010; Rodríguez-Ramírez *et al.*, 2011). Dan como solución el aumento en el consumo de edulcorantes hipocalóricos con respecto del azúcar en la población (CONADESUCA, 2017; García-Chávez *et al.*, 2019). Dado que estos,

en teoría, no son metabolizados por el cuerpo y, por consiguiente, no proveen las 4 kcal/g que generan los carbohidratos como por ejemplo la glucosa (Baduí-Dergal, 2006), siendo sustancias que dan a las papilas gustativas la sensación exacerbada de dulzura que da la sacarosa, pero con un menor aporte energético, se agregan con la intención a los alimentos y bebidas no alcohólicas procesadas para disminuir el aporte calórico aunque teniendo que adicionar aditivos químicos para conservarlos ya que esa era la función original del azúcar como el benzoato de sodio, el sorbato de sodio, etc. (Fragoso-Martínez, 2015).

La obesidad es, teóricamente, un desequilibrio entre la ingesta energética y el gasto energético, ya que algunos corticosteroides hacen que la persona que los ingiere aumente su masa corporal de manera desmedida y los médicos no saben todavía qué está ocurriendo en el metabolismo. Los siguientes autores dicen lo siguiente (Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13780/>):

Efectos fisiológicos y farmacológicos de los corticosteroides
Lorraine I. McKay, PhD y John A. Cidlowski, PhD.

Los corticosteroides son reguladores clave de la homeostasis de todo el cuerpo que brindan al organismo la capacidad de resistir los cambios ambientales y la invasión de sustancias extrañas. Los efectos de los corticosteroides están muy extendidos e incluyen profundas alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos y la modulación del equilibrio de electrolitos y agua. Los corticosteroides afectan a todos los sistemas principales del cuerpo, incluidos los sistemas cardiovascular, musculoesquelético, nervioso e inmunológico y desempeñan funciones fundamentales en el desarrollo fetal, incluida la maduración del pulmón fetal. Debido a que muchos sistemas son sensibles a los niveles de corticosteroides, se ejerce un control regulador estricto sobre el sistema. Los efectos directos de los corticosteroides a veces son difíciles de separar de su compleja relación con otras hormonas, en parte debido a la acción permisiva de los niveles bajos de corticosteroides sobre la eficacia de otras hormonas, incluidas las catecolaminas y el glucagón. No obstante, los efectos de los corticosteroides se pueden clasificar en dos categorías generales: glucocorticoide (metabolismo intermedio, inflamación, inmunidad, cicatrización de heridas, integridad miocárdica y muscular) y mineralocorticoide (metabolismo de la sal, el agua y los minerales). ... , se debe enfatizar que los esteroides naturales poseen actividad tanto glucocorticoide como mineralocorticoide hasta cierto punto. La relación entre las dos actividades varía desde todos los glucocorticoides y casi ninguna actividad mineralocorticoide (cortisol) hasta todos los mineralocorticoides y casi ninguna actividad glucocorticoide (aldosterona).

Metabolismo intermedio

Los glucocorticoides estimulan la conversión de proteínas en carbohidratos a través de la gluconeogénesis y promueven el almacenamiento de carbohidratos como glucógeno. El aumento de nitrógeno urinario después de un aumento de glucocorticoides es el resultado de la movilización de aminoácidos de las proteínas y su posterior descomposición como fuente de carbono durante la gluconeogénesis. Los animales adrenalectomizados pueden funcionar normalmente siempre que haya alimentos disponibles (es decir, aminoácidos libres). Sin embargo, tras la inanición, estos animales no pueden movilizar los aminoácidos de las proteínas musculares

o séricas, lo que indica que el cortisol desempeña un papel en el proceso de movilización. ... El aumento de la gluconeogénesis / glucogénesis hepática se debe a los efectos directos de los glucocorticoides sobre la expresión hepática de genes que codifican las enzimas necesarias para la biosíntesis de glucosa y glucógeno. La exposición prolongada a glucocorticoides conduce a un estado similar al diabético debido al aumento de la glucosa plasmática, mientras que las concentraciones bajas de glucocorticoides producen hipoglucemia, disminución de las reservas de glucógeno e hipersensibilidad a la insulina. Los glucocorticoides también disminuyen la captación facilitada de glucosa en los tejidos periféricos para proporcionar más glucosa para la formación de glucógeno en el hígado. Este efecto es particularmente frecuente en los leucocitos y puede ser un factor importante que contribuya a la rápida elevación de la glucosa en sangre después de la administración de esteroides. Los complejos mecanismos de los efectos periféricos de los glucocorticoides aún no están claros, pero la administración crónica puede producir atrofia del tejido linfático y muscular, osteoporosis y adelgazamiento de la piel.

Hay dos efectos de los glucocorticoides sobre el metabolismo de los lípidos. Uno es la redistribución de la grasa corporal en el hipercorticismos; el otro es la facilitación de los efectos de los agentes lipolíticos. Grandes dosis de glucocorticoides conducen a la redistribución de la grasa hacia la parte superior del tronco y la cara, con una pérdida concomitante de grasa en las extremidades. No se sabe el mecanismo de este efecto, aunque estas respuestas aparentemente paradójicas pueden resultar de diferencias en el número de glucocorticoides receptores en diferentes tipos de células grasas. Según esta hipótesis, las células con menos receptores se salvarían de los efectos de los glucocorticoides sobre el transporte de glucosa. Por tanto, la acumulación de glucosa y triglicéridos se produciría en respuesta al aumento de los niveles de insulina. Las células grasas que contienen niveles más altos de receptor (quizás en la periferia) responderían al nivel alto de glucocorticoides disminuyendo la captación de glucosa y no acumularían triglicéridos. Alternativamente, las células de las extremidades pueden ser menos sensibles a la insulina. La movilización de grasa de los depósitos periféricos por la epinefrina y otros lipolíticos se reduce gravemente en ausencia de glucocorticoides. El cortisol facilita la respuesta de los adipocitos al aumento de cAMP inducido por estos. agentes en lugar de crear un aumento mayor en la cantidad de cAMP.

Y, si en la composición de la dieta se tienen sustancias químicas que han sido estudiadas de manera individual pero no en las combinaciones en las que están en estos alimentos y bebidas no alcohólicas procesadas, podrían tener efectos sinérgicos importantes sobre las rutas metabólicas. Por ello, deben estudiarse cada aditivo uno por uno y luego las mezclas adicionadas a estos productos procesados. Si en la dieta se incluye un exceso de carbohidratos se estimula la lipogénesis y la glucólisis y si la dieta es rica en lípidos, decrece su actividad. En los mamíferos, el hígado es el principal órgano responsable de la conversión del exceso de carbohidratos en lípidos por medio del proceso metabólico llamado lipogénesis (Dentin *et al.*, 2005; Miján de la Torre, 2004; Postic *et al.*, 2007; Poupeau y Postic, 2011).

El aumento de la lipogénesis es el resultado de la activación transcripcional de muchos genes que codifican enzimas glucolíticas y lipogénicas, incluyendo la glucoquinasa (GK), L-piruvatoquinasa (LPK) para la glucólisis y para la lipogénesis la ATP citrato liasa, Acetil CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS) con las siglas en paréntesis en inglés. Los

genes que codifican para las enzimas implicadas en la conversión del exceso de la glucosa en la dieta alta en grasa están controlados por factores de transcripción.

Dos factores de transcripción críticos para la inducción de genes lipogénicos son la isoforma 1 de la proteína de unión al elemento regulado por esteroides (SREBP-1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (Miján de la Torre, 2004; Poupeau y Postic, 2011). ChREBP es un factor que estimula la transcripción de las enzimas piruvatoquinasa (LPK), acetil carboxilasa (ACC) y ácido graso sintasa (FAS) (Dentin *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 2004), por lo que se volvió un objetivo potencial en cuanto a obesidad y a diabetes se refiere. Se sabe, por ejemplo, que la fructosa estimula en mayor medida a este factor de transcripción que la glucosa (Moore *et al.*, 2014). Adicionalmente, se sospecha que posiblemente los edulcorantes artificiales también logren su estimulación (Mendoza-Pérez, 2017).

Para estudiar el efecto de los edulcorantes nutritivos o calóricos y los no nutritivos o hipocalóricos a nivel metabólico, en esta tesis se estudió el efecto del consumo crónico de ambos tipos de edulcorantes. El efecto se midió con la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*), usando ratas de la estirpe Wistar considerando los dos géneros, hembras y machos. Los edulcorantes fueron adicionados al agua potable, simulando las bebidas endulzadas pero sin adicionar, colorantes artificiales, saborizantes artificiales o conservadores químicos como el benzoato de sodio, para evaluar solamente el efecto de ellos suministrados durante 170 días de experimentación.

1.2 Justificación

Los edulcorantes son sustancias muy utilizadas en la actualidad como sustitutos del azúcar debido a que se les han atribuido “efectos benéficos” y, si bien, han sido establecidos los efectos de toxicidad aguda de los edulcorantes hipocalóricos, aún hay dudas sobre cuál es la influencia en el consumo crónico de edulcorantes sobre la regulación de rutas energéticas como la lipogénesis y la glucólisis (Mendoza-Pérez, 2017). Por otro lado, existen estudios que parecen constatar la ineficacia de su uso e incluso muestran una determinada asociación causal

entre diversas patologías metabólicas como son la obesidad y la diabetes *mellitus* debido a su consumo (Cernuda-Martínez y Fernández García, 2016; Feijó *et al.*, 2013; Foletto *et al.*, 2016; Swithers *et al.*, 2013).

A continuación, se presenta la hipótesis de trabajo en el marco de los objetivos general y particulares que se citan más adelante.

1.3 Hipótesis de trabajo

La expresión relativa de *ChREBP* en los extractos hepáticos dependerá del tipo de edulcorante ingerido y del género del espécimen bajo estudio.

1.4 Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo crónico de edulcorantes sobre la expresión del factor de transcripción *ChREBP* en tejido hepático de modelos animales.

1.4.2. Objetivos particulares

a) Determinar la concentración proteica de los extractos de hepatocitos de ratas macho y hembra de la estirpe Wistar que ingirieron tres edulcorantes nutritivos o calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa), cuatro no nutritivos o hipocalóricos (acesulfame de K, mezcla de aspartame:acesulfame, sacarina y sucralosa) y dos controles con agua potable sin aditivo, un grupo basal y un grupo llamado control o blanco por medio de la metodología de Bradford sobre la expresión del factor de transcripción *ChREBP*.

b) Evaluar si la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*) en tejido hepático depende del género de los especímenes.

c) Establecer e implementar la técnica de *Western Blot* en los Laboratorios E-301-302-303 de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

d) Conocer el papel de los edulcorantes en la homeostasis energética y como factor de riesgo en la obesidad.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS

2.1. Edulcorantes

La sensación de dulzor en las personas puede ser provocada por un gran número de compuestos de estructuras químicas muy diferentes las cuales desempeñan una función muy importante hacia la aceptación o rechazo de los alimentos. La capacidad de una sustancia para causar la sensación de dulzura o poder edulcorante, se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa, a la que se le da un valor arbitrario de 1 (Baduí-Dergal, 2006).

Una manera de clasificarlos es conforme a su sensación de dulzura en las papilas gustativas y a su valor nutritivo resultando dos categorías: Edulcorantes nutritivos de poder edulcorante semejante a la sacarosa y edulcorantes no nutritivos y de mayor poder edulcorante que la sacarosa. Algunos ejemplos de estas sustancias son los edulcorantes que a continuación se mencionan y que serán estudiados en esta investigación. Están por orden alfabético.

2.1.1. Acesulfame de potasio

Es el derivado de potasio³ de los ácidos acetoacético y sulfámico con una estructura química semejante a la sacarina (Figura 1). Tiene de 150 a 200 veces más poder edulcorante que la sacarosa. Es estable al calor, muy hidrosoluble, mantiene sus propiedades sensoriales en un intervalo amplio de pH, no deja un resabio desagradable, a excepción de altas concentraciones y puede combinarse con otros edulcorantes. Se emplea en bebidas refrescantes, lácteos, panificación y dulces (Aldrete-Velasco *et al.*, 2017; Baduí-Dergal, 2006). El organismo internacional conocido como *JECFA* estableció su ingesta diaria admisible en 15 mg/kg masa corporal. Al ser hidrofílico y derivado de un ácido orgánico se absorbe rápidamente en el

³ En el diccionario de la lengua española se aceptan las palabras potásico, sódico, amónico, cálcico, las cuales desde el punto de vista químico no son correctas ya que no se han encontrado sales potasosas, sodosas, amoniosas o calzosas por lo que en esta tesis NO se usarán estos términos (nota de la asesora)

intestino delgado y, según sus fabricantes e investigadores afines a ellos, no se metaboliza en el cuerpo por lo que se excreta intacto por medio de la vía renal dentro de las 24 horas posteriores a su consumo (JECFA, 1981a; Magnuson *et al.*, 2016).

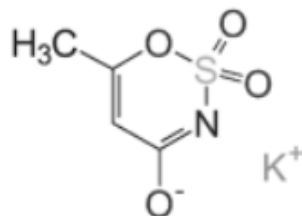


Figura 1. Estructura química del acesulfame de potasio (Magnuson *et al.*, 2016)

2.1.2. Aspartame

Este edulcorante no nutritivo o hipocalórico está constituido por los aminoácidos: ácido aspártico y fenilalanina en forma de un metil éster y se metaboliza como cualquier péptido (Figura 2). Es estable a pH 3-5 y pierde su poder fuera de este intervalo. Da una sensación de dulzor 200 veces mayor que el azúcar y no resiste el calentamiento por la hidrólisis del enlace éster metílico. No presenta resabio amargo. Su empleo se restringe a productos ácidos que no se someten a fuertes tratamientos térmicos, como las bebidas, refrescos y jugos. JECFA estableció en 1981, una ingesta diaria admisible de 40mg/kg de masa corporal (Baduí-Dergal, 2006).

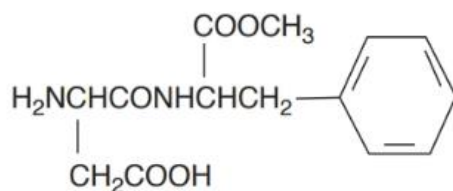


Figura 2. Estructura química del aspartame (Baduí-Dergal, 2006)

Después de ser ingerido, es rápidamente digerido en tres componentes fenilalanina, ácido aspártico y metanol (Magnuson *et al.*, 2016). Si bien la concentración de estos productos de digestión es menor que la obtenida por otros componentes naturales de la dieta, se ha especulado acerca de los potenciales daños neurológicos y en otros sistemas por sus metabolitos, como el metanol (Aldrete-Velasco *et al.*, 2017) y por el contenido de fenilalanina

el cual está restringido para las personas fenilcetonúricas debido a la carencia de la 4-mono-oxigenasa, enzima relacionada con el metabolismo de este aminoácido en el hígado. La acumulación de la fenilalanina o de sus derivados en la sangre provoca una mielización deficiente del cerebro y, en consecuencia, un retraso mental. Sin embargo, la ocurrencia de esta enfermedad en la población es muy baja (Baduí-Dergal, 2006). Existe una combinación de aspartame con acesulfame cuya composición es de un 64-36%, respectivamente. Estas mezclas se denominan en Europa con el código E-962. Su poder edulcorante con respecto del de la sacarosa es de 350 (García-Almeida *et al.*, 2013).

2.1.3. Fructosa

La fructosa es el glúcido reductor natural más dulce que la sacarosa, que se encuentra en algunas frutas y en algunas verduras, su concentración en ellas varía según su estado de madurez (Baduí-Dergal, 2006). También se conoce con el nombre de levulosa o azúcar de la fruta (Figura 3), aunque la que se consume viene de varias operaciones unitarias químicas aplicadas al maíz.

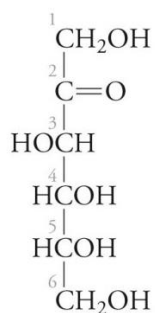


Figura 3. Estructura química de la fructosa (Pratt y Cornely, 2012)

En muchas comidas preparadas es un componente de los siropes de maíz llamados justamente altos en fructosa que no son naturales sino un producto químico y/o bioquímico de la hidrólisis de almidones para obtener glucosa y ésta, a su vez, es transformada en fructosa. Ha servido para emplear los enormes excedentes de maíz producidos en los Estados Unidos y que, al estar subsidiados gubernamentalmente, sus precios están muy por debajo de cualquier otro edulcorante natural, lo que ha provocado desde hace más de 30 años su empleo para endulzar refrescos⁴, postres y mermeladas (Thompson *et al.*, 2008). En México, son adicionados

⁴ Nombre dado en el centro y sur de México a las bebidas industrializadas no alcohólicas

además a productos de panificación, galletería y muchos otros alimentos procesados incluyendo lácteos y cárnicos. A estas mieles de fructosa-glucosa se les conoce como jarabes de alta fructosa o mieles fructosadas de maíz, aunque los fabricantes de alimentos y bebidas no alcohólicas que los adicionan usan el subterfugio de llamarlos *azúcares* en sus etiquetas con la complacencia de las organizaciones nacionales como la Procuraduría Federal del Consumidor, PROFECO, la COFEPRIS y la Secretaría de Salud, las tres de México e internacionales como el *Codex Alimentarius* y la Organización Mundial de la Salud y creando los errores de los periodistas, las propias autoridades gubernamentales y, tristemente, los consumidores, quienes creen que las bebidas “azucaradas” tienen azúcar cuando en realidad contienen estos jarabes sintéticos elaborados a partir de maíz estadounidense.

La fructosa entra en la vía glucolítica mediante dos caminos. La fructoquinasa de las células hepáticas convierte la fructosa en fructosa 1-fosfato que luego es dividida en DHAP y gliceraldehído. Luego el DHAP es convertido en gliceraldehído-3-fosfato por medio de la triosa fosfato isomerasa. El gliceraldehído-3-fosfato es generado a partir del gliceraldehído y del ATP mediante la quinasa de gliceraldehído. En los músculos y en el tejido adiposo, la fructosa es fosforilada por la hexoquinasa para formar el intermediario glucolítico fructosa-6-fosfato. Debido a que las hexoquinasas presentan una baja afinidad por la fructosa, esta reacción tiene una importancia menor a no ser que, el consumo de fructosa sea excepcionalmente elevado (McKee y McKee, 2009). Por otra parte, es sabido que este monosacárido es transformado en triacilglicéridos y que estos son acumulados en el organismo (Stanhope *et al.*, 2013, 2015; Stanhope y Havel, 2010).

2.1.4. Glucosa

Es el monosacárido más abundante en la naturaleza (Figura 4). La D-glucosa, llamada también dextrosa para diferenciarla de la fructosa o levulosa, se encuentra en cantidades importantes en todo el mundo vivo, se encuentra en diferentes frutas, como la manzana, la fresa y la uva. Su concentración depende básicamente del grado de madurez del producto. La glucosa se emplea comercialmente en la elaboración de gran número de alimentos y se obtiene de la hidrólisis controlada del almidón (Baduí-Dergal, 2006). Es el principal combustible de las células. En los animales, la glucosa es la fuente de energía de las células cerebrales y las células que

tienen pocas mitocondrias o que carecen de ellas, como los eritrocitos. Las células que tienen un aporte limitado de oxígeno como las del globo ocular, utilizan también grandes cantidades de glucosa para generar energía. Las fuentes alimentarias son el almidón de las plantas y los disacáridos lactosa, maltosa y sacarosa (McKee y McKee, 2009).

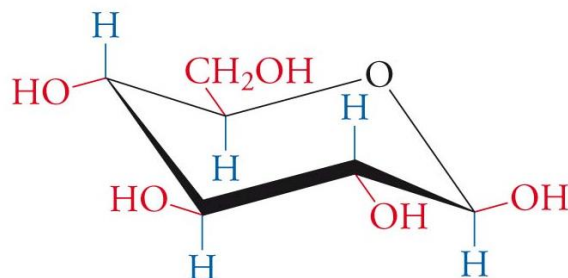


Figura 4. Estructura química de la glucosa (Pratt y Cornely, 2012)

La síntesis y la utilización de la glucosa son de gran importancia para el metabolismo de los carbohidratos. En los vertebrados, la glucosa se transporta en la sangre por todo el cuerpo. Cuando las reservas de energía celular son bajas, la glucosa se degrada por la vía glucolítica. Las moléculas de glucosa que no se requieren para producir energía inmediata se almacenan en forma de glucógeno en el hígado y en los músculos. Según sean las necesidades metabólicas de la célula, la glucosa también puede utilizarse para sintetizar otros monosacáridos, ácidos grasos y determinados aminoácidos (McKee y McKee, 2009).

2.1.5. Sacarina

Se obtiene a partir de la o-toluensulfonamida o de los anhídridos ftálicos y antranílico, su grado de dulzor es de aproximadamente 300 veces más dulce que la sacarosa, con el inconveniente de un resabio amargo metálico, sobre todo en altas concentraciones (Figura 5).

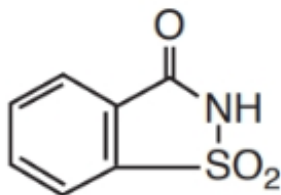


Figura 5. Estructura química de la sacarina (Baduí-Dergal, 2006)

Comercialmente se encuentra tanto en la forma de sal de sodio o de calcio o potasio, muy solubles en agua (600 g/L), estables a valores de pH entre 2 y 9 y a tratamientos térmicos moderados (Baduí-Dergal, 2006). Con una ingesta diaria admisible de 2.5 mg/kg de masa corporal, la sacarina se une reversiblemente a las proteínas plasmáticas y es distribuida a través de la sangre a los órganos del cuerpo (JECFA, 1981b; Cavagnari, 2019).

A pesar de que el hombre la elimina en la orina y heces, existe controversia sobre su inocuidad (Baduí-Dergal, 2006). En el decenio de 1970 se le vinculó con la aparición de cáncer. Posteriormente, sus fabricantes demostraron que el resultado no era relevante para los seres humanos. De manera reciente, estudios de modificación de la microbiota intestinal sugirieron que en dosis relativamente altas, podrían producir alteraciones en la tolerancia a la glucosa (Aldrete-Velasco *et al.*, 2017).

2.1.6. Sacarosa

Este glúcido llamado comúnmente azúcar de caña o de remolacha está integrado por una molécula de glucosa (verde) cuyo carbono aldehídico se une al cetónico de la fructosa (rosa) por medio de un enlace alfa (Figura 6).

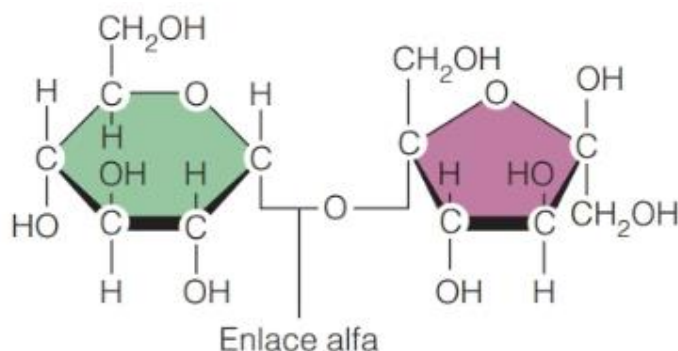


Figura 6. Estructura química de la sacarosa o azúcar de caña (Thompson *et al.*, 2008)

Al contener fructosa, es más dulce que la lactosa o la maltosa. Abunda de manera natural en casi todas las frutas. Algunas raíces como la remolacha, ciertos granos, leguminosas como los chicharos, la miel, el sirope de arce y algunas verduras deben su sabor dulce a la sacarosa. El azúcar de mesa, el azúcar moreno, el azúcar glas y otros muchos productos son obtenidos refinando la sacarosa encontrada en la caña de azúcar y en la remolacha (Baduí-Dergal, 2006;

Thompson, *et al.*, 2008). La sacarosa se dirige en el intestino delgado por medio de la enzima sacarasa, la cual proporciona una molécula de fructosa y otra de glucosa (McKee y McKee, 2009), donde son absorbidas y siguen los respectivos caminos metabólicos ya señalados para ambos glúcidos arriba.

2.1.7. Sucralosa

Es un derivado clorado que se sintetiza a partir de la sacarosa, dando la sensación de dulzor de 400 a 600 veces más que la que da el azúcar de caña. Es soluble en agua y estable en un rango de pH entre 3 y 7 y al calor (Figura 7). Su sabor dulce es semejante al de la sacarosa con la ventaja que no deja resabio en el paladar (Aldrete-Velasco *et al.*, 2017; Badui-Dergal, 2006). En 1991 se estableció la ingesta diaria admisible de 15 mg/kg de masa corporal por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (*JECFA*, por sus siglas en inglés). El cambio de tres grupos hidroxilos resulta en el cambio conformacional de la molécula por lo que las enzimas encargadas de hidrolizar la sacarosa y otros carbohidratos no pueden hidrolizar la molécula de sucralosa, por lo tanto al no ser digeridos en monosacáridos o metabolizados para la obtención de energía en el cuerpo se cree que no aportan calorías y no afectan los niveles de glucosa en la sangre (Magnuson *et al.*, 2016).

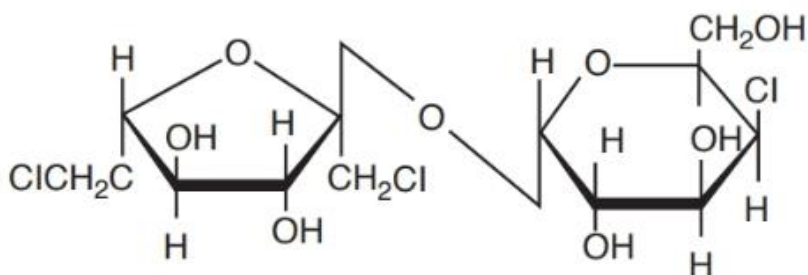


Figura 7. Estructura química de la sucralosa (Baduí-Dergal, 2006)

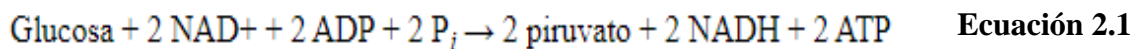
Según sus fabricantes, su absorción, metabolismo y distribución se han estudiado en diversas especies modelo, entre ellas el ratón, rata, perro, conejo y humano encontrándose que estas son similares entre las mismas especies con bajos niveles de absorción y poco o ningún metabolismo reportado. Supuestamente es excretada sin ningún cambio en las heces (Magnuson *et al.*, 2016). Sin embargo, otros autores consideran que daña al organismo (Gupta *et al.*, 2014; Soffritti *et al.*, 2016) e incluso a la microbiota intestinal (Suez *et al.*, 2014).

2.2. Rutas metabólicas

En los mamíferos, el hígado es el órgano crucial para mantener la homeostasis energética general y la conversión de carbohidratos a lípidos. Cuando la glucosa es liberada en grandes cantidades y las concentraciones de glucógeno son estables, es convertida en el hígado en lípidos (Postic *et al.*, 2007). Así, un incremento en grasa, resulta un desbalance entre las calorías ingeridas y la energía consumida, conduciendo a la obesidad, ocasionada por una baja actividad metabólica y un sobreconsumo de ácidos grasos, por lo que la actividad de las vías metabólicas dependerá de las condiciones nutrimentales. Una dieta rica en glucosa, fructosa o sacarosa estimula las rutas metabólicas de la lipogénesis y de la glucólisis, mientras que una dieta rica en lípidos disminuye su actividad (González-Muniesa *et al.*, 2017; Postic *et al.*, 2007).

2.2.1. Glucólisis

La glucólisis, también llamada vía de Embden-Meyerhof-Parnas, parece ser una vía metabólica antigua dado a que no requiere oxígeno, esto podría indicar su aparición antes de la fotosíntesis (Pratt y Cornely, 2012). Es un conjunto de reacciones de 10 pasos catalizadas enzimáticamente, que ocurren en todas las células por las cuales la glucosa proporcionada exógenamente o sintetizada endógenamente es degradada para la obtención de energía dando dos moléculas de piruvato, obteniendo así dos moléculas de ATP y dos de NADH como se aprecia en la Ecuación 2.1 (Lehninger *et al.*, 1993; McKee y McKee, 2009; Muller-Esterl, 2011; Pratt y Cornely., 2012).



La glucólisis se divide en dos fases. En la primera fase la hexosa se fosforila y se escinde por la mitad, en una fase preparatoria para que se lleve a cabo la segunda fase la cual requiere la inversión de la energía libre en forma de dos moléculas de ATP. En la segunda fase, las moléculas de tres carbonos se convierten en piruvato produciendo 4 moléculas de ATP, obteniéndose así una ganancia neta de 2 moléculas de ATP. El destino del piruvato que se

obtiene de esta vía metabólica depende del tipo de célula y de la necesidad energética. Uno de esos destinos es el de ser degradado a acetil-CoA, una molécula importante para la síntesis de ácidos grasos que son precursores de triacilgliceroles y muchos lípidos de membrana (Pratt y Cornely, 2012).

2.2.2. Lipogénesis

Los ácidos grasos son una fuente de energía importante y eficaz para muchas células. En los animales, la mayoría de los ácidos grasos se obtienen de la alimentación. Dependiendo de las necesidades metabólicas de un animal en un momento determinado, los ácidos grasos pueden convertirse en triacilgliceroles, degradarse para generar energía o utilizarse para la síntesis de membranas. Por ejemplo, tras la ingesta de alimentos, se libera insulina en respuesta a la elevada concentración sanguínea de glucosa. La insulina estimula el almacenamiento de triacilgliceroles al desactivar la lipasa sensible a hormonas y, también, al favorecer la síntesis de triacilgliceroles en células adiposas y musculares por medio de la lipogénesis (McKee y McKee, 2009). La lipogénesis comprende los procesos de síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos a partir de acetil coenzima A, llevándose a cabo principalmente en el hígado y en el tejido adiposo (Miján de la Torre, 2004). La síntesis de ácidos grasos comienza con la carboxilación de acetil-CoA en el citosol consumiéndose ATP. Esta síntesis es realizada por la acetil-CoA carboxilasa. Primero el CO₂ es “activado” por su unión a un grupo prostético biotina en una reacción que convierte ATP en ADP + Pi. A continuación, el grupo prostético carboxi-biotina transfiere el grupo carboxilato a acetil-CoA para formar malonil-CoA y regenerar la enzima. La malonil-CoA es el donador de las unidades acetilo que se usan para generar un ácido graso (Pratt y Cornely, 2012). La tasa de síntesis es controlada por la acetil-CoA carboxilasa. Esta enzima es inhibida por un producto de la vía y activada alostéricamente por el grupo citrato (Pratt y Cornely, 2012).

2.3. Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*)

En el hígado las enzimas encargadas de las vías metabólicas anteriores, como la ácido graso sintasa (*FAS*, por sus siglas en inglés) y la piruvato quinasa (*LPK*, por sus siglas en inglés),

son controladas por factores de transcripción. Uno de estos factores es la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*, por sus siglas en inglés) (Miján de la Torre, 2004).

La *ChREBP* es un factor de transcripción de la familia bHLH-Lz, siendo una proteína larga de 95 kDa y 864 aminoácidos, contiene varios dominios incluyendo una señal de localización nuclear (*NLS*, por sus siglas en inglés) y, varios sitios de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMPc y AMPK. Su estructura es muy conservada entre las especies, con una homología de secuencia del 82% entre el hombre, la rata y el ratón (Uyeda *et al.*, 2002; Uyeda y Repa, 2006; López-Oliva y Martínez, 2014).

La *ChREBP* induce la expresión del gen que codifica a la enzima piruvato quinasa en respuesta a las altas concentraciones de glucosa en el organismo, así como también la expresión del gen de la enzima ácido graso sintasa (*FAS*) importante en la lipogénesis (Postic *et al.*, 2007). En los hepatocitos, la actividad de *ChREBP* está regulada de forma aguda por una serie de reacciones de fosforilación/desfosforilación. Por eso, a bajas concentraciones de glucosa, la *ChREBP* existe en un estado inactivo, fosforilado en el citosol. Existen dos sitios principales de fosforilación de la proteína quinasa A (*PKA*, en inglés), el primero ubicado cerca de la señal de localización nuclear en Ser196, y el segundo, cerca del sitio de unión al ADN en Thr666. La desfosforilación de Ser196, permite la entrada de la *ChREBP* en el núcleo, mientras que la desfosforilación de Thr666 permite la unión del ADN. La proteína quinasa activada por una molécula de adenosín monofosfato (*AMP*, en inglés) también regula la *ChREBP* mediante la fosforilación de Ser568, una modificación que disminuye su capacidad de unión al ADN (Uyeda *et al.*, 2002; daSilva *et al.*, 2006).

2.4. Western Blot

Es un procedimiento de inmunodetección de proteínas, en especial de las que se encuentran en una baja concentración. Se fundamenta en la inmovilización de las proteínas sobre una membrana de nitrocelulosa, con una previa separación por electroforesis tipo *SDS-PAGE*. Una vez inmovilizadas las proteínas, se produce un proceso inmunológico con dos anticuerpos: un

anticuerpo primario específico de la proteína que quiere estudiarse y un anticuerpo secundario comercial contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se ha obtenido el anticuerpo primario. El anticuerpo secundario se encuentra conjugado con una enzima utilizando el sustrato adecuado, el cual provoca la emisión de luz (Roca *et al.*, 2003).

A continuación se resumen los pasos para llevar a cabo el método de Western Blot, los cuales son electroforesis, electrotransferencia, la unión a los anticuerpos y la quimioluminiscencia. Para la electroforesis se instala un aparato vertical con amortiguamiento catódico (-) en una cámara superior y amortiguamiento anódico (+) en una cámara inferior. Las moléculas en los pozos de muestra migran hacia el ánodo (+) en un campo eléctrico. Después de un tiempo establecido, las moléculas habrán migrado a posiciones basadas en su tamaño, forma y carga (Figura 8) (Lee, 2007).

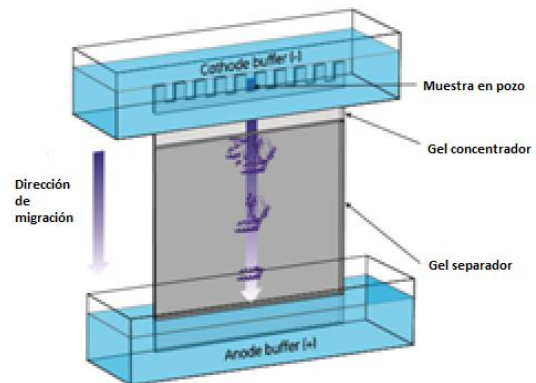
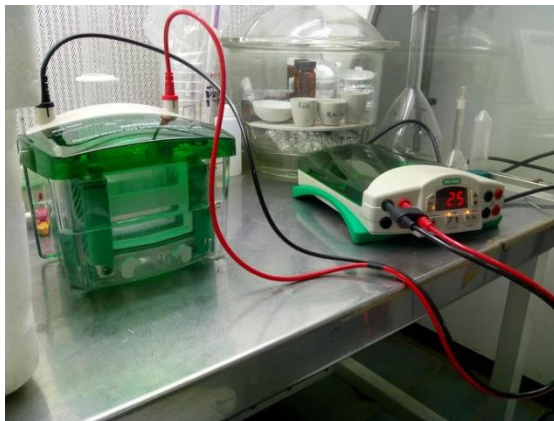


Figura 8. Equipo de electroforesis montado y un ejemplo de su funcionamiento (Lee, 2007)

Después se lleva a cabo la electrotransferencia donde el gel se pone en contacto con la membrana y las proteínas migran luego hacia el ánodo cargado positivamente (+) en un campo eléctrico. Es importante que la transferencia sea lo más uniforme posible en toda el área del sándwich de gel (Figura 9) unido a una membrana para garantizar que las proteínas grandes y pequeñas sean transferidas con una eficiencia similar (Lee, 2007). La técnica de *Western Blot* implica la inmovilización de biomoléculas sobre una membrana vía interacciones hidrofóbicas (Figura 10) (Lee, 2007). Y, debido a la unión de anticuerpos, es esencial que los espacios que no ocupen las proteínas del extracto proteico sean bloqueados, o bien que estos sean ocupados por una proteína conocida que no se una con los anticuerpos que se utilizarán a continuación.

Posterior al bloqueo, la proteína de interés se detecta por el uso de anticuerpos. El anticuerpo primario, específico para la proteína de interés, así como el anticuerpo secundario, específico para el anticuerpo primario, serán los que generen una señal que puede ser cuantificada por quimioluminiscencia (Figura 11) (Lee, 2007).



Figura 9. “Sándwich” para electrotransferencia

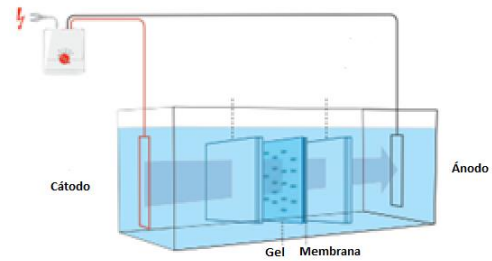


Figura 10. Equipo *BioRad*® donde se realiza la electrotransferencia y un ejemplo de su funcionamiento (Lee, 2007)

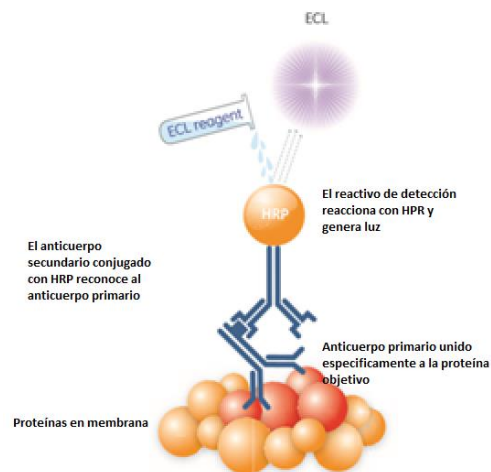


Figura 11. Principio de quimioluminiscencia en la técnica de Western Blot (Lee, 2007)

2.5. Conceptos estadísticos empleados en el análisis de este estudio

2.5.1. Media

Las medidas de tendencia central proporcionan información sobre la posición o localización de los datos observados. Entre las medidas de este tipo se encuentran la media, la mediana o la moda. La media se interpreta como el promedio de los datos y se construye de forma que intervienen todos los datos observados en su cálculo de la Ecuación 2.2

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \qquad \text{Ecuación 2.2}$$

donde: “ x_i ” son las observaciones variables y “ n ” es el número total de observaciones. Esta medida se sitúa en el centro de gravedad de la distribución, por lo que es una medida sensible a observaciones atípicas o extremas. De este modo, un valor alejado del resto, situaría esta medida en un valor poco representativo del conjunto de datos (Moncho, 2015).

2.5.2. Variación y desviación estándar

Las medidas de tendencia central proporcionan información sobre la localización de los datos, pero no sobre la dispersión o variabilidad con las que se sitúan en torno a estas. Es necesario, por lo tanto, disponer de medidas que informen sobre la dispersión de los datos. La desviación típica o estándar es la medida de dispersión más utilizada por sus propiedades y porque involucra a todos los datos en su construcción. La idea es obtener una medida de la distancia de cada dato a la media. Cuanto mayor sea la media más alejados estarán los datos de la media y existirá una mayor dispersión o variabilidad. La varianza como el promedio de las distancias, al cuadrado, de cada dato a la media, se expresa en unidades al cuadrado de la variable. Para conseguir una medida en las mismas unidades que la variable, se extrae la raíz cuadrada, obteniéndose así la desviación estándar como se aprecia en la Ecuación 2.3 (Moncho, 2015):

$$s^2 = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n} \quad s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde: “S” es la desviación estándar, “ x_i ” son las observaciones variables, “ \bar{X} ” es el promedio de las observaciones y “n” es el número total de observaciones.

2.5.3. Pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk)

La prueba de Shapiro-Wilk es un procedimiento estadístico que evalúa numéricamente la evidencia de ciertos tipos de no normalidad en los datos, como en el caso de las gráficas de probabilidad normal. Se basa en medir el ajuste de los datos a una recta probabilística normal. Si el ajuste fuera perfecto los puntos formarían una recta de 45°. El estadístico de contraste se expresa por medio de la Ecuación 2.4 (Samuels *et al.*, 2012).

$$w = \frac{1}{\sum_{j=1}^n (x_j - \mu)^2} \left[\sum_{j=1}^h a_{j,n} (x_{(n-j+1)} - x_j) \right]^2 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

donde: “n” es el número de datos, “ x_j ” es el dato en orden ascendente de la muestra que ocupa el lugar “j”, “ μ ” es la media, “h” es “n/2” si “n” es par, o “(n-1)/2” si “n” es impar y “ $a_{j,n}$ ” es un valor tabulado.

Una vez calculado el estadístico “w”, se contrasta con un valor “w” crítico para el nivel de significación elegido. Como este estadístico mide el ajuste a una recta y no la distancia a la distribución “Normal”. La hipótesis nula es aceptada cuando el valor “w” es superior al valor de contraste tabulado (Guisande González *et al.*, 2006).

2.5.4. Valores atípicos

Cuando se analizan datos, es importante identificar y considerar los valores atípicos porque pueden afectar significativamente los valores de algunos datos estadísticos, como los mencionados anteriormente. Un valor atípico es una observación con un valor que no parece corresponderse con el resto del grupo de datos (Murphy y Lau, 2008; Triola *et al.*, 2018).

2.5.4.1. Prueba de Dixon

Esta prueba utiliza relaciones de los espacios entre datos de diferentes modos según la cantidad de valores en el grupo de datos. Este valor se compara con un valor crítico de una tabla y el valor se declara valor atípico si supera ese valor crítico. El valor crítico depende del tamaño de la muestra, “ n ”, así como de un nivel de representatividad elegido, que es el riesgo de rechazar una observación válida. La tabla por lo general utiliza niveles de baja representatividad tales como 1 o 5% (Murphy y Lau, 2008).

2.5.4.2. Prueba de Grubbs

Esta prueba fue publicada por Frank E. Grubbs en 1950 y se le conoce también como prueba de valores “estudentizados” o prueba gaussiana. Es ampliamente utilizada debido a su simplicidad, aunque por esto mismo tiene algunas limitaciones. Entre éstas se encuentra que solamente permite determinar la probabilidad de muestras provenientes de una distribución normal (Vilalta, 2016). En ella se utiliza una estadística de prueba, “ t ”, que es la diferencia absoluta entre el valor atípico, “ x_0 ”, y el promedio de la muestra “ \bar{X} ” dividida por la desviación estándar de la muestra (Murphy y Lau, 2008).

2.5.4.3. Gráficas de caja y bigotes

Las representaciones gráficas proporcionan una imagen que permiten extraer conclusiones rápidas sobre el comportamiento de la variable en estudio. Dependiendo del tipo de variable será más oportuno utilizar un tipo de representación u otro. El diagrama de cajas y bigotes es un gráfico propio para representar variables cuantitativas continuas, de razón o intervalo, las cuales se especifican como las que toman valores infinitos no numerables (Moncho, 2015). Algunas paqueterías o *software* estadístico proporcionan gráficas modificadas que representan valores extremos como puntos especiales a los que se les conoce como gráficas de caja modificada. Una gráfica de caja modificada contiene los siguientes elementos: un símbolo especial para identificar valores atípicos y la línea horizontal sólida la cual, solamente se extiende hasta el valor de datos mínimo que no es atípico y máximo que tampoco es atípico (Triola *et al.*, 2018).

2.5.5. Análisis de varianza (ANDEVA)

El análisis de varianza, conocido como ANDEVA, es un método de prueba de igualdad de tres o más medias poblacionales resultante de la extensión natural de la prueba “*t*”, por medio del análisis de las varianzas muestrales (Moncho, 2015; Triola *et al.*, 2018). El análisis de varianza de un factor se utiliza con datos clasificados con base en un tratamiento o factor, que es una característica que permite distinguir entre sí a las distintas poblaciones (Triola *et al.*, 2018). Para aplicar correctamente el análisis de varianza, ANDEVA, se debe suponer que las observaciones son normales, independientes y con la misma varianza para cada grupo o bien deben ser homocedásticas (Mongay-Fernández, 2005).

2.5.6. Homocedasticidad

La homocedasticidad implica que la varianza de la variable dependiente debe ser constante, es decir, para cualquier valor de la variable explicativa la varianza de la variable dependiente será la misma. La falta de homocedasticidad influye en la varianza de los estimadores, invalidando las expresiones del contraste F del ANDEVA. Para la evaluación analítica de esta existen varias posibilidades como los contrastes de Gresjer, Brensh-Pagan Levene o White (Moncho, 2015). Todas las pruebas de homocedasticidad contrastan la hipótesis nula de que la varianza de una variable en X en los K grupos es la misma, de forma que si el valor de σ asociado al estadístico de contraste es menor que el valor de α se rechazará la hipótesis nula al nivel de significancia del α establecido (Mongay-Fernández, 2005). La prueba de Levene es una prueba que analiza la homogeneidad de las varianzas y es menos dependiente del supuesto de “normalidad”. Para ello, se calcula para cada dato experimental la diferencia absoluta entre su valor y la mediana de su grupo, llevándose a cabo un análisis de la varianza de un factor sobre esas diferencias, lo cual proporciona un valor de F y su correspondiente valor de σ que corresponden a los estadísticos de la prueba de Levene. En caso de que el experimento tenga varias variables dependientes, la prueba se aplicará independientemente a cada una de ellas (Mongay-Fernández, 2005).

Capítulo 3

Metodología

En la **Figura 12** se aprecia el diagrama de bloques general de la investigación.

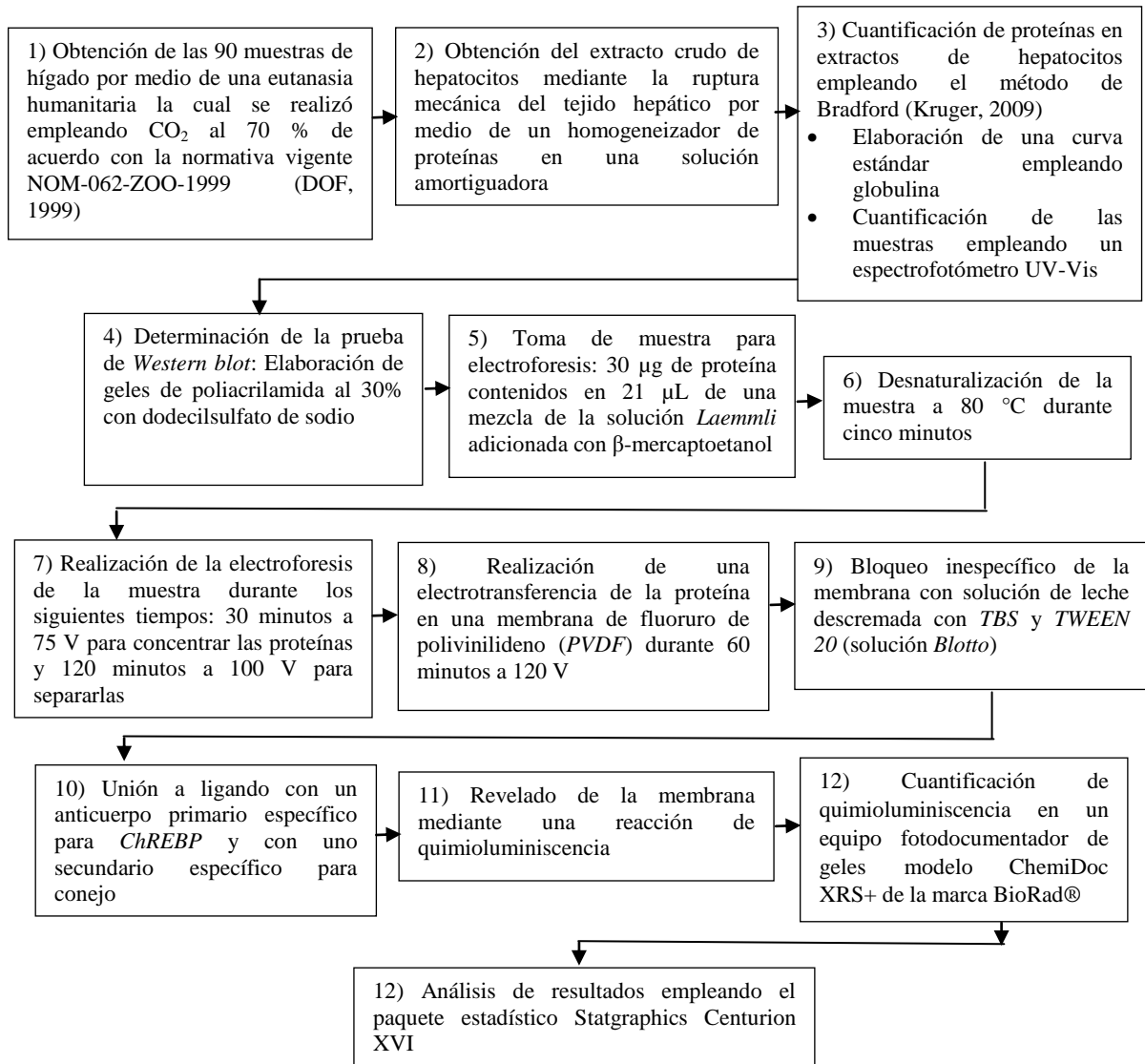


Figura 12. Diagrama general del proceso de la investigación

3.1. Obtención de las 90 muestras de hígados

En este estudio, que abarcó los primeros 170 días del estudio global “Efecto del consumo de edulcorantes sobre la actividad de las enzimas reguladoras de la glucólisis y lipogénesis en extractos de hepatocitos y sus implicaciones metabólicas sobre el exceso de masa corporal y la obesidad”, se analizaron 90 extractos de hepatocitos de hígados provenientes de 90 ratas macho y hembra de la estirpe Wistar recién destetadas. De ellas, 70 consumieron la dieta Teklad Global 21D y los edulcorantes nutritivos o calóricos: glucosa, fructosa y sacarosa y los no nutritivos o hipocalóricos: acesulfame de potasio, mezcla de aspartame:acesulfame, sucralosa y sacarina, de manera *ad libitum*, siendo el criterio para su selección su empleo habitual por la industria alimentaria en concentraciones similares a las encontradas en su momento en las bebidas no alcohólicas comerciales con un dulzor equivalente a una solución de sacarosa al 10%. Las 20 ratas macho y hembra restantes consumieron la dieta y agua potable sin aditivos siendo el control del experimento. Fueron divididas en dos grupos de 10 especímenes cada uno (5 ratas macho y 5 hembras). Al primer grupo, denominado Grupo Basal se le realizó la eutanasia humanitaria a los 3 días de ser destetadas para analizar sus hígados. El segundo grupo, Grupo Control, permaneció con los otros 7 grupos durante los 170 días considerados. Al término de este lapso se realizó una segunda eutanasia humanitaria empleando CO₂ al 70 % de acuerdo con la normativa vigente NOM-062-ZOO-1999 (DOF, 1999). Con la ayuda del M. en C. Gerardo Salas Garrido, especialista en el ramo de histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM se disectaron los 90 hígados. Se pesaron y almacenaron lo más rápidamente posible a -70°C mediante ultracongelación para su estudio posterior.

3.2. Obtención de extractos crudos de hepatocitos (Mendoza-Pérez, 2017)

Los extractos crudos de hepatocitos se obtuvieron de la ruptura mecánica del tejido hepático por medio de un homogeneizador de proteínas en una solución amortiguadora de lisis denominada *RIPA*, la cual contiene *TBS* (solución que lleva *Tris base* 50 mM, NaCl 150 mM y debe tener un pH de 7.6), *NP-40* (nonil-fenol-polietilenglicol éter al 1%), deoxicolato de sodio 0.5%, dodecilsulfato de sodio (*SDS*) y azida de sodio 0.006%.

Para ello, se mezclaron 10 mL de la solución amortiguadora *RIPA*, una pastilla de inhibidores de proteasas “*complete mini*®”, 100 μL de una solución de NaF 100 mM y 200 μL de Na_3VO_4 100 mM. Se tomaron 200 μL de la solución anterior en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se añadieron entre 100-300 mg de hígado congelado de cada espécimen. El hígado se homogeneizó utilizando un homogeneizador de proteínas modelo PELLET PESTLE®, a una temperatura de 4°C, agregándose 800 μL de la solución preparada anteriormente (solución *RIPA*). Inmediatamente después se sometió a una agitación en un equipo vórtex modelo Genie-2 a su máxima potencia (3200 rpm), para centrifugar el sobrenadante en una microcentrífuga modelo 540 marca Eppendorf® a 14000 rpm (F: 1052 x g) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se almacenó (a -20°C) para su uso posterior.

3.3. Cuantificación de proteínas en extractos de hepatocitos por el método de Bradford

A los extractos crudos de hepatocitos se les cuantificaron la concentración de proteínas empleando el método de Bradford que se cita a continuación (cabe mencionar que la selección de este método, fue debido a la sensibilidad presentada ante las muestras de hepatocitos así como la de presentar la menor cantidad de interferencia con respecto de la solución extractiva de lisis).

Para ello, se construyó una curva estándar con globulina con las siguientes concentraciones 8.8×10^{-3} , 1.1×10^{-2} , 1.32×10^{-2} , 1.54×10^{-2} y 1.76×10^{-2} en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A cada tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se le añadieron 200 μL del reactivo de Bradford (elaborado con 100 mg de Azul de Coomassie disuelto en 50 mL de etanol y 100 mL de ácido fosfórico al 85% ajustado a 1 L de agua), midiéndose la absorbancia de cada 400 μL de muestra de extracto en un espectrofotómetro a una λ de 595 nm. Las concentraciones de proteína de los extractos de hepatocitos de cada rata se obtuvieron mediante la interpolación de sus absorbancias en la curva estándar (Kruger, 2009).

3.4. Determinación de la prueba de *Western blot*

Una vez que se cuantificó el contenido de proteína de los extractos de hepatocitos se procedió a realizar la técnica de *Western blot*, la cual, permite la transferencia de proteínas desde un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (*PAGE-SDS*, en inglés) a una membrana de fluoruro de polivinilideno (*PVFD*, en inglés). Los pasos de la técnica de *Western Blot* se presentan a continuación: 1) Elaboración del gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (ver abajo), 2) Realización de la electroforesis de la muestra a diferentes tiempos como se describe abajo, 3) Realización de la electrotransferencia (ver abajo), 4) Bloqueo inespecífico de la membrana con solución *Blotto* de leche descremada con *TBS* y *Tween 20*® (ver abajo), 5) Unión al ligando formado con un anticuerpo primario específico para *ChREBP* (ver abajo), 6) Unión de un anticuerpo secundario específico para conejo (ver abajo) y, finalmente, 7) Realización del revelado de la membrana mediante una reacción de quimioluminiscencia (García-Segura *et al.*, 2007; Kurien y Scofield, 2006).

3.4.1. Elaboración de gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Para el gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (*PAGE-SDS*, en inglés) se elaboró un gel separador al 10%, con agua desionizada, solución Tris 1.5M con un pH 8.8, solución de dodecilsulfato de sodio (*SDS*) al 10%, poliacrilamida 30%, solución de persulfato de amonio al 10%, reactivo TEMED ® (N, N, N', N'-tetrametiletilenoamida) y un gel concentrador al 4%, que contiene agua desionizada, solución Tris 0.5M con un pH 6.8, solución SDS al 10%, poliacrilamida al 30%, persulfato de amonio al 10% y reactivo TEMED®.

3.4.2. Realización de electroforesis de los extractos de hepatocitos

Para realizar la electroforesis de los extractos de hepatocitos de los grupos de edulcorantes, en cada pozo del gel de poliacrilamida se añadieron los μL de muestra necesarios para aportar 30 μg de proteína, junto con la solución 19:1 de β -mercaptoetanol y la solución amortiguadora Laemmli 2X BioRad ®, la cual contiene solución *Tris*-HCl 65.8mM a un pH de 6.8, glicerol 26.3%, SDS 2.1%, así como 0.02% de Azul de bromofenol, en una proporción 2:1 siendo depositada en un tubo de microcentrífuga. La mezcla de la muestra con la solución Laemmli fue sometida a un proceso de desnaturalización en un horno marca Arsa durante 10 minutos a

80°C. Una vez terminado este proceso se cargaron 21 µL de cada preparación en los pozos del gel de poliacrilamida y se usó un marcador de masa molecular llamado “Blueye Protein Ladder” de la marca Sigma-Aldrich®. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis BioRad® durante 30 minutos a un voltaje de 75 V para concentrar la proteína. Posteriormente, la muestra fue corrida durante 120 minutos a 100 V para separar las proteínas del extracto hepático empleándose una solución amortiguadora de corrida la cual contiene solución Tris base 0.25 mM, glicina 1.93 mM y SDS 1% ajustada a un pH de 8.3. Para determinar los µL de cada extracto que fueron añadidos en cada pozo se aplicó la **Ecuación 3.1**.

$$\mu L \text{ de extracto} = 30 \mu g \text{ de proteína en extracto} \left(\frac{1}{\frac{\mu g \text{ de proteína}}{\mu L \text{ de extracto}}} \right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Por ello, esta evaluación se hace como un paso posterior al de haber determinado el contenido de proteína por volumen de extracto.

3.4.3. Realización de la electrotransferencia a la membrana de fluoruro de polivinilideno

La electrotransferencia a la membrana de fluoruro de polivinilideno (Immobilion®-P Transfer, membranas de 0.45 µm) se realizó en la cámara de electrotransferencia marca BioRad®, durante 60 minutos con un voltaje de 120 V. Para la transferencia se elaboró una solución amortiguadora de transferencia llamada Schafer-Nielsen, la cual contiene: Tris base 60 mM, glicina 40 mM, SDS 0.04% y metanol al 20%.

3.4.4. Bloqueo inespecífico de la membrana de fluoruro de polivinilideno

El bloqueo de la membrana se realizó con la solución *Blotto* de la marca BioRad® al 5%. La membrana fue sumergida durante una hora con una agitación constante de 120 rpm a temperatura ambiente en una incubadora orbital de la marca SEV.

3.4.5. Unión de los anticuerpos primario y secundario

La unión del ligando (unión de un anticuerpo específico con una proteína) se realizó con el anticuerpo comercial primario anti-actina de la marca Sigma-Aldrich® empleando una

dilución de 1:5000 y el anticuerpo comercial anti-*ChREBP* de la marca *abcam*® con número de catálogo *ab92809* con una dilución 1:1000. La membrana se incubó durante toda la noche a 4°C bajo agitación constante a 120 rpm. Posteriormente, se realizaron tres lavados a temperatura ambiente con una solución de lavado (*TBS IX* con *Tween 20*® al 0.1%) bajo agitación constante a 150 rpm. Como anticuerpo secundario se usó el anticuerpo anti-ratón de la marca Sigma-Aldrich® con una dilución de 1:2500 para el anticuerpo primario anti-actina. Se usó también el anticuerpo anti-conejo de la marca Sigma-Aldrich® con número de catálogo A0545-1ML con una dilución de 1:2500 para el anticuerpo primario anti-*ChREBP* bajo una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante de 120 rpm. Al terminar la incubación se realizaron tres lavados a temperatura ambiente con una solución de lavado (*TBS IX* con *Tween 20*® al 0.1% bajo agitación constante a 150 rpm y se prosiguió con el revelado de la membrana.

3.4.6. Revelado de las membranas mediante una reacción de quimioluminiscencia

La detección de *ChREBP* se realizó en un equipo fotodocumentador de geles modelo ChemiDoc XRS+ de la marca BioRad® teniendo como reactivo revelador luminol a 250mM, peroxidasa al 30% y 90mM ácido p-cumárico, con un tiempo de revelado de 100 segundos. Los análisis cuantitativos y de normalización fueron realizados bajo el software de *ImageJ*® e *Image Lab*®.

3.5. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Los datos obtenidos se analizaron empleando el programa Statgraphics Centurion XVI donde se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, en este mismo se identificaron valores atípicos bajo las pruebas de Grubbs, así como las gráficas de cajas y bigotes, para continuar con una prueba de Levene para la homocedasticidad y un análisis de varianza (ANDEVA) entre los grupos de edulcorantes así como entre el género de las ratas para determinar la existencia de diferencias significativas de la proteína *ChREBP* en alguno de ellos.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuantificación de proteínas empleando el método de Bradford

Para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se realizó una curva patrón con γ -globulina obteniendo los resultados observados en la Figura 13 y en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados de absorbancia para la curva patrón con γ -Globulina

Globulina [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Absorbancia 595 nm			Media ABS 595 nm	% coeficiente de variación
	1	2	3		
0	0	0	0	0	-
0.0088	0.103	0.097	0.093	0.0977	5.153
0.011	0.138	0.14	0.14	0.1393	0.829
0.0132	0.159	0.163	0.157	0.1597	1.913
0.0154	0.172	0.179	0.166	0.1723	3.775
0.0176	0.218	0.194	0.198	0.2033	6.324

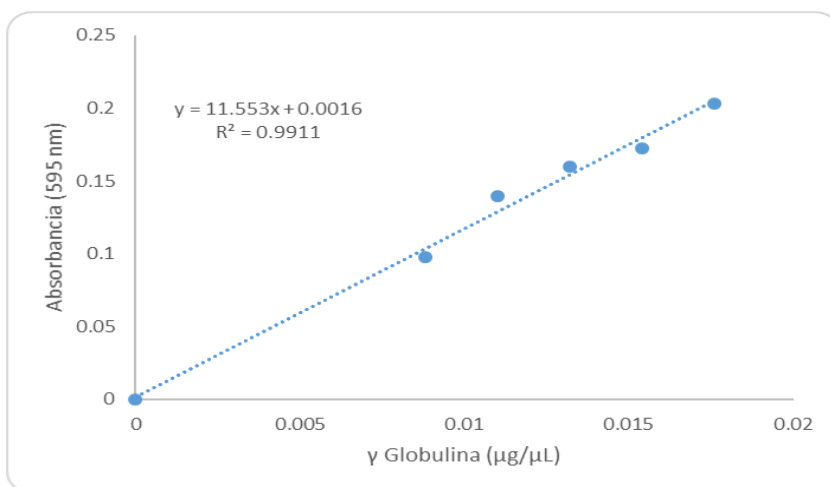


Figura 13. Curva patrón de γ Globulina por el método de Bradford

Partiendo de la curva patrón de globulina se obtuvo el valor de R^2 el cual fue de 0.991, lo cual se interpreta como adecuado y recomendado para esta técnica (Kruger, 2009).

Posteriormente, se sustituyó el valor de la pendiente y la ordenada al origen obtenidos de la curva patrón en la ecuación de la recta **Ecuación 4.1** para obtener la **Ecuación 4.2** la cual sirvió para obtener la concentración de proteína en las muestras por medio de una interpolación del valor de la absorbancia.

$$Y = mX + b \quad \text{Ecuación (4.1)}$$

donde:

Y= absorbancia de la muestra a $\lambda=595\text{nm}$

m= pendiente

X= concentración

b=ordenada al origen

$$Y = 11.553X + 0.0016 \quad \text{Ecuación (4.2)}$$

Aplicando la **Ecuación 4.2**, así como la interpolación de las absorbancias obtenidas por las diluciones de las muestras en la curva patrón (**Figura 13**), se multiplicó por el factor de dilución obtenido de manera experimental y, de esta forma, se calculó la concentración del extracto de hepatocitos expresado en g/L. A continuación se muestra un ejemplo del cálculo de la concentración de proteína aplicando la **Ecuación 4.3** y la **Ecuación 4.4**:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia} - 0.0016}{11.553} \quad \text{Ecuación (4.3)}$$

Y al aplicarse el factor de dilución se obtuvo la **Ecuación 4.4**:

$$\frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de dilución}} \times \frac{\mu\text{L de dilución}}{\mu\text{L de extracto}} = \frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de extracto}} \quad \text{Ecuación (4.4)}$$

Ejemplo usando la muestra de la rata hembra codificada con el número 56 que ingirió agua con sucralosa: Sucralosa H56:

$$\text{Concentración} = \frac{0.177 - 0.0016}{11.553} = 0.0152$$

$$0.0152 \frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de dilución}} \times \frac{10000 \mu\text{L de dilución}}{1 \mu\text{L de extracto}} = 152.110 \frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de extracto}}$$

A continuación, de las **Tablas 2** a la **10** se muestran, acomodadas por grupos, las concentraciones de proteínas de todos los extractos hepáticos de las muestras.

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Basal

Muestra	Masa de hígado (g)	Dilución	Absorbancia 595 nm			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
BM1	0.282	1:10000	0.141	0.148	0.144	0.144	2.433	0.012	123.547
BM2	0.237	1:10000	0.143	0.149	0.15	0.147	2.570	0.013	126.143
BM3	0.228	1:10000	0.085	0.095	0.086	0.089	6.212	0.008	75.363
BM4	0.304	1:10000	0.138	0.137	0.133	0.136	1.945	0.012	116.333
BM5	0.134	1:10000	0.107	0.112	0.113	0.111	2.905	0.009	94.405
BM6	0.151	1:10000	0.17	0.174	0.168	0.171	1.790	0.015	146.340
BM7	0.302	1:10000	0.185	0.19	0.196	0.190	2.894	0.016	163.363
BM8	0.310	1:10000	0.156	0.156	0.148	0.153	3.012	0.013	131.337
BM9	0.313	1:10000	0.157	0.15	0.151	0.153	2.480	0.013	130.760
BM10	0.170	1:10000	0.169	0.179	0.18	0.176	3.456	0.015	150.956
BH1	0.186	1:10000	0.163	0.163	0.164	0.163	0.353	0.014	139.992
BH2	0.139	1:10000	0.147	0.149	0.16	0.152	4.605	0.013	130.183
BH3	0.224	1:10000	0.17	0.171	0.177	0.173	2.193	0.015	148.071
BH4	0.264	1:10000	0.149	0.141	0.149	0.146	3.156	0.013	125.278
BH5	0.100	1:10000	0.153	0.155	0.156	0.155	0.988	0.013	132.491
BH6	0.124	1:10000	0.181	0.174	0.174	0.176	2.292	0.015	151.245
BH7	0.288	1:10000	0.122	0.117	0.114	0.118	3.435	0.010	100.465
BH8	0.188	1:10000	0.142	0.156	0.143	0.147	5.313	0.013	125.855
BH9	0.274	1:10000	0.07	0.07	0.071	0.070	0.821	0.006	59.494
BH10	0.212	1:10000	0.142	0.145	0.141	0.143	1.459	0.012	122.104

Tabla 3. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Control

Muestra	Masa de hígado (g)	Dilución	Absorbancia 595 nm			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H41	0.2603	1:10000	0.175	0.177	0.168	0.173	2.726	0.015	148.648
H71	0.2458	1:20000	0.105	0.106	0.099	0.103	3.664	0.009	88.058
H57	0.2801	1:10000	0.145	0.136	0.144	0.142	3.482	0.012	121.238
H6	0.2554	1:10000	0.149	0.147	0.14	0.145	3.252	0.012	124.412
H22	0.2656	1:10000	0.114	0.123	0.135	0.124	8.496	0.011	105.947
M2	0.2522	1:10000	0.167	0.173	0.17	0.170	1.765	0.015	145.763
M55	0.3160	1:20000	0.101	0.101	0.112	0.105	6.068	0.009	89.212
M56	0.2685	1:10000	0.071	0.078	0.076	0.075	4.807	0.006	63.533
M8	0.2357	1:10000	0.068	0.07	0.067	0.068	2.235	0.006	57.763
M57	0.2881	1:10000	0.14	0.145	0.132	0.139	4.718	0.012	118.930

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Glucosa

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia 595nm			Promedio	C.V %	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H5	0.303	1:10000	0.131	0.137	0.127	0.132	3.823	0.011	112.583
H24	0.294	1:10000	0.165	0.165	0.158	0.163	2.484	0.014	139.415
H36	0.208	1:10000	0.08	0.087	0.096	0.088	9.149	0.007	74.497
H58	0.257	1:10000	0.134	0.134	0.137	0.135	1.283	0.012	115.468
H78	0.256	1:10000	0.092	0.098	0.097	0.096	3.360	0.008	81.422
M67	0.308	1:10000	0.195	0.191	0.199	0.195	2.051	0.017	167.402
M48	0.229	1:10000	0.159	0.168	0.169	0.165	3.331	0.014	141.724
M27	0.210	1:10000	0.087	0.089	0.094	0.090	4.006	0.008	76.517
M64	0.201	1:10000	0.108	0.119	0.119	0.115	5.507	0.010	98.445
M71	0.271	1:10000	0.106	0.11	0.097	0.104	6.382	0.009	88.924

Tabla 5. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sacarosa

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia 595nm			Promedio	C.V %	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H32	0.255	1:20000	0.119	0.12	0.128	0.122	4.032	0.010	104.504
H34	0.279	1:10000	0.181	0.189	0.178	0.183	3.113	0.016	156.727
H52	0.281	1:10000	0.134	0.143	0.143	0.140	3.712	0.012	119.796
H55	0.242	1:10000	0.14	0.146	0.136	0.141	3.578	0.012	120.373
H68	0.269	1:10000	0.136	0.136	0.143	0.138	2.922	0.012	118.353
M41	0.294	1:10000	0.196	0.198	0.201	0.198	1.269	0.017	170.288
M16	0.246	1:10000	0.166	0.161	0.176	0.168	4.555	0.014	143.743
M32	0.244	1:10000	0.148	0.15	0.151	0.150	1.021	0.013	128.163
M61	0.259	1:10000	0.123	0.124	0.116	0.121	3.602	0.010	103.350
M66	0.238	1:10000	0.099	0.092	0.087	0.093	6.505	0.008	78.825

Tabla 6. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Fructosa

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H73	0.233	1:10000	0.189	0.186	0.174	0.183	4.337	0.016	157.015
H28	0.223	1:10000	0.166	0.169	0.153	0.163	5.228	0.014	139.415
H31	0.262	1:10000	0.147	0.145	0.157	0.150	4.296	0.013	128.163
H70	0.234	1:10000	0.143	0.157	0.146	0.149	4.958	0.013	127.297
H18	0.240	1:10000	0.161	0.154	0.154	0.156	2.585	0.013	133.933
M17	0.250	1:20000	0.102	0.108	0.113	0.108	5.115	0.009	91.809
M38	0.262	1:10000	0.147	0.145	0.143	0.145	1.379	0.012	124.124
M42	0.278	1:10000	0.065	0.059	0.056	0.060	7.638	0.005	50.550
M13	0.288	1:10000	0.137	0.134	0.132	0.134	1.873	0.011	114.891
M28	0.266	1:10000	0.13	0.121	0.12	0.124	4.454	0.011	105.658

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sacarina

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H29	0.2504	1:10000	0.15	0.149	0.151	0.150	0.667	0.013	128.451
H45	0.2567	1:10000	0.146	0.147	0.142	0.145	1.825	0.012	124.124
H11	0.2312	1:10000	0.168	0.158	0.16	0.162	3.266	0.014	138.838
H33	0.2565	1:10000	0.138	0.136	0.135	0.136	1.120	0.012	116.622
H72	0.2975	1:10000	0.131	0.137	0.141	0.136	3.692	0.012	116.622
M60	0.2633	1:10000	0.112	0.107	0.103	0.107	4.201	0.009	91.520
M30	0.2199	1:10000	0.134	0.135	0.142	0.137	3.182	0.012	117.199
M18	0.2427	1:10000	0.162	0.163	0.159	0.161	1.290	0.014	138.261
M51	0.2121	1:10000	0.073	0.078	0.078	0.076	3.782	0.006	64.687
M80	0.3002	1:10000	0.146	0.141	0.144	0.144	1.752	0.012	122.970

Tabla 8. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Mezcla aspartame:acesulfame

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H10	0.281	1:10000	0.176	0.176	0.181	0.178	1.625	0.015	152.399
H64	0.209	1:10000	0.089	0.089	0.089	0.089	0.000	0.008	75.651
H1	0.225	1:10000	0.154	0.147	0.141	0.147	4.416	0.013	126.143
H25	0.266	1:10000	0.113	0.118	0.108	0.113	4.425	0.010	96.425
H50	0.225	1:10000	0.115	0.116	0.127	0.119	5.580	0.010	101.907
M11	0.325	1:10000	0.186	0.186	0.185	0.186	0.311	0.016	159.324
M7	0.301	1:10000	0.144	0.141	0.141	0.142	1.220	0.012	121.527
M14	0.258	1:10000	0.14	0.139	0.137	0.139	1.102	0.012	118.642
M49	0.247	1:10000	0.186	0.176	0.181	0.181	2.762	0.016	155.284
M63	0.244	1:10000	0.2	0.201	0.201	0.201	0.288	0.017	172.307

Tabla 9. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Acesulfame de potasio

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H9	0.221	1:10000	0.184	0.185	0.189	0.186	1.422	0.016	159.612
H17	0.258	1:10000	0.137	0.137	0.14	0.138	1.255	0.012	118.065
H19	0.248	1:10000	0.134	0.127	0.124	0.128	3.999	0.011	109.697
H48	0.288	1:10000	0.108	0.102	0.111	0.107	4.283	0.009	91.232
H80	0.244	1:10000	0.132	0.136	0.141	0.136	3.308	0.012	116.622
M45	0.259	1:20000	0.141	0.148	0.138	0.142	3.605	0.012	121.815
M1	0.257	1:10000	0.135	0.131	0.12	0.129	6.037	0.011	109.986
M25	0.269	1:10000	0.142	0.149	0.151	0.147	3.208	0.013	126.143
M58	0.205	1:10000	0.155	0.161	0.166	0.161	3.428	0.014	137.684
M76	0.214	1:10000	0.141	0.138	0.137	0.139	1.501	0.012	118.642

Tabla 10. Resultados de la cuantificación de proteínas en las muestras del Grupo Sucralosa

Muestra	Masa en hígado	Dilución	Absorbancia			Promedio	C.V	[µg/µL] Curva	[µg/µL] Extracto
			1	2	3				
H56	0.221	1:10000	0.175	0.177	0.18	0.177	1.419	0.015	152.111
H16	0.277	1:10000	0.138	0.143	0.145	0.142	2.539	0.012	121.527
H30	0.266	1:10000	0.145	0.144	0.133	0.141	4.733	0.012	120.373
H44	0.229	1:10000	0.03	0.03	0.035	0.032	9.116	0.003	26.025
H79	0.322	1:10000	0.174	0.167	0.164	0.168	3.048	0.014	144.320
M23	0.256	1:10000	0.087	0.086	0.08	0.084	4.489	0.007	71.612
M39	0.244	1:10000	0.167	0.157	0.157	0.160	3.601	0.014	137.396
M35	0.261	1:10000	0.116	0.122	0.123	0.120	3.146	0.010	102.773
M44	0.219	1:10000	0.139	0.133	0.134	0.135	2.375	0.012	115.756
M68	0.204	1:10000	0.108	0.095	0.096	0.100	7.258	0.008	84.884

4.2. Establecimiento de las condiciones óptimas para realizar la electroforesis

Posterior a la cuantificación de proteínas y con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para realizar la electroforesis y la electrotransferencia para la proteína en estudio, se empleó como ejemplo la muestra de extracto perteneciente a la rata M33 del Grupo Sacarina, con la ayuda de una electroforesis *PAGE-SDS* al 10% de poliacrilamida. Para ello se corrió un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio bajo dos condiciones diferentes las cuales se

muestran en la **Tabla 11**. En las **Figuras 14 (condición 1)** y **15 (condición 2)** se puede apreciar que, en ambos casos, se logró una transferencia adecuada debido a que se observaron nítidamente las bandas de proteína en la membrana (bandas rojas). No obstante, en la **Figura 14** se observó que las condiciones para la corrida no fueron las óptimas debido a que, aunque se logró una transferencia adecuada, la resolución (separación entre bandas) no fue la mejor para el estudio de la expresión relativa de *ChREBP*. Lo anterior fue debido a que se tuvo un frente de corrida de solamente de 3 cm y, mientras se tengan frentes de corrida mayores, se obtendrán mejores resoluciones. En contraste, en la **Figura 15** se apreció una transferencia exitosa y una mejor resolución con un frente de corrida de 4.5 cm. Por lo tanto, se seleccionó la condición 2 (**Tabla 11**) para realizar la electroforesis de las muestras.

Tabla 11. Resultados de determinación de las condiciones óptimas

		Condición 1	Condición 2
Electroforesis	Tiempo total de corrida	120 min	150 min
	Tiempo de alineamiento de muestra	30 min	30 min
	Voltaje de alineamiento de muestra	75V	75V
	Tiempo de separación de muestra	90 min	120 min
	Voltaje de separación de muestra	100 V	100 V
Electrotransferencia	Tiempo total	60 min	60 min
	Voltaje	100 V	100 V

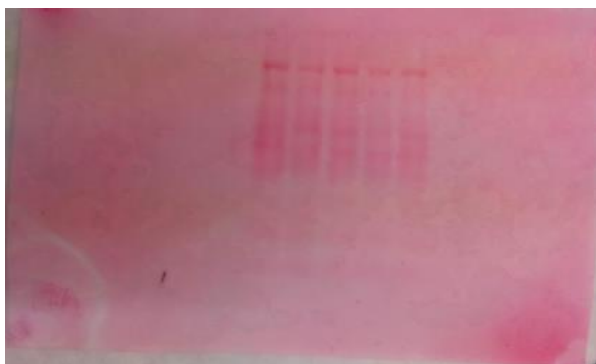


Figura 14. Tinción de membrana con Rojo de Ponceau-S después de la electrotransferencia. En ella es posible apreciar 5 carriles de la muestra M33 del Grupo Sacarina



Figura 15. Tinción de membrana con Rojo de Ponceau-S después de la electrotransferencia. Se aprecian 7 carriles, empezando por la izquierda, 6 son de la albúmina sérica bovina (*BSA*, por sus siglas en inglés) y la última es la muestra M33 del Grupo Sacarina

4.3. Electroforesis de los extractos de hepatocitos

Como se mencionó en la metodología, para realizar la electroforesis de los extractos de hepatocitos de los grupos de edulcorantes, en cada pozo del gel de poliacrilamida se añadieron los μL de muestra necesarios para aportar 30 μg de proteína. Para determinar los μL de cada extracto que fueron añadidos en cada pozo se aplicó la **Ecuación 3.1** (metodología):

$$\mu\text{L de extracto} = 30\mu\text{g de proteína en extracto} \left(\frac{1}{\frac{\mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de extracto}}} \right) \quad \text{Ecuación 3.1}$$

El ejemplo para calcular este volumen se hizo usando la muestra de la rata hembra H56 del Grupo Sucralosa:

$$30\mu\text{g de proteína en extracto} \left(\frac{1}{\frac{152.110 \mu\text{g de proteína}}{\mu\text{L de extracto}}} \right) \\ = 0.197 \mu\text{L de extracto}$$

4.4. Expresión relativa de *ChREBP*

Con la finalidad de establecer la expresión relativa de *ChREBP* en las distintas muestras de extractos hepáticos de los grupos de edulcorantes, se procedió a realizar la unión del anticuerpo primario anti-actina y anti-*ChREBP*. Para ello, después de haber realizado un bloqueo inespecífico de la membrana con la solución *Blotto*, se incubó la membrana con la solución del anticuerpo anti-actina en una dilución 1:2500 durante 12 horas a 4°C y con agitación constante a 120 rpm. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con la solución de lavado que contiene Tween ® al 0.1% y TBS 1X para eliminar el exceso de solución de anticuerpo primario. A continuación, la membrana fue incubada durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-ratón Sigma-Aldrich ® con una dilución de 1:2500 (debido a que el anticuerpo anti-actina provenía de ratón). Posteriormente, se realizó la

reacción de quimioluminiscencia y se llevó a cabo la fotodocumentación en el equipo *ChemiDoc XRS+*, se realizó el mismo procedimiento para el anticuerpo anti-*ChREBP*. Se muestran ejemplos de las imágenes obtenidas en el equipo fotodocumentador *ChemiDoc XRS+* en las **Figuras 16** y **17**. La **Figura 16** corresponde a muestras de las ratas hembra y la **Figura 17** corresponde a las muestras de las ratas macho. Todas las bandas de la proteína endógena (actina) deben de tener la misma intensidad, de lo contrario es necesario realizar una normalización de los datos. Por ello, para realizar un análisis más certero se tuvieron que normalizar los niveles de expresión relativa de las muestras.

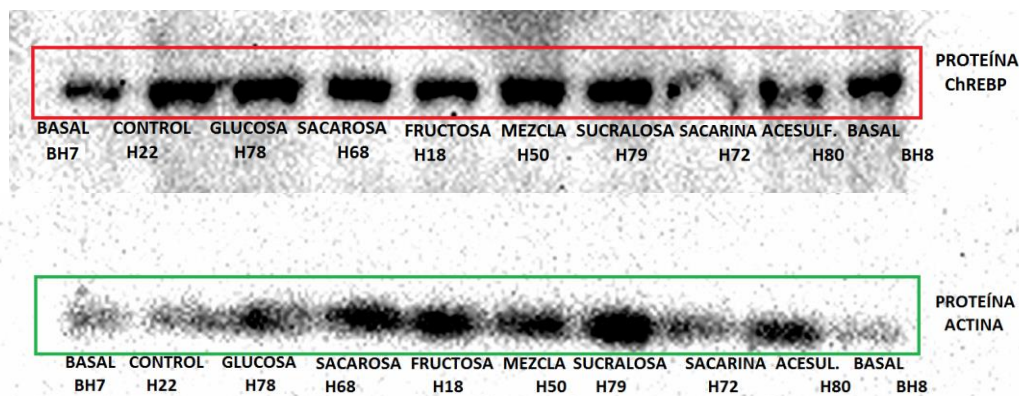


Figura 16. Resultado de *Western Blot* para ratas hembra de la cepa Wistar en los diferentes grupos de edulcorantes, donde se muestra la proteína en estudio *ChREBP* (arriba) en un tamaño de 95kb y la proteína endógena actina (abajo) en un tamaño de 42 kb

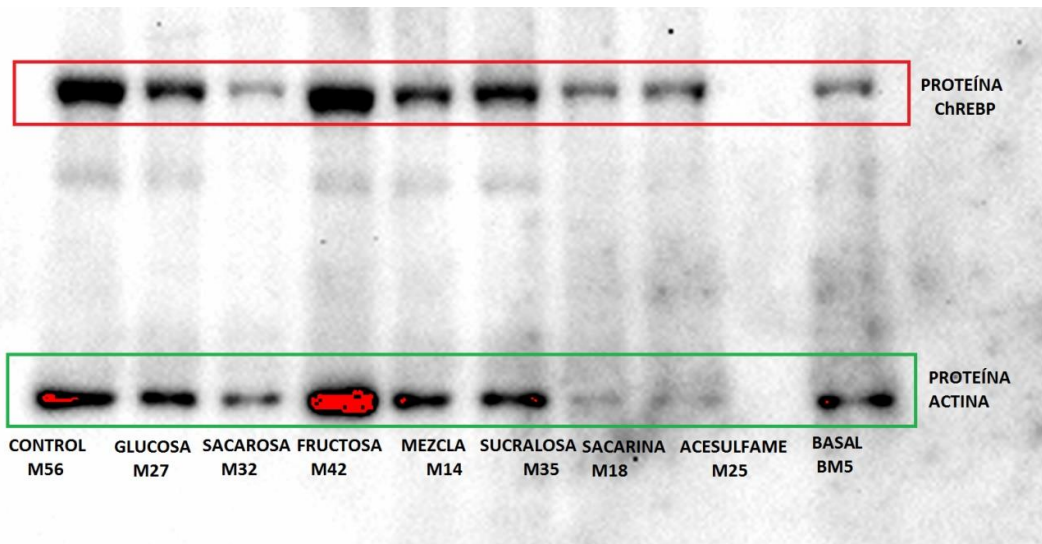


Figura 17. Resultado de *Western Blot* para ratas macho de la cepa Wistar en los diferentes grupos de edulcorantes, donde se muestra la proteína en estudio *ChREBP* (arriba) en un tamaño de 95kb y la proteína endógena actina (abajo) en un tamaño de 42 kb

4.5. Expresión relativa “normalizada” de la proteína *ChREBP* con la proteína endógena de control positivo

Con el objetivo de contar con un análisis más certero de la expresión relativa de *ChREBP*, se normalizaron los niveles de expresión relativa de *ChREBP* mediante los software *ImageJ*® e *Image Lab* de *Bio-Rad*® teniendo como base la proteína actina. A continuación, se describe un ejemplo para el gel 5 de machos. La imagen obtenida en el fotodocumentador (**Figura 17**) se carga en el software de *imageJ*® donde se seleccionan las bandas a estudiar obteniendo el porcentaje del área bajo la curva para cada pico. Cada pico representa una proteína como se observa en las siguientes imágenes (**Figura 18 y Figura 19**).

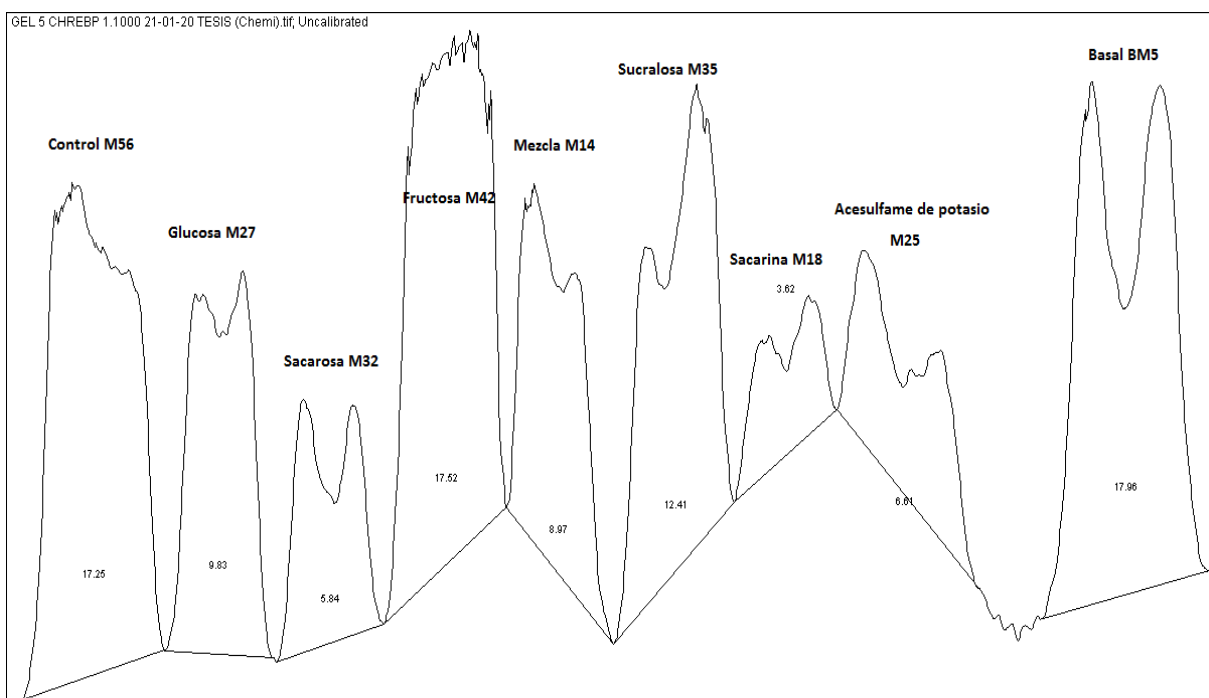


Figura 18. Gráfica del % de área bajo la curva para cada pico gel #5 con muestras de ratas macho donde se estudia a la proteína actina

En estas imágenes se toman los picos como representación de la quimioluminiscencia de cada muestra en el fotodocumentador obteniendo en ambos casos el área de cada pico y el porcentaje que este representa, con el que se procede a normalizar las muestras con respecto del control como se muestra a continuación.

Para la muestra de una rata macho con código 56 del Grupo Control (CM56) en este gel se obtuvo un porcentaje de área en actina de 17.253 % y para *ChREBP* un porcentaje de área de 19.129 % y para la muestra del Grupo Basal (BM5) se obtuvo un porcentaje de área de 17.959 % y de 7.189 % para la proteína actina y *ChREBP*, respectivamente. Con estos datos se procedió a “normalizar” la muestra del Grupo Basal de la siguiente forma:

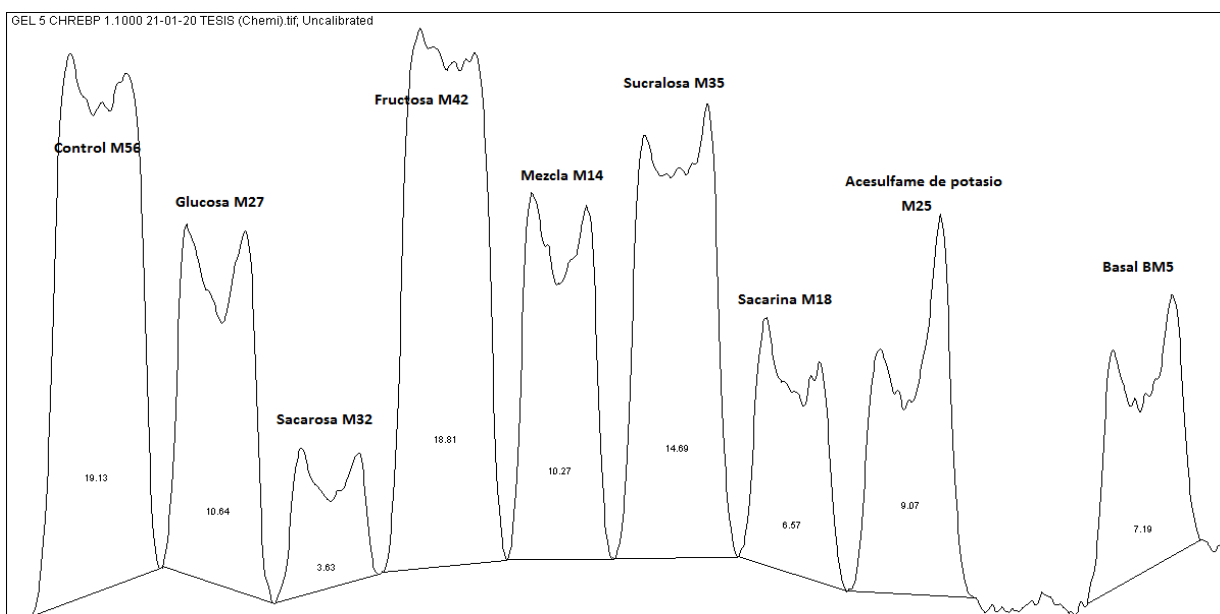


Figura 19. Gráfica del % de área bajo la curva para cada pico del gel #5 de machos donde se estudia a la proteína *ChREBP*

$$\text{Normalización} = \frac{\% \text{ área Muestra a normalizar}}{\% \text{ área Muestra control}}$$

Ecuación 4.5

A continuación sigue un ejemplo con la muestra del mismo espécimen BM5:

$$\text{Normalización de actina} = \frac{17.959\%}{17.253\%} = 1.041$$

$$\text{Normalización de ChREBP} = \frac{7.189\%}{19.129\%} = 0.376$$

Una vez normalizadas ambas proteínas se procedió a compararlas con la proteína endógena, en este caso la actina y con la proteína de estudio, en este caso, *ChREBP*:

$$\frac{\text{Normalización de ChREBP}}{\text{Normalización de actina}} = \frac{0.376}{1.041} = 0.361$$

obteniéndose los resultados de las Tablas 12 a 29.

Tabla 12. Resultados de la normalización de ratas macho del grupo control

Control							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M2	39095.66	15.96	1	2249.347	1.504	1	1
M55	14941.38	12.14	1	4714.146	5.400	1	1
M56	41058.16	17.25	1	47228.915	19.129	1	1
M8	24699.46	10.59	1	11263.489	7.235	1	1
M57	19018.54	10.27	1	32789.539	12.417	1	1

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 13. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Basal

Basal							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
BM1	20833.146	8.504	0.532	19827.078	14.35	1.794	3.37
BM4	16831.945	7.221	0.681	8153.752	5.238	0.723	1.06
BM5	42738.836	17.959	1.041	17749.329	7.189	0.376	0.361

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 14. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Glucosa

Glucosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M48	14484.723	11.768	0.969	9895.832	11.336	2.099	2.165
M27	23383.196	9.826	0.569	26276.823	10.643	0.556	0.977
M71	9414.255	5.083	0.495	11082.761	4.197	0.338	0.682
M64	25256.045	10.835	1.022	12813.208	9.274	1.160	1.134
M67	28066.51	11.456	0.718	2,914.903	2.110	0.264	0.367

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 15. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sacarosa

Sacarosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M16	19812.522	16.097	1.326	7118.844	8.155	1.510	1.138
M32	13897.752	5.84	0.338	8960.388	3.629	0.189	0.560
M61	20189.974	8.662	0.817	16816.409	10.802	1.493	1.826
M66	41054.631	22.168	2.158	22998.004	8.709	0.701	0.324
M41	42214.066	17.231	1.080	1,409.690	1.020364498	0.127	0.118

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 16. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Fructosa

Fructosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M38	11812.581	9.597	0.790	8265.823	9.468	1.753	2.217
M13	16219.016	6.958	0.656	19040.489	12.231	1.690	2.574
M28	22405.246	12.098	1.1781	22759.711	8.619	0.694	0.589
M17	23257.024	9.493	0.594	6935.782	5.020	0.627	1.055
M42	41687.149	17.517	1.015	12525.539	9.066	1.133	1.116

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 17. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Mezcla aspartame:acesulfame

Mezcla aspartame:acesulfame							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M7	18565.744	15.084	1.242	3766.054	4.314	0.798	0.642
M14	21342.836	8.968	0.519	25354.125	10.269	0.536	1.032
M49	36347.51	15.593	1.471	27624.773	17.745	2.452	1.666
M63	2905.548	1.569	0.152	16462.296	6.234	0.502	3.285
M11	35264.459	14.394	0.901	3,855.853	2.790	0.349	0.386

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 18. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sucralosa

Sucralosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M39	27906.702	22.673	1.867	6423.510	7.358	1.362	0.729
M35	29523.806	12.406	0.719	36267.317	14.689	0.767	1.067
M44	25052.066	10.748	1.014	15733.167	10.106	1.396	1.377
M68	32494.43	17.546	1.708	48571.439	18.394	1.481	0.866
M23	47749.702	19.49	1.221	9882.347	7.153	0.894	0.732

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 19. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Sacarina

Sacarina							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M30	4983.338	4.049	0.333	3563.740	4.082	0.755	2.266
M18	8615.037	3.62	0.209	16225.459	6.572	0.343	1.637
M51	38863.146	16.673	1.573	31163.167	20.018	2.766	1.758
M80	14867.321	8.028	0.781	36960.489	13.997	1.127	1.441
M60	8510.711	3.474	0.217	6,260.037	4.531	0.566	2.603

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 20. Resultados de normalización de ratas macho del Grupo Acesulfame de potasio

Acesulfame de potasio							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
M1	10574.882	8.592	0.707	6574.983	7.532	1.394	1.970
M58	24506.108	10.513	0.992	16926.723	10.873	1.502	1.514
M76	43038.572	23.239	2.263	37045.782	14.029	1.129	0.499
M25	15729.141	6.610	0.383	9360.581	6.775	0.847	2.211

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 21. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Control

Control							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H41	24412.037	12.612	1	19003.338	14.438	1	1
H71	14603.652	6.932	1	25091.714	22.132	1	1
H57	48144.505	21.89	1	19844.028	18.081	1	1
H6	25840.128	14.315	1	21350.066	15.22	1	1
H22	8161.635	5.099	1	27679.392	10.461	1	1

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 22. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Basal

Basal							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
BH1	6075.368	3.139	0.248	6034.267	4.585	0.317	1.275
BH2	11229.874	5.33	0.768	8121.371	7.163	0.323	0.420
BH4	7766.957	4.303	0.300	5955.380	4.245	0.278	0.927
BH7	13639.53	8.521	1.671	21335.652	8.064	0.770	0.461
BH8	7366.501	4.602	0.902	31027.371	11.727	1.121	1.242

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 23. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Glucosa

Glucosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H5	35440.765	18.310	1.451	15876.246	12.062	0.835	0.575
H24	28912.421	13.724	1.979	8640.095	7.621	0.344	0.174
H36	16097.563	7.319	0.334	8618.430	7.853	0.434	1.299
H58	22590.196	12.514	0.874	7361.924	5.248	0.344	0.394
H78	16219.995	10.133	1.987	26027.856	9.837	0.940	0.473

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 24. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sacarosa

Sacarosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H36	12466.660	6.441	0.510	11244.673	8.543	0.591	1.159
H34	27090.844	12.859	1.855	9993.368	8.814	0.398	0.215
H52	40161.019	18.26	0.834	13819.187	12.592	0.696	0.835
H55	9825.815	5.443	0.380	4595.631	8.839	0.296	0.777
H68	18513.957	11.566	2.268	31653.48	11.963	1.143	0.504

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 25. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Fructosa

Fructosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H73	13179.915	6.809	0.539	16584.279	12.6	0.872	1.616
H28	20015.924	9.501	1.370	7068.924	6.235	0.281	0.205
H31	10028.338	4.560	0.208	8841.421	8.056	0.445	2.139
H70	13590.785	7.529	0.525	4209.874	3.001	0.197	0.375
H18	18798.128	11.744	2.303	26560.522	10.038	0.959	0.417

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 26. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Mezcla aspartame:acesulfame

Mezcla aspartame:acesulfame							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H10	44990.241	23.243	1.842	11396.418	8.659	0.599	0.325
H64	31699.350	15.046	2.170	13121.087	11.573	0.522	0.241
H1	26019.593	11.830	0.540	17918.631	16.327	0.902	1.671
H25	28498.510	15.787	1.102	2755.468	1.964	0.129	0.117
H50	18731.681	11.702	2.294	37596.865	14.209	1.358	0.592

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 27. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sucralosa

Sucralosa							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
SUH56	21614.903	11.167	0.885	10477.589	7.961	0.551	0.623
SU H16	19408.459	9.212	1.328	8510.874	7.507	0.339	0.255
SU H30	34209.137	15.554	0.710	11113.421	10.126	0.560	0.788
SU H44	19315.321	10.700	0.747	32306.137	23.030	1.513	2.024
SU H79	26517.844	16.566	3.248	27567.380	10.419	0.995	0.307

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 28. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Sacarina

Sacarina							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H29	30618.848	15.819	1.254	15097.915	11.471	0.794	0.633
H45	36343.049	17.251	2.488	10232.731	9.026	0.407	0.164
H11	13899.388	6.320	0.288	10883.660	9.917	0.548	1.900
H33	14258.137	7.899	0.551	23470.765	16.731	1.099	1.992
H72	7334.078	4.582	0.898	11103.048	4.196	0.401	0.446

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

Tabla 29. Resultados de normalización de ratas hembra del Grupo Acesulfame de potasio

Acesulfame de potasio							
ID	Actina			ChREBP			ChREBP/Actina
	Área	%	Normalización	Área	%	Normalización	
H17	21372.605	10.145	1.463	12457.459	10.988	0.496	0.339
H19	31377.037	14.266	0.651	14920.338	13.595	0.751	1.154
H48	36465.827	20.201	1.411	33317.208	23.750	1.560	1.106
H80	24788.652	15.486	3.037	24040.317	9.086	0.868	0.286
H9	4763.347	2.461	0.195	3,020.782	5.809	0.194	0.997

ID: Número de identificación, %: Porcentaje del área total

El siguiente paso para el tratamiento de los datos fue determinar si estos datos seguían una distribución normal o no, ya que es un requisito para poder realizar un análisis de varianza. Para ello se utilizó el software STATGRAPHICS XVI, el cual cuenta con la prueba estadística W de Shapiro-Wilk que es un procedimiento estadístico que evalúa si los datos siguen una distribución normal (Samuels *et al.*, 2012). (Anexo 1, A). En todos los casos la prueba mostró que los datos seguían una distribución normal. Una vez que se constató que las muestras siguieron una distribución normal, se prosiguió a encontrar posibles datos aberrantes. Para lo anterior se ocuparon cuatro pruebas seguidas (Gráfica de Cajas y Bigotes, Prueba de Grubbs, Prueba de Dixon y el valor de la Desviación absoluta de la media, DAM). Ver Anexo 1, B.

En la **Figura 20** es posible observar que, para la densidad óptica relativa, todos los edulcorantes se encontraron por debajo del control. El edulcorante que mayor expresión de

densidad óptica relativa tuvo fue el Grupo **Sacarina**, la cual obtuvo una expresión relativa de 1.027 ± 0.8 , seguido del Grupo **Fructosa** (0.950 ± 0.8).

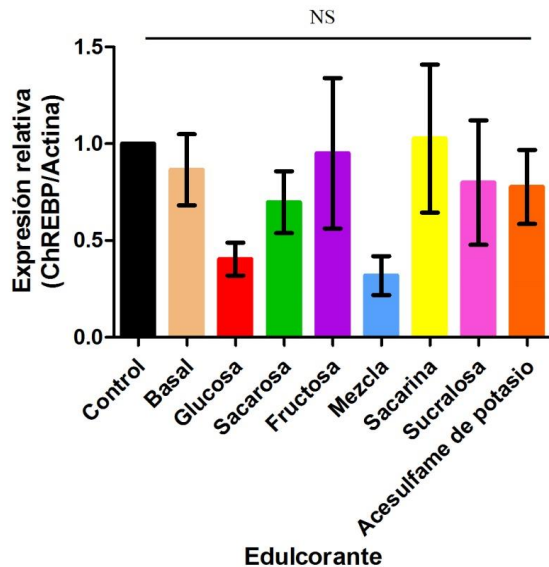


Figura 20. Niveles promedio de densidad óptica relativa para **ratas hembra** de la estirpe Wistar±DEM. Mezcla= Mezcla acesulfame:aspartame, NS= No hubieron diferencias significativas

Lo anterior es congruente con lo reportado por Softic *et al.* (2017), pues se sabe que la fructosa estimula este factor de transcripción. El grupo que tuvo la menor expresión fue el Grupo Mezcla aspartame:acesulfame (0.319 ± 0.20) en ratas hembras de la especie Wistar. Con el objetivo de constatar si los resultados obtenidos anteriormente mostraban alguna diferencia estadísticamente significativa, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANDEVA), de un factor. Los resultados del ANDEVA de una vía se muestran en la **Tabla 30**. Puesto que el valor-P de la razón-F fue mayor o igual que 0.05, no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre la media de la expresión de *ChREBP/Actina* entre un grupo de edulcorante y otro, con un nivel del 95.0% de confianza en ratas hembra. Estos resultados no fueron similares con los reportados por Mendoza-Pérez (2017), donde se estudió *ChREBP* empleando el método basado en la reacción en cadena de la polimerasa, PCR en inglés, para la misma estirpe Wistar. En ese estudio se reportaron diferencias significativas entre los grupos de edulcorantes en estudio. Se observaron algunas similitudes en las tendencias de algunos de los grupos de edulcorantes, como los Grupos Sacarina y Glucosa, para las ratas hembra de la estirpe Wistar. Debe mencionarse que en ese estudio los especímenes estaban separados y podían comer y beber verdaderamente *ad libitum*. En este estudio los especímenes de cada

grupo compartían alimento y bebida y debían competir entre ellos para obtenerlos por lo que no eran realmente *ad libitum*.

Tabla 30. Análisis de varianza para la densidad óptica de ChREBP por grupo de edulcorante en ratas hembra de la estirpe Wistar al 95% de confianza

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1.90273	7	0.271819	0.80	0.5911
Intra grupos	10.1516	30	0.338386		
Total	12.0543	37			

GI= Grados de libertad

En la **Figura 21** se observan los resultados obtenidos para las ratas macho de la estirpe Wistar.

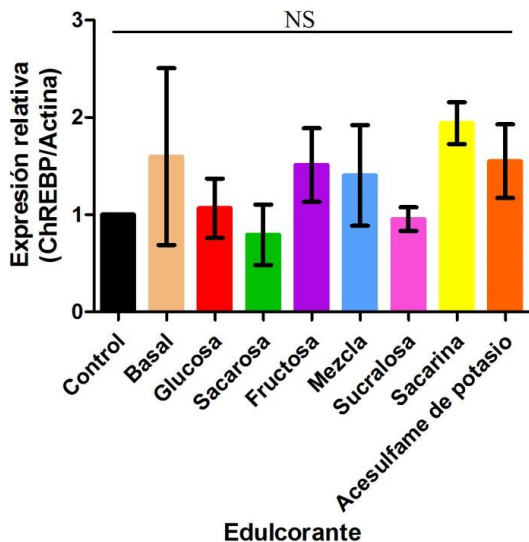


Figura 21. Niveles promedio de densidad óptica relativa para **ratas macho** de la estirpe Wistar \pm DEM. Mezcla= Mezcla acesulfame:aspartame, NS= No hubieron diferencias significativas

Fue posible observar que los edulcorantes que contaron con una mayor densidad óptica relativa fueron los Grupos **Sacarina** (1.941 ± 0.5), seguido de **Acesulfame de potasio** (1.549 ± 0.7) y de **Fructosa** (1.511 ± 0.8). Los grupos con una menor densidad óptica relativa fueron **Sacarosa** (0.794 ± 0.6) y **Sucralosa** (0.955 ± 0.2). En la prueba de ANDEVA (Tabla 31), se observa que el valor-P de la razón-F fue mayor o igual que el valor de $\alpha \geq 0.05$, por lo que no hubieron diferencias estadísticamente significativas entre la media de *ChREBP/Actina* entre un nivel de edulcorante y otro, con un nivel del 95.0% de confianza en ratas macho de la estirpe Wistar.

Tabla 31. Análisis de varianza para la densidad óptica de *ChREBP* por grupo de edulcorante en ratas macho de la estirpe Wistar al 95% de confianza

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.95679	7	0.708113	1.03	0.4296
Intra grupos	19.8658	29	0.685026		
Total	24.8225	36			

GI= Grados de libertad

Lo anterior es congruente con el estudio de Mendoza-Pérez (2017) pues tampoco se reporta una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de edulcorantes, aunque la tendencia en algunos de los edulcorantes se aprecia distinta en ambos estudios, como lo es el caso del Grupo Fructosa. Tanto en la **Figura 20** como en la **Figura 21** se aprecia que el edulcorante que presentó una mayor expresión de densidad óptica relativa fue el del Grupo Sacarina. Por otro lado, dentro de los edulcorantes nutritivos o calóricos, el que tuvo mayor expresión relativa fue el Grupo Fructosa, lo cual resultó acorde con lo reportado en la literatura (Fisher *et al.*, 2017; Moore *et al.*, 2014; Softic *et al.*, 2017), pues se sabe que la fructosa estimula la expresión de *ChREBP*. En relación con el edulcorante que presentó una menor expresión de densidad óptica relativa difirió en ambos casos, siendo en hembras el Grupo Mezcla aspartame:acesulfame, mientras que para los machos fue el Grupo Sacarosa, lo cual hace pensar que el género es un factor importante para ciertos edulcorantes que influye en la expresión de *ChREBP*. Lo anterior concuerda con lo obtenido con el estudio realizado por Vega-Jiménez (2019), en el cual se reporta que el incremento de masa, así como de los niveles de glucosa en ratas Wistar a las que se les suministraron edulcorantes hipocalóricos, tuvieron un comportamiento similar para el Grupo Sacarina y el Grupo Mezcla aspartame:acesulfame para ambos géneros, así como el Grupo Sucralosa para las ratas macho. Esto es relevante pues debe recordarse que *ChREBP* es un factor de transcripción de enzimas importantes en las rutas metabólicas de la lipogénesis y la glucólisis, como la ácido graso sintasa y la piruvato quinasa (Miján de la Torre, 2004). Estas rutas son importantes en el metabolismo de lípidos y carbohidratos y, por ende, un incremento en la masa hablaría indirectamente de un aumento en estas rutas (López-Oliva y Martínez, 2014). Los niveles de expresión de densidad óptica relativa de *ChREBP* encontrados se pueden explicar recordando que su regulación transcripcional depende de otros factores como *LXR* y *TR-β*. Estudios recientes han mostrado que el receptor X del hígado (*LXR*) y el receptor de la hormona tiroidea β (*TR-β*) son reguladores transcripcionales básicos de este factor de transcripción en el hígado, por su unión

en la región promotora del gen a los elementos de respuesta, *LXRE1* y *LXRE2* (Cha y Repa, 2007; Gauthier *et al.*, 2010; López-Oliva y Martínez, 2014). Por otro lado se sabe que la insulina es otro regulador positivo de *ChREBP*, al menos parcialmente, ya que actúa mediante la atenuación del efecto represivo del factor de transcripción *octamer-1 (Oct1)*, un represor de *ChREBP* (Sirek *et al.*, 2009), por lo que se tendría que seguir investigando si la insulina es expresada y si es así, qué tanto se expresa por el consumo de edulcorantes hipocalóricos a mayor profundidad.

En la **Tabla 32** se puede apreciar que para el **género** el valor-P fue menor al valor de $\alpha \geq 0.05$, lo cual indicó que este factor tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la expresión relativa de *ChREBP*, mientras que el valor de P para el **factor del grupo de edulcorante** fue mayor a 0.05 lo cual indica que esta variable no tuvo significancia.

Tabla 32 Análisis de varianza multifactorial para la densidad óptica de *ChREBP* por grupo de edulcorante y por género al 95% de confianza

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A:Género	7.10628	1	7.10628	13.97	0.0004
B:Grupo	4.98852	7	0.712645	1.40	0.2222
Interacciones					
AB	2.00815	7	0.286879	0.56	0.7821
Residuos	30.0173	59	0.508768		
Total	43.269	74			

GI= Grados de libertad

Para determinar la existencia de diferencias significativa entre el género de las ratas se realizó una prueba t. La prueba-t evalúa la hipótesis de que la media del género hembra y macho es igual a 0.0 versus la hipótesis alterna de que la media del género hembra y macho no es igual a 0.0. Debido a que el valor-P (0.000179079) para esta prueba resulto menor que el valor de $\alpha \geq 0.05$, es posible concluir que si hay por lo menos una diferencia significativa con un 95.0% de confianza.

Finalmente, cuando se analizan los grupos de edulcorante sin hacer distinción del género, es decir, todos los machos y hembras que consumieron un mismo edulcorante, se tuvieron los resultados mostrados en la **Tabla 33**.

Tabla 33 Análisis de varianza de un factor para la densidad óptica de *ChREBP* por grupo de edulcorante al 95% de confianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.37939	7	0.625627	1.08	0.3874
Intra grupos	38.8896	67	0.580442		
Total (Corr.)	43.269	74			

Gl= Grados de libertad

Se observa que el valor-P fue mayor o igual que el valor de $\alpha \geq 0.05$ lo cual indica que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la media de la densidad óptica de *ChREBP* entre los grupos de un edulcorante y otro sin hacer distinción del género. Es decir, tras 170 días de experimentación con un nivel del 95.0% de confianza. Lo anterior concuerda con los análisis de varianza individuales realizados a los grupos de ratas macho y ratas hembra que se realizaron por separado.

A continuación, se dan las conclusiones y recomendaciones derivadas de esta investigación experimental.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo con el objetivo general de la investigación, el cual fue el de “Evaluar el efecto del consumo crónico de edulcorantes sobre la expresión del factor de transcripción *ChREBP* en tejido hepático de modelos animales”, de manera puntual, así como los objetivos particulares de (a) Determinar la concentración proteica de los extractos de hepatocitos de ratas macho y hembra de la estirpe Wistar que ingirieron tres edulcorantes nutritivos o calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa), cuatro no nutritivos o hipocalóricos (acesulfame de K, mezcla de aspartame:acesulfame, sacarina y sucralosa) y dos controles con agua potable sin aditivo, un grupo basal y un grupo llamado control o blanco por medio de la metodología de Bradford sobre la expresión del factor de transcripción ChREBP, (b) Evaluar si la expresión de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) en tejido hepático depende del género de los especímenes, (c) Establecer e implementar la técnica de Western Blot en los Laboratorios E-301-302-303 de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM y (d) Conocer el papel de los edulcorantes en la homeostasis energética y como factor de riesgo en la obesidad, fue posible concluir lo siguiente:

- El consumo crónico de los edulcorantes estudiados, en esta etapa del desarrollo de los especímenes, no influyó de manera significativa la expresión relativa de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*) en el tejido hepático de las ratas macho y hembra de la estirpe Wistar analizados.
- Se logró determinar la concentración de las proteínas extraídas de los extractos de hepatocitos de las ratas macho y hembra que ingirieron tres edulcorantes nutritivos o calóricos (sacarosa, glucosa y fructosa), cuatro no nutritivos o hipocalóricos (acesulfame de K, mezcla de aspartame:acesulfame, sacarina y sucralosa) y dos

controles con agua potable sin aditivo, un grupo basal y un grupo llamado control o blanco por medio de la metodología de Bradford sobre la expresión del factor de transcripción ChREBP.

- Se observó que el género de los especímenes fue determinante para aumentar o disminuir la expresión relativa de *ChREBP* siendo esta expresión mayor en las ratas macho que en las hembras.
- Se logró establecer la técnica de *Western Blot* en los Laboratorios E-301-302-303 de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Se implementó su aplicación a todas las muestras estudiadas.
- Existió una tendencia en el aumento de la expresión relativa de *ChREBP* para los grupos de sacarina y fructosa tanto para machos como para hembras. Sin embargo, este incremento no alcanzó significancia estadística por lo que el papel de los edulcorantes en la homeostasis energética y como factor de riesgo en la obesidad NO fue significativo.
- Se adquirieron habilidades en el montaje, manejo y mantenimiento de muestras proteicas extraídas de tejidos hepáticos, así como en la utilización de equipos especializados de laboratorio como el espectrofotómetro UV-Vis y el fotodocumentador *ChemiDoc*.

5.2. Recomendaciones

Dado el curso que llevó esta investigación, se recomienda lo siguiente:

- a. Evaluar otras enzimas y hormonas propias de las vías metabólicas implicadas en la obesidad y diabetes tales como la glucoquinasa, la insulina, el glucagón etc. Además, analizar la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (*SREBP1-c*), el cual es otro factor implicado en la transcripción de enzimas propias de las vías metabólicas de la lipogénesis y la glucólisis, con el objetivo de tener un mayor criterio de evaluación sobre el efecto de los edulcorantes.
- b. Correlacionar los niveles de insulina, glucagón y otros factores de transcripción con los niveles de *ChREBP*.

- c. Seguir con el estudio en las siguientes etapas de vida de las ratas Wistar pues el metabolismo cambia a lo largo de la vida, ya que este estudio abarcó los primeros 170 días del estudio global y esta estirpe de ratas vive 730 días (Envigo, 2018), por lo que esta etapa sería equivalente en la vida humana a un adulto joven de 18 años (Sengupta, 2013).

ANEXOS

ANEXO 1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A. ESTADÍSTICO W DE SHAPIRO-WILK

Tabla 34. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de edulcorante en ratas macho

Grupo de edulcorante	Valor-P
Basal	0.429271
Glucosa	0.504839
Sacarosa	0.567261
Fructosa	0.412424
Mezcla aspartame:acesulfame	0.315284
Sucralosa	0.285224
Sacarina	0.585124
Acesulfame	0.600163

Debido a que el valor-P para estas es mayor o igual que 0.05, no se puede rechazar la idea de que las muestras provienen de una distribución normal con 95%, o más, de confianza.

Tabla 35. Resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para los grupos de edulcorante en ratas hembra

Grupo de edulcorante	Valor-P
Basal	0.188572
Glucosa	0.231278
Sacarosa	0.951936
Fructosa	0.138019
Mezcla aspartame:acesulfame	0.0649623
Sucralosa	0.0908721
Sacarina	0.156423
Acesulfame	0.0716438

Debido a que el valor-P para estas es mayor o igual que 0.05, no se puede rechazar la idea de que las muestras provienen de una distribución normal con 95% ó más de confianza.

B. VALORES ATÍPICOS

B.1. Identificación de valores atípicos – Basal Machos

Datos/Variable: Basal M

3 valores con rango desde 0.361043 a 3.36823

Número de valores actualmente excluidos: 0

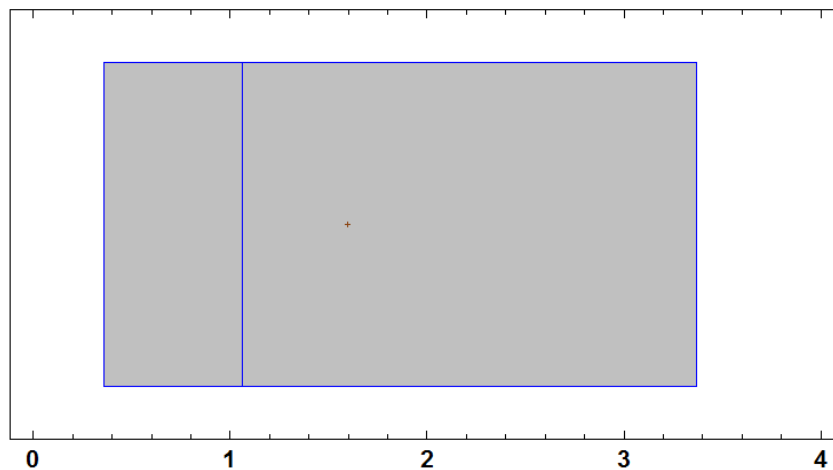


Figura 22. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Basal machos

Prueba de Grubbs (que supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.12566

Valor-P = 0.429271

El valor más extremo es 1.12566 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.2. Identificación de valores atípicos - Glucosa machos

Datos/Variable: Glu M

5 valores con rango desde 0.367584 a 2.16544

Número de valores actualmente excluidos: 0

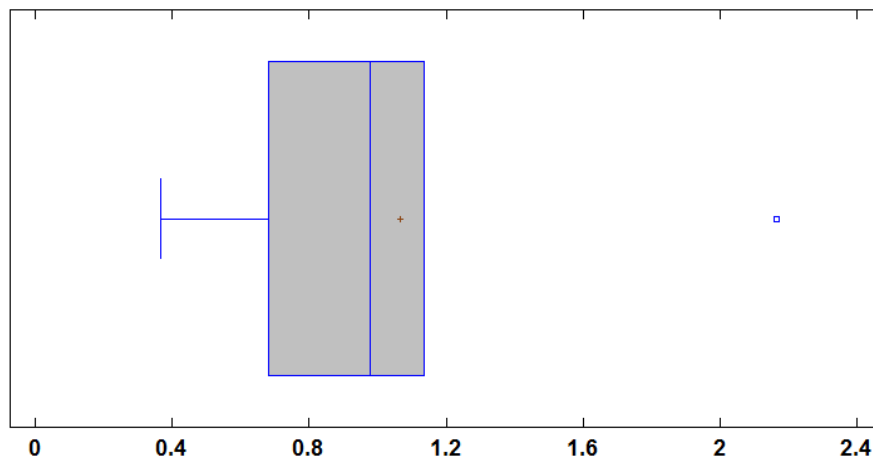


Figura 23. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Glucosa machos

Prueba de Grubbs en el Grupo Glucosa machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.61488

Valor-P = 0.179364

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.06544. El valor más extremo es 1.61488 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.3. Identificación de valores atípicos - Sacarosa machos

Datos/Variable: Sacarosa Machos

5 valores con rango desde 0.118189 a 1.82637

Número de valores actualmente excluidos: 0

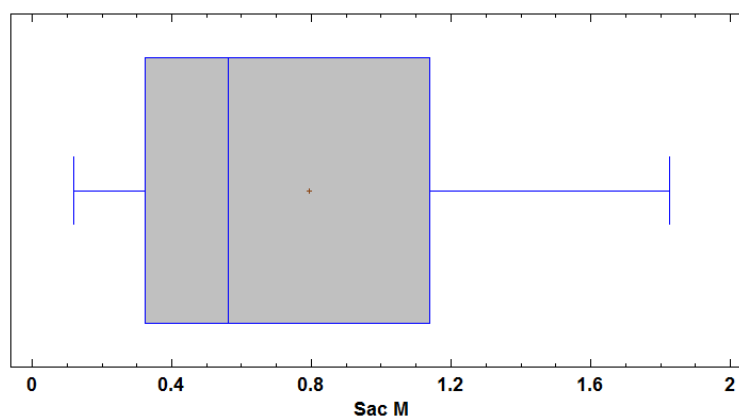


Figura 24. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sacarosa machos

Prueba de Grubbs atípicos en el Grupo Sacarosa machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.492

Valor-P = 0.3955

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.793756. El valor más extremo es 1.492 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.4. Identificación de valores atípicos - Fructosa machos

Datos/Variable: Fru M

5 valores con rango desde 0.589189 a 2.57443

Número de valores actualmente excluidos: 0

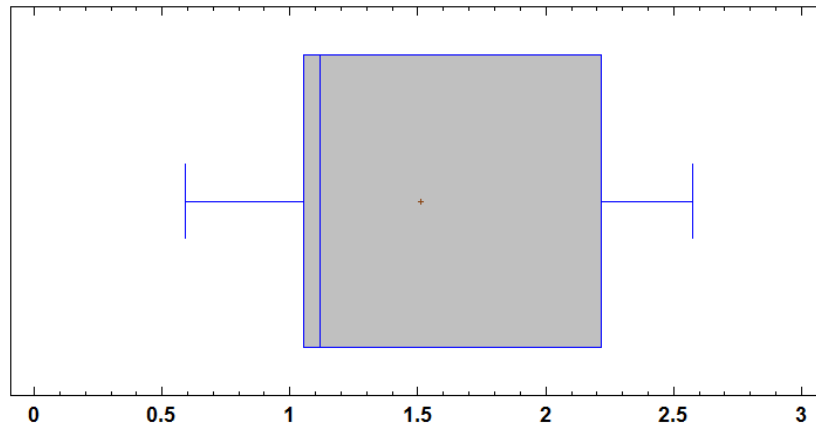


Figura 25. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Fructosa machos

Prueba de Grubbs en el Grupo Fructosa machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.26171

Valor-P = 0.916515

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.51074. El valor más extremo es 1.26171 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.5. Identificación de valores atípicos – Mezcla aspartame:acesulfame machos

Datos/Variable: Mix M

5 valores con rango desde 0.386994 a 3.28591

Número de valores actualmente excluidos: 0

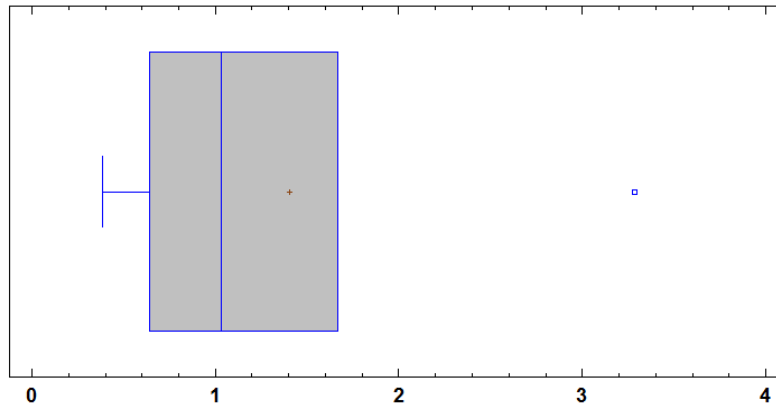


Figura 26. Gráfica de caja y bigotes para el grupo de Mezcla aspartame:acesulfame machos

Prueba de Grubbs en Grupo Mezcla aspartame:acesulfame machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.62625

Valor-P = 0.162233

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.40305. El valor más extremo es 1.62625 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.6. Identificación de valores atípicos - Sucralosa machos

Datos/Variable: Suc M

5 valores con rango desde 0.729525 a 1.37707

Número de valores actualmente excluidos: 0

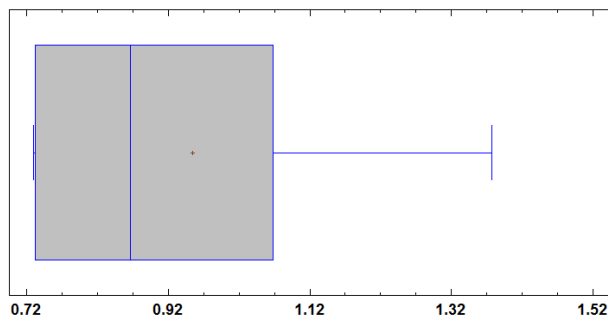


Figura 27. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sucralosa machos

Prueba de Grubbs en el Grupo Sucralosa machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.54455

Valor-P = 0.296648

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.954798. El valor más extremo es 1.54455 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.7. Identificación de valores atípicos - Sacarina machos

Datos/Variable: Sn M

5 valores con rango desde 1.44191 a 2.60323

Número de valores actualmente excluidos: 0

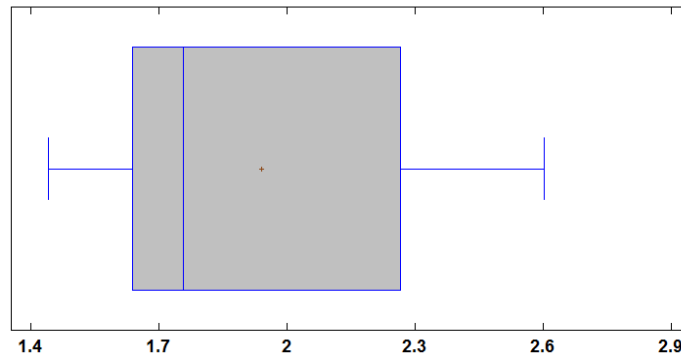


Figura 28. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Sacarina machos

Prueba de Grubbs en el Grupo Sacarina machos (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.3807

Valor-P = 0.63128

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.94144. El valor más extremo es 1.3807 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.8. Identificación de valores atípicos – Acesulfame de potasio Machos

Datos/Variable: Ace K

4 valores con rango desde 0.499253 a 2.21184

Número de valores actualmente excluidos: 0

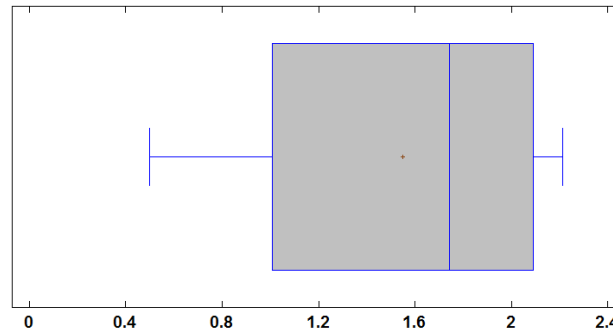


Figura 29. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo de Acesulfame de potasio machos

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.38641

Valor-P = 0.302919

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.5491. El valor más extremo es 1.38641 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.9 Identificación de valores atípicos - Basal hembras

Datos/Variable: basal H

5 valores con rango desde 0.420926 a 1.27592

Número de valores actualmente excluidos: 0

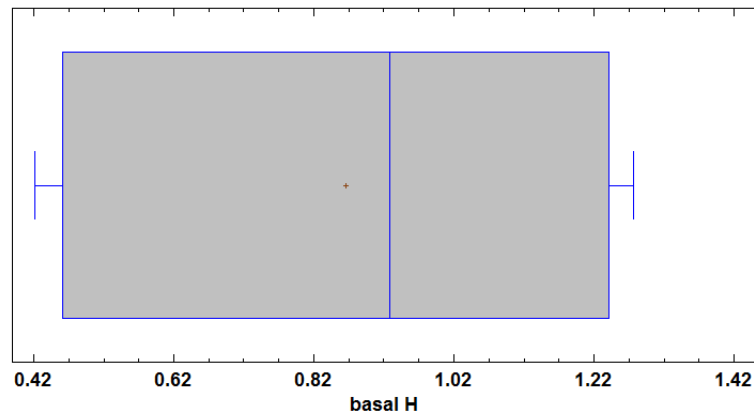


Figura 30. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Basal hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.08237

Valor-P = 1.0

El valor más extremo es 1.08237 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0% suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.10. Identificación de valores atípicos - Glucosa hembras

Datos/Variable: Glu H

5 valores con rango desde 0.173928 a 1.29899

Número de valores actualmente excluidos: 0

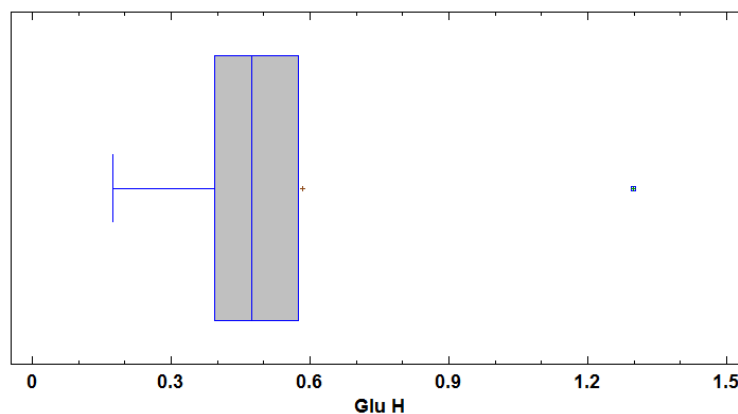


Figura 31. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Glucosa hembras

Prueba de Grubbs en el Grupo de Glucosa hembras (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.67824

Valor-P = 0.0914288

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.583199. El valor más extremo es 1.67824 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal. Por otro lado en la **Figura 31** se observa un valor aberrante que es Glucosa H36.

B.11. Identificación de valores atípicos - Sacarosa hembras

Datos/Variable: Sac H

5 valores con rango desde 0.214686 a 1.1586

Número de valores actualmente excluidos: 0

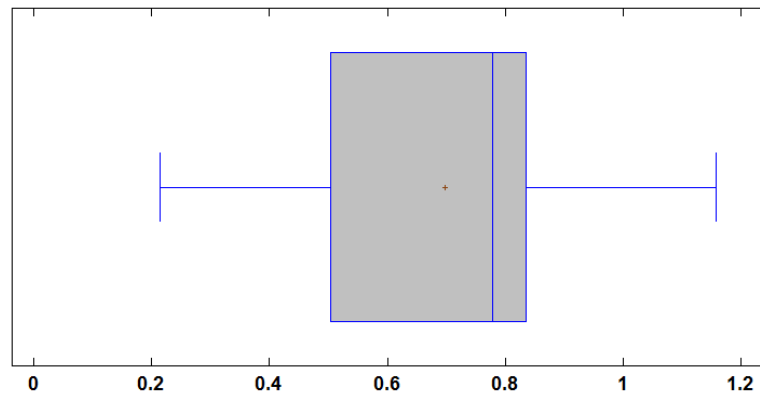


Figura 32. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sacarosa hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.356

Valor-P = 0.687908

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.698185. El valor más extremo es 1.356 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.12. Identificación de valores atípicos – Fructosa hembras

Datos/Variable: Fru H

5 valores con rango desde 0.205544 a 2.13884

Número de valores actualmente excluidos: 0

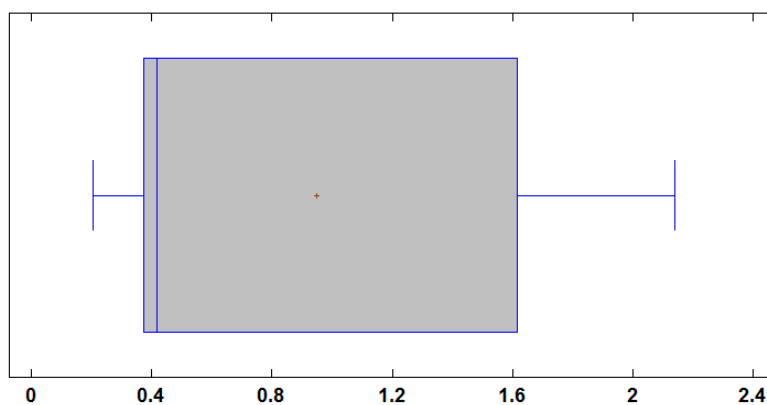


Figura 33. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Fructosa hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.36609

Valor-P = 0.664611

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.950471. El valor más extremo es 1.36609 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.13. Identificación de valores atípicos – Mezcla aspartame:acesulfame hembras

Datos/Variable: Mix H

5 valores con rango desde 0.117009 a 1.67088

Número de valores actualmente excluidos: 0

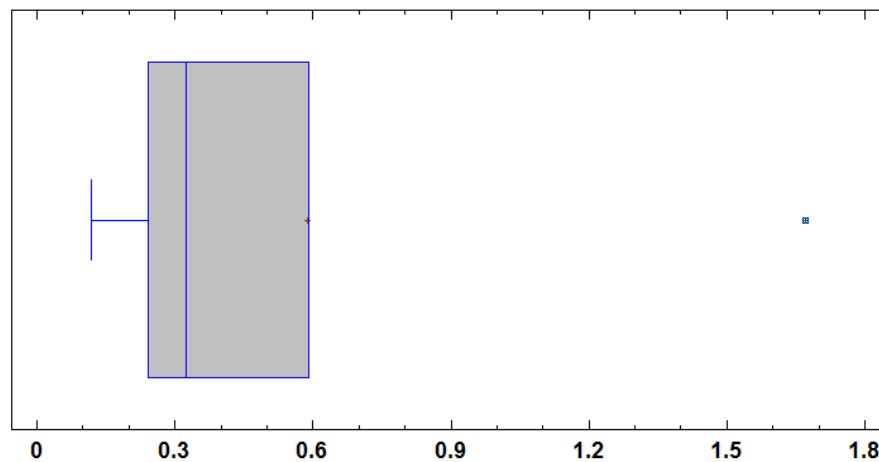


Figura 34. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Mezcla aspartame:acesulfame hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.71894

Valor-P = 0.0461038

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.589217. El valor más extremo es 1.71894 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es menor que 0.05, por lo que el valor de MH1 es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.14. Identificación de valores atípicos - Sucralosa hembras

Datos/Variable: Suc H

5 valores con rango desde 0.255241 a 2.02436

Número de valores actualmente excluidos: 0

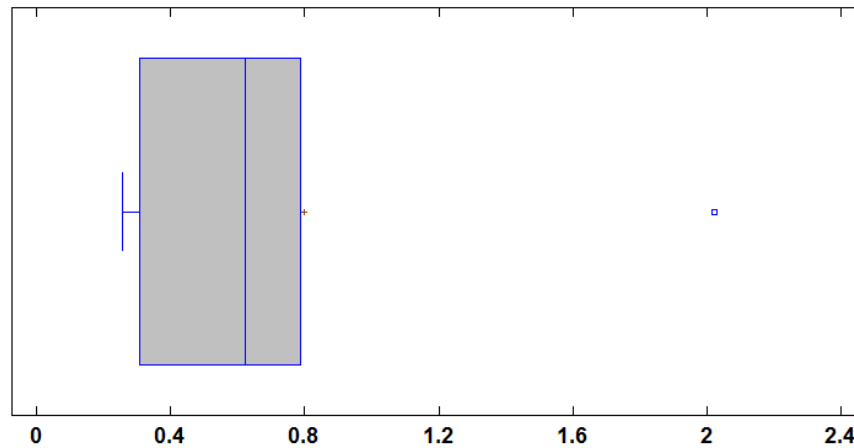


Figura 35. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sucralosa hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.70244

Valor-P = 0.063265

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.799414. El valor más extremo es 1.70244 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.15. Identificación de valores atípicos - Sacarina hembras

Datos/Variable: Sn H

5 valores con rango desde 0.163877 a 1.99217

Número de valores actualmente excluidos: 0

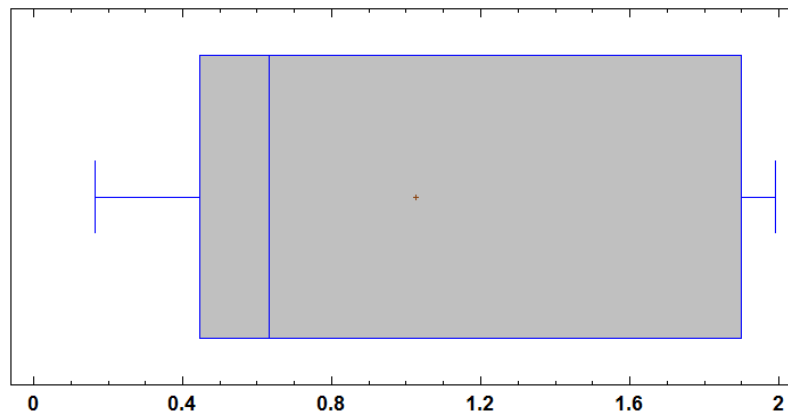


Figura 36. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Sacarina hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.12755

Valor-P = 1.0

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 1.02711. El valor más extremo es 1.12755 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

B.16. Identificación de valores atípicos – Acesulfame de potasio hembras

Datos/Variable: Ace. K H

5 valores con rango desde 0.285986 a 1.15372

Número de valores actualmente excluidos: 0

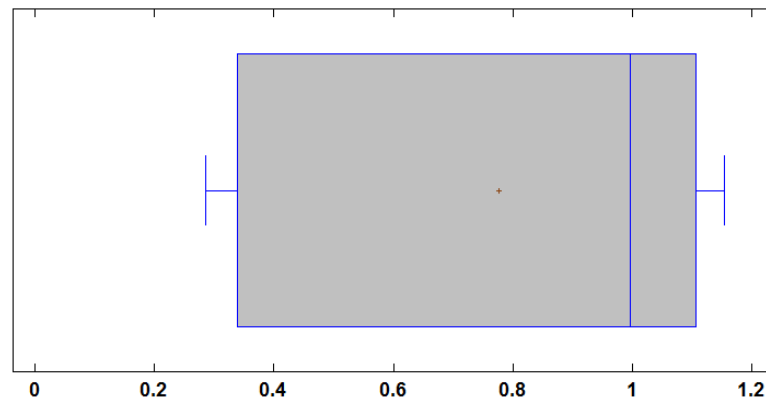


Figura 37. Gráfica de caja y bigotes para el Grupo Acesulfame de potasio hembras

Prueba de Grubbs (supone normalidad)

Estadístico de prueba = 1.14698

Valor-P = 1.0

Los valores estudentizados miden a cuántas desviaciones estándar se encuentra cada valor de la media muestral de 0.776399. El valor más extremo es 1.14698 desviaciones estándar de la media. Puesto que el valor-P para la prueba de Grubbs es mayor o igual que 0.05, ese valor no es un aberrante significativo con un nivel de significancia del 5.0%, suponiendo que todos los demás valores siguen una distribución normal.

C. Prueba de Levene

El estadístico mostrado en la Tabla 36 evalúa la hipótesis de que la desviación estándar de *ChREBP*/Actina dentro de cada uno de los 8 niveles de edulcorante es la misma. De particular interés es el valor-P. Puesto que el valor-P es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 36. Resultado de la prueba de Levene

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Diferencia entre grupos en hembras	0.940336	0.49083
Diferencia entre grupos en machos	0.703945	0.668638
Diferencia entre grupos	0.561414	0.784459

ANEXO 2

ACERVO FOTOGRÁFICO

A continuación, se presentan algunas fotografías del proceso experimental

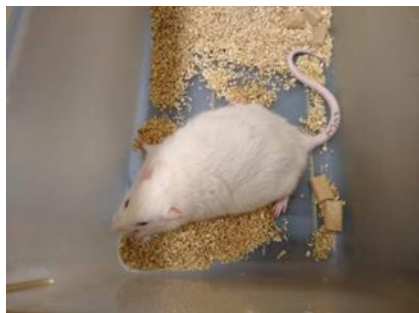


Figura 38. Macho 33 justo antes de eutanasia



Figura 39. Extracción de proteína en hepatocitos



Figura 40. Equipo BioRad® para la elaboración de geles

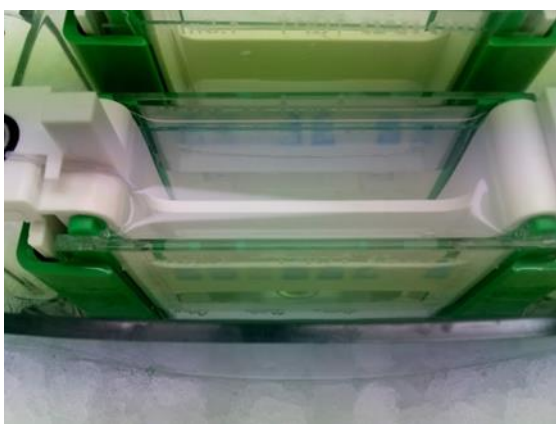


Figura 41. Geles cargados y sumergidos con la solución amortiguadora de carga en la cámara de electroforesis BioRad®



Figura 42. Tinción de membrana con Rojo de Ponceau

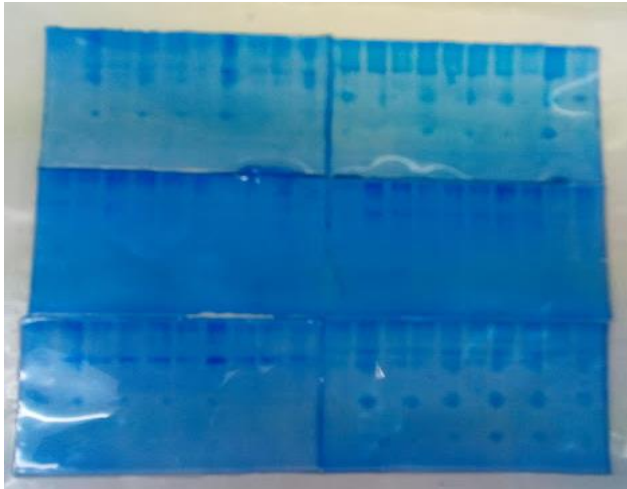


Figura 43. Geles después de electrotransferencia teñidos con Azul de Coomasie



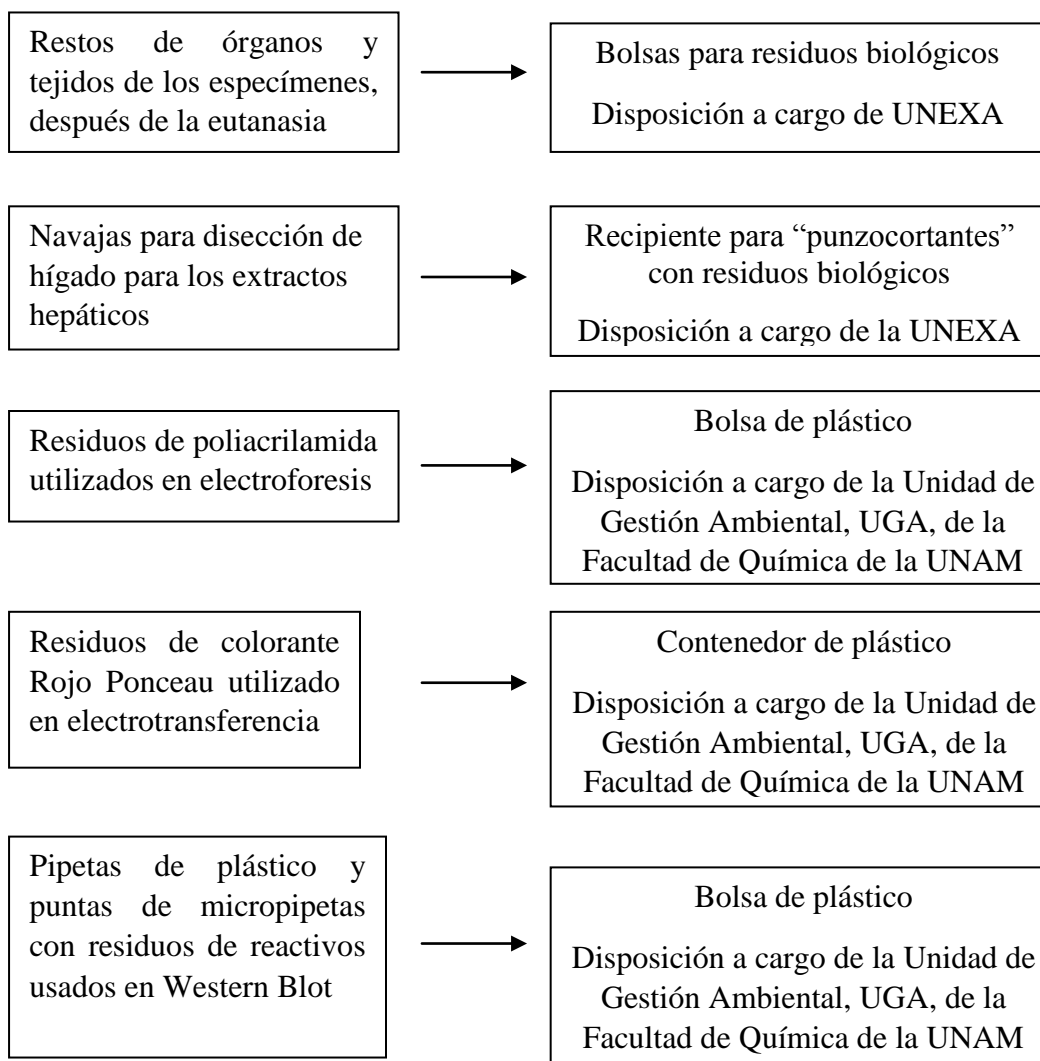
Figura 44. Membranas en agitador orbital para unión con anticuerpos



Figura 45. Cajas con membrana sumergida en solución *Blotto* para bloqueo

ANEXO 3

DISPOSICIÓN CONTROLADA DE LOS RESIDUOS PRODUCIDOS EN ESTA INVESTIGACIÓN



ANEXO 4

ARTÍCULO DE LOS AUTORES DE LA ENCUESTA ENSANUT (2018)⁵

Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E.B., Gómez-Acosta, L, M., Mendoza- Alvarado, L, R., Méndez Gómez-Humarán, I., Rivera-Dommarco, J. 2019. Metodología de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición para localidades con menos de 100 000 habitantes (Ensanut 100k). Cuernavaca, México. *Salud Pública de México*. 61(5): 678-684.

Metodología de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición para localidades con menos de 100 000 habitantes (Ensanut 100k)

Martín Romero-Martínez, PhD,⁽¹⁾ Teresa Shamah-Levy, PhD,⁽¹⁾ Lucía Cuevas-Nasu, MSc,⁽¹⁾ Elsa Berenice Gaona-Pineda, MSc,⁽¹⁾ Luz María Gómez-Acosta, MSc,⁽¹⁾ Laura R Mendoza-Alvarado, MDU,⁽¹⁾ Ignacio Méndez Gómez-Humarán, MSc,⁽²⁾ Juan Rivera-Dommarco, PhD.⁽³⁾

Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, Mendoza-Alvarado LR, Méndez Gómez-Humarán I, Rivera-Dommarco J. Metodología de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición para localidades con menos de 100 000 habitantes (Ensanut 100k). *Salud Publica Mex*. 2019;61:678-684. <https://doi.org/10.21149/10539>

Resumen

Objetivo. Describir el diseño metodológico de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en localidades con menos de 100 000 habitantes (Ensanut 100k). **Material y métodos.** La Ensanut 100k es una encuesta probabilística que sobrerrepresenta a los hogares con menos capacidades económicas. Se describe el alcance de la encuesta, los procedimientos de muestreo, medición e inferencia y la organización logística. **Resultados.** Se obtuvieron 10 461 entrevistas de hogar y 26 161 de individuos. La tasa de respuesta de hogar fue 89% y de individuos 92%. **Conclusiones.** El diseño probabilístico de la Ensanut 100k permite hacer inferencias estadísticas válidas sobre parámetros de interés para la salud pública en localidades con menos de 100 000 habitantes, localidades donde vive 52% de la población según el censo de 2010. La comparabilidad de los resultados con la Ensanut 2012 facilita evaluar las acciones de apoyo que otorga el gobierno a poblaciones con menores capacidades económicas en el periodo 2012-2018.

Palabras clave: encuestas poblacionales; pobreza; México

Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, Mendoza-Alvarado LR, Méndez Gómez-Humarán I, Rivera-Dommarco J. Methodology of the National Health and Nutrition Survey for localities with less than 100 000 inhabitants (Ensanut 100k). *Salud Publica Mex*. 2019;61:678-684. <https://doi.org/10.21149/10539>

Abstract

Objective. To describe the methodological design of the National Health and Nutrition Survey in localities with less than 100 000 inhabitants (Ensanut 100k). **Materials and methods.** The Ensanut 100k is a probabilistic survey that over-represents households with less economic capabilities. This paper describes the scope of the survey, sampling procedures, measurement and inference and logistics organization. **Results.** 10 461 home interviews and 26 161 individual interviews were obtained. The household response rate was 89 and 92% from individuals. **Conclusions.** The probabilistic design of the Ensanut 100k allows to make valid statistical inferences about parameters of interest for public health in localities with less than 100 000 inhabitants, localities where 52% of the population lives according to the 2010 census. The comparability of the results with the Ensanut 2012 facilitates the assessment of the government's support actions to populations with lower economic capacities in the period 2012-2018.

Keywords: population surveys; poverty; Mexico

⁵ Datos proporcionados en una conferencia del PUAL (15/Marzo/2020) y artículo de Nuttal (2015) sobre la pertinencia del uso del Índice de masa corporal, IMC

México es un país que se ha caracterizado por presentar una enorme desigualdad en el ingreso, el nivel educativo y el acceso a oportunidades. Como ejemplo, en 2010,¹ más de 60% de la población en localidades rurales y de entre 2 500 y 15 000 habitantes vivía en condición de pobreza, comparado con 49.4% en ciudades de entre 15 000 y 100 000 y 30.9% en ciudades con más de 100 000 habitantes. Aunado a lo anterior, la Organización Mundial de la Salud² ha demostrado la fuerte relación entre la salud de los individuos y sus condiciones de vida. Por ello resulta relevante describir de modo cuantitativo la relación entre los estados de salud y nutrición con las condiciones de vida, en especial de las personas con mayor vulnerabilidad.

En México, las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición, Ensanut 2006, Ensanut 2012 y Ensanut MC 2016³⁻⁵ han sido un insumo fundamental para la planificación y desarrollo de políticas públicas porque han estudiado a profundidad y de manera conjunta los estados de salud y nutrición, además de las condiciones de vida y la efectividad de los programas de asistencia social que ha establecido el gobierno mexicano con el fin de paliar las vulnerabilidades derivadas de las desigualdades existentes.⁶ Entonces, ante la siempre imperiosa necesidad de contar con información sobre la población con mayores vulnerabilidades, el Instituto Nacional de Salud Pública, en colaboración con el programa *Prospera*, diseñaron una encuesta (*Ensanut Prospera 2016*) representativa de los beneficiarios de dicho programa y de la población en general que habita en localidades con menos de 100 000 habitantes.

En este artículo se presenta de forma detallada la metodología de la Ensanut 100k, la cual es una submuestra de la Ensanut *Prospera* 2016, que puede ayudar a plantear acciones que permitan entender las problemáticas de salud y a buscar soluciones efectivas para las personas que habitan en localidad es con menos de 100 000 habitantes, donde vive 52% de la población y tienen la mayor prevalencia de pobreza.

Material y métodos

Ensanut *Prospera* 2016

La Ensanut *Prospera* 2016 es una encuesta que tuvo como objetivo estudiar de modo prioritario la salud y nutrición de los habitantes de los hogares beneficiarios del programa *Prospera*. El tamaño de muestra planeado fue de 14 000 hogares, de los cuales 10 000 serían beneficiarios del programa. La Ensanut *Prospera* 2016 visitó 13 043 hogares, de los cuales 9 487 fueron identificados como beneficiarios de *Prospera*; la reducción en el tamaño

de muestra de hogares se debió a la veda electoral de las elecciones federales de julio de 2016 y no impactó en el número esperado de cuestionarios completos individuales. Los resultados de la Ensanut *Prospera* 2016 se presentan en su informe final.⁶ En esta investigación, toda la información se acota a las localidades con menos de 100 000 habitantes con el fin de tener una presentación coherente con los datos a analizar, otorgándole a esta submuestra el nombre de Ensanut 100k. Las localidades de 100 000 o más habitantes se excluyeron de este análisis porque la Ensanut *Prospera* 2016 tuvo una cobertura baja (36%) en dichas localidades.

Población objetivo

La población objetivo de este análisis se definió como la unión de dos subconjuntos de habitantes de viviendas particulares: a) viviendas en localidades rurales (localidades con menos de 2 500 habitantes) y b) viviendas en localidades con menos de 100 000 habitantes donde la frecuencia de hogares *Prospera* es mayor a 8%, misma que se aproximó como el cociente entre el número de hogares beneficiarios de *Prospera* al finalizar 2016⁷ y el número de viviendas habitadas en el censo de 2010.

Alcances de la encuesta

En la Ensanut 100k se estudiaron temas importantes para la salud y nutrición que han sido abordados en encuestas previas.³⁻⁵ Se aplicaron los siguientes cuestionarios a todos los grupos de edad: variables sociodemográficas, condición laboral, escolaridad, características de la vivienda, condición indígena, funcionalidad y discapacidad; accidentes, lesiones y violencia; utilización de servicios de salud, antropometría, hemoglobina capilar (1+ años); ingesta de alimentos y bebidas de siete días, seguridad alimentaria y programa de ayuda alimentaria. Para los preescolares (0 a 4 años) se indagó sobre vacunación, infecciones respiratorias agudas y diarrea; atención prenatal, al nacer y en la primera infancia; deficiencia de micronutrientes, desarrollo infantil temprano (DIT), plomo en sangre y prácticas de lactancia y alimentación complementaria en menores de tres años. Para los escolares (5 a 9 años), vacunación y uso de disciplina violenta; para los adolescentes (10 a 19 años), salud sexual y reproductiva, consumo de tabaco y alcohol, uso de disciplina violenta, actividad física (15 a 19 años). En adultos, vacunación (20 a 59 años), salud sexual y reproductiva, tensión arterial, atención del paciente diabético/hipertenso, enfermedades crónicas, actividad física (20 a 69 años) y etiquetado de alimentos y bebidas.

Procedimiento de muestreo

Tamaño de muestra

Después de excluir los hogares que pertenecían a localidades con más de 100 000 habitantes, el número estimado para la Ensanut 100k fue de 11 542 (cuadro I). El 77.4% (8 937/11 542) de ellos era beneficiario del programa *Prospera*, mientras que 22.6% restante no lo era. La mayor parte de los hogares se concentraron en la zona sur (56.8%) y centro (26.9%), seguido de la zona norte (13.5%) y la Ciudad de México (2.7%).

Dominios de estudio

La población objetivo se dividió en cuatro regiones (Norte, Centro, Ciudad de México-Estado de México conurbado y Sur), las cuales han sido utilizadas en encuestas previas sobre salud y nutrición.³⁴³ Las regiones son grupos de estados que pueden usarse para estudiar variaciones geográficas de modo compatible con otras encuestas, pero es posible formar nuevas regiones porque los estados fueron estratos muestrales.

Selección de unidades primarias y secundarias

Las unidades primarias de muestreo fueron las áreas geoestadísticas básicas (AGEB) y se clasificaron de acuerdo con el tamaño de la localidad a la que pertenecían. Las localidades con menos de 2 500 habitantes fueron clasificadas como rurales y el resto como urbanas. Las AGEB urbanas pertenecen al censo de 2010. Las AGEB rurales corresponden al Censo de Población y Vivienda 2005, pero agrupan a las localidades rurales del censo de 2010. Las AGEB se seleccionaron con probabilidad proporcional a su población total según el censo de

Cuadro I
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA EN
VIVIENDAS. MÉXICO, ENSANUT 100K

Región nutrición	Muestra		Total
	Prospera	No Prospera	
Norte	1 223	340	1 563
Centro	2 405	699	3 104
DF-Mex	213	105	317
Sur	5 097	1 460	6 557
Total	8 937	2 605	11 542

Ensanut Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (100k; para localidades con menos de 100 000 habitantes)

2010. Las unidades secundarias de muestreo fueron las localidades en las AGEB rurales y en las urbanas fueron las manzanas. Las unidades secundarias de muestreo fueron seleccionadas con probabilidad proporcional a su población según el censo de 2010. El número de manzanas/localidades a seleccionar por AGEB fue diferente por región; se seleccionaron más manzanas/localidades en las regiones donde los hogares *Prospera* son menos frecuentes (Norte, Ciudad de México-Estado de México conurbado).

Selección de viviendas

En las localidades rurales se contabilizaron los espacios con el potencial de ser viviendas y se seleccionaron entre 40 y 60 espacios en campo, donde se preguntó si pertenecían al programa *Prospera*. Luego, conociendo la pertenencia a *Prospera*, se seleccionaron en promedio 29 viviendas *Prospera* y siete viviendas no *Prospera* o sin información por AGEB. De modo similar, en las manzanas urbanas se seleccionaron entre 35 y 45 espacios en campo, donde se preguntó la pertenencia a *Prospera*; a continuación, se seleccionaron en promedio 20 viviendas *Prospera* y 16 viviendas no *Prospera* o sin información por AGEB. Así, la muestra de viviendas generada por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) sobrerrepresentó a los hogares *Prospera* y subrepresentó a los hogares no *Prospera*. La selección de AGEB, manzanas, localidades y viviendas se realizó en las oficinas del INSP.

Selección de individuos en las viviendas

Siempre que fue posible, en cada hogar se seleccionaron a los siguientes individuos, especificados mediante edades en años cumplidos: a) todos los preescolares (0 a 4 años) para el cuestionario DIT, b) un escolar (5 a 9 años), c) un preescolar (0 a 4 años), d) un adolescente (10 a 19 años) y e) un adulto (20 años o más). Adicionalmente, se definieron las siguientes submuestras: a) el cuestionario de utilizador se aplicó en 70% de los hogares, seleccionando un habitante que hubiera experimentado algún problema de salud o lesión en el último mes; b) el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se aplicó en hasta dos personas (escolar, adolescente o adulto) seleccionadas en cada hogar.

Procedimiento de medición

El procedimiento de medición consta de dos elementos: diseño de cuestionarios y aplicación de los mismos. Los cuestionarios se diseñaron teniendo presente la comparabilidad de resultados; por ello, la gran mayoría de las

preguntas aplicadas provienen de otras encuestas cuyos resultados han sido validados. El cuestionario de DIT nunca había sido utilizado en una Ensanut, pero ha sido probado en las encuestas de indicadores múltiples por conglomerados (MICS) desarrolladas por el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF).⁹ También se hicieron mediciones de plomo en sangre a niños y niñas de 1 a 4 años. Los cuestionarios fueron aplicados por equipos que recibieron una capacitación muy cuidadosa en técnicas de entrevista y en el marco conceptual de los temas de investigación. Adicionalmente, los entrevistadores encargados de hacer las mediciones antropométricas, de tensión arterial y de toma de muestras sanguíneas fueron sometidos a un proceso de estandarización. La capacitación de los entrevistadores fue realizada por los investigadores especialistas del INSP en cada tema. Las entrevistas se aplicaron cara a cara y fueron registradas mediante un sistema de cómputo desarrollado por el INSP.

Diseño logístico de la encuesta

El trabajo de campo lo realizaron tres equipos: cartografía, salud y nutrición. Cada equipo tuvo una coordinación independiente para evitar sesgos de selección. El equipo de cartografía se encargó de hacer los listados de espacios con el potencial de ser viviendas e identificar los hogares beneficiarios de *Prospera* en una muestra de espacios. El equipo de salud recibió la muestra que sobrerrepresentaba a los hogares *Prospera* y aplicó los cuestionarios de hogar e individuales (preescolar, escolar, adolescentes, adultos, utilizadores y desarrollo infantil temprano). También obtuvo el consentimiento informado de los adultos y el asentimiento informado de los responsables de los menores de edad (10 a 17 años). La tercera etapa estuvo a cargo del equipo de nutrición, el cual, después de la visita de salud, acudió a los hogares y obtuvo las mediciones antropométricas y de tensión arterial, aplicó cuestionarios sobre actividad física y dieta, y recolectó muestras de sangre venosa y capilar para la medición de los niveles de hemoglobina y plomo. El operativo en campo tuvo una duración de 21 semanas. El equipo de campo estuvo formado por 18 cartógrafos y 18 brigadas. Cada brigada estuvo integrada por ocho entrevistadores, un supervisor, un apoyo de cómputo y un chofer. El operativo contó con el seguimiento de ocho coordinadores en campo y cuatro más en oficina.

Procedimientos de inferencia

Ponderación

El ponderador w_i es un número asociado con cada medición Y_i . Los ponderadores sirven para estimar el

total del atributo Y mediante $\sum_i w_i Y_i$.¹⁰ Los ponderadores se construyeron considerando tres elementos: la probabilidad de selección, las tasa de respuesta y los factores de calibración, los cuales sirvieron para hacer que los totales estimados de individuos reproduzcan resultados censales. En la Ensanut 100k, los factores de ponderación son esenciales para el análisis porque los hogares *Prospera* están sobrerrepresentados y los hogares no *Prospera* están subrepresentados.

Evaluación de sesgos potenciales debido a exclusiones

La población objetivo de la Ensanut 100k no incluyó a todas las localidades con menos de 100 000 habitantes, por lo tanto, deben evaluarse los sesgos potenciales. Usando los datos de la Ensanut 2012,⁴ se calcula el estimador restringido a la población objetivo de Ensanut 100k y se contrasta el estimador restringido a las localidades con menos de 100 000 habitantes contra los parámetros de interés.

Tasas de respuesta

Las tasas de respuesta se calculan como la fracción de viviendas/individuos con resultados exitosos. También se considera a las viviendas o individuos añadidos para compensar la no respuesta. Con el fin de simplificar la información, no se presentan tasas de respuesta desagregadas por tipo de muestra, ya sea original o adicional, donde la muestra adicional son las viviendas o individuos añadidos.

Construcción del índice de capacidades económicas

La estratificación de hogares se hizo mediante un índice construido a partir de un análisis de componentes principales que consideró a las variables que describen las condiciones de la vivienda (tipo de piso, de techo y de paredes, número de cuartos, disponibilidad de agua y posesión de autos), el número de aparatos electrónicos que se poseen (TV, cable, computadora, radio, teléfono) y el número de equipos domésticos (refrigerador, estufa, lavadora, boiler, horno de microondas). El índice construido se denominó "de capacidades económicas" porque la posesión de bienes y condiciones de una vivienda pueden considerarse como una aproximación a las capacidades económicas de un hogar. Las variables incluidas en el análisis de componentes principales se eligieron por dos razones: a) han sido usadas para construir estratos en la Ensanut 2006 y Ensanut 2012, y b) están disponibles en otras encuestas, lo que facilita la comparabilidad de resultados. El índice de capacidades económicas se construyó utilizando los datos de

la Ensanut 2012;⁴ luego, con los coeficientes obtenidos se calculó el índice en los hogares de la Ensanut 100k. Se formaron tres estratos con igual número de hogares a partir del índice de capacidades; el de menores capacidades se denominó tercil 1 y el de mayores tercil 3.

Validación de los resultados

Las encuestas probabilísticas son el único método con la capacidad de generar muestras representativas,¹¹ esto es, muestras que repliquen de modo aproximado la distribución de casi cualquier variable en la población. Por otra parte, el sexo y la edad son dos factores condicionantes del estado de salud y nutrición. Cabe destacar que la muestra de la Ensanut 100k reproduce la distribución por edad y sexo de la Ensanut 2012.

Procedimientos éticos

Los procedimientos operativos de la encuesta fueron autorizados por las Comisiones de Ética, Investigación y Bioseguridad del INSP. Adicionalmente, la Dirección General de Epidemiología revisó el diseño de la encuesta. La voluntariedad de la participación para cada cuestionario quedó registrada en formatos de consentimiento informado o asentimiento.

Resultados

Alcances de la Ensanut 100k

La Ensanut 100k es una encuesta cuya cobertura depende del tamaño de la localidad (cuadro II). La Ensanut 100k cubre 100% de las localidades con menos de 2 500 habitantes y a 86% de la población que vive en localidades de entre 2 500 y 99 999 habitantes. De modo agregado, la población objetivo de la Ensanut 100k representa 48% del total nacional y es un subconjunto de las localidades con menos de 100 000 habitantes, las cuales representan 52% de la población nacional. La Ensanut 100k tiene las coberturas siguientes en las localidades con menos de 100 000 habitantes: 92.1% de todos los hogares, 98.7% de todos los hogares *Prospera* y 97.6% de los hogares en el primer tercil económico.

Selección de unidades primarias y viviendas

La muestra de la Ensanut 100k quedó distribuida en 32 entidades, 296 municipios, 777 localidades y 323 AGEB. Se visitaron 40 422 viviendas en la etapa de cartografía; 13 284 reportaron tener algún beneficiario de *Prospera*. Se seleccionaron 11 501 viviendas y 8 813 de éstas afirmaron

tener algún beneficiario de *Prospera*. Se visitaron un total de 11 761 hogares, de los cuales se obtuvo respuesta en 10 461 y 7 825 fueron clasificados como hogares *Prospera* en la entrevista de hogar.

Tasas de respuesta y número esperado de sujetos

La tasa de respuesta de cartografía contabiliza las viviendas seleccionadas para la encuesta en las que se logró asignar al menos un cuestionario. La tasa de respuesta de cartografía fue de 94% de los hogares planeados (43 384/46 189 hogares). La tasa de respuesta de hogar fue calculada en 89% (10 461 hogares de 11 761 hogares visitados). El cuadro III presenta las tasas de respuesta y tamaños de muestra conseguidos para los grupos poblacionales de interés. Se obtuvieron más adolescentes y niños de los planeados por hogar, lo cual es explicable porque los hogares *Prospera* están sobrerrepresentados en la muestra y tienen mayor número de menores. Por ejemplo, en la Ensanut 2012,⁴ el promedio de personas de entre 0 y 19 años por hogar *Prospera* fue de 2.18; en contraste, fue de 1.32 en viviendas sin *Prospera*. Adicionalmente, se obtuvieron tasas de respuesta mayores a las planeadas.

La sobrerrepresentación de hogares obligó a hacer una selección de hogares donde no se entrevistó a niños (0 a 9 años) o adolescentes. De modo aproximado, la selección mencionada ocurrió en 40% de hogares visitados y la fracción de selección fue de 15%. La selección no tiene efecto en las inferencias porque fue considerada en la construcción de los ponderadores y se cumplieron los tamaños de muestra planeados.

Evaluación de sesgos

Aunque la cobertura de la Ensanut 100k no es de 100% (respecto a las localidades con menos de 100 000 habitantes), el cuadro IV ilustra que los sesgos no son de significancia práctica para tres variables relevantes: escolaridad, morbilidad y pertenencia a *Prospera*.

Índice de capacidades económicas

El primer componente principal, definido como índice de carencias, explicó 40% de la variabilidad de las variables. En la Ensanut 100k la distribución ponderada de hogares según el índice de carencias fue tercil 1, 57%; tercil 2, 26%; tercil 3, 17%. En contraste, la distribución referida en la Ensanut 2012 fue tercil 1, 53%; tercil 2, 31%; tercil 3, 16%. Entonces, se pueden considerar como similares, de acuerdo con el índice de capacidades económicas, a los hogares visitados en la Ensanut 100k y a los de la Ensanut 2012 restringidos al dominio de

Cuadro II
DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN MEXICANA
SEGÚN TAMAÑO DE LOCALIDAD E INCLUSIÓN EN
LA ENSANUT 100K. DATOS DEL CENSO 2010.
MÉXICO, ENSANUT 100K

Tamaño de la localidad (habitantes)	Excluido Ensanut 100k %	Ensanut 100k %	Nacional (todas las localidades) %
1 a 2 499		23	23
2 500 a 99 999	4	25	29
100 000 o más	48		48
Nacional	52	48	100

Ensanut: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

Ensanut 100k. En consecuencia, es plausible hacer un análisis de tendencias entre 2012 y 2018.

Validación de los resultados

El panel A de la figura 1 presenta la distribución de edad y sexo en los hogares urbanos de *Prospera* en la Ensanut 100k. El panel B presenta la distribución de edad y sexo en los hogares urbanos de *Prospera* de la Ensanut 2012 para el dominio de estudio de la Ensanut 100k. Se observa que las diferencias entre las distribuciones de la figura 1 no son mayores a 1% para todos los grupos de edad. Por ello, se considera que la Ensanut 100k reproduce la distribución de edad de la Ensanut 2012 en los hogares urbanos de *Prospera*. Se obtienen resultados similares para los hogares rurales de *Prospera* y los hogares rurales/urbanos que no son de *Prospera* (datos no mostrados).

Cuadro IV
COMPARACIÓN ENTRE ESTIMACIONES* EN EL
DOMINIO ENSANUT 100K (●_{100k}) Y ESTIMACIONES
EN LOCALIDADES CON MENOS DE 100 000
HABITANTES (●). MÉXICO, ENSANUT 100K

Dominio de estimación	Escolaridad hasta secundaria %	Recibe beneficios de Prospera %	Morbilidad en últimas dos semanas %
Localidades 100k	80.0	20.1	12.8
Ensanut 100k	81.0	21.5	12.8

* Estimaciones obtenidas de Ensanut 2012 en personas de cinco años o más.
Ensanut: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

Resultados de la ponderación

Los ponderadores se calibraron para replicar los siguientes parámetros poblacionales: a) total de hogares beneficiarios por estado en el padrón del Programa *Prospera* en diciembre 2017, b) total de viviendas particulares habitadas y personas por estado en el censo de 2010, c) la predicción de la población nacional a mediados de 2018 del Consejo Nacional de Población (Conapo) y d) el porcentaje de población masculina del censo de 2010. Como resultado, la Ensanut 100k supone una tasa de crecimiento de 1.67% anual. El número de integrantes y hogares estimados por la Ensanut 100k fue de 42 502 personas y 10 461 hogares no ponderado con un cociente de 4.06.

Cuadro III
COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE INDIVIDUOS SELECCIONADOS PLANEADOS Y OBSERVADOS
PARA LAS DIFERENTES SUBMUESTRAS. MÉXICO, ENSANUT 100K

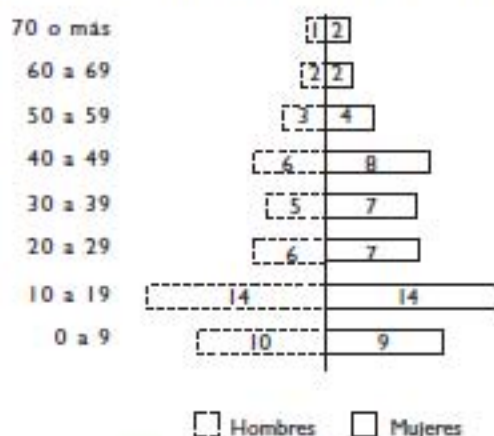
Submuestra (años)	Promedio de individuos a seleccionar por hogar		Tasa de respuesta		Cuestionarios completos
	Planeado	Observado	Planeado %	Observado %	
0 a 4	0.26	0.29	93	98	2 943
5 a 9	0.27	0.33	93	99	3 360
10 a 19	0.43	0.50	87	91	4 768
20 o más	1.00	1.00	85	89	9 286
DIT* (0 a 4)	.33	0.37	85	93	3 576
Utilizadores [†]	.27	0.23	93	93	2 228

* La submuestra desarrollo infantil temprano (DIT) seleccionó a todos los niños de 0 a 4 años.

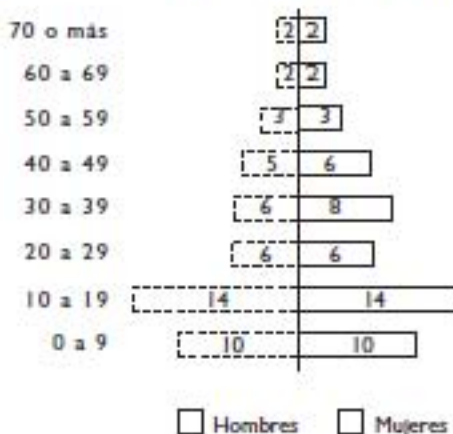
[†] Se seleccionó un utilizador en 70% de los hogares; para el resto de las submuestras se seleccionó un sujeto por hogar.

Ensanut: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

A) Hogares Prospero urbanos no ponderado de Ensanut 100k



B) Hogares Prospero urbanos no ponderados de Ensanut 2012



Ensanut Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FIGURA 1. COMPARACIÓN DE LA PIRÁMIDE DE EDAD. MÉXICO, ENSANUT 100K

Discusión

La Ensanut 100k logró una cobertura total en localidades de menos de 2 500 habitantes y una cobertura de 86% en localidades de 2 500 a 99 999 habitantes. Esta característica permite que la Ensanut 100k proporcione información representativa de estas localidades. Adicionalmente, la Ensanut 100k logró una distribución de participantes por tercil socioeconómico similar a la Ensanut 2012; esta característica permite que dentro de la Ensanut 100k se puedan contrastar las condiciones de salud y nutrición entre el tercil 1 (57% de la muestra) y los terciles 2 y 3 (26 y 17%, respectivamente).

Finalmente, la Ensanut 100k abre nuevas oportunidades para el análisis de equidad en salud y nutrición de las localidades con mayor prevalencia de población vulnerable del país, que puede ser la base para el diseño de las políticas de salud pública que impacten favorablemente en el bienestar de la población mexicana con menores capacidades económicas.

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. Pobreza urbana y de las zonas metropolitanas en México [documento en internet]. México: Coneval, 2012 [citado junio 26, 2019]. Disponible en: https://www.coneval.org.mx/Informes/Pobreza/Pobreza%20urbana/Pobreza_urbana_y_de_las_zonas_metropolitanas_en_Mexico.pdf

2. Shelham A. Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. A report of the WHO Commission on Social Determinants of Health (CSDH) 2008. *Community Dent Health*. 2009;26(1):2-3.

3. Oláiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/Informes/ensanut2006.pdf>

4. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JA. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pública Mex*. 2013;55(suppl 2):S332-40. <https://doi.org/10.21149/spm.v55s2.5132>

5. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Méndez Gómez-Humarán I, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, et al. Diseño metodológico de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Pública Mex*. 2017;59(3):299-305. <https://doi.org/10.21149/8593>

6. Morales-Ruán MC, Shamah-Levy T, Mundo-Rosas V, Cuevas-Nasu L, Lozada-Tequeanes AL, Romero-Martínez M. Evolución de los Programas de Ayuda Alimentaria en México a través de información de la Ensanut MC 2016. *Salud Pública Mex*. 2018;60:319-27. <https://doi.org/10.21149/8818>

7. Prospera. Módulo de Prospera en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) 2017-2018 [documento en internet]. México: Prospera, 2018 [citado junio 26, 2019]. Disponible en: https://evaluacion.prospera.gob.mx/es/docs/p_docs2018.php

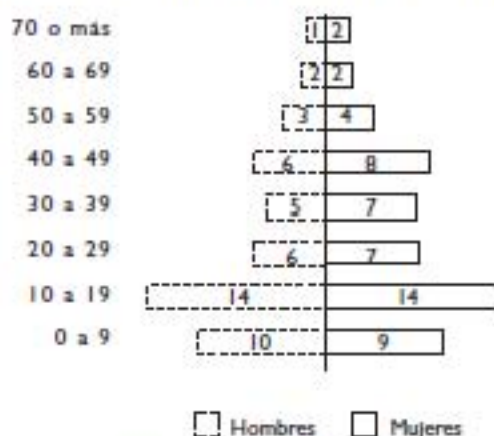
8. Rivera-Dommarco J, Levy TS. Presentación de resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. *Salud Pública Mex*. 2002;44(2):188. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000200013>

9. de Castro F, Rojas R, Villalobos A, Allen B, Hubert C, Romero M, et al. Bases metodológicas y resultados de la implementación de la Encuesta Nacional de Niños, Niñas y Mujeres en México 2015. *Salud Pública Mex*. 2016;58(6):676-84. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i6.8192>

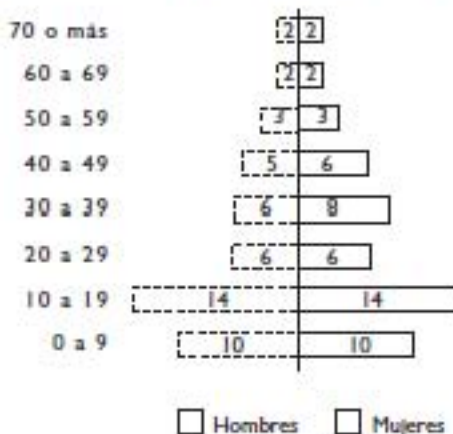
10. Valliant R, Dever JA, Kreuter F. Practical tools for designing and weighting survey samples. New York: Springer, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6449-5>

11. Kish L. Statistical design for research. New York: Wiley & Sons, 1987. <https://doi.org/10.1002/bmjl.4710300736>

A) Hogares Prospera urbanos no ponderado de Ensanut 100k



B) Hogares Prospera urbanos no ponderados de Ensanut 2012



Ensanut: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición

FIGURA 1. COMPARACIÓN DE LA PIRÁMIDE DE EDAD. MÉXICO, ENSANUT 100K

Discusión

La Ensanut 100k logró una cobertura total en localidades de menos de 2 500 habitantes y una cobertura de 86% en localidades de 2 500 a 99 999 habitantes. Esta característica permite que la Ensanut 100k proporcione información representativa de estas localidades. Adicionalmente, la Ensanut 100k logró una distribución de participantes por tercil socioeconómico similar a la Ensanut 2012; esta característica permite que dentro de la Ensanut 100k se puedan contrastar las condiciones de salud y nutrición entre el tercil 1 (57% de la muestra) y los terciles 2 y 3 (26 y 17%, respectivamente).

Finalmente, la Ensanut 100k abre nuevas oportunidades para el análisis de equidad en salud y nutrición de las localidades con mayor prevalencia de población vulnerable del país, que puede ser la base para el diseño de las políticas de salud pública que impacten favorablemente en el bienestar de la población mexicana con menores capacidades económicas.

Declaración de conflicto de intereses. Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Referencias

1. Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. Pobreza urbana y de las zonas metropolitanas en México [documento en internet]. México: Coneval, 2012 [citado junio 26, 2019]. Disponible en: https://www.coneval.org.mx/Informes/Pobreza/Pobreza%20urbana/Pobreza_urbana_y_de_las_zonas_metropolitanas_en_Mexico.pdf

2. Sheiham A. Closing the gap in a generation: health equity through action on the social determinants of health. A report of the WHO Commission on Social Determinants of Health (CSDH) 2008. *Community Dent Health*. 2009;26(1):2-3.

3. Olaitz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villalpando-Hernández S, Hernández-Avila M, Sepúlveda-Amor J. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006. Disponible en: <https://ensanut.insp.mx/Informes/ensanut2006.pdf>

4. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Franco-Núñez A, Villalpando S, Cuevas-Nasu L, Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco JA. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: diseño y cobertura. *Salud Pública Mex*. 2013;55(suppl 2):S332-40. <https://doi.org/10.21149/spm.v55s2.5132>

5. Romero-Martínez M, Shamah-Levy T, Cuevas-Nasu L, Méndez-Gómez-Humarán I, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, et al. Diseño metodológico de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Salud Pública Mex*. 2017;59(3):299-305. <https://doi.org/10.21149/8593>

6. Morales-Ruán MC, Shamah-Levy T, Mundo-Rosas V, Cuevas-Nasu L, Lozada-Tequeanes AL, Romero-Martínez M. Evolución de los Programas de Ayuda Alimentaria en México a través de información de la Ensanut MC 2016. *Salud Pública Mex*. 2018;60:319-27. <https://doi.org/10.21149/8818>

7. Prospera. Módulo de Prospera en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Ensanut) 2017-2018 [documento en internet]. México: Prospera, 2018 [citado junio 26, 2019]. Disponible en: https://evaluacion.prospera.gob.mx/es/docs/p_docs2018.php

8. Rivera-Dommarco J, Levy TS. Presentación de resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. *Salud Pública Mex*. 2002;44(2):188. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342002000200013>

9. de Castro F, Rojas R, Villalobos A, Allen B, Hubert C, Romero M, et al. Bases metodológicas y resultados de la implementación de la Encuesta Nacional de Niños, Niñas y Mujeres en México 2015. *Salud Pública Mex*. 2016;58(6):676-84. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i6.8192>

10. Valliant R, Dever JA, Kreuter F. Practical tools for designing and weighting survey samples. New York: Springer, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6449-5>

11. Kish L. Statistical design for research. New York: Wiley & Sons, 1987. <https://doi.org/10.1002/bimj.4710300736>

Body Mass Index

Obesity, BMI, and Health: A Critical Review

Frank Q. Nuttall, MD, PhD

The body mass index (BMI) is the metric currently in use for defining anthropometric height/weight characteristics in adults and for classifying (categorizing) them into groups. The common interpretation is that it represents an index of an individual's fatness. It also is widely used as a risk factor for the development of or the prevalence of several health issues. In addition, it is widely used in determining public health policies. The BMI has been useful in population-based studies by virtue of its wide acceptance in defining specific categories of body mass as a health issue. However, it is increasingly clear that BMI is a rather poor indicator of percent of body fat. Importantly, the BMI also does not capture information on the mass of fat in different body sites. The latter is related not only to untoward health issues but to social issues as well. Lastly, current evidence indicates there is a wide range of BMIs over which mortality risk is modest, and this is age related. All of these issues are discussed in this brief review. *Nutr Today*. 2015;50(3):117–128

Body fatness has been an important psychosocial issue among humans for millennia. It is clearly manifested by paleolithic statuettes of exceedingly plump women. This suggests being “full figured” was highly desirable at least for women. In contrast, images of obese people, males or females, are never exhibited in ancient Egyptian funerary wall paintings, stela, or statues suggesting that fatness was not considered to be a desirable trait there. This also is the case in artifacts from other cultures in the Middle East in that era. Why the degree of fatness has varied in different cultures is not clear. However, it may have depended on the availability of a reliable food supply and the effort required in obtaining it.

Frank Q. Nuttall, MD, PhD, is a full professor at the University of Minnesota, Minneapolis, and chief of the Endocrine, Metabolic and Nutrition Section at the Minneapolis VA Medical Center, Minnesota. His PhD degree is in biochemistry. He has more than 250 scientific publications in peer-reviewed journals, and he is the winner of numerous prestigious academic and scientific awards, including the 2014 Physician/Clinician Award of the American Diabetes Association.

The author has no conflicts of interest to disclose.

Correspondence: Frank Q. Nuttall, MD, PhD, Minneapolis VA Medical Center, One Veterans Dr 111G, Minneapolis, MN 55417 (Nutta001@umn.edu).

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 3.0 License, where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.

DOI: 10.1097/NT.0000000000000092

More recently, the degree of rotundity considered ideal also has varied considerably in the general population, but particularly for young women. Before the 1920s, “full figured” women were considered to be desirable as long as the distribution was hourglass in type. However, the 1920s Flapper era introduced abbreviated and revealing dresses. The result was that thinness was not only desirable but also required. This concept has moderated but still influences women's views of beauty and eating habits at present.

Fatness as a Personal or Society Issue

Traditionally, a person's fatness has been defined at a personal level as well as at a societal level. However, this is difficult to quantify. That is, each individual has his/her own perception of how fat he/she should be. As indicated above, this often depends on a general concept of societal norms or is due to peer pressure. For example, currently in Western societies, young women are often concerned about their body image, and most consider themselves to be too fat, even though they are well within population-based references. This is not only due to societal concepts of an ideal degree of fatness, but also due to thinness being a goal promulgated by the fashion industry and reinforced by commercial advertising. At a societal level, although poorly described or quantified, there also is a degree of fatness beyond which a person generally is considered to be unacceptably fat; that is, there is an ill-defined threshold at which a person is labeled as being “fat” or “obese.” However, it is based on the “I can't define it but I know it when I see it” concept. In addition, implicit in this context is that the location of the excess fat plays a role, as does a person's age. It is much more acceptable to be “overweight” when one is old than when one is young. Also particularly in women, the accumulation of fat in certain areas of the body is considered to be much more acceptable than in other areas. For example, truncal (belly fat) accumulation would be considered to be less acceptable than the accumulation of fat in the peripelvic and thigh areas as well as in the breast area¹; that is, one may be statistically “fat” but with an appropriate figure be merely referred to “as amply endowed” or “pleasingly plump.” The social consequences of being “too fat” are severe. Discrimination begins in childhood and results in serious emotional scars. Societal discrimination limits career choices, and indeed many career paths are closed to those considered to be too fat. Also, societal stigmatization often impairs a person's ability to express his/her intellectual and other talents; that is, they become underachievers. In addition, the

potential pool of mates is limited because of their perceived unattractiveness. Thus, obese people tend to marry other obese people and, parenthetically, to produce obese children.²⁻⁴

Fatness as a Medical Issue

Not only the societal but also the functional and indirectly the medical consequences of an excessive accumulation of fat also have been recognized for millennia. Nevertheless, the concept that "body build" (fatness) is a major population-based medical issue gained popularity in this country only shortly before 1900. Life insurance data accumulated at that time⁵ and subsequently⁶ indicated that body weight, adjusted for height (Wt/Ht), was an independent determinant of life expectancy, and in 1910, the effects of being overweight were noted to be greater for younger people than for the elderly.⁶

Subsequently, the Metropolitan Life Insurance Company in 1959 published tables of average body weights for heights (Wt/Ht) by gender and at different ages.⁷ This was based on data from 1935 to 1953 from more than 4 million adults, mostly men, insured by 26 different insurance companies. The risk for development of certain diseases as well as mortality data related to Wt/Ht differences also were analyzed and reported in the 1960 Statistical Bulletin of the Metropolitan Life Insurance Co.^{8,9}

The Wt/Ht tables were used for many years as a reference for population-based studies. If a person's Wt/Ht was 20% above or below the mean for that height category, he/she was considered to be overweight or underweight, respectively. The insurance data also indicated the ratios of weights for heights (the term used was "body build") at

which mortality was lowest in adults. The latter was referred to as the "ideal" or later the "desirable" weight. All of these data were periodically updated.¹⁰ Interestingly, from 1959 to 1983, the desirable weight, that is, the weight/height representing the lowest mortality had increased.¹⁰⁻¹² However, a "desirable body" weight for height was invariably lower than the average weight for height in the insured population.^{7,10,13}

Problems With the Wt/Ht (Body Build) Index

Early on it was recognized that tall people had a lower death rate than did short people^{7,8,12} with the same Wt/Ht ratio. It also was recognized that a person's height in general and leg length in particular could affect the calculated body mass adjusted for height. A person's bony frame, that is, bone mass, also could affect the interpretation of this ratio. In general, it reflected whether one was narrowly or broadly built. Thus, efforts were made to eliminate lower limb length and frame size as variables.^{7,10} The strategy was to develop representations of body build, that is, charts of weight/height that were independent of these variables. The overall goal was to have the same distribution of Wt/Ht at each level of height.

Although not stated, the implicit goal in developing these tables was to define a person's fat mass as a proportion of their total mass, irrespective of their height or frame size.¹⁴ Efforts were made to adjust for frame size (nonfat mass) by categorizing people as those with a small, medium, or large frame. Estimation of frame size was attempted using a number of measurements including shoulder width, elbow width, knee width, ankle width, and so on.¹⁵ None of these were widely adopted. Nevertheless, frame size based on elbow width was included in the Metropolitan Life weight/height tables,^{7,10} even though it was never validated.

Mathematical Adjustment of Body Build

Mathematically, the issue of adjusting body build for differences in height was approached with the concept that the body, particularly the trunk, could be considered as being a 3-dimensional volume or mass. Thus if a tall person were simply a scaled-up version of a short person, weight would increase approximately with the cube of height.¹⁶ Indeed, several equations were developed and tested based on this concept; that is, the cube root of weight divided by height ($\sqrt[3]{\text{Wt/Ht}}$) or weight/height,³ and so on, but none were ideal.¹⁷ This is because tall people are not just scaled-up versions of short people. As indicated previously, they tend to be more narrowly built resulting in a greater lean/fat proportion of body mass.

Later, it was shown that the body mass for height actually scaled best with weight for height when the height was raised to the 1.6 to 1.7 exponent (Wt/Ht^{1.6} etc).¹⁸ Thus, with an increase in Ht, the effect of Ht on the ratio is exponential, whereas the change in Wt is linear. This has the effect of Ht on the ratio to be magnified as Ht increases. Overall,

it results in a lower ratio in tall people than will be obtained with just a Wt/Ht ratio. Thus, it potentially compensates for a narrower build in tall compared with short people. This exponent is not convenient for use in population-based studies, and it was determined that Wt/Ht² generally was satisfactory.^{16,18} The latter represents the Quetelet Index. It was developed by Dr Quetelet in the 1800s.

Lambert Adolph Jacque Quetelet

I would like to briefly mention who Dr Quetelet was and how the "Quetelet Index" was derived.¹⁹⁻²¹ Lambert Adolphe Jacque Quetelet (1796-1874) was a Flemish astronomer and statistician. Indeed, he is considered to be the patriarch of statisticians. He introduced the concept of "social averages." In developing the "social average" concept, his goal was to determine the characteristics of an "average man" and the distribution of various human characteristics around the "average man." Overall, it was his desire to obtain a distribution such that it formed a bell-shaped curve, that is, a Gaussian or normal distribution. He referred to his studies as "social physics." Thus, this represents the first application of distribution mathematics to human characteristics. In 1835, Quetelet noted the body mass relationship

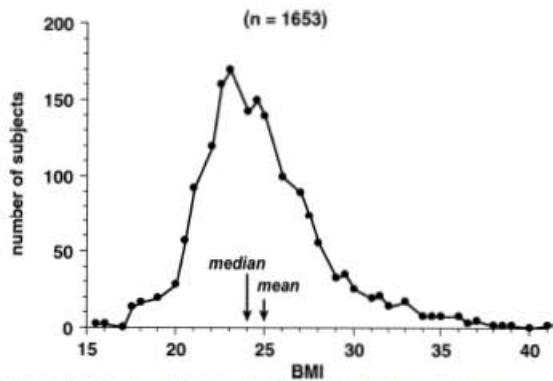


FIGURE. Distribution of BMI in Adult American Men and Women (Carnegie Institute of Washington, Publ No 329, 1923). Adapted from Rony.^{27, p152}

to height in normal young adults was least affected by height when the ratio of weight to height squared was used rather than merely using the ratio of the weight to height or weight to height raised to the third power.¹⁶

Adoption of the BMI as an Index of Obesity

In 1972, Keys et al¹⁶ severely criticized the validity of Metropolitan Life Insurance published data per se, and the then-published tables of desirable weight for height, as well as the tables used to define people who were underweight or overweight.⁷ (The pejorative term “obese” was rarely used in that era.) Instead, Keys et al, using better documented weight for height data, popularized the Quetelet Index in population-based studies. They referred to it as the body mass index (BMI). Thus, Quetelet Index = body weight (kilograms) divided by height squared (meters) = BMI. As indicated above, by squaring the height, it reduces the contribution of leg length in the equation and tends to normalize the body mass distribution at each level of height; that is, it reduces the effect of a variance in height in the relationship of weight to height. This was considered to be important because most of body fat is in the trunk. Nevertheless, as also pointed out by Keys et al,¹⁶ even the BMI rather poorly represents a person’s percent of body fat. Despite all the criticisms, the Metropolitan Life Tables criteria for defining obesity were widely used in the United States until the early 1990s.^{22–24} At about that time, the World Health Organization (WHO) classification of body weight for height, based on the BMI, was published,²⁵ and later it was widely adopted.²⁶

BMI Distribution in a Normal Population

Although a BMI determination reduces the effect of lower-extremity length on the Wt/Ht ratio, whether one uses the BMI or merely the ratio of weight to height, the population distribution is still not Gaussian. That is, it is not symmetrical but is always skewed to the right, that is, toward a higher ratio of weight (body mass) to height. For example,

the distribution of BMIs in adult American men and women was determined in 1923 in 1026 individuals (Figure).²⁷ The median BMI was 24, but the mean BMI was 25. The distribution curve clearly indicated a skewing toward an increase in BMI, and this trend has continued.²⁶

This skewing is not surprising because a markedly reduced BMI, theoretically and actually, would be incompatible with life because of an excessive reduction in lean as well as fat mass as a result of under nutrition²⁸ or disease. In contrast, excessive accumulation of body fat with maintenance or usually an increase in lean mass^{29,30} is at least compatible with life, even though it may eventually affect long-term survival.

WHO and the Categorization of BMIs Into Quartiles

In 1993, the WHO assembled an Expert Consultation Group with a charge of developing uniform categories of the BMI. The results were published as a technical report in 1995.²⁵ Four categories were established: underweight, normal, overweight, and obese. An individual would be considered to be underweight if his/her BMI was in the range of 15 to 19.9, normal weight if the BMI was 20 to 24.9, overweight if the BMI was 25 to 29.9, and obese if it was 30 to 35 or greater. Using linear regression, a BMI of 16.9 in men and 13.7 in women represents a complete absence of body fat stores.³¹ The above 4 categories are similar to those suggested by John S. Garrow in 1981,^{31,32} but the terminology was changed. The terminology he used was “desirable” for a BMI up to 25, “grade I obesity” between 25 and 29.9, “grade II obesity,” between 30 and 40, and “grade III obesity” for BMI greater than 40. The latter classification was based on Rosenbaum and colleagues³³ own data obtained in a survey of an adult population, aged 16 to 64 years, in Great Britain and published in 1985. The population-based data indicated the majority of people were in the “desirable” range of the BMI distribution as indicated in Table 1. Unfortunately, this distribution is not and has not been similar to those found in other surveys. The BMIs have been higher.

At the time that the WHO classification was published, the National Institutes of Health (NIH) in the United States classified people with a BMI of 27.8 (men) and 27.3 (women)

TABLE 1 Garrow Classification

Obesity				
	Desirable	Grade I	Grade II	Grade III
BMI	(Up to 25)	(25–29.9)	(30–40)	(≥40)
Percentage				
Women	67.6	24	8	0.4
Men	58.2	34	6	0.2
Abbreviation: BMI, body mass index				

or greater as being overweight. If they were below this BMI, they were considered to be "normal." This was based on an 85% cutoff point of people examined in the National Health and Nutrition Examination Study (NHANES) II.^{12,22,34}

Subsequently, in 1998, the cutoff point between normal and overweight was reduced to a BMI of 25 to bring it into line with the 4 categories in the WHO guidelines.^{25,35} Parenthetically, this instantaneously converted millions of Americans from being "normal weight" to being "overweight."

In 1997, the International Obesity Task Force expanded the number of BMI categories to include different degrees of obesity and changed the terminology modestly.³⁶ A BMI of 25 to 29.9 is referred as "preobesity," a BMI of 30 to 34.9 is class I obesity, 34.9 to 39.9 is class II obesity, and a BMI of 40 or greater is class III obesity.^{37,38}

The new terminology appears to be a bit presumptuous and careless because the BMI is not a direct measure of percent of fat mass, and the dynamic concept that those in the former "overweight" category are now in the "preobesity" category invariably going on to "obesity" is not the case. Also those with a lower BMI initially, but with a dynamic weight gain over time, would have to transition through this category in order to become classified as "obese" regardless of the terminology. By analogy, should those classified as "underweight" now be referred to as being "prenormal"?

Distribution of BMI in the General Population

It should be understood that in Western population-based studies, generally the mean or median BMI is about 24 to 27.^{22,27,39,40} Thus, the consequence of adopting the WHO classification is that ~50% or more of the general adult population will always be in the overweight (now preobese) and obese categories. Indeed, the term "overweight" or particularly "preobesity" is prejudicial since people in this category are a major part of the expected normal distribution of BMI in the general population, and this has been the case for decades. Unfortunately, in discussing the so-called "obesity epidemic," the number of people in the overweight (preobese) category generally is lumped together with those in the obese category in order to advertise and dramatize the perceived seriousness of this issue.

Regardless of the terminology and population reference issues, at present the BMI is the currency by which we define the obesity issue throughout the Western world. It was developed for the convenience of the epidemiologists, and indeed it did provide a uniform codification of body weight for height reporting. The BMI categories are shown in (Table 2).

BMI as a Determinant of Body Fat Mass

A particular problem with BMI as an index of obesity is that it does not differentiate between body lean mass and body fat mass; that is, a person can have a high BMI but still have a very low fat mass and vice versa.^{39,41-46}

TABLE 2 Categories of BMI

Underweight	15–19.9
Normal weight	20–24.9
Overweight	25–29.9
Preobesity	
Class I obesity	30–34.9
Class II obesity	35–39.9
Class III obesity	≥40
Abbreviation: BMI, body mass index	

From an anatomical and metabolic perspective, the term *obesity* should refer to an excessive accumulation of body fat (triacylglycerols), and upon these grounds, the accuracy of the BMI as a determinant of body fat mass has been repeatedly questioned,^{16,39-41,46-48} because it clearly has limitations in this regard. Gender, age, ethnic group, and leg length are important variables.^{45,49-55} It should be noted that in population-based studies women generally have a BMI that is lower than that in men, even though their fat mass relative to their body build or BMI is considerably greater (~20% to 45%+).

The relatively poor correlation between percent of body fat mass and BMI in males has been known for many years¹⁶ and was clearly shown in a study in which percent of body fat was determined by a densitometric method.⁵⁶ For men with a BMI of 27 in that study, the 95% confidence intervals for percent of body fat were 10% to 32%; that is, in this group, the percent of body fat varied from very little to that considered to be in the obesity range. (NIH-suggested criterion for obesity based on percent of body fat for men is ≥25%, and that for women is ≥35%.⁵⁷) The relatively poor correlation between percent of body fat mass and BMI also clearly has been shown more recently in the NHANES III database in which bioelectrical impedance was used to estimate the fat component of body composition.⁵¹ In subjects with a BMI of 25 kg/m², the percent of body fat in men varied between 14% and 35%, and in women it varied between 26% and 43%. Thus, using the NIH-suggested criterion based on percent of body fat to define obesity, subjects with a BMI of 25, a group that would be considered to be essentially normal, were associated with a body fat mass that varied again between low normal to obese. Also it is of interest that in the entire NHANES cohort, the BMI correlated better with lean body mass than with fat mass in men.⁵¹ More recent NHANES data also indicate a poor correlation of BMI with percent of body fat, particularly in men.⁵⁸ In addition, in a recent study in individuals with or without diabetes in which the loss of lean body mass with aging

was reported, the mean BMI in those without diabetes was 26.8. In those with diabetes, the BMI was 29.1; that is, it was higher as generally expected. However, the percent of lean body mass was the same; that is, the increased BMI in those with diabetes was not due only to an excessive accumulation of fat.⁵⁹

Trends in Body Weight and Height

Over the past several decades, there has been an increase in BMI in the general population. This has resulted in predictions of a public health disaster. It should be recognized that in the United States during the period from 1960 to 2002 not only has the mean weight increased by 24 lb among men aged 20 to 74 years, but also the height has increased by about 1 in. We can then calculate that the weight increase per year has only been 0.57 lb, and as indicated above, this could be due to an increase in lean mass rather than fat mass, or it may be a combination of the two. In women, there was a similar increase in weight and height.⁴⁰ In an earlier report, life-insured men up to age 40 years were reported to be 0.5 to 1.5 inches taller and 2 to 9 lb heavier for the same height in 1959 than those studied 50 to 60 years prior to 1959. Also, in the earlier study, the mortality rate was lowest in those with higher weight-to-height ratios. This was attributed to the presence in the population of wasting diseases such as tuberculosis that resulted in an increased death rate.¹³ Previously, a secular upward trend in height in adults in the United Kingdom also was reported.⁶⁰ In addition, in a twin study in the United Kingdom, children in 2005 were not only heavier but also taller than 1990 norms, whereas their BMIs were essentially the same.³ Overall, the history of changes in height and weight in Western European men and probably women has been that of an increase in both weight and height. In the 17th century, the average height of men in Northern Europe was ~5 ft 3 in. It now approaches 6 ft.⁶¹ These data suggest that the BMI categories should be adjusted upward periodically to accommodate population-based changes. Improvements in mortality rates also suggest an adjustment would be useful.

Body Fat Location

An additional limitation of the BMI is it does not capture body fat location information. This is an important variable in assessing the metabolic as well as mortality consequences of excessive fat accumulation. It was first recognized in France by Dr Jon Vague⁶² in the 1940-1950s. He noted that accumulation of fat in the upper part of the body versus the lower part of the body was associated with an increased risk for coronary heart disease, diabetes, and also gallstones and gout. That is, individuals who accumulated excessive fat in the lower body segment were relatively spared from these complications. The body fat distribution was referred to as being "android" if it occurred in the upper body and

"gynecoid" when it occurred in the lower segment of the body. This is because men tend to accumulate fat in the abdominal (upper body) area, whereas women tend to accumulate it in the peripelvic (gluteal) area and the thighs. A surrogate for this information has been to determine the abdominal circumference or an abdominal/hip circumference ratio. Subsequent data indicate that indeed the risk for development of diabetes and the so-called "metabolic syndrome," as well as coronary heart disease, is more strongly related to the accumulation of upper body fat than lower body fat in both sexes.⁶³⁻⁶⁷ That is, an android (male) distribution more closely predicts the development of the chronic diseases of aging than does the gynecoid (female) distribution.

More specifically, both visceral fat accumulation^{68,69} and an expanded girth have been associated with development of insulin resistance, diabetes, and risk for coronary heart disease and hypertension.^{63,64,70-74} Accumulation of fat in the abdominal area appears to correlate best with triacylglycerols accumulating in the liver and skeletal muscle. These may actually represent the pathogenetically important metabolic consequences that result in insulin resistance and more directly correlate with development of the above adverse medical conditions.^{68,75,76} Incidentally, the relatively small accumulation of fat in these organs would not be detectable by BMI determinations, and they do not correlate simply with total body fat mass.⁷⁵

The Life Cycle and Location of Accumulated Fat

Prior to puberty, boys and girls tend to be lean and not much different in this regard. Girls tend to accumulate relatively large amounts of fat during and after puberty, particularly in the peripelvic and thigh region; boys do not. During and after puberty, boys accumulate a relatively large amount of lean mass (bone and muscle) but not fat mass. In both sexes, these changes are reflected in an increased BMI. With aging, both sexes tend to develop fat in the upper part of the body (circumferentially), that is, the middle-age spread.^{49,77-80} The reason for these changes in amount and distribution is not completely understood. Generally, it is considered to be due to hormonal changes. It is of some interest that accumulation of fat in the lower body at puberty in females is unique to humans, is not present in any of the great apes, and most likely is estrogen mediated.¹

In a teleological sense, why this occurs, if due to estrogen, is uncertain. It could represent a means of maintaining body fat during pregnancy without an undue expansion in abdominal girth. It also may act as a counterbalance when women carry a child either during pregnancy or afterward. It also may be a space-filling fat site due to the relatively larger pelvis in postpubertal females.⁸¹ Overall, it may represent an adaptation to the human upright bipedal posture. In any event, it results in a lower center of gravity among

women compared with men. Indeed, the lower body segment in females becomes ~40% greater than in males (quoted in Singh, 1993),¹ and it has strong sex-related overtones.

Not only is thigh fat greater in women than in men, but also women generally have a preponderance of slow-twitch fibers, whereas men have a preponderance of fast-twitch fibers in their quadriceps muscles, as do upper-body-obese women,⁸² suggesting either genetic or earlier developmental differentiation events. Could this be an adaptation for load-bearing versus speed as a group survival adaptation?

As indicated above, the accumulation of fat with aging in both sexes tends to occur in the truncal area and is associated with an increase in visceral fat. In women, this could be explained by a decrease in circulating estradiol, that is, a decreased estrogen/testosterone ratio associated with the menopause. (Again of some interest, it is only humans who have a defined menopause).

In men, with aging, there is a decrease in testosterone and a relative increase in estrogen, resulting in a decrease in the testosterone/estrogen ratio.⁸³ Thus, in men, a change in sex hormone concentrations could possibly explain the increased accumulation of fat in general. However, why there is a preferential accumulation in the truncal location, that is, why they too develop an increase in visceral fat, is unclear. Clearly, location of fat in this area would help to maintain mobility. The latter could be of great importance in hunter-gatherer societies and in defense of the tribe. Perhaps the distribution is programmed by gender earlier in life.

In this regard, it should be recognized that the accumulation of fat in certain body areas as well as the total amount of fat accumulated has a strong genetic or at least a familial component that diminishes with age.^{3,27,84,85}

Methods of Estimating Body Fat Mass and Location of the Fat

At present, simple, accurate methods for measuring percent of body fat and, in particular, body fat in different fat depots are not available. The indirect methods currently in use for estimating total percent of body fat include underwater weighing, an air displacement and density determination using a Bod Pod, a bioelectrical impedance analyzer, and a determination of the isotopically labeled water mass. In the past, determination of the total body radioactive potassium and thus metabolizing tissue mass have been used to estimate lean body mass, and by difference, the fat mass.⁸⁶

Anthropometric determination of fat mass directly has been done using skin-fold thickness measured at various sites.⁸⁷ A dual-energy x-ray absorptiometry (DEXA) scan, which provides a 3-dimensional picture of body organ densities, can be used for estimating total body fat. Its location also can be determined. Single computed tomography (CT) slices of the abdomen and thigh can be used to obtain 2

dimensions of those fat depots from which a 3-dimensional fat area can be reconstructed. This also can be done using magnetic resonance imaging, but magnetic resonance imaging is very expensive. One cannot do serial sections of the body using CT to determine fat mass because of the excess radiation associated with this procedure.

Because of their convenience, bioelectric impedance methods or DEXA scans are the most commonly used to estimate the amount and, with DEXA scans, the location of body fat depots. Estimates of abdominal and thigh fat depots also can be estimated using CT slices.^{52,72,88}

All of the previously mentioned methods use certain assumptions in the calculation of body fat mass, and all are subject to potential error. Nevertheless, there are more specific methods of determining body fat mass than is the BMI. Important information regarding the location of the stored fat also can be determined with some methods.

It now is generally accepted that a relationship between BMI and mortality risk should be applied only to large populations. It should not be applied to an individual in an unqualified fashion. As indicated previously, there is the issue of being "overweight" versus "over fat." In addition, a segment of the population is now considered to be "fat" by any criteria but "fit" and not at risk for early mortality.^{74,75,89-91}

BMI and Morbidity and Mortality

The BMI classification system currently is being widely used in population-based studies to assess the risk for mortality in the different categories of BMI. It also is being used in regard to specific etiologies for mortality risk. However, as with its use to estimate percent of body fat, it is a rather crude approach. Even when some comorbidities are considered, the correlation of mortality rates with BMI often does not take into consideration such factors as family history of diabetes, hypertension, coronary heart disease, metabolic syndrome, dyslipidemias, familial longevity or the family prevalence of carcinomas, and so on. Recently it has been reported that more than 50% of susceptibility to coronary artery disease is accounted for by genetic variants.⁹² Frequently, when correlations are made they also do not take into consideration a past as well as a current history of smoking, alcohol abuse, serious mental disorders or the duration of obesity, when in the life cycle it appeared, and whether the body weight is relatively stable or rapidly progressive, that is, type 1 or type 2 obesity.^{93,94} In most population-based studies, only the initial weight and/or BMI are given, even though weight as well as fat stores are known to increase and height to decrease with aging. In addition, the rate of weight gain varies among individuals,^{7,94,95} as does the loss of muscle mass.⁹⁵ Muscle mass has been correlated negatively with insulin resistance and prediabetes.⁹⁶ Lastly, population-based studies do not take into consideration the present and past history of a person's occupation,

medication-induced obesity, and how comorbidities are being treated. All of the above are significant issues.

More Explicit Problems in Relating the BMI to Medical Issues

Based on data in the literature, there are several additional problems in determining associations between BMI and overall death rate or, more specifically, cardiovascular events or death rates. Many obese people do not have cardiovascular risk factors, and in those who do, BMI no longer correlates with cardiovascular events⁹⁷⁻¹⁰¹ when the untoward effects of these other factors are factored out. Another issue is that the treatment status of the previously mentioned cardiovascular risk factors often is unknown or not stated; that is, the efficacy of treatment is rarely considered. This also is the case for diabetes. For example, the prevalence of diabetes has been increasing but not the disease-specific death rate.¹⁰² Also, in people with diabetes, the death rate from cardiovascular disease has decreased dramatically.¹⁰²

The "Obesity Epidemic"

Recently, there has been concern that an epidemic of obesity is occurring, not only in the United States, but also worldwide based on BMI data. In the NHANES data, there has been a change in the mean but to a greater extent in the distribution of BMI for adults aged 20 to 74 years in the United States.²⁶ That is, the mean BMI has increased, but there has been a greater increase in skewing toward the right and very large BMI. This results in more individuals being categorized as "obese." The reason for the recent increase in mean BMI, but particularly in those in the obese category, is unknown, although there are many speculations. The dramatic decrease in smoking is likely to have been a contributor.^{91,103-106} Smoking contributes to population-based BMI by at least 2 mechanisms. Smoking impairs appetite *per se*. It also is pathogenetically important in the development of chronic obstructive pulmonary disease, which itself results in a lower body mass. Of some interest, NHANES data also indicate that the trend of an increase in BMI has not continued since 1999 in women and only modestly in men.⁵⁸ Smoking rates also have stabilized at a low level.

Is Being "Overweight" by BMI Criteria a Medical Issue?

Regardless of an observed increased skewing in the BMI distribution, it is important to note that several recent studies indicate that for most of us being a bit overweight (preobese?) as determined by BMI may not be so bad.¹⁰⁷⁻¹¹¹ The EPIC observational study is a population-based study that includes 359 387 individuals aged 25 to 70 years living in Europe.¹⁰⁹ The mean age of this group at the initiation of the study was 51.5 years, and the mean follow-up has been 9.7 ± 2 years. In this study, both the crude and ad-

justed relative risk of death among men was actually the lowest in those with a BMI of 26.5 to 28, that is, those in the overweight (preobese) category. Also, a significant increase in risk of death was present only among those with a BMI of less than 21 or greater than 30. That is, there is a wide range of BMIs in the central part of this population in which there was relatively little impact of BMI on risk of death over a 9.7-year period.

Similar data were obtained in the NIH-American Association of Retired Persons study of 527 265 men and women between the ages of 50 and 71 years in the United States and followed for up to 10 years.¹¹⁰ The lowest death rate in the entire cohort was among those in the "overweight" category, and this was particularly true among the men. There also was a broad range of BMIs over which there was little difference in mortality (BMI of 23.5 to 30).

The NHANES data going back to 1971 and up to 1994 also indicate that the relative mortality risk is lowest in men with a BMI of 25 to 30 in all age groups, that is, from the age of 25 years up to the age of 70 years.¹⁰⁷ In addition, the risk of mortality was little affected by a BMI from 18.5 up to a BMI of 30 in all age categories. Indeed, in those older than 70 years, there was little impact on the death rate even if they were in the obese category. Similar results have been reported for women in the NHANES reports.¹¹² The lowest mortality occurred with a BMI of 27.

In a Canadian study, the age-adjusted mortality rate over 13 years in men was essentially unchanged in those with a BMI of 18.5 up to 35, that is, from the Normal Weight category through the obesity class I category. In women, there was only a modest increase over the same range.¹¹³

In summary, there is a large range of BMIs over which there is little association with the death rate. Generally, the range is from a BMI of 21 up to and often including 30. It is centered in the 24-to-28 BMI range. This information is not entirely new. Andres¹¹⁴ in 1980 summarized 16 different population-based studies in which anthropometrically determined obesity was not associated with increased mortality rate. A detailed analysis in 1960 of the Metropolitan Life Insurance data also suggested little increase in mortality rates in people with a degree of overweight less than 20% or more above the average for a given height and age (quoted in Keys et al⁹⁷).

Interestingly, in the EPIC observational Study,¹⁰⁹ when the waist circumference-to-BMI ratio was calculated, that is, adjusting the waist circumference for BMI, it tended to linearize the association of BMI with risk for death, and the ratio was greatest for those with a low BMI. Thus, even if an individual had a low BMI but a relatively increased waist circumference, the risk was increased. Indeed, for any given BMI, a 5-cm increase in circumference increased the risk of death by a factor of 1.17 among men and 1.13 for women. Also in this study, the overall greatest mortality risk was in those individuals with the lowest BMI and not

those with the highest BMI. Nevertheless, even in the category with the lowest BMI, adjusting for waist circumference affected the mortality rate negatively. This again indicates the importance of the location of body fat in addition to the total amount of fat accumulated.

A recent analysis of 50 prospective observational studies indicated the lowest mortality at a BMI of 23 to 25. However, these data were obtained in the 1970s and 1980s in an aggregate population with a mean BMI of 24.8, that is, lower than at present. The increased mortality at higher BMIs was modest up to a BMI of 27.5, and the authors could account for the excess mortality largely on the risk factors known to be associated with obesity. The latter are currently being much better treated than in that era.¹¹⁵

Issues to be Resolved When Relating BMI With Health Determinants

Overall, a major unresolved issue is which factor of the following is more important in the prediction of comorbidities such as cardiovascular disease, diabetes, hypertension, malignancies, or overall death rates. Is it BMI, total body fat mass, or the distribution of body fat, that is, visceral versus subcutaneous, or upper body fat accumulation (as determined by abdominal circumference, or a waist/hip ratio, or some combination of these, and so on)? The EPIC¹⁰⁹ data suggest that where fat is accumulated is much more important than merely the BMI, with the exception of those with an exceeding large total fat mass.

SUMMARY AND CONCLUSION

It is time to move beyond the BMI as a surrogate for determining body fat mass. Alternatively, if BMI continues to be used, the categories and definitions should be changed to reflect the current distribution of BMIs in the general population.

A better means than the BMI for estimating percent of body fat and its relationship to mortality and various morbidities clearly would be desirable.

The BMI was not originally developed for use specifically as an index of fatness in population-based studies. However, it has been coopted for this use because it is a readily obtained metric. It should be understood that the BMI has serious limitations when used as an indicator of percent of body fat mass. Indeed, it may be misleading in this regard, particularly in men. The terminology currently used also is prejudicial. By definition, one-half or more adults in the recent past and currently are overweight (preobese) or obese in Western, industrialized nations.

The current BMI classification system also is misleading in regard to effects of body fat mass on mortality rates. The role of fat distribution in the prediction of medically significant morbidities as well as for mortality risk is not captured by use of the BMI. Also, numerous comorbidities, lifestyle issues, gender, ethnicities, medically significant

familial-determined mortality effectors, duration of time one spends in certain BMI categories, and the expected accumulation of fat with aging are likely to significantly affect interpretation of BMI data, particularly in regard to morbidity and mortality rates. Such confounders as well as the known clustering of obesity in families, the strong role of genetic factors in the development of obesity, the location in which excessive fat accumulates, its role in the development of type 2 diabetes and hypertension, and so on, need to be considered before promulgation of public health policies that are designed to apply to the general population and are based on BMI data alone.

Clearly, obesity, as determined by BMI, is not a monotypic, age-invariant condition requiring a general public health "preventative" approach. A BMI-determined categorization of an individual should not be used exclusively in counseling or in the design of a treatment regimen. In addition, when considering weight loss regimens, variations in body weight attributed to weight loss and dietary cycling may be hazardous.¹¹⁶⁻¹²⁰ They have been associated with an increased mortality rate.^{116,117,119,121-124} The concept of starvation-associated obesity^{125,126} also needs to be considered.

Prevention and/or Treatment of BMI-Determined Overweight or Obesity

Clearly episodic starvation or semistarvation regimens are not the answer,¹²⁷ nor are population-based efforts to increase fresh fruits and vegetables and tax soda pop, and so on. In my opinion, the major focus on prevention and treatment should be on those unfortunate individuals who are grossly obese, mechanically compromised, and who are at very high risk for death.¹²⁸ Surgical gastrointestinal intervention has proven to be at least partially successful in improving fuel regulation and storage.^{129,130} Hopefully, medications will be developed that will reinstitute a metabolic fuel regulatory system that prevents the relentless accumulation of body fat, which is characteristic of those who are grossly obese. For others, an improvement in physical fitness may be salutary.

A Personal Perspective Regarding the Obesity Epidemic

Currently there are 4 truths regarding historical changes in body weights and the prevalence of obesity. People of Western European extraction are on average (1) heavier, (2) taller, and (3) more likely to be "overweight" or "obese" as defined by current BMI standards than those in other parts of the world. However, (4) it also should be pointed out they are healthier and are living longer than in any previous period in history.^{131,132}

Beginning in the 17th century,⁶¹ the general underlying theme in all the studies done on weight gain in populations is an increase in height as well as weight. These changes are likely to be due to an increase in high-quality dietary

protein (animal products), as well as an increased availability of total food energy in the diet. That is, there was not only an increase in food availability and variety, but also an increase in food quality.¹³³ The near elimination of chronic and serious acute infectious diseases also may have played a role, as has the dramatic decrease in cigarette smoking and its serious medical consequences.

The net effect of the above is that the chronic diseases of aging have become more of a public health problem, but better treatments are widely available. The prevalence of type 2 diabetes has increased, but overall the cardiovascular death rate has decreased dramatically. The death rate from malignancies is decreasing, and there has been a remarkable improvement in longevity, which is continuing.¹³¹ The latter also is likely to continue into the future.^{131,132}

Some view the secular trend in the US population over the past 40 years as being one in which the population in general is "more obese, more diabetic, more arthritic, more disabled, and more medicated" but living longer.¹³⁴ A less sanguine view is indicated by others.¹³⁵ Many consider the overabundance of "calorie dense, processed foods," the availability of soda pop,¹³⁶ and presence of fast-food restaurants and large food portion sizes to be strong, pathogenic, obesity-inducing factors,¹³⁷ or more broadly, they consider obesity to be due to a "toxic" or "poisonous" food supply.¹³⁸ Some also are concerned that the increase in obesity (defined by BMI) will overwhelm any gains in health and life expectancy noted over the past several decades, that is, an Apocalypse awaits us.¹³⁹ I and others^{140,141} do not share this pessimism.

Finally, I would like the political activists and doomsday prophets whose professional careers appear to depend on frightening the public and inducing politicians to pass restrictive laws without proven value, to be introduced to the prescient comments made by A. E. Harper¹³³ 33 years ago. It is clear that currently we have a case of "déjà vu all over again."

In regard to predicting the future, a wise person whose name I cannot recall stated presciently "Predicting the future is a fool's playground"; the physicist Neils Bohr said, "Prediction is very difficult, especially about the future," or as stated by that sage of the baseball world, Yogi Berra, "The future ain't what it used to be." Bertrand Russell said, "Fools and fanatics are always so sure of themselves, but wiser people are so full of doubt." The true scientist should always be a skeptic.

Acknowledgments

The author thanks Rachel Anderson for help in preparing the manuscript for submission and Dr Mary C. Gannon for reading the manuscript and making numerous helpful comments.

REFERENCES

- Singh D. Body shape and women's attractiveness: the critical role of waist-to-hip ratio. *Human Nature*. 1993;4(3):297-321.
- Katzmarzyk PT, Perusse L, Rao DC, Bouchard C. Familial risk of overweight and obesity in the Canadian population using the WHO/NIH criteria. *Obes Res*. 2000;8(2):194-197.
- Wardle J, Camell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr*. 2008; 87(2):398-404.
- Katzmarzyk PT, Hebebrand J, Bouchard C. Spousal resemblance in the Canadian population: implications for the obesity epidemic. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(2):241-246.
- Rogers O. Build as a Factor Influencing Longevity. In *Proceedings of the Association of Life Insurance Medical Directors of America from Organization to and including the 10th annual meeting: 12th annual meeting held at the Hunt Memorial Building of the Hartford Medical Society; May 29, 1901; Hartford, CT*. New York: Knickerbocker Press; 1901:280-288.
- The Association of Life Insurance Medical Directors and the Actuarial Society of America. *Medico-Actuarial Mortality Investigation*. Vol 1-3. New York, NY: 1912-1913.
- Metropolitan Life Insurance Company. New weight standards for men and women. *Stat Bull*. 1959;40:1-4.
- Metropolitan Life Insurance Company. Mortality record for 1959. *Stat Bull*. 1960;41(February):1-11.
- Metropolitan Life Insurance Company. Mortality among overweight women. *Stat Bull*. 1960;41(March):1-11.
- Metropolitan Life Insurance Company. 1983 Metropolitan height and weight tables for men and women, according to frame, ages 25-29. *Stat Bull*. 1983;64(Jan-June):2-9.
- Burton BT, Foster WR, Hirsch J, Van Itallie TB. Health implications of obesity: an NIH Consensus Development Conference. *Int J Obes*. 1985;9(3):155-170.
- Health implications of obesity. National Institutes of Health Consensus Development Conference; February 11-13, 1985. *Ann Intern Med*. 1985;103(6 (pt 2)):977-1077.
- Blackburn H, Parlin RW. Antecedents of disease. Insurance mortality experience. *Ann N Y Acad Sci*. 1966;134:965-1017.
- Khosla T, Lowe CR. Indices of obesity derived from body weight and height. *Br J Prev Soc Med*. 1967;21(3):122-128.
- Himes JH, Bouchard C. Do the new Metropolitan Life Insurance weight-height tables correctly assess body frame and body fat relationships? *Am J Public Health*. 1985;75(9):1076-1079.
- Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *J Chron Dis*. 1972;25(6):329-343.
- Watson PE, Watson ID, Batt RD. Obesity indices. *Am J Clin Nutr*. 1979;32(4):736-737.
- Benn RT. Some mathematical properties of weight-for-height indices used as measures of adiposity. *Br J Prev Soc Med*. 1971;25(1):42-50.
- Eknoyan G. Adolphe Quetelet (1796-1874)—the average man and indices of obesity. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(1):47-51.
- Quetelet LAJ. *Physique Sociale*. Vol 2. Brussels, Belgium: C. Muquardt; 1869-92.
- Jelliffe DR, Jelliffe FF. Underappreciated pioneers. Quetelet-man and index. *Am J Clin Nutr*. 1979;32(12):2519-2521.
- Kuczmarski RJ, Flegal KM, Campbell SM, Johnson CL. Increasing prevalence of overweight among US adults. The National Health and Nutrition Examination Surveys, 1960 to 1991. *JAMA*. 1994;272(3):205-211.
- Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens CH, Willett WC. Body weight and longevity. A reassessment. *JAMA*. 1987;257(3):353-358.
- Must A, Dallal GE, Dietz WH. Reference data for obesity: 85th and 95th percentiles of body mass index (wt/ht²) and triceps skinfold thickness. *Am J Clin Nutr*. 1991;53(4):839-846.
- WHO. *Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry: Report of a World Health Organization (WHO) Expert Committee*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1995.
- Flegal KM, Carroll MD, Kuczmarski RJ, Johnson CL. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(1):39-47.

27. Rony H. The homeostatic body weight regulation. *Obesity and Leanness*. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1940:192–209.
28. Leiter LA, Marliss EB. Survival during fasting may depend on fat as well as protein stores. *JAMA*. 1982;248(18):2306–2307.
29. Salans LB, Horton ES, Sims EA. Experimental obesity in man: cellular character of the adipose tissue. *J Clin Invest*. 1971;50(5):1005–1011.
30. Forbes GB, Welle SL. Lean body mass in obesity. *Int J Obes*. 1983;7(2):99–107.
31. Garrow JS, Webster J. Quetelet's index (W/H²) as a measure of fatness. *Int J Obes*. 1985;9(2):147–153.
32. Garrow JS. *Treat Obesity Seriously: A Clinical Manual*. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1981.
33. Rosenbaum S, Skinner RK, Knight IB, Garrow JS. A survey of heights and weights of adults in Great Britain, 1980. *Ann Hum Biol*. 1985;12(2):115–127.
34. Najjar MF, Rowland M. Anthropometric reference data and prevalence of overweight, United States, 1976–80. *Vital Health Stat 11*. 1987;(238):1–73.
35. National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute. *National Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults: The Evidence Report*. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 1998.
36. WHO. Managing the global epidemic of obesity. Report of the World Health Organization (WHO) consultation on obesity. Paper presented at the International Obesity Task Force; June 3–5, 1997; Geneva, Switzerland.
37. International Obesity Task Force. Managing the Global Epidemic of Obesity. Report of the World Health Organization (WHO) Consultation on Obesity; June 5–7, 1997; Geneva, Switzerland.
38. WHO. *Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic*. Geneva, Switzerland: WHO; 2000.
39. Wellens RI, Roche AF, Khamis HJ, Jackson AS, Pollock ML, Siervogel RM. Relationships between the body mass index and body composition. *Obes Res*. 1996;4(1):35–44.
40. Ogden CL, Fryar CD, Carroll MD, Flegal KM. Mean body weight, height, and body mass index, United States 1960–2002. *Adv Data*. 2004;(347):1–17.
41. Strain GW, Zumoff B. The relationship of weight-height indices of obesity to body fat content. *J Am Coll Nutr*. 1992;11(6):715–718.
42. Segal KR, Dunaif A, Gutin B, Albu J, Nyman A, Pi-Sunyer FX. Body composition, not body weight, is related to cardiovascular disease risk factors and sex hormone levels in men. *J Clin Invest*. 1987;80(4):1050–1055.
43. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, et al. Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *Eur Heart J*. 2010;31(6):737–746.
44. Gam SM, LaVelle M, Rosenberg KR, Hawthorne VM. Maturation timing as a factor in female fatness and obesity. *Am J Clin Nutr*. 1986;43(6):879–883.
45. Norgan NG. Relative sitting height and the interpretation of the body mass index. *Ann Hum Biol*. 1994;21(1):79–82.
46. Flegal KM, Shepherd JA, Looker AC, et al. Comparisons of percentage body fat, body mass index, waist circumference, and waist-stature ratio in adults. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(2):500–508.
47. Gam SM, Leonard WR, Hawthorne VM. Three limitations of the body mass index. *Am J Clin Nutr*. 1986;44(6):996–997.
48. Heitmann BL, Erikson H, Ellsinger BM, Mikkelsen KL, Larsson B. Mortality associated with body fat, fat-free mass and body mass index among 60-year-old Swedish men—a 22-year follow-up. The study of men born in 1913. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(1):33–37.
49. Borkan GA, Hulth DE, Gerzof SG, Robbins AH, Silbert CK. Age changes in body composition revealed by computed tomography. *J Gerontol*. 1983;38(6):673–677.
50. Kuczmarski RJ. Prevalence of overweight and weight gain in the United States. *Am J Clin Nutr*. 1992;55(Suppl 2):495S–502S.
51. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, et al. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(6):959–966.
52. Rice CL, Cunningham DA, Paterson DH, Lefcoe MS. Arm and leg composition determined by computed tomography in young and elderly men. *Clin Physiol*. 1989;9(3):207–220.
53. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet*. 2004;363:157–163.
54. Deurenberg P, Yap M, van Staveren WA. Body mass index and percent body fat: a meta analysis among different ethnic groups. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(12):1164–1171.
55. Wang J, Thornton JC, Russell M, Burastero S, Heymsfield S, Pierson RN Jr. Asians have lower body mass index (BMI) but higher percent body fat than do whites: comparisons of anthropometric measurements. *Am J Clin Nutr*. 1994;60(1):23–28.
56. Smalley KJ, Knerr AN, Kendrick ZV, Colliver JA, Owen OE. Reassessment of body mass indices. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(3):405–408.
57. National Institutes of Health. *Understanding Adult Obesity*. Bethesda, MD: National Institutes of Health; 2008.
58. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Curtin LR. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2008. *JAMA*;2003(3):235–241.
59. Park SW, Goodpaster BH, Lee JS, et al. Excessive loss of skeletal muscle mass in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(11):1993–1997.
60. Morant GM. A discussion on the measurement of growth and form; secular changes in the heights of British people. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1950;137(889):443–452.
61. Fogel RW. *The Escape From Hunger and Premature Death, 1700–2100*. Cambridge, UK: The Press Syndicate of the University of Cambridge; 2004.
62. Vague P. The degree of masculine differentiation of obesity: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr*. 1956;4(1):20–34.
63. Kissebah AH, Freedman DS, Peiris AN. Health risks of obesity. *Med Clin North Am*. 1989;73(1):111–138.
64. Kissebah AH, Vydelingum N, Murray R, et al. Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(2):254–260.
65. Ohlson LO, Larsson B, Svardsudd K, et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. *Diabetes*. 1985;34(10):1055–1058.
66. Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo G, Sjöström L. Distribution of a dipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1984;289(6454):1257–1261.
67. Fox KA, Despres JP, Richard AJ, Brette S, Deanfield JE. Does abdominal obesity have a similar impact on cardiovascular disease and diabetes? A study of 91,246 ambulant patients in 27 European countries. *Eur Heart J*. 2009;30(24):3055–3063.
68. Wajchenberg BL, Giannella-Neto D, da Silva ME, Santos RF. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res*. 2002;34(11–12):616–621.
69. Nguyen-Duy TB, Nichaman MZ, Church TS, Blair SN, Ross R. Visceral fat and liver fat are independent predictors of metabolic risk factors in men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(6):E1065–E1071.
70. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):497–511.
71. Poullet MC, Despres JP, Lemieux S, et al. Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol*. 1994;73(7):460–468.

72. Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, et al. Associations between regional body fat distribution, fasting plasma free fatty acid levels and glucose tolerance in premenopausal women. *Int J Obes*. 1990;14(4):293–302.
73. Lemieux S, Prud'homme D, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Anthropometric correlates to changes in visceral adipose tissue over 7 years in women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(7):618–624.
74. Wildman RP, Muntner P, Reynolds K, et al. The obese without cardiometabolic risk factor clustering and the normal weight with cardiometabolic risk factor clustering: prevalence and correlates of 2 phenotypes among the US population (NHANES 1999–2004). *Arch Intern Med*. 2008;168(15):1617–1624.
75. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med*. 2008;168(15):1609–1616.
76. Savage DB, Petersen KF, Shulman GI. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev*. 2007;87(2):507–520.
77. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. A single threshold value of waist girth identifies normal-weight and overweight subjects with excess visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr*. 1996;64(5):685–693.
78. Lemieux S, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Seven-year changes in body fat and visceral adipose tissue in women. Association with indexes of plasma glucose-insulin homeostasis. *Diabetes Care*. 1996;19(9):983–991.
79. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(2):226–231.
80. Skerlj B. Age changes in fat distribution in the female body. *Acta Anat (Basel)*. 1959;38:56–63.
81. Tanner JM. *Growth at Adolescence*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1955.
82. Björntorp P. The android woman—a risky condition. *J Intern Med*. 1996;239(2):105–110.
83. Davidson JM, Chen JJ, Crapo L, Gray GD, Greenleaf WJ, Catania JA. Hormonal changes and sexual function in aging men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;57(1):71–77.
84. Malis C, Rasmussen EL, Poulsen P, et al. Total and regional fat distribution is strongly influenced by genetic factors in young and elderly twins. *Obes Res*. 2005;13(12):2139–2145.
85. Bouchard C, Despres JP, Mauriege P. Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution. *Endocr Rev*. 1993;14(1):72–93.
86. Larsson I, Lindroos AK, Peltonen M, Sjostrom L. Potassium per kilogram fat-free mass and total body potassium: predictions from sex, age, and anthropometry. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284(2):E416–E423.
87. Garn SM. Anthropometry in clinical appraisal of nutritional status. *Am J Clin Nutr*. 1962;11:418–432.
88. Borkan GA, Hulth DE, Gerzof SG, Robbins AH. Comparison of body composition in middle-aged and elderly males using computed tomography. *Am J Phys Anthropol*. 1985;66(3):289–295.
89. Sims EA. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism*. 2001;50(12):1499–1504.
90. Ruderman NB, Schneider SH, Berchtold P. The “metabolically-obese,” normal-weight individual. *Am J Clin Nutr*. 1981;34(8):1617–1621.
91. Pisinger C, Jorgensen T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter99 study. *Prev Med*. 2007;44(4):290–295.
92. McPherson R. Chromosome 9p21 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1736–1737.
93. Nuttall FQ. Diet and the diabetic patient. *Diab Care*. 1983;6:197–207.
94. Chaudhry ZW, Gannon MC, Nuttall FQ. Stability of body weight in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(3):493–497.
95. Forbes GB, Reina JC. Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism*. 1970;19:653–663.
96. Srikanthan P, Karlamangla AS. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;95(9):2898–2903.
97. Keys A, Aravanis C, Blackburn H, et al. Coronary heart disease: overweight and obesity as risk factors. *Ann Intern Med*. 1972;77(1):15–27.
98. Chapman JM, Massey FJ Jr. The interrelationship of serum cholesterol, hypertension, body weight, and risk of coronary disease. results of the first ten years' follow-up in the Los Angeles Heart Study. *J Chron Dis*. 1964;17:933–949.
99. Kip KE, Marroquin OC, Kelley DE, et al. Clinical importance of obesity versus the metabolic syndrome in cardiovascular risk in women: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Circulation*. 2004;109(6):706–713.
100. St-Pierre AC, Cantin B, Mauriege P, et al. Insulin resistance syndrome, body mass index and the risk of ischemic heart disease. *CMAJ*. 2005;172(10):1301–1305.
101. Keys A. Overweight and the risk of sudden heart attack and sudden death NIH; 1973:215–223.
102. Preis SR, Pencina MJ, Hwang SJ, et al. Trends in cardiovascular disease risk factors in individuals with and without diabetes mellitus in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2009;120(3):212–220.
103. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev*. 2004;5(2):95–103.
104. Flegal KM. The effects of changes in smoking prevalence on obesity prevalence in the United States. *Am J Public Health*. 2007;97(8):1510–1514.
105. Yeh HC, Duncan BB, Schmidt MI, Wang NY, Brancati FL. Smoking, smoking cessation, and risk for type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):10–17.
106. O'Hara P, Connert JE, Lee WW, Nides M, Murray R, Wise R. Early and late weight gain following smoking cessation in the Lung Health Study. *Am J Epidemiol*. 1998;148(9):821–830.
107. Flegal KM, Graubard BI, Williamson DF, Gail MH. Excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. *JAMA*. 2005;293(15):1861–1867.
108. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet*. 2006;368(9536):666–678.
109. Pischon T, Boeing H, Hoffmann K, et al. General and abdominal adiposity and risk of death in Europe. *N Engl J Med*. 2008;359(20):2105–2120.
110. Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med*. 2006;355(8):763–778.
111. Troiano RP, Frongillo EA Jr, Sobal J, Levitsky DA. The relationship between body weight and mortality: a quantitative analysis of combined information from existing studies. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1996;20(1):63–75.
112. Zhu S, Heo M, Plankey M, Faith MS, Allison DB. Associations of body mass index and anthropometric indicators of fat mass and fat free mass with all-cause mortality among women in the first and second National Health and Nutrition Examination Surveys follow-up studies. *Ann Epidemiol*. 2003;13(4):286–293.
113. Katzmarzyk PT, Craig CL, Bouchard C. Original article underweight, overweight and obesity: relationships with mortality in the 13-year follow-up of the Canada Fitness Survey. *J Clin Epidemiol*. 2001;54(9):916–920.
114. Andres R. Effect of obesity on total mortality. *Int J Obes*. 1980;4(4):381–386.
115. Whitlock G, Lewington S, Sherfiker P, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373(9669):1083–1096.

116. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. Weight cycling. *JAMA*. 1994;272(15):1196–1202.
117. Gaesser GA. Thinness and weight loss: beneficial or detrimental to longevity? *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31(8):1118–1128.
118. National Task Force on the Prevention and Treatment of Obesity. Weight cycling. *JAMA*. 1994;272(15):1196–1201.
119. Danforth E Jr, Sims EA. Obesity and efforts to lose weight. *N Engl J Med*. 1992;327(27):1947–1948.
120. Hamm P, Shekelle RB, Stamler J. Large fluctuations in body weight during young adulthood and twenty-five-year risk of coronary death in men. *Am J Epidemiol*. 1989;129(2):312–318.
121. Lissner L, Odell PM, D'Agostino RB, et al. Variability of body weight and health outcomes in the Framingham population. *N Engl J Med*. 1991;324(26):1839–1844.
122. Gregg EW, Gerzoff RB, Thompson TJ, Williamson DF. Trying to lose weight, losing weight, and 9-year mortality in overweight U.S. adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):657–662.
123. Sorensen TI, Rissanen A, Korkeila M, Kaprio J. Intention to lose weight, weight changes, and 18-y mortality in overweight individuals without co-morbidities. *PLoS Med*. 2005;2(6):e171.
124. Blair SN, Shaten J, Brownell K, Collins G, Lissner L. Body weight change, all-cause mortality, and cause-specific mortality in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Ann Intern Med*. 1993;119(7 Pt 2):749–757.
125. Dulloo AG. Human pattern of food intake and fuel-partitioning during weight recovery after starvation: a theory of auto-regulation of body composition. *Proc Nutr Soc*. 1997;56(1A):25–40.
126. Keys A, Brozek J, Henshel O, Mickleson O, Taylor HL. *The Biology of Human Starvation*. Minneapolis, MN: University of Minnesota Press; 1950.
127. Mann T, Tomiyama AJ, Westling E, Lew AM, Samuels B, Chatman J. Medicare's search for effective obesity treatments: diets are not the answer. *Am Psychol*. 2007;62(3):220–233.
128. Drenick EJ, Bale GS, Seltzer F, Johnson DG. Excessive mortality and causes of death in morbidly obese men. *JAMA*. 1980;243(5):443–445.
129. Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, et al. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med*. 2007;357(8):741–752.
130. Shah M, Simha V, Garg A. Review: long-term impact of bariatric surgery on body weight, comorbidities, and nutritional status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4223–4231.
131. National Center for Health Statistics. *Health, United States, 2009: In Brief*. Hyattsville, MD; 2010. http://www.cdc.gov/nchs/data/healthus09_InBrief.pdf. Accessed April 28, 2015.
132. Rodu B, Cole P. We're living longer healthier lives. *St Paul Pioneer Press*. January 30, 2007.
133. Harper AE. Dietary goals - a skeptical view. *Am J Clin Nutr*. 1978;31:310–321.
134. Gregg EW, Cheng YJ, Cadwell BL, et al. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. *JAMA*. 2005;293(15):1868–1874.
135. Kim S, Popkin BM. Commentary: understanding the epidemiology of overweight and obesity—a real global public health concern. *Int J Epidemiol*. 2006;35(1):60–67 discussion 62–81.
136. Brownell KD, Farley T, Willett WC, et al. The public health and economic benefits of taxing sugar-sweetened beverages. *N Engl J Med*. 2009;361(16):1599–1605.
137. Nestle M, Jacobson MF. Halting the obesity epidemic: a public health policy approach. *Public Health Rep*. 2000;115(1):12–24.
138. Battle EK, Brownell KD. Confronting a rising tide of eating disorders and obesity: treatment vs. prevention and policy. *Addict Behav*. 1996;21(6):755–765.
139. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1138–1145.
140. Preston SH. Deadweight? The influence of obesity on longevity. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1135–1137.
141. Couzin-Frankel J. A pitched battle over life span. *Science*. 29; 333(6042):549–550.

Evidence-Based Approach to Fiber Supplements and Clinically Meaningful Health Benefits, Parts 1 and 2: What to Look for and How to Recommend an Effective Fiber Therapy: Erratum

The articles cited above, published in the March/April 2015 issue of *Nutrition Today*, were designated for open access but were not identified as such in the print issue. Open access labels have been applied and the articles are freely available on the journal's Web site: www.nutritiontodayonline.com.

References

1. McRorie JW. Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 1: what to look for and how to recommend an effective fiber therapy. *Nutr Today*. 2015;50(2):82–89.
2. McRorie JW. Evidence-based approach to fiber supplements and clinically meaningful health benefits, part 2: what to look for and how to recommend an effective fiber therapy. *Nutr Today*. 2015;50(2):90–97.

DOI: 10.1097/NT.000000000000100

BIBLIOGRAFÍA

- Aldrete-Velasco, J., Lopez-García, R., Zúñiga-Guajardo, S., Riobó-Serván, P., Serra-Majem, L., Suverza-Fernández, A., Laviada-Molina, H. 2017. Análisis de la evidencia disponible para el consumo de edulcorantes no calóricos. Documento de expertos. *Medicina Interna de México*. 33(1):61-83.
- Baduí-Dergal, S. 2006. Química de los alimentos. Cuarta edición. Pearson Educación. Ciudad de México, México.
- Cavagnari, B. M. 2019. Edulcorantes no calóricos: características específicas y evaluación de su seguridad. *Archivos Argentinos de Pediatría*. 117(1):1-7.
<https://doi.org/10.5546/aap.2019.e1>
- Cernuda-Martínez, J., Fernández-García, A. 2016. Los edulcorantes y su papel sobre el metabolismo humano. RqR Enfermería Comunitaria. *Revista de SEAPA*. 4(2):13-22.
- Cha, J. Y., Repa, J. J. 2007. The Liver X Receptor (LXR) and hepatic lipogenesis: The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *Journal of Biological Chemistry*. 282(1):743-751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605023200>
- CONADESUCA. 2017. Comité Nacional para el Desarrollo Sustentable de la caña de Azúcar. Perspectiva de la caña de azúcar de caña frente a la inclusión de edulcorantes artificiales. [En línea]. [Último acceso el 22 de Junio de 2020] Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/201026/Nota_Febrero.pdf
- daSilva-Xavier, G., Rutter, G. A., Diraison, F., Andreolas, C., Leclerc, I. 2006. ChREBP binding to fatty acid synthase and L-type pyruvate kinase genes is stimulated by glucose in pancreatic β -cells. *Journal of Lipid Research*. 47:2482-2491.
- Dentin, R., Girard, J., Postic, C. 2005. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): Two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver. *Biochimie*. 87(1 SPEC. ISS):81-86. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.008>
- 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. [En línea](Actualizado al 22 de agosto de 2001) Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf [Último acceso 24 de mayo de 2019]
- DOF. 2009. DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. CUARTO.- Se modifica el encabezado de la Tabla 13 para quedar como sigue: Tabla 21 - Reglas para la escritura de los números y su signo decimal. Signo decimal El signo decimal debe ser una coma sobre la línea (,) o un punto sobre la línea (.). Si la magnitud de un número es menor que la unidad, el signo decimal debe ser precedido por un cero. *Diario Oficial de la Federación*: jueves 24 de septiembre de 2009. Poder Ejecutivo Federal. México D.F., México.
- DOF. 2016. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo por el que se modifica y se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios,

su uso y disposiciones sanitarias, publicado el 16 de julio de 2012. [En línea] (Actualizado el 16 de mayo del 2016). Disponible en:

http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5437267&fecha=16/05/2016

- Envigo. 2018. Historical background control data in the RccHan®: WIST rat in chronic toxicity studies. Recuperado el 14 de septiembre 2020. [En línea] Disponible en: <https://www.envigo.com/model/rcchan-wist>
- A. M., Ribeiro, M. F. M., Bertoluci, M. C. 2013. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*. 60(1):203-207. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.10.009>
- Fisher, F. M., Kim, M., Doridot, L., Cunniff, J. C., Parker, T. S., Levine, D. M., Hellerstein, M. K., Hudgins, L. C., Maratos-Flier, E., Herman, M. A. 2017. A critical role for ChREBP-mediated FGF21 secretion in hepatic fructose metabolism. *Molecular Metabolism*. 6(1):14-21. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.11.008>
- Flores, M., Macias, N., Rivera, M., Lozada, A., Barquera, S., Rivera-Dommarco, J., Tucker, K. L. 2010. Dietary patterns in Mexican adults are associated with risk of being overweight or obese. *The Journal of Nutrition*. 140(10):1869-1873. <https://doi.org/10.3945/jn.110.121533>
- Foletto, K. C., Melo-Batista, B.A., Neves, A. M., Feijó, F. de M., Ballard, C. R., Marques Ribeiro, M. F., Bertoluci, M. C. 2016. Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*. 96:604-610. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.11.003>
- Fragoso-Martínez, J. 2015. Edulcorantes: Investigación de los principales usos en la industria alimenticia, así como riesgos a la salud y la importancia de su uso. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- García-Almeida, J. M., Casado Fernández, G. M., García Alemán, J. 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*. 28(SUPPL.4):17-31.
- García-Chávez, Luis Ramiro CONADESUCA, López-Medel, Federico Gabriel PROCAZUCAR, Durán-Domínguez-de-Bazúa, María del Carmen UNAM-FQ-DIQ-LIQAYQA. 2019. Foro sobre edulcorantes en alimentos y bebidas no alcohólicas en México. *Revista ATAM*. 32(4):16-20. ISSN: 2007-610X. <https://atamexico.com.mx/revistas/>
- García-Segura, J., Gavilanes, J., Martínez del Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., Vivanco, F. 2007. Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica. Tercera Edición. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España.
- Garrido Pertierra, A., Teijón Rivera, J. M. 2009. *Fundamentos de bioquímica metabólica*. Editorial TEBAR. 2da edición. Madrid, España.
- Gauthier, K., Billon, C., Bissler, M., Beylot, M., Lobaccaro, J. M., Vanacker, J. M., Samarut, J. 2010. Thyroid hormone receptor β (TR β) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner. *Journal of Biological Chemistry*. 285(36):28156-28163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146241>
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M. A., Hu, F. B., Després, J.-P., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., Bray, G. A., Martínez, J. A. 2017. Obesity. *Nature reviews. Disease Primers*. 3. Article number: 17034, 18 páginas.

- Guisande González, C., Barreiro Felpeto, A., Maneiro Estraviz, I., Vergara Castaño, A. R., Vaamonde Liste, A. 2006. *Tratamiento de datos*. Editorial Diaz de Santos. Madrid, España. https://books.google.com.mx/books?id=AhNx24025ZoC&pg=PA114&dq=prueba+de+shapiro+wilk&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwil_8SnuvjpAhUDRqwKHAYGAj4Q6AEIODAC#v=onepage&q=prueba%20de%20shapiro%20wilk&f=false
- Gupta, S., Kalra, S., Bharihoke, V., Dhurandhar, D. 2014. Sucralose induced pancreatic toxicity in albino rats: Histomorphological evidence. *Journal of Morphological Sciences*. 31(2):123-127. <http://doi.org/10.4322/jms.073614>
- Instituto Nacional de Salud Pública. 2018. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018. (en línea) Disponible en: https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf [Último acceso el 22 de junio de 2020]
- Ishii, S., Iizuka, K., Miller, B. C., Uyeda, K. 2004. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(44):15597-15602. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405238101>
- JECFA. 1981a. Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (JECFA). 496: Acesulfame potassium. In *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. [Consulta: 26 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je02.htm>
- JECFA. 1981b. Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA). 595: Saccharin. In: *Toxicological Evaluation of Certain Food Additives*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. [Consulta: 26 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je25.htm>
- Kruger, N. 2009. The Bradford method for protein quantitation. En: Walker, J. Editor. *The protein protocols handbook*. Humana Press. 17-24. New York, EE.UU.
- Kurien, B., Scofield, R. 2006. Western blotting. *Methods*. 38(4):283-293.
- Lee, C. 2007. Western blotting. *Methods in Molecular Biology*. 362:391-399. <https://doi.org/10.1385/1-59745-257-2:391>
- Lehninger, A., Nelson, D., Cox, M. 1993. *Principios de Bioquímica*. Segunda edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España.
- López-Oliva, E., Martínez, E. 2014. *SREBP-1c*, *ChREBP* y *LXR*: Su influencia en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 80(1):14-48.
- Magnuson, B. A., Carakostas, M. C., Moore, N. H., Poulos, S. P., Renwick, A. G. 2016. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutrition Reviews*. 74(11):670-689. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuw032>
- McKee, R. J., McKee, T. 2009. *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*. 4^{ta} edición. McGraw-Hill Interamericana Editores (880 páginas) traducción por Juan Roberto Palacios Martínez. Ciudad de México, México.
- Mendoza-Pérez, S. 2017. *Efecto 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 obtener el grado de Maestro en Ciencias. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Miján de la Torre, A. 2004. *Nutrición y metabolismo en trastornos de la conducta alimentaria*. [En línea] [Último acceso 23 de mayo del 2019] Disponible en:

https://books.google.com.mx/books?id=ZPkU0ou-Mg4C&pg=PA208&dq=chrebp&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiI16fhy9fgAhUQS6wKHa_mDTIQ6AEIKDAA&fbclid=IwAR2KKVcIMEL4OyvT538wLOolK0Kng7n2X3h1nuYvNpokfSGCLFWxz03PVAk#v=onepage&q=chrebp&f=false

- Moncho, V. J. 2015. *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. Elsevier Health Sciences Spain. Barcelona, España.
- Mongay-Fernández, C. 2005. *Prueba de Levene, Homocedasticidad de las variables Capítulo 7. Análisis de varianza. Quimiometría*. Editorial Universidad de Valencia. España. [En línea] (Último acceso el 16 de junio de 2020) en: <https://books.google.com.mx/books?id=1xNQAZeNUrgC&pg=PA133&dq=prueba+levene&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjOjtDtoXqAhXJB80KHbccAzIQ6AEIKDAA#v=onepage&q=prueba%20levene&f=false>
- Moore, J., Gunn, P., Fielding, B. 2014. The role of dietary sugars and *de novo* lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*. 6(12):5679-5703.
- Muller-Esterl, W. 2011. *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Versión española traducida por Josep Joan Centelles Serra. Reverté. Barcelona, España.
- Murphy, T., Lau, A. 2008. Manejo de valores atípicos. *ASTM Standardization News*. Nov/Dic 2008. En línea. [Último acceso el 05 de Junio de 2020] Disponible en: https://www.astm.org/SNEWS/SPANISH/SPND08/datapoints_spnd08.html
- Navarro, M. 2006. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los edulcorantes. Ediciones Díaz de Santos. ProQuest Ebook Central, (En línea) <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliodgbsp/detail.action?docID=3201604>.
- Nutall, F.Q. 2015. Body mass index. Obesity, BMI, and Health. A critical review. *Nutrition Today*. 50(3):117-128.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2018. Países por producto. [En línea] (Último acceso el 05 de junio de 2020) Disponible en: http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/commodities_by_country
- Postic, C., Dentin, R., Denechaud, P., Girard, J. 2007. ChREBP a transcriptional regulator of glucose and lipid metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 27:179-192.
- Poupeau, A., Postic, C. 2011. Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1812(8):995-1006.
- Pratt, C. W., Cornely, K. 2012. *Bioquímica*. Traducido por Palacios Martínez, R., Morales Saavedra, J. L. Editorial El Manual Moderno. Ciudad de México, México.
- Roca, P., Oliver, J., Rodríguez, A. M. 2003. *Bioquímica: Técnicas y métodos*. Editorial Hélice. Barcelona, España.
- Rodríguez-Ramírez, S., Mundo-Rosas, V., García-Guerra, A., Shamah-Levy, T. 2011. Dietary patterns are associated with overweight and obesity in Mexican school-age children. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 61(3):270-278.
- Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., Cuevas-Nasu, L., Gaona-Pineda, E.B., Gómez-Acosta, L. M., Mendoza-Alvarado, L. R., Méndez Gómez-Humarán, I., Rivera-Dommarco, J. 2019. Metodología de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición para localidades con menos de 100 000 habitantes (Ensanut 100k). Cuernavaca, México. *Salud Pública de México*. 61(5): 678-684.

- Samuels, M. L., Witmer J. A, Schaffner, A. 2012. *Fundamentos de estadística para las ciencias de la vida*. Pearson. 4^{ta} edición. Madrid, España.
- Secretaría de Economía. 2012. *Análisis de la situación económica, tecnológica y de política comercial el sector edulcorantes en México*. 94. [En línea] (Último acceso el 3 de marzo de 2020) Disponible en: https://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/Analisis_Sectorial_Mercado_Edulcorantes.pdf
- Sengupta P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International journal of preventive medicine*. 4(6): 624–630.
- Sirek, A. S., Liu, L., Naples, M., Adeli, K., Ng, D. S., Jin, T. 2009. Insulin stimulates the expression of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) by attenuating the repressive effect of pit-1, Oct-1/Oct-2, and Unc-86 homeodomain protein octamer transcription factor-1. *Endocrinology*. 150(8):3483-3492. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1702>
- Soffritti, M., Padovani, M., Tibaldi, E., Falcioni, L., Manservisi, F., Lauriola, M., Bua, F., Manservisi, 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.
- Softic, S., Gupta, M., Wang, G., Fujisaka, S., O'Neill, B., Nageswara, R., Willoughby, J., Harbinson, C., Fitzgerald, K., Ilkayeva, O., Newgard, C., Cohen, D., Kahn, R. 2017. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 127(11):4059-4074.
- Stanhope, K. L., Havel, P. J. 2010. Fructose consumption: Recent results and their potential implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1190(1):15-24.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Havel, P. J. 2013. Adverse metabolic effects of dietary fructose: Results from the recent epidemiological, clinical, and mechanistic studies. *Current Opinion in Lipidology*. 24(3):198-206.
- Stanhope, K. L., Medici V., Bremer A. A., Lee V., Lam H. D., Nunez M. V., Chen G. X., Keim N. L., Havel P. J. 2015. A dose-response study of consuming high-fructose corn syrup-sweetened beverages on lipid/lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 101(6):1144-1154.
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 514(7521):181-186. <https://doi.org/10.1038/nature13793>
- 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. *Behavioural Neuroscience*. 127(2):262-274.
- Thompson, J., Manore, M., Vaughan, L. 2008. *Nutrición*. Pearson Educación. Ciudad de México, México.
- Triola, M. F., Lossi, L., Murrieta Murrieta, J. E., Montes Sifuentes, G., Rosa Elizalde, A. de la, Acosta Rodríguez, J. S. 2018. *Estadística*. 12^a edición. Pearson. Ciudad de México, México.

- Uyeda, K., Repa, J. J. 2006. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis. *Cell Metabolism*. 4(2):107-110. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.06.008>
- Uyeda, K., Yamashita, H., Kawaguchi, T. 2002. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): A key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochemical Pharmacology*. 63(12):2075-2080. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01012-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01012-2)
- Valle-Vega, P., Lucas-Florentino, B. 2000. *Toxicología de alimentos*. Instituto Nacional de la Salud Pública. Centro Nacional de Salud Ambiental. Ciudad de México, México.
- Vega-Jiménez, J. A. 2019. Uso de un modelo animal para evaluar la ingestión crónica de edulcorantes hipocalóricos: mediciones de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero sanguíneo. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Química de Alimentos. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Vilalta, C. J. 2016. *Análisis de datos*. Centro de Investigación y Docencia Económicas. Colección: Docencia. Primera edición. Ciudad de México, México.