



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTO DE LOS EDULCORANTES NUTRITIVOS Y NO NUTRITIVOS
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS REGULADORAS DE LA
GLUCÓLISIS Y LA LIPOGÉNESIS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Samuel Mendoza Pérez

TUTORA

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

Ciudad de México, septiembre de 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**EFFECTO DE LOS EDULCORANTES NUTRITIVOS Y NO
NUTRITIVOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS
REGULADORAS DE LA GLUCÓLISIS Y LA LIPOGÉNESIS**

**T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Samuel Mendoza Pérez

TUTORA

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



Ciudad de México, octubre 2021

JURADO ASIGNADO

Presidente Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

Vocal Dra. Laura Patricia Martínez Padilla

Vocal Dr. Modesto Javier Cruz Gómez

Vocal Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz

Secretario Dra. Raquel López Arellano

Lugares donde se realizó el proyecto de investigación:

Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y Química Ambiental. Conjunto E. Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

Unidad de Experimentación Animal (UNEXA). Conjunto E. Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

Sustentante M. en C. Samuel Mendoza Pérez



Tutora Dra. María del Carmen Durán
Domínguez de Bazúa



Comité tutorial

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, Facultad de Química, UNAM

Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz, Facultad de Medicina, UNAM

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

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'SM', with a large, sweeping flourish underneath.

Samuel Mendoza Pérez

RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

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

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca de posgrado brindada No. 473402 bajo el número de becario 576643.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por el apoyo para la adquisición de materiales y reactivos a través de los siguientes programas: Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (**PAIP**), clave **5000-9067** y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), clave **IN217619**.

A la **Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa** por su asesoría, orientación, formación académica brindada y apoyo a lo largo de todo este tiempo que pertencí a su grupo de investigación.

A los miembros de mi Comité Tutoral, la **Dra. Rosario Muñoz Clares** y la **Dra. Elia Martha Pérez Armendáriz** por su asesoría académica a lo largo de los ocho semestres de estos estudios y sus valiosos comentarios que enriquecieron esta investigación.

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

Al **M. en C. Rolando García Gómez** por su incondicional apoyo y amistad otorgados a lo largo de todo este tiempo. Además, su valioso apoyo para la consecución de fondos para adquirir los insumos para realizar la investigación fue decisivo.

A los(as) compañeros(as) y personal de los Laboratorios 301, 302 y 303 del Edificio E-3 Ambiental y Química Ambiental Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

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

Al **M. en C. Gerardo Salas Garrido** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo durante las eutanasias de los roedores y toda la investigación.

Al Químico **Guillermo Ordaz Nava** y el **Dr. Enrique Gómez** del Departamento de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el uso del equipo Magpix® para la cuantificación de las hormonas.

DEDICATORIAS

A mi familia, sin su apoyo esto no hubiera sido posible

PRODUCTOS ACADÉMICOS

Publicaciones

Mendoza-Pérez, S., García-Gómez, R. S., Ordaz-Nava, G., Gracia-Mora, M. I., Macías-Rosales, L., Morales-Rico, H., Salas-Garrido, G., Pérez-Armendariz, E. M., Bustamente-García, R., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. (2021). Consumption of sweeteners at different stages of life: effects on body mass, food and drink intake in male and female Wistar rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/09637486.2021.1888077>

En preparación

Mendoza-Pérez et al. (2021). Effects of chronic consumption of sweeteners on glycolysis and lipogenesis regulating enzymes in liver extracts (Título tentativo).

Mendoza-Pérez et al. (2021). Chronic consumption of sweeteners: Histological analysis of liver, kidney, heart, and retroperitoneal adipose tissue in male and female Wistar rats (Título tentativo).

Presentaciones en eventos académicos relacionados con la tesis:

1. **V CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE INNOVACIÓN Y TENDENCIAS EN PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS Y XX CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.** Efecto del consumo crónico de edulcorantes naturales y artificiales en la ganancia de masa corporal en ratas macho. **S. MENDOZA-PÉREZ, C.A.** Reyes-Díaz, J.M. Pérez-Rico, R.S. García-Gómez, G. Ordaz-Nava, M.I. Gracia-Mora, L. Macías-Rosales, H. Morales-Rico, G. Salas-Garrido, M.C. Durán-Domínguez-de-Bazúa. Universidad Autónoma de Nuevo León y Universidad de Guanajuato. Monterrey, N.L., México. Mayo 23-25, 2018 (*R, I:13 págs.) [Obtuvo el reconocimiento al mejor trabajo en el nivel de posgrado]
2. **PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL CIENCIA SALUD Y GÉNERO (1CICSG).** Efecto del género en la ganancia de masa corporal de modelos animales del destete a la juventud consumiendo sacarosa, glucosa y fructosa suministradas en el agua potable / *Gender effect on body mass gain for animal models from weaning to youth consuming sucrose, glucose, and fructose in drinking water.* **S. Mendoza-Pérez, R.S.** García-Gómez, G. Ordaz-Nava, M.I. Gracia-Mora, L. Macías-Rosales, H. Morales-Rico, G. Salas-Garrido, M.C. Durán-Domínguez-de-Bazúa. Facultad de Medicina, UNAM. México D.F., México. Septiembre 10-11, 2018 (*R)
3. Efecto del consumo crónico de edulcorantes como sustancias peligrosas. Parte 2. Niveles de actividad de la enzima ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en inglés) en ratas de la estirpe Wistar / *Effect of the chronic consumption of sweeteners as dangerous substances. Part 2. Levels of activity of the fatty acid synthase (FAS) in rats of the Wistar line* (SyRP y EA-105). Diana Laura Rosas-Aguilar, **Samuel Mendoza-Pérez,** Rolando Salvador García-Gómez, María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa. **2019 IX MINISIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES DE AGUAS ATMÓSFERA Y SUELOS 2019 NINTH INTERNATIONAL MINISYMPOSIUM ON REMOVAL OF CONTAMINANTS FROM WATER, ATMOSPHERE, AND SOIL.** En **Libro electrónico de contribuciones selectas/ In Electronic Book of Selected Papers** Pp. 387-393. September 09-14, 2019. Villahermosa, Tabasco, México
4. Efecto del consumo crónico de edulcorantes como sustancias peligrosas. Parte 1. Niveles séricos de glucosa y triglicéridos a los 2, 4 y 9 meses en ratas de la estirpe Wistar / *Effect of chronic consumption of sweeteners as dangerous substances. Part 1. Serum levels of glucose and triglyceride levels at 2, 4 and 9 months in rats of the Wistar line* (SyRP y EA-104). **Samuel Mendoza-Pérez,** Rolando Salvador García-Gómez, María del Carmen Durán-Domínguez-de-Bazúa. **2019 IX MINISIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES DE AGUAS ATMÓSFERA Y SUELOS 2019 NINTH INTERNATIONAL MINISYMPOSIUM ON REMOVAL OF CONTAMINANTS FROM WATER, ATMOSPHERE, AND SOIL.** En **Libro electrónico de contribuciones selectas/ In Electronic Book of Selected Papers** Pp. 377-385. September 09-14, 2019. Villahermosa, Tabasco, México
5. **e-Latin Food 2020. 9th Food Science, Biotechnology, and Safety Congress.** Mexican Association of Food Science (9^o Congreso de Ciencias de los Alimentos, Biotecnología y Seguridad. Asociación Mexicana de Ciencias de los Alimentos, in Spanish). Effect of chronic consumption (480 days) of sweeteners on body mass gain, blood glucose and triglycerides levels in weaned male and female Wistar rats. **Mendoza-Pérez, S.,** García-Gómez, R. S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M. del C. NN-P04. UADEC 1-Room. Nutrition and Nutrigenomics I. November 11-13, 2020. ‘Virtual Trade Center’.

Índice

	Página
RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS	II
DEDICATORIAS	III
PRODUCTOS ACADÉMICOS	IV
GLOSARIO DE SIGLAS ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
Capítulo 1. PROBLEMÁTICA	1
1.1. Hipótesis	2
1.2. Objetivos	2
1.2.1. Objetivo general	2
1.2.2. Objetivos particulares	3
1.3. Alcance	3
Capítulo 2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. EDULCORANTES	4
2.1.1. Edulcorantes nutritivos	4
2.1.1.1. Glucosa	4
2.1.1.2. Fructosa	6
2.1.1.3. Sacarosa	9
2.1.2. Edulcorantes no nutritivos	10
2.1.2.1. Acesulfamo de potasio	10
2.1.2.2. Mezcla aspartamo: acesulfamo de potasio	12
2.1.2.3. Sacarina	12
2.1.2.4. Sucralosa	14
2.2. GLUCÓLISIS	16
2.2.1. Glucoquinasa (<i>GK</i>)	17
2.2.1.1. Regulación de la glucoquinasa (<i>GK</i>)	18
2.2.2. Fosfofructoquinasa-1 (<i>PFK-1</i>)	19
2.2.2.1. Regulación de la fosfofructoquinasa-1 (<i>PFK-1</i>)	19
2.2.3. Piruvato quinasa (<i>PK</i>)	20
2.2.3.1. Regulación de la piruvato quinasa	20
2.3. LIPOGÉNESIS	21
2.3.1. Acetil coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>)	24
2.3.1.1. Regulación de la acetil coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>)	24
2.3.2. Sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>)	25
2.3.2.1. Regulación de la sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>)	26
2.4. Insulina	26
2.5. Glucagón	28
2.6. Leptina	31
2.7. Grelina	31
2.8. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (<i>GIP</i>)	33
2.9. Actividad enzimática	34
Capítulo 3. METODOLOGÍA	36

	Página	
3.1.	Extracción y cuantificación de proteínas	37
3.2.	Actividad enzimática	38
3.2.1.	Determinación de la actividad enzimática de la glucoquinasa (<i>GK</i>)	38
3.2.2.	Determinación de la actividad enzimática de la fosfofructoquinasa (<i>PFK</i>)	39
3.2.3.	Determinación de la piruvatoquinasa hepática (<i>PKL</i>)	40
3.2.4.	Determinación de la actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>)	41
3.2.5.	Determinación de la actividad enzimática de la acetil-coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>)	42
3.3.	Efectos de la ingestión de edulcorantes sobre la masa corporal	45
3.3.1.	Tejido adiposo retroperitoneal	45
3.3.2.	Ganancia de masa corporal	45
3.4.	Velocidad de crecimiento, alimento, bebida y energía ingeridos	45
3.4.1.	Velocidad de crecimiento	45
3.4.2.	Alimento ingerido	46
3.4.3.	Bebida ingerida	46
3.4.4.	Energía ingerida teórica	46
3.5.	Determinación de glucosa y triglicéridos	47
3.5.1.	Determinación de glucosa <i>in vivo</i>	47
3.5.2.	Determinación de triglicéridos <i>in vivo</i>	47
3.5.3.	Determinación de las hormonas por fluoroinmunoensayos	48
Capítulo 4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1.	Niveles de actividad enzimática	49
4.1.1.	Glucoquinasa (<i>GK</i>)	49
4.1.2.	Fosfofructoquinasa 1 (<i>PFK-1</i>)	52
4.1.3.	Piruvato quinasa (<i>PKL</i>)	54
4.1.4.	Ácido graso sintasa (<i>FAS</i>)	56
4.1.5.	Acetil coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>)	60
4.2.	Efectos de la ingestión de edulcorantes sobre sistemas fisiológicos: Cantidad de tejido adiposo retroperitoneal, masa corporal y patrones de ingesta de alimento, bebida y energía	63
4.2.1.	Tejido adiposo retroperitoneal	63
4.2.2.	Ganancia de masa corporal	68
4.2.3.	Cambio de masa corporal expresado en porcentaje	75
4.2.4.	Velocidad de crecimiento	77
4.2.5.	Alimento ingerido	80
4.2.6.	Bebida ingerida	81
4.2.7.	Energía ingerida teórica	83
4.3.	Parámetros bioquímicos	84
4.3.1.	Niveles séricos de glucosa	84
4.3.2.	Niveles séricos de triglicéridos	85
4.3.3.	Niveles de insulina	88
4.3.4.	Niveles de glucagón	90

		Página
4.3.5.	Niveles de grelina	91
4.3.6.	Niveles de leptina	92
4.3.7.	Niveles de <i>GIP</i>	94
4.4.	Discusión integrada de los resultados	95
Capítulo 5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	100
5.1.	Conclusiones	100
5.2.	Recomendaciones	102
ANEXOS		104
ANEXO A	Descripción detallada de la determinación de insulina, glucagón, leptina, grelina y <i>GIP</i>	104
ANEXO B	Curva de crecimiento de las ratas macho y hembra de la estirpe Wistar	107
ANEXO C	Disposición de residuos de la investigación	108
Referencias		110

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.	Características de los transportadores de glucosa y otros monoglúcidos (Modificada de Castrejón et al., 2007; Díaz-Hernández et al., 2002)	5
Tabla 2.2.	Sitios activos de la sintasa de ácidos grasos	25
Tabla 4.1.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas macho	49
Tabla 4.2.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas hembra	50
Tabla 4.3.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas macho y hembra a los 480 días	51
Tabla 4.4.	Análisis de varianza de dos vías para los niveles medios de actividad enzimática de la glucoquinasa de las muestras de la segunda eutanasia	51
Tabla 4.5.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la fosfofructoquinasa para las ratas macho y hembra a los 160 días	52
Tabla 4.6.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la fosfofructoquinasa para las ratas macho y hembra a los 480 días	53
Tabla 4.7.	Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la piruvato quinasa para las ratas macho y hembra a los 160 días	54
Tabla 4.8.	Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la piruvato quinasa hepática (<i>PKL</i>) para las ratas macho y hembra a los 480 días	55
Tabla 4.9.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>) para las ratas macho y hembra a los 160 días	56
Tabla 4.10.	Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la ácido graso sintasa <i>FAS</i> (mU/mg) de las muestras de la primera eutanasia	57

	Página	
Tabla 4.11.	Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>) para las ratas macho y hembra a los 480 días	57
Tabla 4.12.	Análisis de varianza de dos vías para la sintasa de ácidos grasos (<i>FAS</i>) mU/mg a los 480 días	58
Tabla 4.13.	Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la acetil coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>) para las ratas macho y hembra a los 160 días	60
Tabla 4.14.	Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la <i>ACC</i> (mU/mg) en muestras de la primera eutanasia (160 días)	61
Tabla 4.15.	Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la acetil coenzima A carboxilasa (<i>ACC</i>) para las ratas macho y hembra a los 480 días	62
Tabla 4.16.	Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la <i>ACC</i> (mU/mg) en muestras de la segunda eutanasia (480 días)	62
Tabla 4.17.	Medias de la ganancia de masa por grupo de ratas macho con intervalos de confianza del 95%	69
Tabla 4.18.	Medias de la ganancia de masa por grupo de ratas macho con intervalos de confianza del 95%	69
Tabla 4.19.	Media por grupo del % de incremento de masa para las ratas macho y hembra a los 480 días	76
Tabla 4.20.	Velocidad de crecimiento promedio (g/día) en ratas macho durante la etapa de crecimiento exponencial	77
Tabla 4.21.	Velocidad de crecimiento promedio (g/día) en ratas hembra durante la etapa de crecimiento exponencial	80
Tabla 4.22.	Niveles séricos de insulina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	88
Tabla 4.23.	Niveles séricos de insulina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	90
Tabla 4.24.	Niveles séricos de glucagón en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	90
Tabla 4.25.	Niveles séricos de glucagón en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	91
Tabla 4.26.	Niveles séricos de grelina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	92
Tabla 4.27.	Niveles séricos de grelina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	92
Tabla 4.28.	Niveles séricos de leptina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	93
Tabla 4.29.	Niveles séricos de leptina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	94
Tabla 4.30.	Niveles séricos de GIP en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	94
Tabla 4.31.	Niveles séricos de GIP en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas	95
Tabla A.2.1.	Concentración de los estándares de las hormonas	105

		Página
ÍNDICE DE FIGURAS		
Figura 2.1.	Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)	5
Figura 2.2.	Estructura química de la fructosa (White y Osberger, 2011)	7
Figura 2.3.	Metabolismo de la fructosa (Modificado de Bray et al., 2004)	8
Figura 2.4.	Estructura química de la sacarosa (Varzakas, 2012)	9
Figura 2.5.	Estructura química del acesulfamo de potasio (Haber et al., 2012)	10
Figura 2.6.	Esquema general de la síntesis de acesulfamo de K (Lawrence, 2003)	11
Figura 2.7.	Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011)	13
Figura 2.8.	Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)	15
Figura 2.9.	Reacciones químicas de la glucólisis (Modificado de Nelson y Cox, 2009)	16
Figura 2.10.	Reacción catalizada por la hexoquinasa o glucoquinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)	17
Figura 2.11.	Reacción catalizada por la hexoquinasa o glucoquinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)	17
Figura 2.12.	Reacción catalizada por la piruvato quinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)	17
Figura 2.13.	Reacción de la acetil-Coenzima A catalizada por la ACC (Anónimo, 2020a)	22
Figura 2.14.	Reacción en 4 pasos catalizada por la sintasa de ácidos grasos (Modificado de Nelson y Cox, 2009)	22
Figura 2.15.	Representación esquemática de la principal cascada de reacciones que conllevan a la liberación de insulina (Modificada de Fu et al., 2013)	28
Figura 2.16.	Regulación de la liberación de glucagón. A. En bajas concentraciones de glucosa se produce la liberación de glucagón por el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la polarización de la membrana por la actividad de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} y Na^+ . B. Bajo altas concentraciones de glucosa se bloquean los canales K_{ATP} necesarios para que los canales dependientes del voltaje se encuentren abiertos, disminuyéndose entonces los niveles de Ca^{2+} . Para altos niveles de glucosa se libera la insulina de las células β y somatostatina de las células δ , ambas inhibidoras de la secreción de glucagón (Modificado de Gaisano et al., 2012)	30
Figura 2.17.	Representación esquemática de los efectos fisiológicos de la grelina (Modificada de Müller et al., 2015)	32
Figura 2.18.	Representación esquemática de principales eventos moleculares durante la secreción de insulina inducida por la incretina <i>GIP</i> , desde una célula β pancreática (Modificado de Kim y Egan, 2008)	34
Figura 3.1	Reacciones para la determinación de la actividad enzimática de la acetil coenzima A carboxilasa	43
Figura 4.0	Figura 4.0. (A) Curva de avance de reacción de la glucoquinasa. Muestra M30. (B) Aumento de la de la curva de avance de reacción para determinación de la velocidad inicial de reacción	49

	Página
Figura 4.1.	Hígado de rata macho No. 3 que consumió sacarina durante 480 días. Se aprecian posibles daños hepáticos 60
Figura 4.2.	Masa de tejido adiposo retroperitoneal A. Ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 168 días. Media \pm DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren 64
Figura 4.3.	Masa de tejido adiposo retroperitoneal (T.A.R.) por cada 100 g de masa corporal. A. ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 168 días. Media \pm DE 65
Figura 4.4.	Masa de tejido adiposo retroperitoneal. A. ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 480 días. Media \pm DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan 66
Figura 4.5.	Masa de tejido adiposo retroperitoneal (T.A.R.) por cada 100 g de masa corporal. A. Ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 480 días. Media \pm DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan 67
Figura 4.6A.	Ganancia de masa de las ratas macho corporal hasta el día 480 70
Figura 4.6B.	Ganancia de masa de las ratas hembra corporal hasta el día 480 71
Figura 4.7A.	Heridas necróticas en la piel de la rata macho # 73 del grupo que ingería fructosa 72
Figura 4.7B.	Heridas necróticas en la piel de la cola de la rata macho # 73 del grupo que ingería fructosa 72
Figura 4.8.	Corazón de la rata macho # 78 del grupo que ingería fructosa. En el círculo rojo se señala el hemangiosarcoma 73
Figura 4.9.	Adenoma en la hipófisis de la rata macho 34 del grupo que ingería fructosa. El adenoma es la estructura en el centro del cerebro de color rojo oscuro 73
Figura 4.10.	Adenoma en la hipófisis de la rata macho #75 del grupo que ingería sacarosa 74
Figura 4.11.	Vejiga de la rata macho # 33 del grupo que ingería sacarina. Se observa la vejiga inflamada por acumulación de orina y sangre por obstrucción de esta 74
Figura 4.12.	Rata macho # 12 que ingirió glucosa. Se observa el desarrollo de un tumor en el costado derecho del tórax 75
Figura 4.13.	Porcentaje de incremento en masa diario de las ratas macho 78
Figura 4.14.	Porcentaje de incremento en masa diario de las ratas hembra 79
Figura 4.15.	Alimento consumido acumulado hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan 81
Figura 4.16.	Bebida ingerida acumulada hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan 82
Figura 4.17.	Energía ingerida consumida acumulada hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente. Método de Duncan al 95% de confianza 83

	Página
Figura 4.18. Niveles séricos de glucosa en ratas macho a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales	84
Figura 4.19. Niveles séricos de glucosa en ratas hembra a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales	85
Figura 4.20. Niveles séricos de triglicéridos en ratas macho a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales	86
Figura 4.21. Niveles séricos de triglicéridos en ratas hembra a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales	87
Figura B.1. Curva de crecimiento de ratas estirpe Wistar (RccHan®: Wist) durante 104 semanas (la determinación comienza en la semana 7 de vida y termina en la 113). Media \pm 2 D.E. Adaptada de Envigo (2008) y Envigo (2016)	107
Figura C.1. Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación	108

Nota: Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009), así como los símbolos % y °C junto al guarismo o letra

GLOSARIO DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- 8-OHdG.** 8-oxo-2'-desoxiguanosina. Es un producto de la oxidación del ADN y se relaciona con los niveles de estrés oxidativo de las células
- ACE K.** Acesulfamo de potasio
- ACC.** Acetil-Coenzima A carboxilasa
- ACP.** En inglés *Acyl carrier protein*. Proteína acarreadora de acilos
- ACTH.** Hormona adrenocorticotrópica
- ADI.** En inglés *Acceptable Daily Intake*
- ADP.** Adenosin difosfato en inglés
- Ad libitum.** Sin restricción en latín
- ALT.** Alanina transaminasa
- AMPc.** Adenosin monofosfato cíclico en inglés
- ANDEVA.** Análisis de varianza, en inglés *ANOVA*
- ASP.** Aspartamo
- AST.** Aspartato transaminasa
- ATP.** Adenosin trifosfato
- BSA.** Albúmina sérica bovina en inglés
- ChREBP.** En inglés *Carbohydrate-response element-binding protein*. Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
- DE.** Desviación estándar
- DEM.** Desviación estándar de la media
- DH.** β -hidroxiacil-ACP-deshidratasa
- DHAP.** Dihidroxiacetona fosfato en inglés
- DPP4.** En inglés *Dipeptidyl peptidase-4*. Dipeptidil dipeptidasa 4
- ELOVL6.** En inglés *fatty acid elongase 6*. Elongasa de ácidos grasos 6
- ER.** Enoil-ACP reductasa
- F-2,6-P.** Fructosa-2,6-bifosfato en inglés
- FAO.** En inglés *Food and Agriculture Organization*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
- FAS.** En inglés *Fatty acid synthase*. Sintasa de ácidos grasos
- Fd.** Factor de dilución
- FDA.** En inglés *Food and Drug Administration*. Administración de Alimentos y Fármacos. Agencia del Gobierno de Estados Unidos responsable de la regulación de alimentos y medicamentos
- G3P.** Gliceraldehído-3-fosfato en inglés
- G6P.** Glucosa-6-fosfato en inglés
- GH.** En inglés *Growth Hormone*. Hormona del crecimiento
- GIP.** En inglés *glucose-dependent insulintropic peptide*. Péptido insulínico dependiente de glucosa
- GIPR.** En inglés *glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor*. Receptor del Péptido insulínico dependiente de glucosa
- Gl.** Grados de libertad
- GKRP.** Proteína reguladora de la glucoquinasa en inglés
- GLP-1.** En inglés *glucagon like peptide*. Péptido similar al glucagón tipo 1
- GLUT.** En inglés *glucose transporter*. Transportador de glucosa
- GLUT-2.** En inglés *glucose transporter 2*. Transportador de glucosa tipo 2
- GK.** Glucoquinasa en inglés
- GPAT.** Glicerol-3-fosfato aciltransferasa en inglés

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

HGNA. Hígado graso no alcohólico

IGF1. En inglés *Insulin-like growth factor 1*. Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IMC. Índice de masa corporal.

IUBMB. En inglés *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular

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

Katal. Unidad del Sistema Internacional de unidades para medir la actividad catalítica. Un katal se define como la actividad catalítica responsable de la transformación de un mol de compuesto por segundo

K_{ATP}. Forma de denominar a los canales de potasio sensibles al *ATP*

kDa. Unidad de masa molecular equivalente a 1.000 daltons. Un dalton es la décima parte de la masa del átomo de carbono 12 y equivale a 1.66×10^{-24} g

K_m. Constante de Michaelis-Menten. Concentración de sustrato a la que una reacción enzimática tiene lugar a la mitad de su velocidad máxima (Nelson y Cox, 2009).

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

KR. β-cetoacil-ACP reductasa en inglés

KS. β-cetoacetil-ACP-sintasa

Kv. Canales de potasio activados por voltaje

LED. Diodo emisor de luz en inglés

LPK. Piruvato quinasa hepática en inglés

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

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

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

MAT. Malonil/acetil transferasa

MC. Masa corporal

MFI. Intensidad Media de Fluorescencia en inglés

Microglía. Células del sistema nervioso central que realizan una función de fagocitaria y de soporte

NP-40. Nombre comercial del nonil-fenol-polietilenglicol éter

NS. No existieron diferencias significativas

OMS. Organización Mundial de la Salud

PCI. Convertasa de prohormona 1 en inglés

PC2. Convertasa de prohormona 2 en inglés

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa en inglés

Pellet. Bolita o pequeña pastilla de alguna sustancia (de pila en latín, pelota o bola)

PE. Ficoeritrina en inglés

PEP. Fosfoenol piruvato en inglés

PFVD. En inglés polyvinylidene difluoride. Fluoruro de polivinilideno

PFK-1. En inglés phosphofructokinase-1. Fosfofructoquinasa-1

PI3K. Fosfatidilinositol 3-quinasa en inglés

PKA. Proteína quinasa A en inglés

PKB. Proteína quinasa B en inglés

PKL. Piruvato quinasa hepática en inglés

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

RER. Retículo endoplasmático rugoso

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

SCAP. Proteína de escisión activada en inglés

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

SD. Desviación estándar en inglés

SEM. Error estándar de la media en inglés

Ser-196. Aminoácido serina en la posición 196 de la proteína

Serendipia. Hallazgo valioso que se produce de manera accidental o casual (Real Academia Española, 2021)

SGLT-1. En inglés *sodium-glucose linked transporter*. Transportador de glucosa acoplados a sodio 1

SI. Sistema Internacional de Unidades

SNS. Sistema nervioso simpático

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

TAR. Tejido adiposo retroperitoneal

TBS. Solución salina amortiguadora con tris en inglés

TE. Tioesterasa

Tris. Nombre abreviado del compuesto orgánico tris(hidroximetil)aminometano, de fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Nombre IUPAC 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

U. Unidad de actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto

UDP-glucosa. Uridina difosfato glucosa en inglés

USF1. Factor estimulador ascendente 1

USF2. Factor estimulador ascendente 2

VDCC. Canales de calcio dependientes de voltaje en inglés

VLDL. lipoproteínas de muy baja densidad en inglés

Vm. Volumen de muestra

Vt. Volumen total del ensayo

RESUMEN

El consumo de edulcorantes no nutritivos se ha incrementado en las últimas décadas. Sin embargo, aún existen dudas sobre su consumo y su impacto en la masa corporal y diversas alteraciones del metabolismo energético. Por esta razón, este estudio investiga los efectos del consumo por un modelo animal de edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre diversos parámetros bioquímicos y fisiológicos como los niveles de actividad de las enzimas glucoquinasa (*GK*), fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*), piruvato quinasa (*PKL*), acetil coenzima A carboxilasa (*ACC*) y la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) en extractos hepáticos, los niveles séricos de glucosa, colesterol, triglicéridos, insulina, glucagón, leptina, grelina y GIP; así como los patrones de ganancia de masa, ingesta de alimento, bebida y energía. Para ello, se emplearon 8 grupos de ratas macho y hembra recién destetadas (10 ratas por grupo/género) sacarosa 10%, glucosa 14%, fructosa 7%, acesulfamo de K 0.05%, mezcla aspartamo con acesulfamo de K 1.55%, sacarina 0.033%, sucralosa 0.017% y un grupo control. Durante 480 días se les suministraron a las ratas soluciones de cada edulcorante y fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta balanceada. Se realizaron eutanasias a los 5 meses y a los 16 meses de experimentación. Se incrementaron significativamente los niveles de actividad enzimática de la *GK* de los extractos hepáticos, tanto de las ratas macho como de las ratas hembra en ambas eutanasias, siendo los grupos de edulcorantes nutritivos y sucralosa los que presentaron los mayores niveles. En relación con los niveles de *PFK-1* también existieron aumentos significativos atribuibles al tipo de edulcorante ingerido, así como al género de los especímenes. A los 160 días, en las ratas macho los grupos de sacarosa y fructosa tuvieron mayores niveles de actividad, de forma significativa, con respecto del control. Para el caso de las hembras fue el grupo de glucosa. A los 480 días los grupos sacarina, sacarosa y glucosa en las ratas macho tuvieron incrementos significativos con respecto del control. En contraste, en las ratas hembra solamente aumentaron de forma significativa los grupos de sacarosa y sacarina. Para el caso de la *PKL*, tanto a los 160 días como a los 480 días existieron aumentos significativos en los niveles de actividad enzimática, tanto en las ratas macho como en las ratas hembra. A los 160 días en las ratas macho únicamente el grupo de sacarosa fue significativamente mayor que el control. Para el caso de las ratas hembra, los grupos con actividad mayor que el control fueron fructosa, glucosa y sacarosa. A los 480 días los grupos con mayores niveles de actividad que el control fueron los que bebieron sacarosa, sacarina y la mezcla de aspartamo con acesulfamo de K; para las hembras fueron los grupos de fructosa y sacarosa. Los análisis de varianza indicaron que hubieron diferencias intergrupales en los niveles de actividad de la *FAS* en las muestras provenientes de las dos eutanasias tanto en los machos como en las hembras. De manera general los mayores niveles de *FAS* se observaron en los grupos de edulcorantes nutritivos y el de sacarina. Para la enzima *ACC* los análisis de varianza indicaron la existencia de incrementos significativos en los niveles de actividad únicamente en las muestras de extractos hepáticos de la primera eutanasia. En las ratas macho únicamente el grupo de glucosa tuvo mayores niveles que el control, en las ratas hembra los grupos con mayores niveles de actividad que el control fueron los que bebieron glucosa, fructosa, sacarosa y sacarina. En relación con los niveles de glucosa existieron diferencias significativas en las diversas tomas de muestras realizadas. Empero, en ningún grupo ni en ningún género se alcanzaron niveles de glucosa que pudieran ser considerados patológicos. Para los triglicéridos únicamente los grupos que consumieron edulcorantes nutritivos presentaron niveles considerados como patológicos. En el caso de las diversas hormonas estudiadas en cada una de ellas existieron diferencias intergrupales. Los niveles de insulina se correlacionaron con los incrementos de las diversas enzimas. Para el caso de la ganancia de masa corporal únicamente en las ratas macho existieron diferencias significativas siendo el grupo que bebió la glucosa el único con mayor masa que el control. En los patrones de ingesta de alimento y bebida se observó que, de forma general, los grupos de edulcorantes no nutritivos ingirieron la mayor cantidad de alimento y de forma inversa ingirieron la menor cantidad de bebida. La tendencia en los edulcorantes nutritivos fue la opuesta. Los datos parecen indicar que los diversos parámetros evaluados dependieron del tipo de edulcorante ingerido, el género y la edad de los especímenes. El consumo de edulcorantes, tanto nutritivos como no nutritivos, por sí solos no produjeron el desarrollo de patologías.

Palabras clave: Edulcorantes no nutritivos y nutritivos, glucoquinasa, fosfofructoquinasa-1, piruvato quinasa, acetil coenzima a carboxilasa, sintasa de ácidos grasos, ganancia de masa

ABSTRACT

*The consumption of non-nutritive sweeteners has increased in recent decades. However, there are still doubts about its consumption and its impact on body mass and various alterations in energy metabolism. For this reason, this study investigates the effects of consumption by an animal model of nutritive and non-nutritive sweeteners on various biochemical and physiological parameters such as the activity levels of the enzymes glucokinase (GK), phosphofructokinase-1 (PFK-1), pyruvate kinase (PKL), acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS) in liver extracts, serum levels of glucose, cholesterol, triglycerides, insulin, glucagon, leptin, ghrelin, and GIP; as well as the patterns of mass gain, food intake, drink and, energy. For this, 8 groups of newly weaned male and female rats were used (10 rats per group / gender): Sucrose 10%, glucose 14%, fructose 7%, acesulfame K 0.05%, mixture aspartame with acesulfame K 1.55%, saccharin 0.033%, sucralose 0.017%, and a control group. For 480 days, the rats were given solutions of each sweetener and were fed *ad libitum* with a balanced diet. Euthanasias were performed at 5 months and at 16 months of experimentation. The levels of enzymatic activity of the GK of the hepatic extracts were significantly increased, in both male rats and female rats in both euthanasias, being the groups of nutritive sweeteners and sucralose those that presented the highest levels. In relation to the PFK-1 levels, there were also significant increases attributable to the type of sweetener ingested, as well as the gender of the specimens. At 160 days, in male rats, the sucrose and fructose groups had significantly higher activity levels than the control. In the case of females, it was the glucose group. At 480 days the saccharin, sucrose, and glucose groups in the male rats had significant increases with respect to the control. In contrast, only the sucrose and saccharin groups were significantly increased in female rats. In the case of PKL, both at 160 days and at 480 days there were significant increases in the levels of enzymatic activity, both in male and female rats. At 160 days in male rats only the sucrose group was significantly higher than the control. For the case of female rats, the groups with significantly higher activity than the control were fructose, glucose, and sucrose. At 480 days, the groups with higher activity levels than the control were those that drank sucrose, saccharin, and the mixture of aspartame with acesulfame K; for females it was the fructose and sucrose groups. The analyzes of variance indicated that there were intergroup differences in the levels of FAS activity in the samples from the two euthanasias in both males and females. In general, the highest levels of FAS were observed in the nutritive sweeteners and saccharin groups. For the ACC enzyme, the analysis of variance indicated the existence of significant increases in the activity levels only in the samples of liver extracts from the first euthanasia. In male rats only the glucose group had higher levels than the control. In female rats the groups with higher levels of activity than the control were those that drank glucose, fructose, sucrose, and saccharin. In relation to glucose levels, there were significant differences in the various samples taken. However, in neither group nor in any gender were glucose levels reached that could be considered pathological. For triglycerides, only the groups that consumed nutritive sweeteners presented levels considered pathological. In the case of the various hormones studied in each of them, there were intergroup differences. Insulin levels correlated with increases in the activity levels of the analyzed enzymes. In the case of body mass gain, only in male rats there were significant differences, the group that drank glucose being the only one with greater mass than the control. In the food and drink intake patterns, it was observed that, in general, the non-nutritive sweetener groups ingested the highest amount of food and conversely ingested the least amount of drink. The trend in nutritive sweeteners was the opposite. The data seem to indicate that the various parameters evaluated depended on the type of sweetener ingested, the gender and the age of the specimens. The consumption of sweeteners, both nutritious and non-nutritive, by themselves did not produce the development of pathologies.*

Keywords: *Non-nutritive and nutritive sweeteners, glucokinase, phosphofructokinase 1, pyruvate kinase, acetyl coenzyme a carboxylase, fatty acid synthase, body mass gain*

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

El exceso de masa corporal y la obesidad son enfermedades de etiología multifactorial que han ido en incremento. De acuerdo con la OMS (2017) de 1975 al 2017 la prevalencia de estos padecimientos se había triplicado en todo el mundo. En el caso específico de México la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición del 2012, con base en las mediciones del índice de masa corporal, IMC, indicó una alarmante prevalencia de exceso de masa corporal y obesidad del 69.37% en hombres adultos y 73.01% en mujeres adultas (Gutiérrez et al., 2012).

Aunque estas enfermedades son de etiología multifactorial, se ha atribuido como causa fundamental el desequilibrio energético. Este desbalance energético es debido principalmente a un estilo de vida más sedentario y al aumento en el consumo de alimentos de alto contenido energético y de grasas. Bajo esta premisa, la industria alimentaria ha introducido edulcorantes hipocalóricos con la finalidad de disminuir la ingesta calórica. Si bien han sido establecidos los efectos de toxicidad aguda y algunos de los efectos a largo plazo de estos edulcorantes hipocalóricos, como su potencial carcinogénico, aún hay dudas sobre cuál es la influencia de estos edulcorantes sobre la microbiota intestinal (Bian et al., 2017a; 2017b; Palmnäs et al., 2014; Suez et al., 2014), el apetito (Wang et al., 2016), el balance de energía (Swithers y Davidson, 2008; Swithers et al., 2009; 2010; 2013) y el incremento de masa corporal (Feijó et al., 2013; Foletto et al., 2016; Martínez et al., 2010; Swithers et al., 2009).

Los factores de transcripción SREBP-1c y ChREBP estimulan a diversas enzimas de la lipogénesis y la glucólisis (Iizuka y Horikawa, 2008; López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014; Raghov et al., 2008). En investigaciones previas (Mendoza-Pérez, 2017) se encontró que el consumo durante 120 días de edulcorantes provocó una expresión de estos factores de transcripción moderadamente mayor. Además, en la investigación de Elkatry (2011) se demostró en ensayos *in vitro* que la sacarina y el ciclamato provocaban una mayor transcripción de ChREBP. Ferreira et al. (2006) demostraron que la administración de 20 mg de sacarina/kg de masa corporal a ratas macho Wistar provocaba una disminución de la glucosa plasmática debido a la disminución de la actividad de la piruvatoquinasa.

Dado lo anterior se sospecha que el consumo crónico de edulcorantes altera la regulación de las principales rutas metabólicas de regulación energética: la glucólisis y la lipogénesis, posiblemente incrementando niveles de actividad enzimática de la glucoquinasa (*GK*), la fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*), la piruvato quinasa (*PK*), la acetil coenzima A carboxilasa (*ACC*) y la sintasa de ácidos grasos (*FAS*).

Es por ello por lo que, en el presente proyecto, se evaluó el efecto del consumo crónico de edulcorantes sobre la actividad puntual *in vitro* de las enzimas reguladoras de la glucólisis y la lipogénesis: la glucoquinasa, la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa, la acetil-coenzima A carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos.

1.1. HIPÓTESIS

La ingesta a largo plazo de edulcorantes altera el metabolismo energético incrementando los niveles de actividad de la glucoquinasa, la fosfofructoquinasa-1, la piruvatoquinasa hepática, la acetil-Coenzima A carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos, así como los niveles de hormonas relacionadas con la homeostasis energética como la insulina, glucagón, leptina grelina y el péptido insulínico dependiente de glucosa. Como consecuencia de estos incrementos se elevan los niveles séricos de glucosa y triglicéridos, así como la ganancia de masa corporal y la cantidad de tejido adiposo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto a largo plazo de la ingesta de diferentes edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre la actividad de enzimas de la glucólisis y lipogénesis; los patrones de ingesta de alimento, bebida y ganancia de masa; los niveles séricos de diversas hormonas relacionadas con la homeostasis energética, el apetito y la saciedad; los niveles séricos de glucosa y triglicéridos en ratas macho y hembra de la estirpe Wistar identificando algunas de las implicaciones sobre la homeóstasis energética que conlleva el consumo crónico de edulcorantes.

1.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar mediante ensayos espectrofotométricos las actividades enzimáticas puntuales e *in vitro* en extractos hepáticos de las enzimas glucoquinasa, fosofructoquinasa-1, piruvato quinasa, acetil coenzima A carboxilasa y la sintasa de ácidos grasos.

Determinar el efecto de los edulcorantes artificiales sobre la expresión de las enzimas: glucoquinasa, fosofructoquinasa, piruvatoquinasa, acetil-CoA carboxilasa y sintasa de ácidos grasos en extractos de hepatocitos.

Evaluar los patrones de ingesta de alimento, bebida y ganancia de masa de cada uno de los grupos experimentales.

Relacionar los patrones de ingesta de alimento, bebida y ganancia de masa con el tipo de edulcorante ingerido.

Cuantificar los niveles séricos de glucosa, colesterol y triglicéridos de los especímenes.

Cuantificar los niveles séricos de diversas hormonas relacionadas con la saciedad y el apetito: leptina, grelina y el péptido insulínico dependiente de glucosa.

Cuantificar los niveles séricos de hormonas relacionadas con la homeostasis de glucosa: Insulina y glucagón.

Asociar los cambios de la actividad enzimática con los patrones de ganancia de masa corporal y los niveles séricos de: glucosa, triglicéridos, colesterol, leptina, grelina, *GIP*, *GLP-1*, insulina y glucagón.

1.3. ALCANCE

Los resultados obtenidos de esta investigación se obtuvieron de una muestra puntual de hígado y sangre de los animales modelo por lo que debe tomarse en cuenta esto al realizar el análisis de los datos y las conclusiones derivadas de ellos. Los procesos metabólicos de la glucólisis y lipogénesis son mediados y modulados por una gran cantidad de genes y hormonas, pero en la presente investigación solamente se evaluaron los factores indicados en los objetivos.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. EDULCORANTES

El término edulcorante cambia entre las diversas legislaciones nacionales e internacionales existentes, algunas de ellas excluyendo a los mono y diglúcidos. En términos más amplios un edulcorante puede ser definido como “una sustancia que se emplea para dar sabor dulce a los alimentos” (Real Academia Española, 2020).

Existen diversas formas de clasificarlos. Una de ellas es acorde con su valor nutritivo: En nutritivos y no nutritivos (Baduí, 2006).

2.1.1. Edulcorantes nutritivos

Los edulcorantes nutritivos son aquellos que al consumirse proporcionan una cantidad significativa de energía. En términos generales se clasifican en dos grandes ramas:

- a. Monoglúcidos, diglúcidos y oligoglúcidos: Sacarosa, fructosa, glucosa, lactosa, isomaltosa, miel de abeja, azúcar invertido y jarabe de maíz. De manera general su consumo aporta 4 kcal/g.
- b. Polioles o polialcoholes: sorbitol, xilitol, isomaltitol, maltitol y manitol. Los polialcoholes aportan en promedio 2.4 kcal/g.

2.1.1.1. Glucosa

La glucosa es un monoglúcido también conocido como dextrosa y es la fuente principal de energía de los seres vivos. Todas las frutas y hortalizas contienen en menor o mayor cantidad a este monoglúcido, pero las frutas que contienen una mayor cantidad de glucosa son los dátiles, las manzanas, las fresas, las peras, etc. La miel es otro producto rico en glucosa, llegando a contener en promedio un 40%. No obstante, la mayor parte de la glucosa que se utiliza industrialmente en los alimentos proviene de la hidrólisis enzimática del almidón de diversos cereales como el maíz o el trigo. La glucosa tiene un poder edulcorante de 0.7 con respecto de la sacarosa (Valdés-Martínez, 2006).

Debido a la naturaleza altamente polar de la glucosa (Figura 2.1) no puede cruzar las membranas celulares mediante difusión pasiva por lo que requiere de diversos tipos de transportadores para entrar a las células. Entre esos está el *SGLT-1* (*Sodium-glucose linked transporter*) en los enterocitos. En el resto de los tejidos los transportadores encargados del transporte de glucosa al interior de las células son los denominados transportadores *GLUT*. Existen diversas isoformas de estos transportadores en los diferentes tejidos, cada isoforma con diversa afinidad a la glucosa y otros monoglúcidos (Díaz-Hernández y Burgos-Herrera, 2002). La Tabla 2.1 muestra diferentes transportadores de glucosa en diversos tejidos.

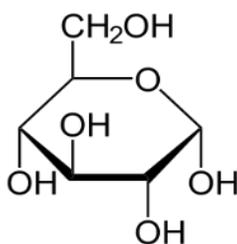


Figura 2.1. Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)

Tabla 2.1. Características de los transportadores de glucosa y otros monoglúcidos (Modificada de Castrejón et al., 2007; Díaz-Hernández y Burgos-Herrera, 2002)

Transportador	Tipo de transporte	Transporta	Km	Localización tisular
<i>SGLT1</i>	Activo	Una glucosa o galactosa por 2 Na ⁺	0.3 mM	Intestino delgado y riñón
<i>SGLT2</i>	Activo	Una glucosa por un Na ⁺	2 mM	Túbulo contorneado proximal (riñón)
<i>SGLT3</i>	Activo	Una glucosa por 2 Na ⁺	6 mM	Neuronas colinérgicas del intestino delgado y uniones neuromusculares
<i>GLUT1</i>	Pasivo	Glucosa y galactosa	2 mM y ND	Ubicuo, eritrocitos, células endoteliales del cerebro, neuronas, riñón y linfocitos
<i>GLUT2</i>	Pasivo	Glucosa, galactosa y fructosa	17 mM, 92 mM, 76mM	Células β pancreáticas, hígado, riñón e intestino delgado
<i>GLUT3</i>	Pasivo	Glucosa y galactosa	2 mM y 8.5 mM	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón
<i>GLUT4</i>	Pasivo	Glucosa	5 mM	Músculo esquelético y cardíaco, tejido adiposo y tejidos sensibles a insulina
<i>GLUT5</i>	Pasivo	Fructosa	10 mM	Yeyuno, espermatozoides, riñón y células de la microglía
<i>GLUT6</i>	Pasivo	Glucosa	5 mM	Cerebro, bazo y leucocitos
<i>GLUT7</i>	Pasivo	Glucosa y fructosa	0.3 mM y 0.06 mM	Intestino delgado, colon, testículo, próstata
<i>GLUT8</i>	Pasivo	Glucosa	2 mM	Testículo, hígado y tejidos dependiente de insulina
<i>GLUT9</i>	Pasivo	Glucosa, fructosa y ácido úrico	0.6 mM, 0.4mM y 0.9mM	Riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmones y leucocitos
<i>GLUT10</i>	Pasivo	Glucosa	0.3 mM	Hígado y páncreas
<i>GLUT11</i>	Pasivo	Glucosa y fructosa	0.16 mM	Corazón, músculo esquelético, riñón, tejido adiposo, placenta y páncreas
<i>GLUT12</i>	Pasivo	Glucosa	ND	Músculo esquelético, tejido adiposo e intestino delgado
<i>GLUT13</i>	Pasivo	Mioinositol	100 μM	Cerebro
<i>GLUT14</i>	Pasivo	Glucosa	ND	Testículo

ND: No hay datos disponibles

Existen dos vías principales para la utilización de la glucosa. La principal de ellas es la glucólisis. En términos muy generales la glucólisis es una serie de reacciones cuyo resultado final son dos moléculas de piruvato, dos moléculas de ATP y dos de NADH. La oxidación completa puede continuar a través del ciclo del ácido cítrico. La glucólisis y el ciclo de Krebs son vitales en el músculo y la mayoría de las células. La otra ruta de utilización de la glucosa es la vía de las pentosas fosfato, esta ruta genera ribosa-fosfato, la cual es un precursor para la síntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos (ADN y ARN); adicionalmente esta ruta genera NADPH. El NADPH generado por esta ruta es requerido para la síntesis de ácidos grasos, la síntesis del colesterol, hormonas esteroideas. Además, ayuda a contrarrestar el efecto de radicales libres y es necesario para la producción de glutatión reducido (GSH) (Kohlmeier, 2003).

2.1.1.2. Fructosa

La fructosa es otro monoglúcido común en la naturaleza también conocido como levulosa. La fructosa es una cetosa a diferencia de la glucosa que es una aldosa y tiene un poder edulcorante de 1.4 con respecto a la sacarosa. Su estructura se muestra en la Figura 2.2. Al igual que la glucosa se encuentra en una gran cantidad de vegetales y frutos, casi siempre acompañada de la glucosa y la sacarosa. De igual manera, la fructosa se encuentra presente en cantidades abundantes en la miel de abeja, entre un 28 y 44%. Sin embargo, a partir de comienzos de la década de 1970 la mayor parte de la fructosa que se consume en la dieta humana proviene de los jarabes de maíz de alta fructosa que se añaden a diversos productos alimentarios al sustituir la sacarosa por estos jarabes (Keim y Havel, 2013). De forma muy general los pasos para la producción de jarabes de maíz de alta fructosa son los siguientes: (1) molienda húmeda del maíz para obtener el almidón; (2) sacarificación y licuefacción para hidrolizar el polímero de almidón hasta los monómeros de glucosa utilizando α -amilasa, β -amilasa y glucoamilasa; (3) isomerización de la glucosa en fructosa empleando la enzima isomerasa y (4) fraccionamiento para enriquecer la concentración de fructosa en la corriente del producto de isomerización (Johnson y Conforti, 2003).

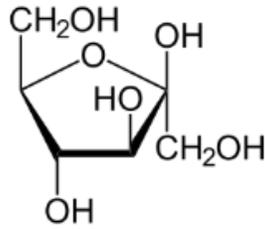


Figura 2.2. Estructura química de la fructosa (White y Osberger, 2011)

La absorción de fructosa, a diferencia de la de glucosa, ocurre por difusión facilitada a través de los transportadores GLUT5. La mayor parte de la absorción de la fructosa ocurre en el yeyuno. Posteriormente la fructosa entra a la circulación portal desde los enterocitos empleando el transportador GLUT2. La fructosa no se absorbe tan bien como la glucosa; se ha observado que cuando se consumen dosis de más de 25 g de fructosa más de la mitad de los adultos presentan síntomas de malabsorción. La malabsorción de fructosa produce hinchazón abdominal, flatulencia y diarrea (Keim y Havel, 2013).

El metabolismo de la fructosa ocurre predominantemente en el hígado. En el hígado existen dos vías para el metabolismo de la fructosa, una de ellas es a través de la fructosa-1-fosfato (la principal) y la otra a través de la fructosa-6-fosfato. La fructosa es primero fosforilada por la fructoquinasa (cetohecoquinasa) a fructosa-1-fosfato. Posteriormente la fructosa-1-fosfato es escindida por la aldolasa a gliceraldehído y dehidroxiacetona fosfato (*DHAP*). El gliceraldehído es fosforilado por la triosa quinasa en gliceraldehído-3-fosfato. Por su parte la triosa fosfato isomerasa transforma la *DHAP* en gliceraldehído-3-fosfato. El gliceraldehído-3-fosfato se puede incorporar a las rutas metabólicas de la glucólisis, la gluconeogénesis o la lipogénesis (Bray et al., 2004; Hui et al., 2014; Keim y Havel, 2013).

Existen diferencias importantes en el metabolismo de la glucosa y la fructosa que impactan en el metabolismo de los hidratos de carbono y los lípidos. La entrada a la vía glucolítica le permite pasar por alto un paso crítico limitante de la velocidad de la glucólisis. Este paso crítico de regulación de la glucólisis ocurre antes de la formación del gliceraldehído-3-fosfato. Este punto crítico de regulación de la glucólisis es la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa-1. La fosfofructoquinasa-1 cataliza la reacción de fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. La inhibición alostérica (por ATP y citrato) de la PFK-1 reduce

eficazmente la velocidad de la glucólisis. En contraste, la entrada de carbonos provenientes de la fructosa no tiene esta limitación.

Cuando se ingieren grandes cantidades de fructosa la vía glucolítica se satura de gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y dehidroxiacetonafofato (DHAP), recordando que el metabolismo de la fructosa se salta el principal punto de control de la glucólisis que es la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa-1. Bajo estas circunstancias la *DHAP* se convierte en glicerol-3-fosfato. Mientras que el G3P continúa la glucólisis generando más piruvato. El piruvato por acción de la piruvato deshidrogenasa se convierte en acetilcoenzima A y este entra a la vía de la lipogénesis a formar ácidos grasos que después serán esterificados con las moléculas de glicerol-3-fosfato para formar triglicéridos (Keim y Havel, 2013). Todo lo descrito anteriormente se puede apreciar en forma resumida en la Figura 2.3.

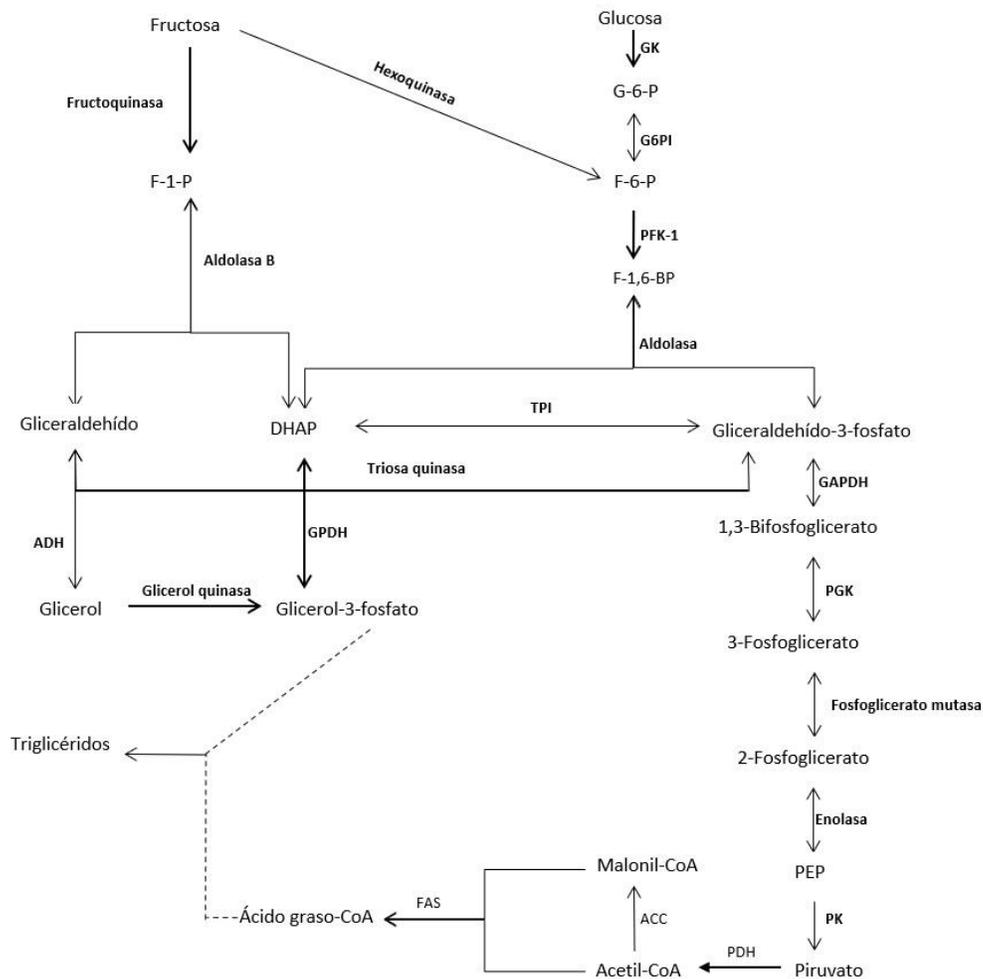


Figura 2.3. Metabolismo de la fructosa (Modificado de Bray et al., 2004)

2.1.1.3. Sacarosa

La sacarosa es un diglúcido formado a partir del enlace de glucosa y fructosa entre C1 en la subunidad glucosilo y C2 en la unidad fructosilo. La sacarosa es conocida como azúcar de mesa, azúcar de caña o simplemente “azúcar”. Su estructura química se muestra en la Figura 2.4 (Varzakas et al., 2012). Este diglúcido no tiene poder reductor. Las soluciones de sacarosa son tomadas como el patrón de referencia para la equidulzura, asignándosele un valor de 1 (Gwak et al., 2012).

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en las plantas. La mayoría de las triosas fosfato en exceso se convierten en sacarosa y almidón. A continuación, se describe de forma sucinta la síntesis de sacarosa en las plantas. Las plantas producen triosas fosfato a través del ciclo de Calvin. Posteriormente, las triosas fosfato son transportadas al citosol de las células. En el citosol, dos moléculas de triosa-P producen una molécula de fructosa 1,6-bisfosfato (F-1,6-BP). Luego la F-1,6-BP puede ser transformada en fructosa-6-fosfato o glucosa-6-fosfato. Posteriormente la sacarosa-6-fosfato sintasa condensa *UDP*-glucosa y fructosa-6-fosfato para dar sacarosa-6-fosfato y, posteriormente, la sacarosa-6-fosfato fosfatasa escinde el grupo fosfato para producir sacarosa (Stein y Granot, 2019). En la caña de azúcar se encuentran concentraciones de aproximadamente el 20% (en su tallo), mientras que en la remolacha azucarera se encuentra en concentraciones aproximadas al 15% (en su raíz) (Varzakas, 2012).

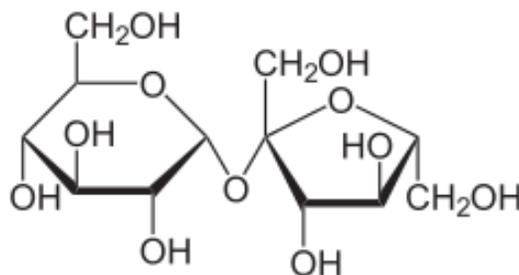


Figura 2.4. Estructura química de la sacarosa (Varzakas, 2012)

En los seres humanos y la mayoría de los mamíferos la sacarosa es hidrolizada por la sacarasa, enzima localizada en la membrana de las microvellosidades intestinales, en los dos monosacáridos correspondientes: glucosa y fructosa, las cuales seguirán sus correspondientes rutas metabólicas (Fox, 2011).

2.1.2. Edulcorantes no nutritivos

Los edulcorantes no nutritivos también conocidos como hipocalóricos son aquellos que no son supuestamente metabolizados por el organismo y que aportan cantidades despreciables de energía. Son considerados dentro de esta categoría todos aquellos con un poder edulcorante mucho mayor que la sacarosa. En términos generales se clasifican en naturales y sintéticos:

- a. Sintéticos: Acesulfamo de K, aspartamo, ciclamato, sacarina, sucralosa, etc.
- b. De origen vegetal: Glucósidos de esteviol, taumatina, monelina, mogrósido 5, etc.

2.1.2.1. Acesulfamo de potasio

El acesulfamo de K (Figura 2.5) es un edulcorante no nutritivo descubierto accidentalmente en 1967 en los laboratorios Hoechst Aktiengesellschaft por el Dr. Clauss y el Dr. Jensen (Lipinski y Hanger, 2011). Es un edulcorante de alta intensidad, aproximadamente 20 veces más dulce que la sacarosa. No obstante, en soluciones acuosas con altas concentraciones de acesulfamo de K, a veces se puede detectar un sabor amargo. Es por este resabio amargo que generalmente se emplea en mezclas con otros edulcorantes como el aspartamo, el ciclamato y, más recientemente, con sucralosa (Lawrence, 2003).

El acesulfamo de K es un sólido cristalino con una estabilidad térmica de hasta 250°C, temperatura a partir de la cual comienza a descomponerse. El acesulfamo de K tiene una alta solubilidad llegando hasta soluciones del 27% (m/v) en agua a 20°C. Empero, las soluciones acuosas son sensibles al pH. A un pH inferior a 3 comienza su degradación. Debido a estas características se considera el acesulfamo K adecuado para productos horneados y para productos con acidez moderada como las bebidas no alcohólicas y productos fermentados (Lipinski y Hanger, 2011).

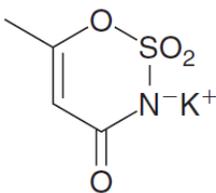


Figura 2.5. Estructura química del acesulfamo de potasio (Haber et al., 2012)

La síntesis de acesulfamo implica la reacción de isocianato de fluorosulfonio con derivados del acetileno o con compuestos como α -diacetonas, α -cetoácidos o ésteres. En la Figura 2.6 se muestra un esquema de reacción generalizado para la síntesis del acesulfamo, la posterior neutralización genera la sal de potasio (Lawrence, 2003).

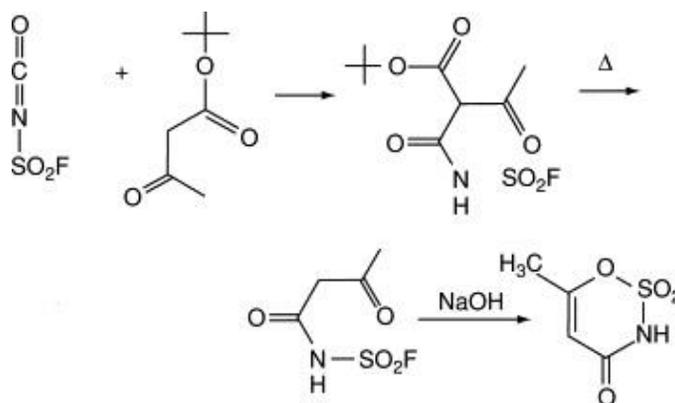


Figura 2.6. Esquema general de la síntesis de acesulfamo de K (Lawrence, 2003)

De acuerdo con el Comité Mixto *FAO/OMS* de Expertos en Aditivos Alimentarios (*JECFA*, en inglés) su ingesta diaria admisible (*ADI*) es de 0-15 mg/kg de masa corporal/día. La *FDA* de los EE. UU. establece el mismo valor. Sin embargo, el Comité Científico para Alimentos de la Unión Europea (*SCF*) establece un *ADI* de 9 mg/kg de masa corporal/día (Haber et al., 2012). Actualmente su uso se encuentra aprobado en más de 100 países.

A pesar de contar con la aprobación de diversos organismos reguladores su consumo no está exento de controversia. Por ejemplo, de acuerdo con Cong et al. (2013) “la exposición prolongada a acesulfamo de K (40 semanas) en ratones macho C57BL/6J normales demostró una influencia moderada y limitada en la homeostasis metabólica, incluida la alteración de los niveles de insulina y leptina en ayunas, el tamaño de los islotes pancreáticos y los niveles de lípidos, pero sin afectar la sensibilidad a la insulina y la masa corporal”. Estos mismos autores también concluyen que el consumo crónico de acesulfamo de K también podría alterar las funciones neuro-metabólicas en los ratones macho C57BL/6J. Por otro lado, la investigación de Bian et al. (2017a) demostró que ratones macho y hembra de la estirpe CD-1 tras consumir 14 semanas acesulfamo de K presentaron alteraciones en la ganancia de masa, composición de la microbiota, cambios en el metaboloma fecal y enriquecimiento de genes bacterianos relacionados con el metabolismo energético. Además, encontraron que los

efectos eran dependientes del género. En particular el consumo de acesulfamo de K provocó un incremento significativo de masa en los ratones macho pero no en los ratones hembra.

2.1.2.2. Mezcla aspartamo:acesulfamo de potasio

Como se mencionó previamente el acesulfamo a ciertas concentraciones deja un resabio metálico amargo en la boca. Es por ello por lo que se emplea generalmente en mezcla junto con otros edulcorantes. La mezcla comercial más común durante muchos años ha sido la mezcla de aspartamo con acesulfamo de K. las ventajas que tienen estas mezclas es su efecto sinérgico; es decir, el dulzor que se obtendría de sus respectivas mezclas es mucho mayor a la simple suma de sus valores individuales, existiendo un incremento exponencial en el dulzor de estas mezclas. La mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo es 300 veces más dulce que una solución de sacarosa al 10% (Klug y von Rymon-Lipinski, 2011).

Cuando se comercializa como edulcorante de mesa esta mezcla, se suele usar como excipiente a la dextrosa, maltodextrina o algún polialcohol o mezclas de estos. Por ejemplo, en México, la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo más común es comercializado con el nombre comercial Canderel®, el cual está constituido por un 93.67% de dextrosa (glucosa), 2.90% de maltodextrina, 1.86% de aspartamo y 1.24% de acesulfamo de K.

2.1.2.3. Sacarina

La sacarina (Figura 2.7) es un edulcorante no nutritivo de alta intensidad 300 a 500 veces más dulce que la sacarosa, dependiendo de la concentración y el producto alimenticio en el que se emplee. La sacarina fue descubierta por serendipia en 1879 por Constantine Fahlberg mientras estaba investigando los mecanismos de oxidación de la toluenosulfonamida; durante la investigación, una sustancia le salpicó accidentalmente el dedo; más tarde se lamió el dedo y notó que la sustancia tenía un sabor dulce, la sustancia responsable de ese sabor dulce en su dedo fue la sacarina (Bakal y O'Brien, 2011). Desde principios de 1900 se empleaba este edulcorante, pero fue hasta 1970 que la *FDA* autorizó su uso. Actualmente la *ADI* (*acceptable daily intake*) establecida por la *FDA* (*Food Drug Administration*) es de 5 mg/kg de masa corporal (Bassolini y Merlini, 2003).

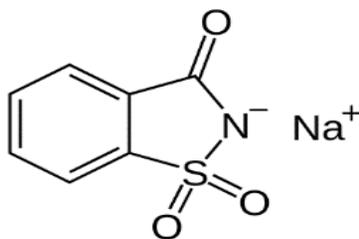


Figura 2.7. Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011)

Aproximadamente un tercio de la población percibe las soluciones de sacarina con un resabio metálico y amargo. Es por ello por lo que la sacarina no se utiliza muy frecuentemente de manera aislada en los productos comerciales, sino en combinación con otros edulcorantes de alta intensidad como el ciclamato, el aspartamo, el alitamo y la sucralosa, con los cuales presenta un efecto sinérgico del dulzor. Está disponible comercialmente en cuatro formas: sacarina ácida y las sales de sodio, potasio y calcio. La sacarina de sodio es la forma más comúnmente utilizada debido a su alta solubilidad, estabilidad y bajos costos de producción (Bassolini y Merlini, 2003).

La sacarina ha estado envuelta en controversia a lo largo de muchos años. En 1977 la *FDA* trató de prohibir el uso de sacarina después de que estudios revelaran que altas dosis de sacarina producía cáncer de vejiga en ratas (Howe et al., 1977; Reuber, 1975). Sin embargo, debido a grupos de presión y cabildeos de la industria alimentaria el Congreso estadounidense adoptó una postura más condescendiente. En vez de implementar una prohibición, el Congreso decretó en 1977 que cualquier alimento endulzado con sacarina debía llevar una etiqueta de advertencia: "El uso de este producto puede ser nocivo para su salud. Este producto contiene sacarina, que se ha determinado que provoca cáncer a animales de laboratorio" (Bassolini y Merlini, 2003).

La administración de altas dosis de sacarina de sodio a las ratas produce un precipitado compuesto principalmente de fosfato de calcio. El fosfato de calcio es citotóxico para las células uroteliales. Esto produce necrosis de la capa superficial del urotelio con la consiguiente hiperplasia (Cohen, 2010; Cohen et al., 1995; Ellwein y Cohen, 1990). Sin embargo, supuestamente el consumo de sacarina de sodio no promueve la producción de este precipitado en primates. Thorgeirsson et al. (1994) suministraron de forma continua sacarina (25 mg/kg de masa) durante 22 años a monos Rhesus (*Macaca mulatta*). Posterior al tiempo

de estudio se realizaron las eutanasias correspondientes y no se encontraron daños en el urotelio, ni ningún desarrollo de tumor en la vejiga de los especímenes. En el caso de los humanos estudios de corte epidemiológico no encontraron una relación clara entre el consumo de sacarina y la prevalencia de cáncer de vejiga (Elcock y Morgan, 1993). Tal parece ser que la generación del precipitado de fosfato de calcio por consumir sacarina parece ser un fenómeno específico de la rata, relacionado predominantemente con las altas concentraciones de proteínas en la orina de estos roedores (Cohen, 2010).

Por lo tanto, en 1995, el Comité Científico Europeo de Alimentos llegó a la conclusión de que la sacarina no representa un riesgo de cáncer para los seres humanos. Actualmente, la sacarina está aprobada para el uso en más de 90 países. La *FDA* estable un *IDA* de 0-5 mg/kg de masa corporal. En 1991 la propuesta para la prohibición de la sacarina fue desechada y a partir del 2000 la legislación de EE. UU. retiró el requisito de que cualquier alimento o dentífrico con sacarina contara con una leyenda de advertencia.

Sin embargo, la controversia aún continua. Los experimentos de Suez et al. (2014) concluyeron que la sacarina producía intolerancia a la glucosa en ratones C57BL/6 debido a la alteración de la microbiota intestinal. Por otro lado, Bian et al. (2017b) concluyeron que la sacarina producía inflamación en el hígado de ratones C57BL/6 y alteraba la microbiota intestinal y sus funciones metabólicas. Por otro lado, Swithers et al. (2009), encontraron que las ratas que eran alimentadas con sacarina tenían un mayor aporte energético comparado con las ratas que ingerían glucosa. Por su parte Feijó et al. (2013) y Foletto et al. (2016) concluyeron que el consumo de sacarina incrementaba la masa corporal de ratas macho adulto de la estirpe Wistar, pero sin ocasionar intolerancia a la glucosa. Como se observa aún existen dudas sobre la inocuidad de este edulcorante.

2.1.2.4. Sucralosa

La sucralosa (Figura 2.8) es un derivado clorado de la sacarosa. Fue descubierta en 1976 por Shashikant Phadnis miembro del equipo de investigación de carbohidratos del Queen Elizabeth College y Tate and Lyle, Reino Unido. Al igual que otros edulcorantes fue descubierto por serendipia. Es un edulcorante de alta intensidad 600 veces más dulce que la

sacarosa. Fue aprobado para su uso en los alimentos por la *FDA* en 1998. La sucralosa a diferencia del acesulfamo o de la sacarina presenta un dulzor limpio y no muestra resabios amargos. En cuanto a sus propiedades se puede mencionar que la sucralosa es estable a altas temperaturas y en un intervalo amplio de valores de pH. Su síntesis es un proceso patentado que implica la cloración selectiva de la sacarosa en las posiciones 1, 4' y 6' (Goldsmith y Merkel, 2011).

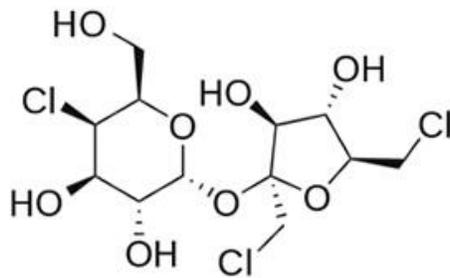


Figura 2.8. Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)

El *JECFA* lo examinó favorablemente y en 1990 recomendó una *IDA* de 0 a 15 mg por kilogramo de masa corporal. La sucralosa está aprobada para su uso en una amplia gama de productos alimenticios en Canadá, EE. UU., Australia, México, Rusia, Rumania, China, la Unión Europea y Mercosur (Goldsmith y Merkel, 2011).

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

No obstante, como el resto de los edulcorantes, su uso no se encuentra exento de controversia. Por ejemplo, Wang et al. (2016) indicaron que la sucralosa promueve una mayor ingesta de alimentos a través de la estimulación del neuropéptido “Y” y la respuesta neurológica al ayuno. Por su lado, Gupta et al. (2014) concluyeron que cuando se suministraba sucralosa en cantidades elevadas a ratas macho albinas se observó toxicidad pancreática en forma de cálculo de islotes, infiltrado linfocítico, degeneración de islotes del páncreas. Asimismo, Farid et al. (2020) estudiaron ratones albinos macho y hembra BALB/c a los cuales se les

suministraron diferentes dosis de sucralosa. Estos autores concluyeron que el consumo de sucralosa incrementó la glicemia, incremento ciertas enzimas hepáticas debido al reajuste de la microbiota intestinal y provocó un incremento en los niveles de urea y creatinina.

2.2. GLUCÓLISIS

En términos muy generales la glucólisis es una vía citoplasmática que descompone la glucosa en dos moléculas de piruvato y genera energía. En condiciones aerobias la acetil coenzima A, generada a partir del piruvato, entra en el ciclo de Krebs para una mayor producción de energía. En condiciones anaerobias el piruvato puede ser convertido en ácido láctico (Nelson y Cox, 2009).

La glucólisis está conformada por 10 reacciones químicas las cuales se ilustran en la Figura 2.9. Sin embargo, la regulación de esta vía metabólica es mediada únicamente por 3 reacciones que presentan una energía libre de Gibbs (ΔG°) negativa.

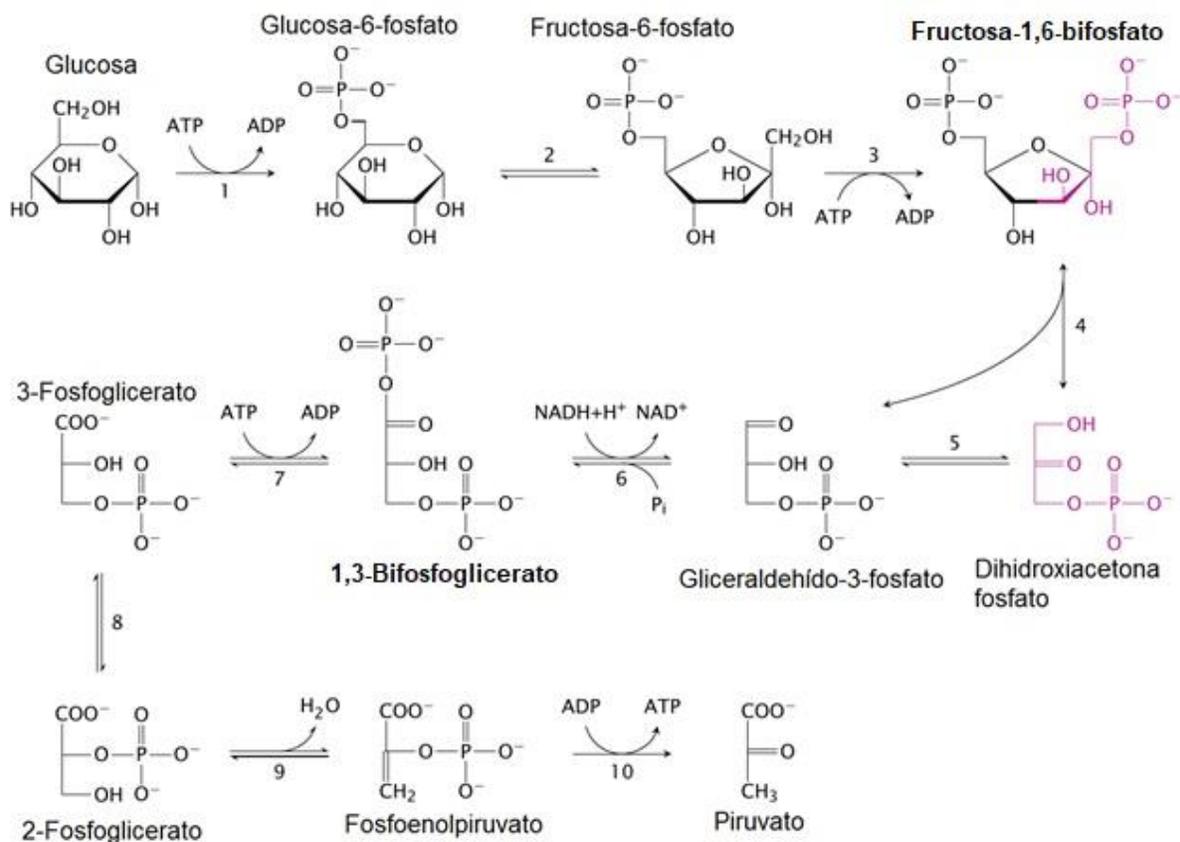


Figura 2.9. Reacciones químicas de la glucólisis (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

Estas tres reacciones clave son:

1. Glucosa a glucosa-6-fosfato catalizada por la hexoquinasa (*HK*) o glucoquinasa (*GK*) (en el hígado), $\Delta G^\circ = -16.7 \text{ kJ/mol}$ (Figura 2.10).

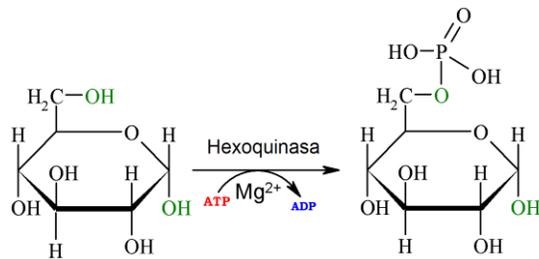


Figura 2.10. Reacción catalizada por la hexoquinasa o glucoquinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

2. Fructosa-6-fosfato a fructosa-1,6-bisfosfato catalizada por la fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*), $\Delta G^\circ = -14.2 \text{ kJ/mol}$ (Figura 2.11).

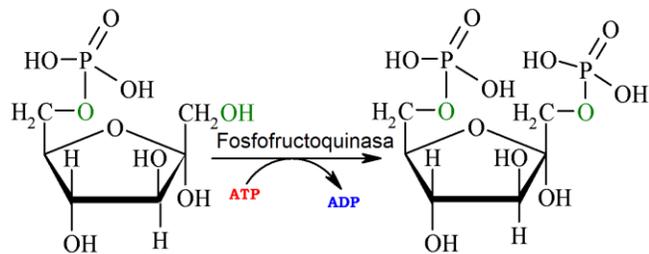


Figura 2.11. Reacción catalizada por la fosfofructoquinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

3. Fosfoenolpiruvato a piruvato por la piruvato quinasa (*PK*), $\Delta G^\circ = -31.4 \text{ kJ/mol}$ (Figura 2.12).

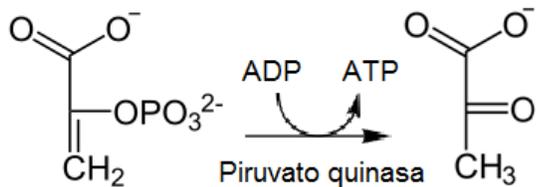


Figura 2.12. Reacción catalizada por la piruvato quinasa (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

2.2.1. Glucoquinasa (*GK*)

La glucoquinasa o hexoquinasa IV es una isoenzima de la hexoquinasa que se expresa principalmente en los hepatocitos y las células β del páncreas. Como todas las hexoquinasas

fosforila una hexosa hasta su correspondiente hexosa-6-fosfato. La glucoquinasa en específico cataliza la reacción de glucosa a glucosa-6-fosfato (Matschinsky et al., 2006). La glucoquinasa es una enzima con una sola subunidad y tiene una masa molecular de aproximadamente 50 kDa, presenta una baja afinidad por la glucosa $K_m=8$ mM; además, presenta una curva de saturación sigmoidea y no es inhibida por concentraciones fisiológicas de glucosa 6-fosfato (van Schaftingen, 2020).

Los niveles basales de glucosa se encuentran por debajo de 5.6 mM. Debido a que la K_m de la glucoquinasa es de 8mM, esta enzima equipa a las células secretoras de insulina con la capacidad de conectar los cambios en la concentración fisiológica de glucosa en sangre con los cambios en el flujo glucolítico (Lenzen, 2014). Lo anterior es debido a que cuando aumenta la glucosa en sangre en la etapa postprandial, la glucoquinasa es la única hexoquinasa que fosforila a la glucosa debido a que, en contraste con la glucoquinasa, las demás isoformas de la hexoquinasa de alta afinidad son inhibidas por la glucosa-6-fosfato (Lenzen, 2014).

En el hígado, la regulación de la glucoquinasa es importante para la síntesis y el almacenamiento posterior de glucógeno en el estado posprandial. Durante el ayuno y la inanición, cuando las reservas de glucógeno hepático disminuyen, el suministro de glucosa al cerebro se mantiene mediante una tasa creciente de gluconeogénesis. En estas condiciones, la fosforilación de glucosa por enzimas de baja afinidad, como la glucoquinasa, es mínima debido a la baja concentración de glucosa en sangre y porque la glucoquinasa se transloca al núcleo y se inhibe por su unión a la proteína reguladora de glucoquinasa (Lenzen, 2014; Matschinsky et al., 2006; van Schaftingen, 2020).

2.2.1.1 Regulación de la glucoquinasa (GK)

La glucoquinasa está sujeta a inhibición por la unión reversible de la proteína reguladora de la glucoquinasa (*GKRP*). La *GKRP* se une y se comporta como un inhibidor competitivo con respecto a la glucosa. La unión de estas dos proteínas es estimulada por la fructosa-6-fosfato, un ligando de la *GKRP*, y antagonizada por la fructosa-1-fosfato (van Schaftingen, 2020).

Adicionalmente, la *GKRP* induce el transporte al núcleo de la glucoquinasa cuando la concentración de fructosa-6-fosfato es elevada y la libera al citosol cuando la concentración de glucosa se eleva. Por lo tanto, a niveles basales de glucosa (5mM) la glucoquinasa se encuentra principalmente en el núcleo. Pero se mueve hacia el citosol cuando aumenta la concentración de glucosa o si hay fructosa, debido a la conversión de esta última en fructosa 1-fosfato (Matschinsky et al., 2006; van Schaftingen, 2020).

2.2.2. Fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*)

La fosfofructoquinasa 1 es el principal punto de regulación de la glucólisis. Esta enzima fosforila la fructosa 6-fosfato a fructosa-1,6-bifosfato. Esta es una reacción prácticamente irreversible bajo condiciones fisiológicas. La fosfofructoquinasa es una proteína tetramérica de una masa aproximada de 340 kDa. Esta enzima puede existir en dos estados conformacionales, el estado R y el estado T. El estado R es la forma activa y el estado T la forma inactiva.

2.2.2.1. Regulación de la fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*)

La fosfofructoquinasa-1 está sujeta a una compleja regulación alostérica; en términos generales, su actividad aumenta siempre que disminuyen las concentraciones de ATP o cuando existe un exceso de ADP o AMP; en contraste, es inhibida cuando existe mucho ATP. La fosfofructoquinasa-1 también es inhibida por una disminución en el pH, la inhibición de la fosfofructoquinasa-1 por H^+ previene la formación excesiva de ácido láctico en condiciones anaerobias (Berg et al., 2002a).

Los principales activadores alostéricos de la *PFK-1* son: la fructosa-2,6-bifosfato, el ADP, el AMP y NH_4^+ . En contraste, los principales inhibidores son el ATP y el citrato. La fructosa 2,6-bifosfato activa la fosfofructoquinasa aumentando su afinidad por la fructosa 6-fosfato y disminuyendo el efecto inhibitor del ATP (Mor et al., 2011).

La fosfofructoquinasa-2 es controlada mediante modificaciones covalentes, alternando entre su actividad quinasa y fosfatasa. La forma desfosforilada de la *PFK-2* tiene actividad de

quinasa aumentando la síntesis de fructosa-2,6-bisfosfato, la cual es un potente activador alostérico de la *PFK-1*. En contraste, cuando la *PFK-2* está fosforilada presenta actividad de la fosfatasa favoreciendo la transformación de fructosa-2,6-bisfosfato a fructosa-6-fosfato (Mor et al., 2011).

La fosfofructoquinasa-2 (*PFK-2*) es una enzima controlada por la acción de la insulina y el glucagón, lo cual permite un control hormonal de la glucólisis. Cuando los niveles de glucosa son bajos, como en el ayuno, se libera glucagón al torrente sanguíneo activando una cascada de señalización que activa a la proteína quinasa A. La proteína quinasa A fosforila a la *PFK-2*. Al estar fosforilada la *PFK-2* se disminuyen los niveles de fructosa-2,6-bisfosfato. En contraste, cuando los niveles de glucosa son elevados, la *PFK-2* es desfosforilada en respuesta a la insulina promoviendo su actividad quinasa elevando los niveles de la fructosa-2,6-bisfosfato (Pilkis et al., 1983; Raben y Wolfgang, 2013).

2.2.3. Piruvato quinasa (PK)

La enzima piruvato quinasa es la última enzima de la glucólisis. Cataliza la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (*PEP*) al ADP, generándose como resultado una molécula de piruvato y otra de ATP. La piruvato quinasa es una enzima tetramérica y cada monómero tiene una masa molecular aproximada de 57 kDa. En los mamíferos existen 4 isoformas de esta enzima: *PKM1*, *PKM2*, *PKR*, *PKL*. La isoforma *PKL* es expresada principalmente en el hígado, riñones y eritrocitos. Por su parte *PKM1* es expresada en tejidos con alta actividad catabólica como el músculo esquelético, el músculo cardíaco y cerebro. *PKM2* es expresada principalmente en cerebro e hígado. Finalmente, *PKR* es expresada en los eritrocitos (Israelsen y vander Heiden, 2015; Li et al., 2015).

2.2.3.1. Regulación de la piruvato quinasa

La actividad de la piruvato quinasa es activada la fructosa-1,6-bisfosfato. En ausencia de activadores alostéricos la *PKL* tiene baja afinidad por el *PEP*. Cuando se une la enzima a la fructosa-1,6-bisfosfato la afinidad por el *PEP* incrementa. En contraste es inhibida por el ATP, la acetil-CoA, la fenilalanina y la alanina (Uyeda, 2021).

La *PKL* también es regulada a través de mecanismos de fosforilación y desfosforilación a través de la proteína quinasa A activada por *AMPc*. La fosforilación de la enzima produce su inactivación. La proteína quinasa A es activada por el glucagón, cuando los niveles de glucagón son altos se activa la *PKA* provocando la fosforilación de la enzima inactivándola (Uyeda, 2021).

A largo plazo la expresión del gen *PKL* es regulado por nutrientes y hormonas. La insulina y el glucagón pueden activar y reprimir, respectivamente, la transcripción de *PKL*. Estos efectos hormonales están mediados por la respuesta directa a las señales hormonales que actúan a través de los receptores de membrana. Además del aumento de la secreción de insulina, el exceso de glucosa en la sangre circulante conduce a la activación de la transcripción del gen *PKL* (Uyeda, 2021). La glucosa estimula la transcripción del gen de la *PKL* mediante la activación del factor *ChREBP* al provocar su desfosforilación por parte de la fosfoproteína fosfatasa 2A (*PP2A*). La *PP2A* es activada alostéricamente por la xilulosa-5-fosfato (intermediario de la vía de las pentosas fosfato) (López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014).

Adicionalmente, la piruvato quinasa es regulada a nivel transcripcional por los factores de transcripción *ChREBP* (proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos) y el factor de transcripción *SREBP-1c* (proteína de unión al elemento regulador de los esteroides) (Nelson y Cox, 2009).

2.3. LIPOGÉNESIS

La lipogénesis es un conjunto de reacciones químicas para la síntesis de ácidos grasos a partir de moléculas de acetil-coenzima A. La glucosa al oxidarse a través de la glucólisis genera dos moléculas de piruvato; el piruvato es ingresado a la matriz mitocondrial y mediante la acción del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa origina acetil-Coenzima A, la cual ingresa al ciclo de Krebs. El exceso de citrato sale de la mitocondria al citosol y es transformado en acetil-Coenzima A y oxaloacetato por acción de la ATP-Citrato liasa. Una vez que la acetil-coenzima A se encuentra en el citosol, mediante la acción de la enzima acetil coenzima A carboxilasa (ACC), reacciona con un ion bicarbonato (HCO_3^-) para originar a la malonil-coenzima A. Las cadenas carbonadas largas de los ácidos grasos se forman mediante

una secuencia repetida de reacciones catalizadas por la enzima ácido graso sintasa (*FAS* en inglés) en cuatro etapas: (1) La condensación de un grupo acilo activado y dos carbonos provenientes de la malonil-coenzima A, con la eliminación de CO_2 , extendiéndose la cadena dos carbonos. (2) El grupo β -ceto se reduce a alcohol. (3) La eliminación de H_2O , origina un doble enlace y (4) El doble enlace se reduce para formar el correspondiente grupo acilo saturado a partir del cual, se repite el proceso hasta cumplir 7 ciclos que dan origen al ácido palmítico ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COOH}$), el cual es liberado por la acción de la enzima tioesterasa (Nelson y Cox, 2009).

Las enzimas fundamentales en la regulación de la lipógenesis son la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC) y la enzima sintasa de ácidos grasos (*FAS*) (Nelson y Cox, 2009). Las reacciones catalizadas por estas enzimas se ilustran en las Figuras 2.13 y 2.14.

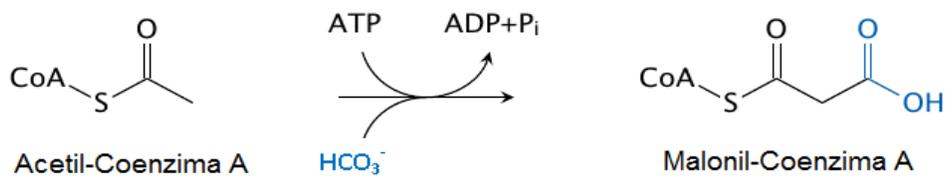


Figura 2.13. Reacción de la acetil-Coenzima A catalizada por la ACC (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

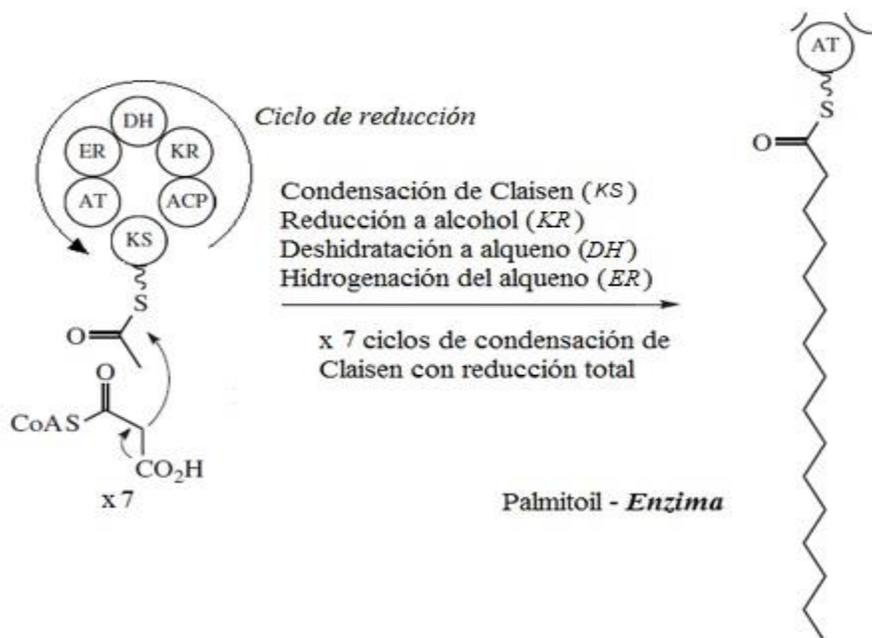


Figura 2.14. Reacción en 4 pasos catalizada por la sintasa de ácidos grasos (Modificado de Nelson y Cox, 2009)

La lipogénesis es regulada en niveles hormonales, nutricionales y transcripcionales. La reacción catalizada por la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC) es el paso limitante en la velocidad de biosíntesis de los ácidos grasos, siendo entonces esta enzima un importante sitio de regulación.

A nivel hormonal, el glucagón y la adrenalina inhiben la acción de la acetil-Coenzima A carboxilasa (ACC), al provocar su fosforilación. El estado inactivo de esta enzima es la forma fosforilada. La insulina por otra parte favorece la desfosforilación (forma activa de la ACC) (Nelson y Cox, 2009).

A nivel transcripcional, la lipogénesis es regulada por la proteína de unión al elemento regulador del esteroil (*SREBP-1*, por sus siglas en inglés), la proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos (*ChREBP*, por sus siglas en inglés), entre otros (Wang et al., 2015). La proteína *SREBP-1c* induce la expresión de los genes lipogénicos y glucolíticos, que intervienen en la lipogénesis *de novo*. Entre las enzimas que inducen su transcripción se encuentran las siguientes: la glucoquinasa (*GK*), la piruvato quinasa hepática (*PKL*), la ATP-citrato liasa (*ACL*), la acetil-coenzima A carboxilasa (*ACC*), la ácido graso sintasa (*FAS*), la elongasa de ácidos grasos 6 (*ELOVL6*), la esteroil coenzima A desaturasa 1 (*SCD1*) y la lipina-1 (López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014). Respecto a *ChREBP*, se ha reportado que es capaz de estimular la transcripción de los genes codificantes de las siguientes enzimas involucradas en la glucólisis y lipogénesis: la piruvato quinasa hepática (*PKL*), la acetil-CoA carboxilasa (*ACC*), la sintasa de ácidos grasos (*FAS*), la elongasa de ácidos grasos 6 (*ELOVL6*), la esteroil-Coenzima-A desaturasa (*SCD1*) y la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (*GPAT*) (Baraille et al., 2015; Iizuka y Horikawa, 2008).

Se ha descrito que algunos edulcorantes artificiales favorecen la adipogénesis y suprimen la lipólisis (Simon et al., 2013). Los mecanismos por los que esto ocurre no están del todo elucidados, pero se sospecha que los edulcorantes artificiales estimulan la síntesis de los factores de transcripción *SREBP-1* y *ChREBP*, los cuales como ya se mencionó anteriormente regulan la transcripción de numerosas enzimas de la glucólisis y la lipogénesis.

2.3.1. Acetil coenzima A carboxilasa (ACC)

La acetil coenzima A carboxilasa cataliza la reacción irreversible de formación de malonil-CoA a acetil-CoA. La acetil coenzima A tiene tres regiones funcionales: una de ellas es la proteína portadora de biotina; la otra región es la biotina carboxilasa, que activa el HCO_3^- uniendo un grupo carboxilo a la biotina en una reacción dependiente de ATP; finalmente, la ACC tiene una región transcarboxilasa que transfiere el grupo carbonilo desde la biotina hasta la acetil-CoA produciendo malonil-CoA como resultado (Berg et al., 2002b; Nelson y Cox, 2009). En los animales se han encontrado hasta el momento dos isoformas ACC-1 y ACC-2. La isoforma ACC-1 tiene una masa molecular aproximada de 265 kDa, se expresa principalmente en el hígado y el tejido adiposo. La isoforma ACC-2 tiene una masa molecular aproximada de 280 kDa y se expresa principalmente en el corazón, músculo esquelético y otros tejidos (Brownsey et al., 2006).

2.3.1.1. Regulación de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC)

La acetil coenzima A carboxilasa es regulada mediante su fosforilación/desfosforilación. La fosforilación de la ACC es llevada a cabo por la proteína quinasa activada por AMP (*AMPK*). La ACC es inactiva cuando se encuentra fosforilada y activa cuando está desfosforilada. Si aumenta la relación *AMP/ATP* se activa la enzima *AMPK*. Por tanto, la acetil coenzima A carboxilasa se inactiva cuando la carga de energía en la célula es baja. La insulina estimula la acetil coenzima A carboxilasa provocando su desfosforilación. Empero, no está claro cuál de las fosfatasas activa la carboxilasa en respuesta a la insulina. Por el contrario, el glucagón y la adrenalina inhiben a la acetil coenzima A carboxilasa (Brownsey et al., 2006; Peng et al., 2012).

Adicionalmente, la acetil coenzima A carboxilasa tiene control alostérico. Esta enzima es estimulada por el citrato. El citrato revierte la inactivación ocasionada por la fosforilación. Los niveles de citrato son altos cuando la acetil-coenzima A y el ATP se encuentran elevados. En contraste, la acetil coenzima A es inhibida por el palmitoil coenzima A, que es abundante cuando existe un exceso de ácidos grasos. El palmitoil-CoA hace que los filamentos se desarmen en los octámeros inactivos (Berg et al., 2002b).

2.3.2. Sintasa de ácidos grasos (FAS)

La ácido graso sintasa es un complejo multienzimático que se encuentra en el citosol de las células y está encargada de la transformación de la malonil-coenzima A en ácido palmítico. En la naturaleza existen dos variantes de la sintasa de ácidos grasos: la *FAS I* y la *FAS II*. La *FAS I* se encuentra presente en los mamíferos y los hongos. La *FAS II* se encuentra en las plantas, las bacterias y las arqueas. La *FAS I* de los mamíferos tiene una masa molecular de aproximadamente 240 kDa (Nelson y Cox, 2009). Esta cadena es multifuncional y homodimérica (Nelson y Cox, 2009). Cada homodímero contiene 7 sitios activos diferentes que se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Sitios activos de la sintasa de ácidos grasos (Nelson y Cox, 2009)

Sitio activo (proteína)	Función
Proteína acarreadora de acilos (<i>ACP</i>)	Acarrea grupos acilo mediante enlaces tioéster
Malonil/acetil transferasa (<i>MAT</i>)	Transfiere un grupo acetilo de la acetil-CoA al sitio <i>KS</i> . También transfiere el grupo malonilo del malonil coenzima A a la <i>ACP</i>
β -cetoacetil- <i>ACP</i> -sintasa (<i>KS</i>)	Condensa grupos acilo y malonilo
β -hidroxiacil- <i>ACP</i> -deshidratasa (<i>DH</i>)	Remueve H ₂ O de β -hidroxiacil- <i>ACP</i> , produciendo un doble enlace
Enoil- <i>ACP</i> reductasa (<i>ER</i>)	Reduce un doble enlace, formando acil- <i>ACP</i> saturada
β -cetoacil- <i>ACP</i> reductasa (<i>KR</i>)	Reduce un grupo β -ceto a un grupo hidroxilo (OH)
Tioesterasa (<i>TE</i>)	Libera el producto palmitato de la <i>ACP</i> cuando se completa la síntesis

Como se describió previamente, cada ciclo de reacciones del complejo multienzimático de la *FAS* comprende (Figura 2.14): (1) Condensación de Claisen, (2) reducción del grupo carbonilo, (3) deshidratación y (4) reducción del doble enlace. Con este primer ciclo se genera un grupo butirilo, el grupo butirilo es transferido desde la *ACP* a la β -cetoacetil sintasa (*KS*) para iniciar con un nuevo ciclo de reacciones para alargar la cadena en dos carbonos más. Finalmente, 7 ciclos de condensación y reducción producen un grupo saturado palmitilo; llegando a la síntesis del grupo palmitilo donde la serie de reacciones se detiene y la molécula de palmitato es liberada de la *ACP* por acción de la tioesterasa (*TE*).

2.3.2.1. Regulación de la sintasa de ácidos grasos (FAS)

La sintasa de ácidos grasos no sufre regulación alostérica o por modificación covalente. No obstante, la concentración de *FAS* es sensible al estado nutricional y hormonal. En condiciones de abundancia de nutrientes, la lipogénesis *de novo* puede promover el almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos hepáticos (Jensen-Urstad y Semenkovich, 2012).

La insulina promueve la expresión de *FAS* mediante la activación de factores de transcripción como la proteína de unión al elemento regulador del esteroide (*SREBP-1c*) y los factores estimuladores ascendentes 1 y 2 (*USF1* y *USF2*) (Griffin y Sul, 2004; Jensen-Urstad y Semenkovich, 2012).

A concentraciones bajas de glucosa, el factor de transcripción *ChREBP* (Proteína de unión al elemento de respuesta de los carbohidratos) se encuentra fosforilado e inactivo, mientras que, a concentraciones altas de glucosa, *ChREBP* sufre desfosforilación (en Ser-196) y se transloca al núcleo para activar sus genes diana (Li et al., 2006; Jensen-Urstad y Semenkovich, 2012; López-Oliva Muñoz y Muñoz-Martínez, 2014).

El metabolismo hepático de la glucosa por la glucoquinasa es necesario para la inducción de la *FAS* mediada por glucosa con *ChREBP*. La activación inducida por insulina de *SREBP-1c* y la activación inducida por glucosa de *ChREBP* actúan sinérgicamente para promover la expresión de *FAS* (Denechaud et al., 2008; López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014).

Como se ha descrito anteriormente muchas de las enzimas son controladas por diversas hormonas. A continuación, se darán algunas características de algunas de las hormonas encargadas de la regulación del metabolismo energético.

2.4. Insulina

La insulina es una hormona peptídica sintetizada en las células β -pancreáticas. El gen de la insulina codifica para un precursor de 110 aminoácidos, conocido como pre-proinsulina. La pre-proinsulina entra al lumen del retículo endoplasmático rugoso (RER) en donde se

remueve el péptido señal por la acción de una peptidasa, formándose la proinsulina. Las vesículas celulares transfieren la proinsulina del RER al aparato de Golgi, en donde se forman hexámeros solubles de proinsulina Zn^{2+} . La proinsulina se secreta dentro de vesículas. Las enzimas convertidas de prohormonas (*PC1* y *PC2*, en inglés), localizadas fuera del aparato de Golgi, cortan en dos sitios específicos liberando al péptido C y a la insulina; estos son liberados finalmente a la circulación sanguínea por exocitosis (Wilcox, 2005; Vakilian et al., 2019).

Al incrementarse los niveles de glucosa ésta entra a células β de los islotes de Langerhans a través del transportador de glucosa *GLUT-2*. Al entrar a la célula es fosforilada por la glucoquinasa, para formar la glucosa-6-fosfato e iniciar la glucólisis. Como resultado ésta genera piruvato y ATP. La glucoquinasa actúa como un sensor de glucosa, ya que debido a su baja afinidad solamente funciona a elevadas concentraciones de glucosa. El piruvato en la mitocondria entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y se genera más ATP. Al incrementarse la relación ATP/ADP se cierran los canales de K^+ sensibles al ATP. Al cerrarse los canales de K^+ -ATP, se despolariza la membrana abriéndose entonces los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje y, al abrirse estos canales, se da un influjo de Ca^{2+} , por lo que estos cambios en la concentración de Ca^{2+} conducen a la fusión de las vesículas contenedoras de insulina con la membrana plasmática (Fu et al., 2013; Wilcox, 2005). La Figura 2.15 es la representación esquemática de lo descrito anteriormente. Algunas hormonas también se encargan de la regulación de la secreción de insulina. Entre estas hormonas se encuentran el estrógeno, la melatonina, el *GLP-1*, el *GIP*, la leptina y la hormona del crecimiento (*GH*) (Fu et al., 2013; Vakilian et al., 2019).

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

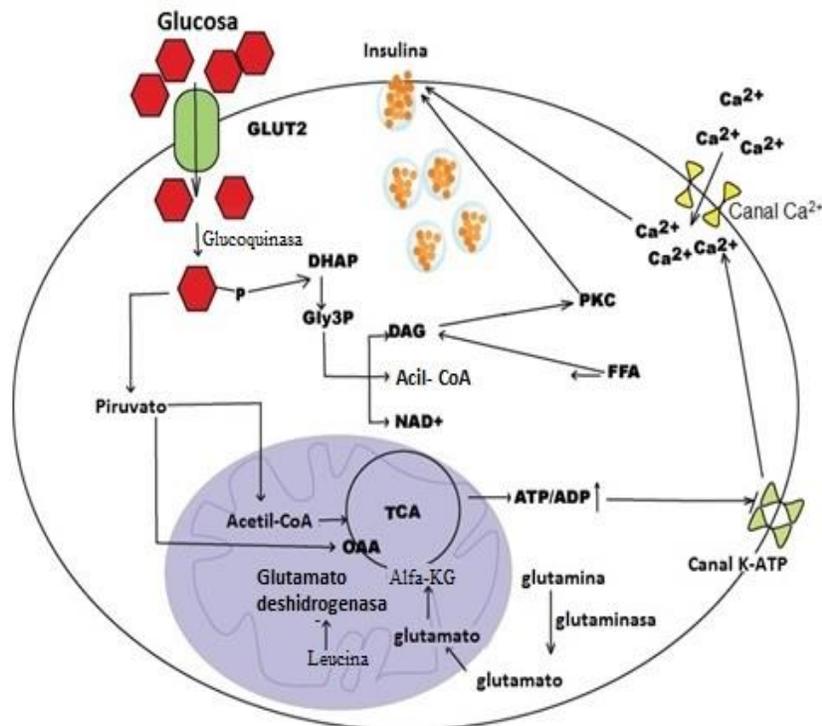


Figura 2.15. Representación esquemática de la principal cascada de reacciones que conllevan a la liberación de insulina (Modificada de Fu et al., 2013)

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

2.5. Glucagón

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

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

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

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

La unión del glucagón a su receptor en las células activa la adenilciclase provocando un aumento del adenosín monofosfato cíclico (*AMPc*) intracelular que determina la activación de la proteinquinasa A (*PKA*), la cual fosforila enzimas claves que ponen en marcha todas las acciones biológicas del glucagón. Además de esta vía también se ha descrito que el glucagón está implicado en vías de señalización que involucran a la proteína quinasa dependiente de *AMP* (*AMPK*), por ejemplo, en la regulación de la acetil coenzima A carboxilasa (Lima-Martínez et al., 2011).

A nivel hepático, el glucagón aumenta la liberación de glucosa mediante la inhibición de la síntesis de glucógeno y la estimulación, tanto de la glucogenólisis como de la glucoenogénesis. Del mismo modo, el glucagón inhibe la lipogénesis al reducir las concentraciones de malonil-CoA mediante un mecanismo dual: por un lado, inhibe la glucólisis y, además, inhibe la acetil-CoA carboxilasa (Lima-Martínez et al., 2011).

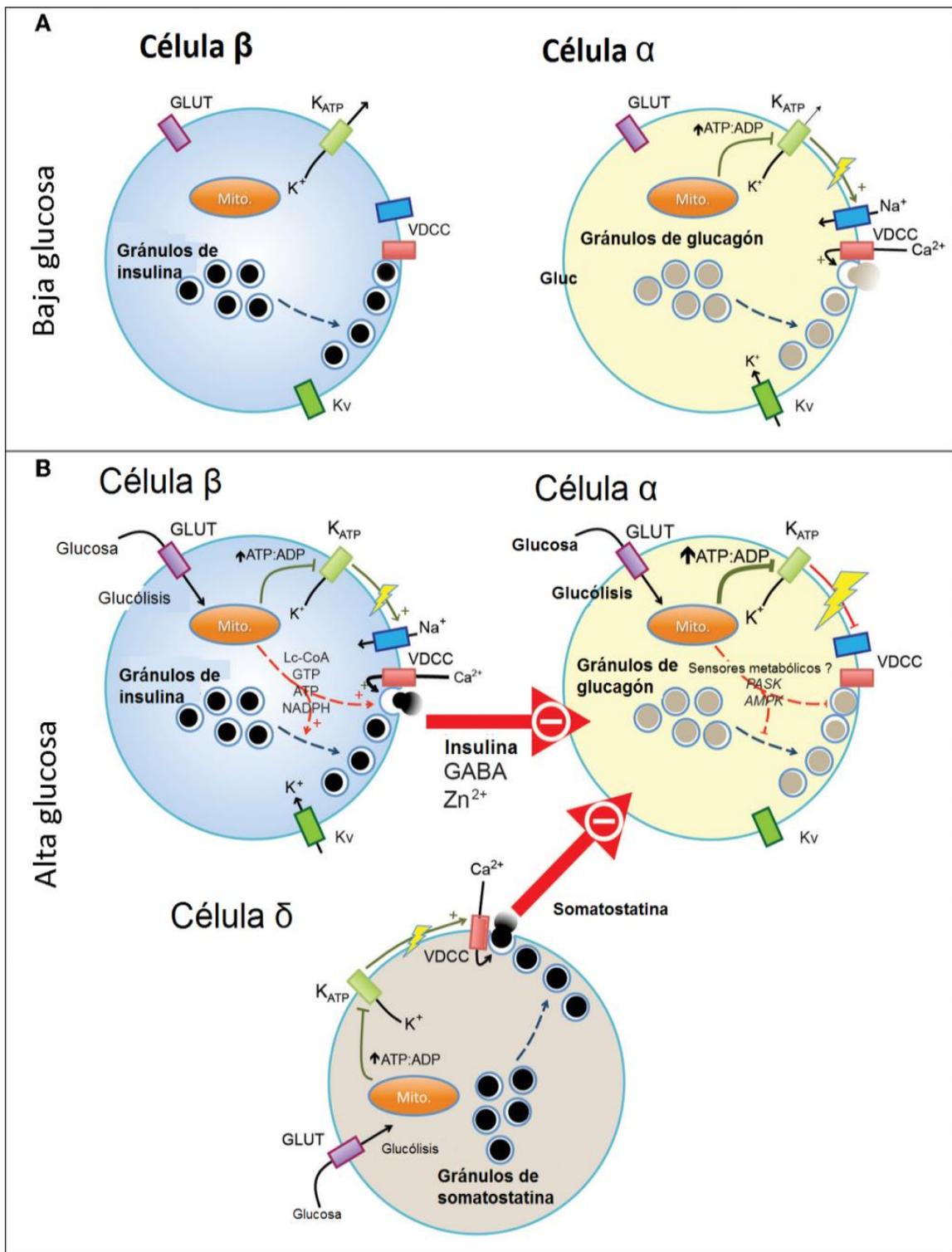


Figura 2.16. Regulación de la liberación de glucagón. A. En bajas concentraciones de glucosa se produce la liberación de glucagón por el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, debido a la polarización de la membrana por la actividad de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} y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

2.6. Leptina

La leptina es una hormona peptídica de 167 aminoácidos, aunque la forma presente en la circulación sanguínea es de solamente 146 aminoácidos. Es conocida como “la hormona de la saciedad”. La leptina se expresa primordialmente en tejido adiposo y especialmente en el tejido adiposo blanco. No obstante, se ha descrito que es secretada en otros tejidos como la placenta, el músculo esquelético, los ovarios y el estómago, pero en concentraciones mucho menores a las secretadas por el tejido adiposo (Myers et al., 2008).

Las principales funciones de la leptina son: la regulación de la homeostasis energética, función neuroendocrina y control del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Kelesidis et al., 2010). Los niveles de la leptina circulante son un reflejo directo de la cantidad de energía almacenada en el tejido adiposo ya que, a mayor tejido adiposo, mayores serán los niveles de leptina circulante (Myers et al., 2008). Los niveles de leptina dirigen al sistema nervioso central para ajustar la ingesta de alimentos. La leptina actúa directamente ejerciendo efectos reguladores del apetito (Oswal y Yeo, 2010). Se ha sugerido que la leptina atraviesa la barrera hematoencefálica y actúa impidiendo la síntesis neural del neuropéptido Y, una hormona que junto con la grelina se relaciona con el apetito (Myers et al., 2008; Oswal y Yeo, 2010).

La resistencia a la leptina es un término usado para describir la aparente paradoja de la acción anoréxica de la leptina y sus elevadas concentraciones en sujetos obesos. Se sugiere que niveles crónicos elevados de leptina podrían ocasionar la disminución del transporte de leptina hacia el sistema nervioso central y afectar las propiedades de señalización de los receptores de leptina. Esta resistencia a la leptina confiere mayor susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta, lo cual a su vez incrementa aún más los niveles de leptina empeorando la resistencia a la leptina. Esto se convierte en un círculo vicioso ya que, a mayor obesidad, se tienen mayores niveles de leptina y, a mayores niveles de leptina, hay más intolerancia a ésta, por lo que existe mayor susceptibilidad a la obesidad (Myers et al., 2008; Oswal y Yeo, 2010).

2.7. Grelina

La grelina es una hormona peptídica gastrointestinal descubierta en 1999, conocida como “hormona del apetito”. En el año 2000, Mark Heiman y Matthias Tschöp, descubrieron que

la grelina actúa en el cerebro, regulando la ingesta de alimentos, la masa corporal, la adiposidad y el metabolismo de la glucosa. Se encontró además que la grelina modula el metabolismo sistémico a través de la activación de los circuitos neurales orexigénicos (Müller et al., 2015). En años posteriores numerosas acciones fisiológicas fueron asociadas con la grelina tal y como se muestran en la Figura 2.17.

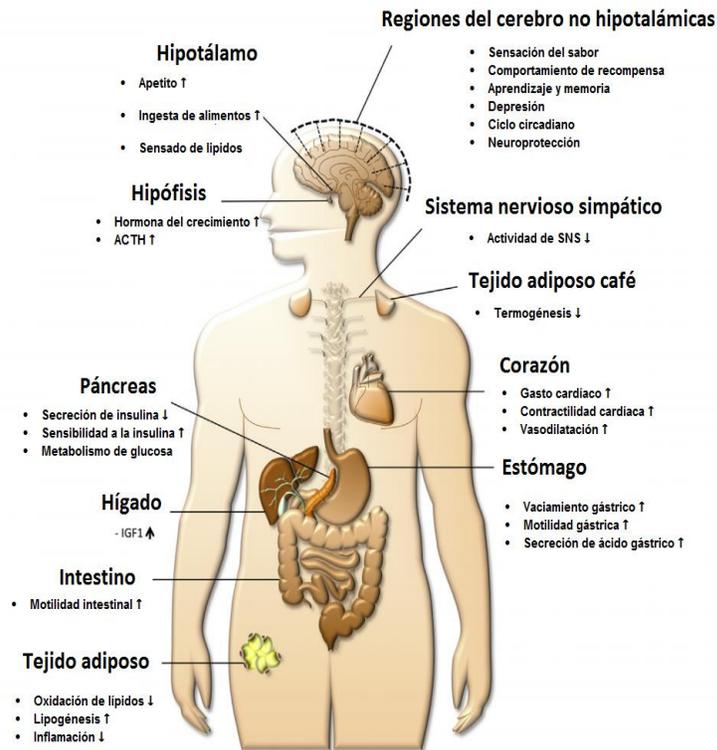


Figura 2.17. Representación esquemática de los efectos fisiológicos de la grelina (Modificada de Müller et al., 2015)

Entre los efectos reportados se encuentran: la estimulación de la motilidad intestinal, secreción del ácido gástrico, la modulación del sueño, la sensación del gusto y la recompensa del comportamiento de búsqueda, regulación del metabolismo de la glucosa, la supresión de la termogénesis en el tejido adiposo pardo, modulación del estrés y la ansiedad y las funciones de vasodilatación y contracción cardíaca (Overduin et al., 2012; Müller et al., 2015). En relación con la estimulación del apetito la investigación de Overduin et al. (2012) indicó que la grelina incrementaba la motivación de las ratas para obtener alimento después de una administración intracerebroventricular de grelina. Aquellas ratas que fueron administradas con el vehículo prácticamente no ingirieron alimento en los 30 minutos posteriores a la intervención. Caso contrario a aquellas en las que se les administró grelina en dosis de 0.1 nM y 1nM. En humanos se han observado efectos similares. Hotta et al.

(2009), desarrollaron un ensayo clínico piloto con pacientes de anorexia nerviosa, observando que la administración de 3µg de grelina/kg de masa corporal incrementaba el hambre y la ingesta de alimentos de manera significativa.

2.8. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa (*GIP*)

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

Los carbohidratos y las grasas son estimulantes de la secreción de *GIP*, mientras que los aminoácidos estimulan débilmente su secreción. No todos los carbohidratos estimulan con la misma intensidad la secreción de *GIP*. La sacarosa y la galactosa la estimulan con la misma intensidad, mientras que la fructosa la estimula mucho más; en contraste, la manosa no estimula su secreción (Baggio y Drucker, 2007).

En ayuno los niveles circulantes de *GIP* son bajos (20-25 pmol/L) con respecto a los alcanzados después de la ingesta de alimentos (60-70pmol/L). La liberación de *GIP* en el torrente sanguíneo es estimulada por la ingesta de alimentos ricos en glucosa y grasas, pero en ausencia de carbohidratos la grasa no es capaz de estimular la secreción de *GIP* en niveles suficientes como para lograr la secreción de insulina (Kim y Egan, 2008). La unión de *GIP* a sus receptores *GIPR* en las células β pancreáticas estimula la liberación de insulina contenida en los gránulos. El receptor de *GIP* es un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G y consta de 7 dominios transmembranales (Kim y Egan, 2008). La Figura 2.18 ilustra el proceso que conlleva a la liberación de insulina mediada por *GIP*.

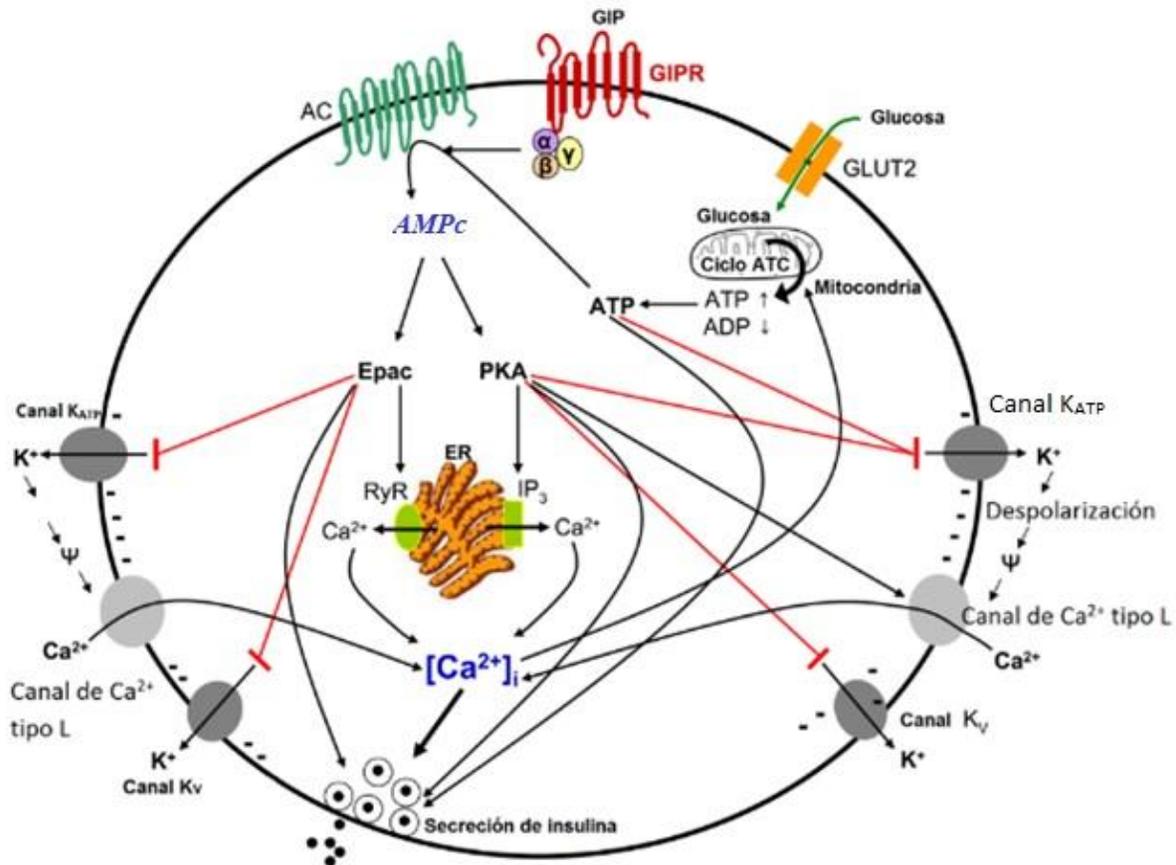


Figura 2.18. Representación esquemática de los principales eventos moleculares durante la secreción de insulina inducida por la incretina *GIP*, desde una célula β pancreática (Modificado de Kim y Egan, 2008)

2.9. Actividad enzimática

Se define a la unidad de actividad enzimática (U) como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μmol de sustrato en un minuto. La actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg). La "unidad" para la "actividad enzimática" ($U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$) fue recomendada por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) en 1961 y se utiliza ampliamente en informes de laboratorio médico. No obstante, a partir de la resolución de 1999 de la Conferencia General de Pesas y Medidas se recomienda el uso del katal como medida de actividad enzimática. Empero, el uso de unidad de actividad enzimática (U) sigue siendo ampliamente usado (Dybkær, 2002). En el sistema internacional de unidades (SI) la actividad enzimática se ha definido como la cantidad de enzima que transforma 1 mol de sustrato por segundo. Esta unidad se denominó katal. 1 katal equivale a 60×10^6 U. Esta unidad es muy grande, de forma que se utilizan frecuentemente los submúltiplos como el microkatal (μkat , 10^{-6} kat) o nanokatal (nkat 10^{-9}

kat) o en su defecto la unidad de actividad enzimática y sus derivados como la miliunidad (mU 10^{-3} U) (Dybkær, 2002).

Con base en estos fundamentos, en el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida en la presente investigación para la determinación de los niveles de actividad enzimática en extractos hepáticos de las enzimas: glucoquinasa (*GK*), fosfofructoquinasa-1 (*PFK-1*), piruvato quinasa hepática (*PKL*), la acetil coenzima A carboxilasa (*ACC*) y la sintasa de ácidos grasos (*FAS*). Asimismo, se describen las metodologías para las determinaciones de los niveles séricos de diversas hormonal relacionadas con la regulación de estas enzimas.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

El proyecto se basó en un diseño multifactorial categórico. Se tuvieron tres factores categóricos: 1) edulcorante ingerido, 2) género de los especímenes y 3) tiempo. El factor edulcorante ingerido constó de 8 niveles: sacarosa 10% (m/v), glucosa 14% (m/v), fructosa 7% (m/v), acesulfamo de K 0.05% (m/v), mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo 1.55% (m/v), sucralosa 0.017% (m/v) y sacarina 0.033% (m/v) y un grupo control (agua potable). El factor género constó de 2 niveles: macho y hembra. Finalmente, el factor tiempo tuvo 2 niveles: 5 y 16 meses. Se tuvo una $n = 10$ por género por grupo. Se tuvo un total de $N = 160$ especímenes, 80 machos y 80 hembras. Las variables de respuesta fueron: la actividad enzimática de la glucoquinasa (*GK*), la fosfofructoquinasa1 (*PFK1*), la piruvato quinasa hepática (*PKL*), la acetil-coenzima A carboxilasa (*ACC*) y la sintasa de ácidos grasos (*FAS*); la ganancia de masa corporal, las cantidades de alimento y bebidas consumidas; los niveles séricos de colesterol, glucosa, triglicéridos, leptina, grelina, *GIP*, insulina y glucagón.

Los datos resultantes se analizaron mediante un análisis de varianza con un $\alpha = 0.05$. Como comparaciones *post hoc* se realizó la prueba de Duncan verificando previamente que no existieran datos atípicos mediante la prueba de Grubbs. Para la normalidad de los datos se empleó la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad de los grupos con la prueba de Levene. En aquellos resultados en donde no se tuvieron poblaciones normales de datos se utilizó la prueba no paramétrica conocida como prueba de las medianas de Mood y en aquellos en los que no se tuvieron datos homocedásticos se realizó la prueba de Games-Howell como método *post hoc*. Todas estas pruebas fueron realizadas con los programas estadísticos Statgraphics XVI.I y Minitab 18.

Se empleó la variedad “*Wistar*” de ratas de la estirpe Wistar HsdHan:WIST, empleándose ratas macho y hembras recién destetadas con una masa corporal de entre 35-45 g, las cuales fueron adquiridas en el Centro UNAM-HARLAN de Producción de Animales de Laboratorio. Estos especímenes comieron y bebieron *ad libitum* sin restricciones de horario. Los 8 grupos en los cuales se distribuyeron aleatoriamente 10 machos y 10 hembras fueron los siguientes: Grupo control (agua potable), sacarosa 10%, glucosa 14%, fructosa 7%, acesulfamo de potasio o acesulfamo K 0.05%, mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo 1%, sucralosa 0.017% y sacarina 0.033%, considerando estas adiciones al agua

potable de acuerdo con las concentraciones que actualmente tienen las bebidas no alcohólicas que ingiere la población. Por instrucciones del personal del CICUAL, por primera vez en casi cuarenta años de realizar experimentación con animales modelo, en vez de utilizar cajas individuales los ejemplares de cada grupo de edulcorante y de cada género fueron colocados compartiendo la caja.

Todos los ejemplares consumieron la dieta balanceada Teklad Global 18S, la cual suministra todos los macro y micronutrientes necesarios para su correcto desarrollo. A partir del mes de septiembre de 2019 y hasta el mes de noviembre de 2019 se dio un cambio en el tipo de dieta ya que Envigo, la empresa que adquirió Harlan salió de México y el bioterio ya no pudo obtenerla. El suministro de la nueva dieta, 500I RodentDiet®, se dosificó en forma paulatina 100-0%, 75-25%, 50-50%, 25-75% y 0-100% con la dieta anterior. Esta transición se realizó en un lapso de 20 días (5 días de cada proporción sin considerar la primera)¹. A los 4 meses, 5 de los ejemplares de cada grupo, fueron colocados en ayuno de 12 horas, para posteriormente realizar una eutanasia de manera humanitaria y se recolectaron las muestras de sangre (plasma sanguíneo) para determinarse los parámetros bioquímicos: Glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, insulina, glucagón, etc. Así mismo, se realizó la disección del hígado y otros órganos de interés. Finalmente, al transcurrir 16 meses se procedió a realizar la segunda eutanasia de los 5 especímenes restantes de cada grupo para la recolección de las muestras de plasmas sanguíneos y la disección del hígado y otros órganos de interés.

Posterior a cada eutanasia, se realizó la obtención de un extracto crudo del tejido hepático y se realizó la cuantificación de proteínas de cada extracto hepático a través del método de Bradford.

3.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Los extractos crudos de hepatocitos se obtuvieron de la ruptura mecánica del tejido por medio de un homogeneizador de proteínas (Sigma-Aldrich, St. Louis, No. Cat. Z359971) en una solución amortiguadora de lisis denominada RIPA, la cual contiene TBS (solución que lleva

¹ Los primeros cinco días selectivamente los ejemplares prefirieron el alimento Teklad Global 18S®pero, en los siguientes 10 días, ya comieron ambos sin problema quedando en los últimos 5 días solamente con el alimento 500I Rodent Diet ®

Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, pH de 7.6), NP-40 1% (nonil-fenol-polietilenglicol éter), deoxicolato de sodio 0.5%, dodecilsulfato de sodio 0.1%, azida de sodio 0.006%, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 2 mM y una pastilla inhibidora de proteasas Complete mini® (Roche, Mannheim, No. Cat. 11836153001) por cada 10 mL de solución de lisis. Inmediatamente después el extracto hepático se sometió a una agitación en un equipo Vórtex Genie-2 a 3200 rpm (700 *x g*). Posteriormente fue centrifugado en una microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415, a 13,200 rpm (16,110 *x g*) durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se trasvasó a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se almacenaron a -20 °C para su uso posterior (Creative Diagnostic, 2018).

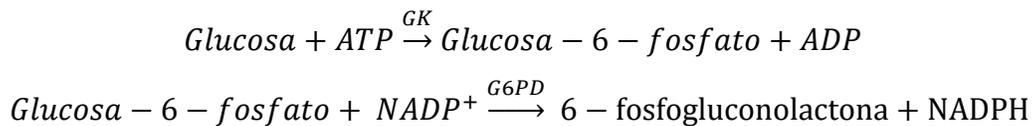
Después de la extracción de proteínas se realizó la cuantificación de estas empleando el método de Bradford. Para ello se elaboró una curva patrón de albúmina sérica bovina (*BSA*, por sus siglas en inglés), por triplicado, de 0.01 mg/mL a 0.1 mg/mL, obteniéndose una $r^2=0.9988$. Para la cuantificación de las muestras a cada tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se le añadieron 100 μ L de muestra y 1000 μ L de reactivo de Bradford (elaborado con 100 mg de azul de Coomassie disuelto en 50 mL de etanol al 96% y 100 mL de ácido fosfórico al 85% ajustados a 1 L de agua), registrándose la absorbancia a 595 nm. Las concentraciones de proteína de cada extracto se obtuvieron por interpolación en la curva estándar de *BSA* (Kruger, 2002).

3.2. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

3.2.1. Determinación de la actividad enzimática de la glucoquinasa (*GK*)

La actividad de la glucoquinasa fue determinada en los extractos de hepáticos por una adaptación (disminución del volumen de ensayo de 3 mL a 0.6 mL, el volumen de muestra de 100 μ L a 20 μ L y empleando celdas desechables de polimetilmetacrilato (PMMA) en lugar de celdas de cuarzo) de los métodos de Bergmeyer et al. (1983), Goward et al. (1986), Pilkis (1975) y Walker y Parry (1966). Para cada una de las muestras se realizó el seguimiento de la reacción al registrar la absorbancia cada 5 segundos durante 5 minutos a 340 nm. A partir de la curva de avance de reacción se calculó la pendiente de la recta tangente que equivale a la velocidad inicial de la reacción. El proceso anterior se realizó a cada uno de los 160 de extractos hepáticos por triplicado.

Principio: Este método se basa en un ensayo enzimático acoplado a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La glucoquinasa transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato es el sustrato para la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que genera 6-fosfogluconolactona con la consecuente reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada ($NADP^+$) a su forma reducida ($NADPH$). Los cambios en la absorbancia a 340 nm son proporcionales al cambio en la concentración de $NADP^+$, por cada mol de $NADP^+$ reducida se transformó 1 mol de glucosa a glucosa-6-fosfato por parte de la glucoquinasa. Las reacciones se muestran a continuación:



Condiciones del ensayo: pH=7.6, T=25°C

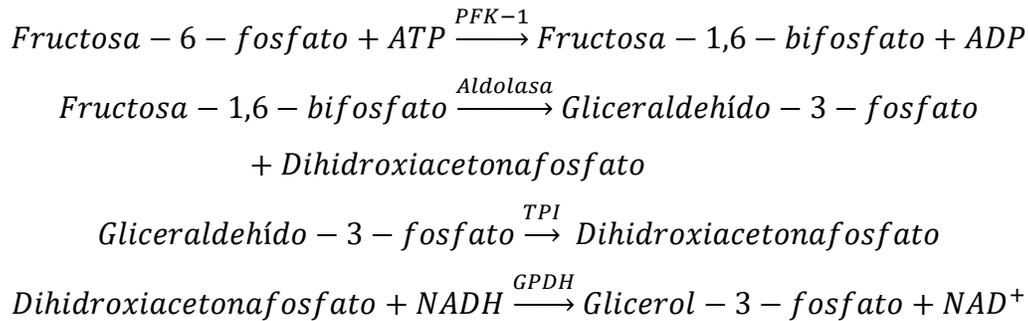
Concentraciones finales de la mezcla de reacción: 60 mM Tris, 20 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 12 mM de glucosa, 0.9 mM $NADP^+$ y 10 U/mL de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Volumen final 0.6 mL, volumen de muestra 20 μ L.

Procedimiento: Colocar 600 μ L de la mezcla de reacción en celdas desechables de polimetilmetacrilato (PMMA) de 850 μ L (Brand®), adicionar 20 μ L de muestra (extracto hepático) y registrar la absorbancia a 340 nm cada 3 s durante 3 min. Para cada muestra correr un blanco sustituyendo los 20 μ L de muestra por agua destilada.

3.2.2 Determinación de la actividad enzimática de la fosfofructoquinasa (*PFK-1*)

Fundamento: La fosfofructoquinasa cataliza el tercer paso de la glucólisis. La actividad de esta enzima es determinada por un ensayo enzimático acoplado a las enzimas aldolasa, triosa fosfato isomerasa y glicerolfosfato deshidrogenasa. Se cuantifican los cambios en la oxidación del NADH a NAD^+ a 340 nm (Hofmann y Kopperschläger, 1982; Kemp, 1975).

Las reacciones se muestran a continuación:



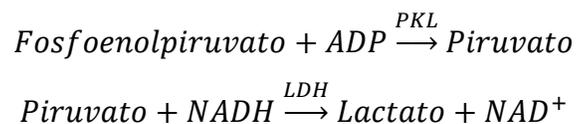
Condiciones de ensayo: pH=8, T=25°C

Concentraciones finales de la mezcla de reacción: 25 mM de glicilglicina, 25 mM β-glicerodifosfato de sodio, 6 mM MgCl₂, 1 mM fructosa-6-fosfato, 1 mM ATP, 0.25 mM NADH, 0.1 mM ditiotreitól, 0.6 U/mL de aldolasa, 0.3 U/mL de triosafofosfato isomerasa (TPI) y 0.3 U/mL de glicerofosfato deshidrogenasa (GPDH). Volumen final 0.6 mL, volumen de muestra 20μL.

Procedimiento: Colocar 600 μL de la mezcla de reacción en celdas desechables de polimetilmetacrilato (PMMA) de 850 μL (Brand®), adicionar 20 μL de muestra (extracto hepático) y registrar la absorbancia a 340 nm cada 3 s durante 3 min. Para cada muestra correr un blanco sustituyendo los 20 μL de muestra por agua destilada.

3.2.3. Determinación de la piruvatoquinasa hepática (PKL)

Fundamento: La actividad de la piruvatoquinasa se determina mediante un ensayo acoplado a la lactato deshidrogenasa (LDH) por el decrecimiento en la absorbancia a 340 nm resultado de la oxidación de la NADH a NAD⁺ (Cardenas y Dyson, 1973). Las reacciones se muestran a continuación:



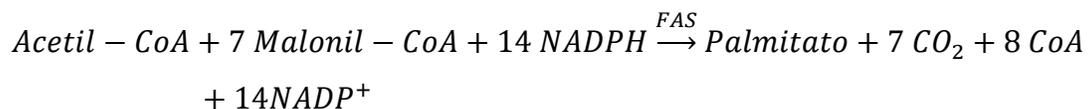
Condiciones de ensayo: pH=7.6, T=25°C

Concentraciones finales de la mezcla de reacción: 45 mM imidazol-HCl, 108 mM KCl, 5.6 mM MgSO₄, 1.5 mM ADP, 0.22 mM NADH, 1.5 mM fosfoenolpiruvato y 1 U/mL de LDH. Volumen final 0.6 mL, volumen de muestra 2μL.

Procedimiento: Colocar 600 μL de la mezcla de reacción en celdas desechables de polimetilmetacrilato (PMMA) de 850 μL (Brand®), adicionar 2 μL de muestra (extracto hepático) y registrar la absorbancia a 340 nm cada 1 s durante 5 min. Para cada muestra correr un blanco sustituyendo los 2 μL de muestra por agua destilada.

3.2.4. Determinación de la actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*)

Fundamento: Una alternativa idónea para la determinación de la actividad de *FAS* son los métodos espectroscópicos. Estos métodos cuantifican las tasas de cambio de la acetil-CoA y malonil-CoA dependientes de la oxidación del NADPH que presenta cambios en la absorbancia a 340 nm (Nepokroeff et al., 1975). Las reacciones se muestran a continuación:



Condiciones de ensayo: pH=7, T=25°C

Concentraciones finales de la mezcla de reacción: 210 mM de KH₂PO₄, 290 mM de K₂HPO₄, 33 μM de acetil-Coenzima A, 100 μM de malonil-CoA, 100 μM de NADPH, 1 mM de β-mercaptoetanol. Esta mezcla de reacción se debe utilizar recién preparada. Volumen final 0.6 mL, volumen de muestra 2μL.

Procedimiento: Colocar 600 μL de la mezcla de reacción en celdas desechables de polimetilmetacrilato (PMMA) de 850 μL (Brand®), adicionar 2 μL de muestra (extracto hepático) y registrar la absorbancia a 340 nm cada 1s durante 5 min. Para cada muestra correr un blanco sustituyendo los 2 μL de muestra por agua destilada. Corregir la tasa de oxidación del NADPH corriendo un ensayo con muestra, pero en ausencia de malonil-CoA.

Los 4 ensayos enzimáticos descritos anteriormente emplean la **Ecuación 1** para determinar la actividad enzimática que se basa en la cuantificación de NADPH o NADH mediante su coeficiente de extinción molar.

$$\frac{U}{mL} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{340nm} \text{ muestra}}{\text{min}} - \frac{\Delta A_{340nm} \text{ blanco}}{\text{min}}\right)(V_t)Fd}{(6.22)(V_m)} \quad (1)$$

donde:

U = unidad de actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto en las condiciones de pH y T de cada ensayo

V_m = Volumen de muestra en mL

V_t = volumen total del ensayo

Fd = factor de dilución de la muestra

6.22 mM⁻¹ cm⁻¹ = coeficiente de extinción milimolar del NAD(P)H a 340 nm

El ensayo para determinar la actividad de la acetil coenzima A carboxilasa, a diferencia de los otros 4 ensayos, no se basa en los cambios de la absorbancia del NADH. A continuación, se describirá brevemente su fundamento.

3.2.5. Determinación de la actividad enzimática de la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC)

Fundamento: La acetil coenzima A carboxilasa cataliza la reacción de acetil-CoA a Malonil-CoA. La reacción de la acetil coenzima A carboxilasa se acopla a la reacción de la citrato sintasa. La citrato sintasa genera citrato y coenzima A a partir del oxaloacetato y acetil-CoA, Se cuantifica el cambio de la absorbancia a 412 nm del ácido ditionitrobenzoico, el cual reacciona con la coenzima A (Santoro et al., 2006; Willis et al., 2008). Las reacciones se muestran en la Figura 3.1.

Condiciones finales de la mezcla de reacción 1 (primera reacción): 94mM K₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄, 15 mM KHCO₃, 5mM MgCl₂, 5mM ATP, 1 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA), 1mM acetil-CoA y 3mg/L biotina. Volumen final 0.25 mL, volumen de muestra 12.5 μL. pH=8.0, T=25 °C.

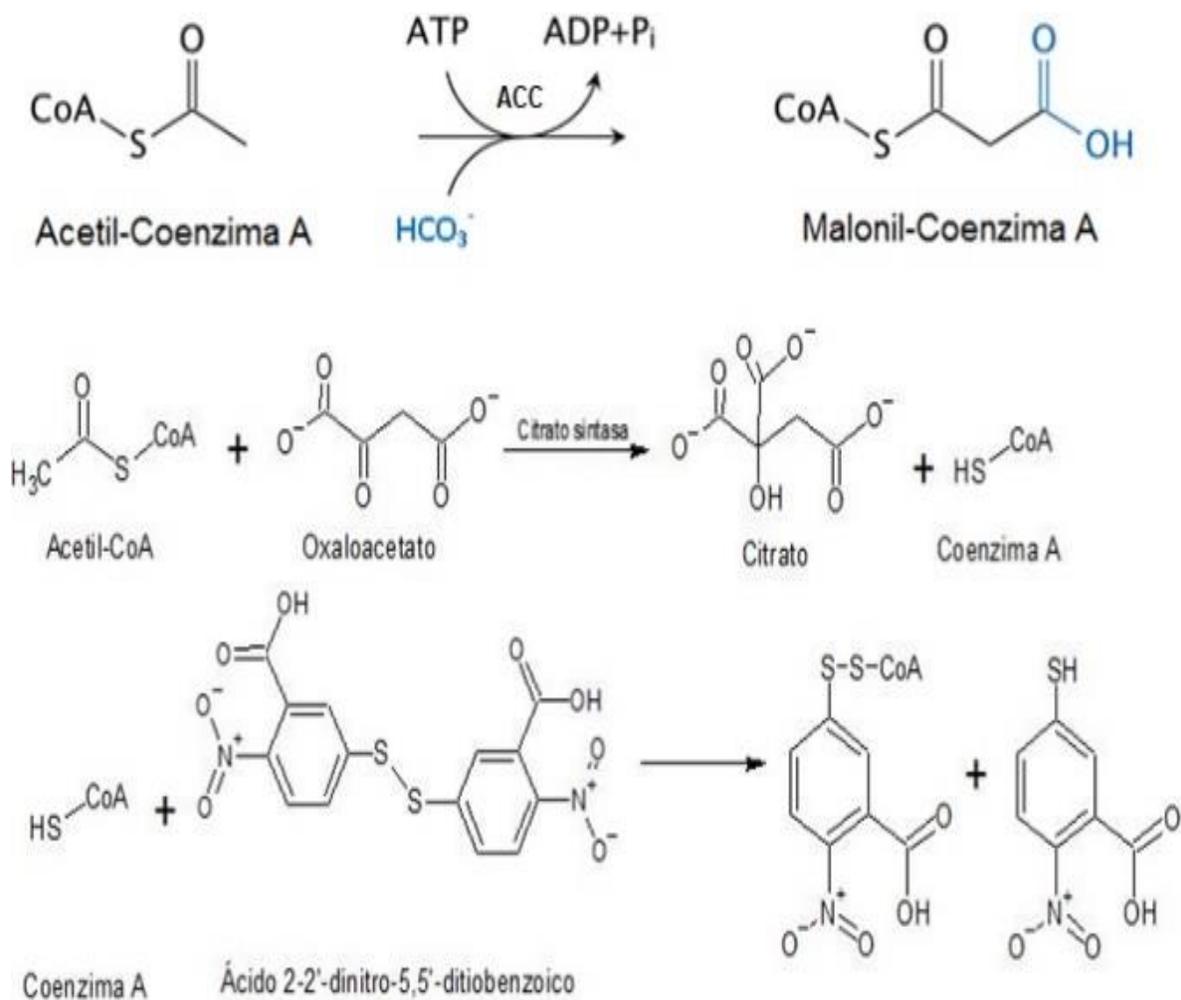


Figura 3.1. Reacciones para la determinación de la actividad enzimática de la acetil coenzima A carboxilasa

Condiciones finales de la mezcla de reacción 2 (segunda reacción): 94mM K_2HPO_4 , 6 mM KH_2PO_4 , 0.1mg/mL ácido ditiobi(nitrobenzoico) (DTNB), 1 mg/mL albúmina sérica bovina (BSA), 20 mM de oxalacetato, 0.5U/mL de citrato sintasa. Volumen final 0.25 mL, volumen de muestra 12.5 μL . pH=8.0, T=25°C.

Procedimiento: Colocar 250 μL de la mezcla de reacción 1 y adicionar 12.5 μL de la muestra. Tomar 50 μL de la mezcla anterior a los 0 min y a 1 min y transferirlos a tubos de microcentrífuga que contenga 5 μL de ácido tricloroacético para detener la primera reacción. Centrifugar a 13,200 rpm (16,110 $\times g$) durante 15 minutos a 4°C. Transferir 50 μL de sobrenadante a celdas espectrofotométricas desechables de PMMA que contienen previamente 250 μL de la mezcla de reacción 2. Leer la absorbancia a 412 nm (5 minutos) e

interpolarse en una curva patrón de acetil-CoA (0.1-2 mM) para determinar la cantidad de acetil-CoA remanente.

Para determinar la actividad específica, en todos los ensayos, se emplea la **Ecuación 2**:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{mg \text{ proteína}}{mL}} \quad (2)$$

La concentración de acetil coenzima A se determinó empleando el coeficiente de extinción molar del ácido ditionitrobenzoico. Para cada muestra se calculó la cantidad de acetil coenzima A inicial, así como la remanente después de 5 minutos de reacción. Con esta información y la concentración de proteínas en cada extracto se calculó la razón de $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ para cada muestra. A continuación, se ilustra el proceso mediante un ejemplo de cálculo.

Ejemplo de cálculo de la determinación de la actividad de la ACC

t=0 min, A=0.064, b=1 cm

$$\varepsilon = 1.415 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$c = \frac{A}{b\varepsilon}$$

Donde A= abs 412nm

b= paso óptico 1cm

ε =coeficiente de extinción del DTNB $1.415 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$c = \frac{0.064}{1.415 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (1 \text{ cm})} = 4.52 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\frac{4.52 \mu\text{mol}}{1000 \text{ mL}} \times (0.5 \text{ mL}) = 2.26 \times 10^{-3} \mu\text{mol Acetil - CoA}$$

t=5 min

$$c = \frac{0.017}{1.415 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} (1 \text{ cm})} = 1.20 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\frac{1.2 \mu\text{mol}}{1000 \text{ mL}} \times (0.5 \text{ mL}) = 6 \times 10^{-4} \mu\text{mol Acetil - CoA}$$

$$\frac{\Delta \mu\text{mol}}{\text{min}} = \frac{(2.26 \times 10^{-3} - 6 \times 10^{-4}) \mu\text{mol Acetil - CoA}}{5 \text{ min}} = \frac{1.66 \times 10^{-3} \mu\text{mol}}{\text{min}}$$

$$\frac{\frac{1.66 \times 10^{-3} \mu\text{mol}}{\text{min}}}{1.75 \times 10^{-3} \text{mL}} = \frac{0.95 \text{ U}}{\text{mL}}$$

$$\frac{0.95 \text{ U/mL}}{25.4 \text{ mg/mL}} = 0.037 \text{ U/mg}$$

3.3. EFECTOS DE LA INGESTIÓN DE EDULCORANTES SOBRE LA MASA CORPORAL

3.3.1. Tejido retroperitoneal

El tejido adiposo retroperitoneal se ubica a lo largo del borde dorsal de los intestinos y la superficie ventral de los riñones. El tejido adiposo retroperitoneal de cada uno de los especímenes fue extirpado posterior a la eutanasia de los roedores. Esta operación fue realizada por personal especializado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El tejido adiposo retroperitoneal tanto izquierdo como derecho fue pesado en una balanza electrónica marca Ohaus® modelo Scout pro. Se registró en una base de datos la masa de tejido adiposo retroperitoneal de cada uno de los especímenes.

3.3.2. Ganancia de masa corporal

El registro del aumento de masa corporal se realizó diariamente a la misma hora. El pesaje de los especímenes se realizó empleando una balanza electrónica Ohaus® modelo Scout pro. Los datos eran anotados en una libreta de bitácora física y posteriormente eran transcritos a una base electrónica. Diariamente se verificaba que no existieran pérdidas significativas de masa de los especímenes. En caso de existir una pérdida considerable de masa el espécimen era apartado del resto de las ratas de la caja hasta que recuperase masa. A los 160 días y 480 días se realizó un análisis estadístico de la ganancia de masa de los grupos.

3.4. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, ALIMENTO, BEBIDA Y ENERGÍA INGERIDOS

3.4.1. Velocidad de crecimiento

La velocidad de crecimiento fue determinada mediante la pendiente de la curva de crecimiento durante los primeros 40 días de experimentación y fue expresada como g/día. Indica el crecimiento promedio en gramos por cada día de la etapa de crecimiento

exponencial. De acuerdo con Sengupta (2014) las ratas se convierten en jóvenes adultas a los 63 días de edad; recordando que las ratas tenían aproximadamente 21 días al momento del destete y se tuvieron 3 días en acondicionamiento a la alimentación sólida, al llegar a los 40 días de experimentación tenían una edad aproximada de 64 días.

3.4.2. Alimento ingerido

El acceso al alimento se realizó de manera *ad libitum*. Diariamente a la misma hora era pesada y colocada una cantidad conocida de alimento en cada uno de los comederos de las ratas. Posteriormente, al día siguiente (24 horas después) se pesaba el alimento remanente en el comedero antes de colocar una nueva cantidad conocida de alimento. La ingesta diaria de alimento fue calculada por la sustracción de la cantidad remanente de alimento a la cantidad colocada 24 horas antes. El pesaje del alimento se realizó empleando una balanza electrónica Ohaus® modelo Scout pro. Los datos diariamente se registraron en una bitácora física y en una base de datos electrónica.

3.4.3. Bebida ingerida

Las bebidas se suministraron sin restricción de tiempo. Las bebidas se reponían diariamente con soluciones recién preparadas en bebederos limpios. La ingesta de bebida se determinó cada 24 h restando la cantidad remanente en el bebedero de la cantidad diaria suministrada (250 mL). Diariamente se realizaba el registro en la libreta de bitácora física, así como en una base de datos electrónica.

3.4.4 Energía ingerida teórica

La ingesta energética teórica se determinó mediante la suma de la energía de los alimentos más la energía de la bebida. La contribución energética de la dieta Teklad Global 2018S © fue de 13 kJ/g y la de LabRodent Diet 5001 © fue de 14 kJ/g. El aporte energético de las bebidas nutritivas (glucosa, fructosa y sacarosa) fue de 1.16 kJ/mL para la bebida con fructosa, 2.34 kJ/mL para la bebida con glucosa y 1.67 kJ/mL para la bebida con sacarosa. Para la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo, el aporte energético de las bebidas

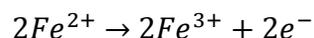
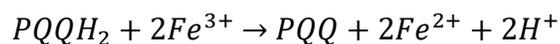
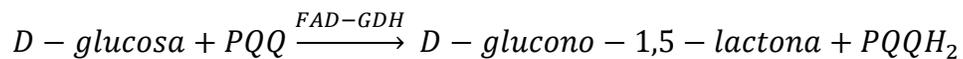
fue de 0.256 kJ / mL. Para el resto de los edulcorantes no nutritivos, su aporte energético se consideró insignificante.

3.5. Determinación de glucosa y triglicéridos

3.5.1 Determinación de glucosa *in vivo*

Las mediciones de glucosa se realizaron con la ayuda del glucómetro de la marca Bayer® modelo Contour® TS el cual proporciona una medición cuantitativa de la glucosa en sangre desde 10 a 600 mg/dL mediante tiras reactivas que involucran la reacción catalizada por la glucosa deshidrogenasa dependiente de *FAD* (*flavin adenin dinucleotide*) (*FAD-GDH*), la pirroloquinolina quinona (PQQ) y el ferrocianuro de potasio. La medición de glucosa en sangre con CONTOUR® TS se realiza con base en la medición de la corriente eléctrica provocada por la reacción de la glucosa ante los reactivos sobre el electrodo de la tira reactiva. La muestra de sangre es absorbida en la punta de la tira reactiva mediante acción capilar. La glucosa en la muestra reacciona con la *FAD-GDH* y el ferrocianuro de potasio lo cual hace que se generen electrones produciéndose una corriente eléctrica, la cual es proporcional a la glucosa existente en la muestra (Ascensia, 2017).

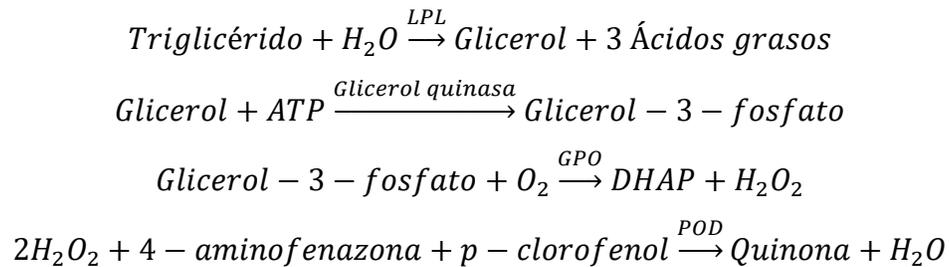
Las reacciones en la tira son:



3.5.2. Determinación de triglicéridos *in vivo*

Las mediciones de triglicéridos se realizaron con la ayuda del medidor multiparamétrico Accutrend® Plus de la marca Roche® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), el cual proporciona una medición cuantitativa de los triglicéridos en sangre desde 70 a 600 mg/dL mediante tiras reactivas. Este equipo se basa en la espectrofotometría de reflectancia. Cada tira reactiva consta de una zona de prueba que contiene una mezcla de 0.15 U de LPL (lipoproteinlipasa); 0.36 U de *GK* (glicerol quinasa); 0.08 U de *GPO* (glicerol fosfato oxidasa); 0.63 U de *POD* (peroxidasa); 12 µg de *ATP* y 27 µg de 4-aminofenazona y 27 µg de p-clorofenol (Roche, 2014). Los resultados de las pruebas se basan la medición de la luz

reflejada (reflectancia) en la tira reactiva que ha cambiado de color después de que se le ha aplicado sangre y esta ha reaccionado con la serie de enzimas presentes en la zona de prueba de la tira reactiva. Cuanto más oscura es la coloración, mayor será el nivel de triglicéridos. La reflectancia de la tira es medida a 660 nm y se convierte a concentración mediante un algoritmo (Scafoglieri et al., 2012). Las reacciones que ocurren en la tira reactiva son las siguientes:



3.5.3. Determinación de las hormonas por fluoroinmunoensayos

La determinación de las hormonas insulina, glucagón, leptina, grelina y *GIP* se realizó a través de un fluoroinmunoensayo por inmunoadsorción con tecnología Luminex®. La tecnología Luminex® funciona de la siguiente forma: La muestra se agrega a una mezcla de microesferas codificadas por colores (longitud de onda), prerrevestidas con anticuerpos de captura específicos para cada analito. Los anticuerpos que recubren las microesferas se unen a los analitos de interés presentes en las muestras de plasma sanguíneo. Se añaden anticuerpos de detección biotinilados específicos para los analitos de interés. Se añade estreptavidina conjugada con ficoeritrina (*PE*). La estreptavidina conjugada con ficoeritrina se une a los anticuerpos de detección biotinilados. Un imán en el analizador MAGPIX® captura y mantiene las microesferas magnéticas en una monocapa, mientras que dos diodos emisores de luz (*LED*) espectralmente distintos iluminan las microesferas. Un *LED* (621nm) identifica el analito que se está detectando y el segundo *LED* (511 nm) determina la magnitud de la señal derivada de la ficoeritrina, que es directamente proporcional a la cantidad de analito unido (EMD Millipore, 2018).

Para esta determinación se empleó el Milliplex Map Kit ® de la marca Merck® número de catálogo RMHMAG-84K-05. Para la lectura de los resultados se utilizó el equipo MAGPIX® con el software xPONET. Para la descripción detallada de esta metodología consultar el Anexo A.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. NIVELES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

4.1.1. Glucoquinasa (GK)

Para cada una de las muestras se realizó el seguimiento de la reacción al registrar la absorbancia a 340 nm. A partir de la curva de avance de reacción se calculó la pendiente de la recta en la parte lineal lo que equivale a la velocidad inicial de la reacción. En las Figuras 4.0 A y 4.0 B se muestra un ejemplo de curva de avance de reacción y de determinación de la velocidad inicial. El proceso anterior se realizó a cada uno de los 160 de extractos hepáticos por triplicado.

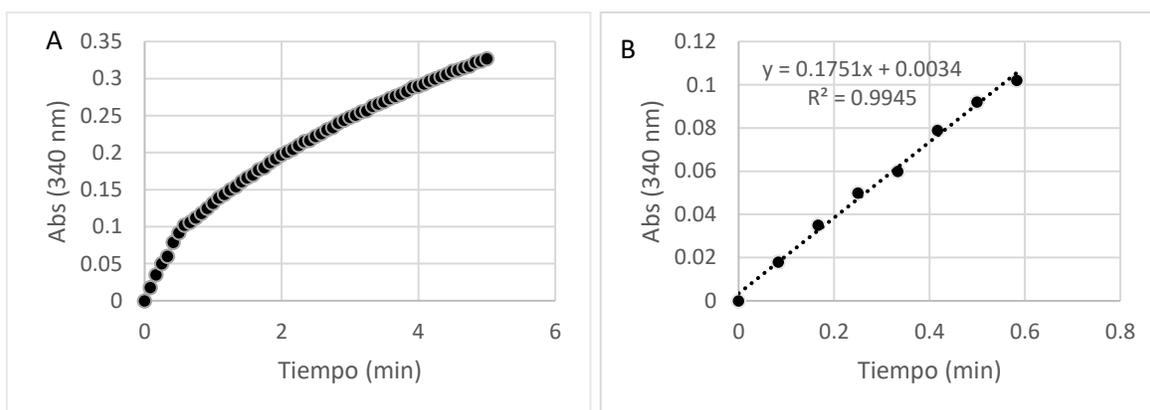


Figura 4.0. (A) Curva de avance de reacción de la glucoquinasa. Muestra M30. (B) Aumento de la curva de avance de reacción para determinación de la velocidad inicial de reacción

En la Tabla 4.1 se muestran las medias de la actividad enzimática específica (mU/mg) y la desviación estándar de cada uno de los grupos de edulcorantes. La Tabla 4.1 corresponde a las muestras provenientes de las ratas macho y la Tabla 4.2 los de las ratas hembra.

Tabla 4.1. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas macho

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)	Grupos homogéneos
Fructosa	29.0 \pm 4.6	A
Glucosa	28.7 \pm 7.3	AB
Sacarosa	23.7 \pm 3.9	ABC
Sacarina	18.7 \pm 3.6	BC
Acesulfamo	18.3 \pm 2.8	BC
Mezcla ace:asp	18.1 \pm 4.7	BC
Control	15.1 \pm 5.6	C
Sucralosa	13.7 \pm 5.7	C

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

El grupo control de las ratas macho presentó una media de actividad específica de 15.1 ± 5.6 mU/mg, lo cual concuerda con lo reportado por Walker y Perry (1966), quienes determinaron que un “pool” (mezcla en la que cada una de las muestras aporta la misma cantidad de proteínas) de extractos de tejido hepático de 10 ratas macho de la estirpe Wistar de 120 g de masa corporal tuvo una actividad de 10 mU/mg.

En las ratas macho, el valor p del análisis de varianza fue menor a 0.05 por lo que sí existieron diferencias significativas. La prueba de Duncan indicó que únicamente los grupos de glucosa y fructosa tuvieron niveles significativamente mayores con respecto del control. En el caso de las ratas hembra el valor p del ANDEVA también fue menor a 0.05, por lo que sí existieron diferencias significativas. En contraste con los especímenes macho, en las ratas hembra únicamente los grupos que bebieron sacarosa y glucosa tuvieron niveles medios de actividad de la glucoquinasa en los extractos hepáticos significativamente mayores que el grupo control.

Tabla 4.2. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas hembra

Edulcorante	Actividad específica (mU/mg \pm DE)	Grupos homogéneos
Sacarosa	36.0 ± 7.6	A
Glucosa	34.0 ± 3.9	A
Acesulfamo	31.0 ± 4.2	AB
Mezcla ace:asp	27.5 ± 7.2	AB
Fructosa	26.0 ± 6.4	AB
Sacarina	25.7 ± 4.8	B
Control	23.4 ± 5.7	B
Sucralosa	22.5 ± 6.2	B

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Los niveles de actividad específica correspondientes a los extractos hepáticos de la segunda eutanasia (480 días) se muestran en la Tabla 4.3, los datos corresponden tanto a las ratas macho como a las ratas hembra. El valor p obtenido del análisis de varianza para las ratas macho fue de 0.0128, por lo tanto, existieron diferencias significativas intergrupales en los niveles de actividad de la glucoquinasa. Los resultados de la prueba de rangos múltiples por el método de Duncan indicaron que únicamente el grupo que ingirió glucosa tuvo niveles significativamente mayores que el control. El grupo control tuvo en promedio 68.7 ± 13.8 mU/mg contra 228.1 ± 81.3 mU/mg del grupo que bebió glucosa. Cabe destacar que los grupos de edulcorantes nutritivos, sacarosa y fructosa, tuvieron niveles elevados de

glucoquinasa; no obstante, no lograron ser significativamente superiores a los niveles del control.

Asimismo, en las ratas hembra existieron diferencias significativas intergrupales ($p=0.004$) en los niveles de actividad de la glucoquinasa. Para el caso de las hembras, en contraste con los machos, el único grupo que tuvo niveles significativamente más altos que el control (27.8 ± 11.4 mU/mg) fue el grupo que bebió sucralosa (60.0 ± 9.1 mU/mg).

Tabla 4.3. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa para las ratas macho y hembra a los 480 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	90.9 \pm 17.6	a	23.2 \pm 7.8	A
Control	68.7 \pm 13.8	a	27.8 \pm 11.4	AB
Fructosa	154.3 \pm 55.6	ab	32.7 \pm 13.2	AB
Glucosa	228.1 \pm 81.3	b	44.5 \pm 7.0	BC
Mezcla ace:asp	84.1 \pm 27.1	a	44.5 \pm 13.2	BC
Sacarina	55.9 \pm 22.1	a	25.1 \pm 7.6	A
Sacarosa	124.4 \pm 68.3	a	36.0 \pm 12.1	AB
Sucralosa	98.3 \pm 27.7	a	60.0 \pm 9.1	C

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

De acuerdo con el análisis de varianza de dos vías (Tabla 4.4) se aprecia que el género también resultó ser un factor significativo ($p=0.0001$). Las ratas hembra tuvieron en general un nivel de actividad específica promedio (36.7 ± 8.8 mU/mg) menor al observado en los machos (113.1 ± 8.5 mU/mg). Adicionalmente el análisis de varianza de dos vías muestra que la interacción entre los factores edulcorante y género resultó ser significativa $p=0.027$. Lo anterior significa que los grupos de ratas macho y hembras no siguieron la misma tendencia. Lo anterior se aprecia en la Tabla 3.3; en las ratas macho el grupo con los mayores niveles de actividad fue el grupo que bebió glucosa, en contraste en las ratas hembra fue el grupo de sucralosa.

Tabla 4.4. Análisis de varianza de dos vías para los niveles medios de actividad enzimática de la glucoquinasa de las muestras de la segunda eutanasia

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Edulcorante	68494.1	7	9784.8	3.17	0.0059
B: Género	120451.0	1	120451.0	39.04	0.0000
Interacciones					
AB	52832.4	7	7547.4	2.45	0.0270
Residuos	206733.0	67	3085.5		
Total (corregido)	469278.0	82			

Gl: Grados de libertad

4.1.2. Fosfofructoquinasa 1 (PFK)

En la Tabla 4.5 se muestran las medias de la actividad enzimática específica de los extractos hepáticos provenientes de las ratas de la primera eutanasia (día 160). Los análisis de varianza indicaron que tanto en las ratas macho como en las ratas hembra existieron diferencias significativas ($p < 0.05$).

En el caso de las ratas macho los extractos hepáticos del grupo control tuvieron niveles de actividad de 16.6 ± 6.4 mU/mg. Estos niveles se encuentran dentro de los valores reportados por la literatura los cuales para extractos crudos hepáticos de ratas macho oscilan entre 6 a 20 mU/mg (Dunaway y Weber, 1974; Lelevich et al., 2013; Reinhart y Lardy, 1980).

La prueba de Duncan indicó la existencia de 3 grupos homogéneos en las ratas macho designándolos con las letras a, b, c. Los únicos grupos cuyos extractos hepáticos tuvieron niveles de actividad enzimática significativamente superiores al control (16.6 ± 6.4 mU/mg) fueron los grupos que ingirieron sacarosa (53.7 ± 15.5 mU/mg) y fructosa (96.4 ± 22.1 mU/mg). En contraste, en las ratas hembra únicamente el grupo de glucosa (68.9 ± 18.3 mU/mg) presentó niveles significativamente superiores al control (19.0 ± 9.2 mU/mg).

Tabla 4.5. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la fosfofructoquinasa para las ratas macho y hembra a los 160 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	34.0 ± 16.4	ab	32.8 ± 11.5	AB
Control	16.6 ± 6.4	a	19.0 ± 9.2	A
Fructosa	96.4 ± 22.1	c	48.9 ± 11.7	AB
Glucosa	35.4 ± 10.4	ab	68.9 ± 18.3	B
Mezcla ace:asp	22.6 ± 6.0	a	21.3 ± 6.6	A
Sacarina	26.0 ± 5.4	ab	35.4 ± 11.1	AB
Sacarosa	53.7 ± 15.5	b	36.0 ± 11.7	AB
Sucralosa	18.8 ± 5.9	a	18.6 ± 6.4	A

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

A largo plazo, muchas de las enzimas que se encuentran involucradas en la lipogénesis y glucólisis son reguladas de forma transcripcional. Los factores de transcripción *SREBP* y *ChREBP* inducen la expresión de genes glucolíticos y lipogénicos. Entre los genes estimulados por estos factores de transcripción se encuentra el de la fosfofructoquinasa (López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014). Asimismo, se sabe que los glúcidos simples como la glucosa, fructosa y sacarosa estimulan la expresión de los genes de *SREBP-1c* y *ChREBP*.

En la Tabla 4.6 se muestran los niveles de actividad enzimática de los extractos hepáticos provenientes de las ratas de la segunda eutanasia (480 días). Los análisis de varianza indican que hubieron diferencias estadísticamente significativas, tanto en las ratas macho como en las ratas hembra. En el caso de las ratas macho se observa que en los extractos hepáticos provenientes de los grupos que ingirieron sacarina, sacarosa y glucosa tuvieron niveles de actividad específica significativamente superiores al control. Nuevamente, se tienen dos grupos de hidratos de carbono simples cuyo consumo aumentó la cantidad de *PFK-1* presente en los extractos hepáticos. En el caso de la sacarina es novedoso ya que no hay reportes que relacionen el consumo de este edulcorante con un incremento en la actividad de la *PFK-1*, por lo que los mecanismos involucrados en este incremento deberán indagarse en futuras investigaciones.

En el caso de las ratas hembra únicamente los grupos de sacarosa (143.6 ± 65.4 mU/mg) y sacarina (193.9 ± 59.9 mU/mg) tuvieron niveles de actividad específica significativamente superiores al control (54.5 ± 15.2 mU/mg). Los mecanismos por los cuales la sacarina provoque este incremento en la cantidad de *PFK-1* en el hígado tampoco están elucidados. Pero se puede plantear la hipótesis de que posiblemente esté relacionado con una estimulación de los factores de transcripción *SREBP*; *ChREBP* y *LXR* (Receptor X hepático). En investigaciones previas mediante *Western Blot* se demostró que el consumo crónico de sacarina incrementaba la expresión tanto de *SREBP-1* y de *ChREBP* en el hígado de ratas macho y hembra (Mendoza-Pérez, 2017).

Tabla 4.6. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la fosfofructoquinasa para las ratas macho y hembra a los 480 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	38.7 ± 7.6	a	41.2 ± 11.9	A
Control	49.4 ± 16.5	a	54.5 ± 15.2	A
Fructosa	44.1 ± 12.4	a	46.9 ± 19.2	A
Glucosa	136.4 ± 67.8	c	64.9 ± 15.6	AB
Mezcla ace:asp	42.7 ± 14.4	a	32.7 ± 14.5	A
Sacarina	94.6 ± 27.2	bc	193.9 ± 59.9	C
Sacarosa	126.8 ± 49.1	bc	143.6 ± 65.4	BC
Sucralosa	50.3 ± 11.9	ab	35.0 ± 11.5	A

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

4.1.3. Piruvato quinasa (PKL)

En la Tabla 4.7 se muestran las medias de la actividad específica de la enzima piruvato quinasa en los extractos hepáticos provenientes de las ratas macho y hembra de la primera eutanasia. Los análisis de varianza indicaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), tanto en las ratas macho como en las ratas hembra.

En las ratas macho los extractos crudos hepáticos del grupo control tuvieron niveles de actividad de 1.3 ± 0.6 U/mg. Estos niveles concuerdan con lo reportado por Tanaka et al. (1967). Ellos reportan que en extractos hepáticos de ratas macho alimentadas se tenían niveles de 1.61 ± 0.17 U/mg. Asimismo, Tanaka et al. (1967) reportaron que los extractos hepáticos de ratas con ayuno de 48 h tenían niveles de actividad de 0.99 ± 0.05 U/mg. Los especímenes de la presente investigación fueron sometidas a un ayuno de 12 h, por lo que los niveles de actividad deberían estar entre el intervalo de 0.99 – 1.61 U/mg lo cual, como se menciona previamente, ocurrió.

Al observar la Tabla 3.7 se aprecia que, de acuerdo con la prueba de Duncan, únicamente existieron 2 grupos homogéneos codificados por las letras a, b. El único grupo que tuvo niveles significativamente mayores que el control (1.3 ± 0.6 U/mg) fue el grupo de ratas macho que ingirió sacarosa (3.9 ± 1.5 U/mg).

Tabla 4.7. Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la piruvato quinasa para las ratas macho y hembra a los 160 días

Grupo	Actividad específica (U/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	2.6 ± 1.1	ab	2.2 ± 1.2	ABC
Control	1.3 ± 0.6	a	1.5 ± 0.6	A
Fructosa	2.9 ± 1.0	ab	3.0 ± 0.9	BC
Glucosa	2.7 ± 1.4	ab	3.4 ± 0.7	C
Mezcla ace:asp	1.7 ± 0.2	a	1.6 ± 0.8	A
Sacarina	1.9 ± 0.8	a	1.8 ± 0.7	AB
Sacarosa	3.9 ± 1.5	b	3.1 ± 1.3	BC
Sucralosa	1.9 ± 0.9	a	1.9 ± 0.5	AB

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Para las ratas hembra, los datos de la Tabla 4.7 muestran la existencia de 3 grupos homogéneos designados por las letras A, B y C. El grupo con la menor actividad de la fosfofructoquinasa 1 en sus extractos fue el grupo control 1.5 ± 0.6 U/mg. La prueba *t de*

student no encontró diferencias significativas entre los niveles observados de las ratas macho y los reportados en las ratas hembra ($p>0.05$). En las ratas hembra, tanto los grupos que ingirieron glucosa como sacarosa presentaron los mayores niveles de actividad y fueron los únicos que difirieron de forma significativa en relación con el control. Como se ha mencionado previamente reportes anteriores indican que los glúcidos simples son estimulantes de los factores de transcripción *SREBP* y *ChREBP* (Elkatry, 2011; Mendoza-Pérez, 2017). Estos factores están involucrados en el control transcripcional de varias enzimas glucolíticas y lipogénicas. Entre las enzimas cuya transcripción es regulada y estimulada por *SREBP-1*, *ChREBP* y otros factores de transcripción se encuentra la fosfofructoquinasa 1.

En la Tabla 4.8 se muestran los promedios de actividad enzimática de cada uno de los grupos de especímenes macho y hembra de la segunda eutanasia (480 días). Asimismo, se muestran los resultados de las comparaciones múltiples de las medias mediante la prueba de Duncan. En el caso de las ratas macho la prueba de Duncan indicó la existencia de 4 grupos homogéneos codificados bajo las letras a, b, c y d. Del análisis de los grupos homogéneos se desprende que solamente los grupos de sacarina, fructosa, la mezcla comercial de aspartame con acesulfame de K y sacarosa tuvieron niveles de actividad enzimática significativamente superiores al control.

Tabla 4.8. Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la piruvato quinasa hepática (PKL) para las ratas macho y hembra a los 480 días

Grupo	Actividad específica (U/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	0.5 \pm 0.3	a	0.9 \pm 0.3	A
Control	0.9 \pm 0.3	ab	1.3 \pm 0.6	A
Fructosa	2.2 \pm 0.6	c	3.3 \pm 1.7	BC
Glucosa	2.1 \pm 0.9	bc	1.6 \pm 0.6	AB
Mezcla ace:asp	2.7 \pm 0.5	c	0.9 \pm 0.4	A
Sacarina	2.6 \pm 0.4	c	1.7 \pm 0.4	AB
Sacarosa	3.4 \pm 1.3	cd	3.4 \pm 2.2	C
Sucralosa	1.3 \pm 0.4	b	1.0 \pm 0.6	A

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Los mecanismos mediante los cuales la sacarina provoca aumentos en la actividad de esta enzima no están aún elucidados, pero se ha observado en forma consistente que, en varias etapas, en ambos géneros y en varios parámetros bioquímicos, la sacarina ocasiona cambios metabólicos, tal vez no hasta niveles patológicos pero estos cambios deben ser tomados en

consideración. Las ratas están alimentadas con dietas balanceadas y es posible que la sacarina pueda tener un efecto sinérgico cuando se consume con dietas que contengan menos grasa y más hidratos de carbono simples (Mendoza-Pérez, 2017).

En el caso de las ratas hembra la comparación de medias por el método de Duncan indicó la existencia de tres grupos homogéneos designados por las letras A, B y C. Al analizar los grupos homogéneos se concluye que solamente los grupos de ratas que ingirieron fructosa y sacarosa difirieron significativamente del control.

4.1.4. Ácido graso sintasa (*FAS*)

En la Tabla 4.9 se muestran los niveles de actividad de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) de las muestras de las ratas macho y hembra de la primera eutanasia. Asimismo, se muestran las designaciones de los grupos homogéneos como resultado de la prueba de intervalos múltiples por el método de Duncan con un 95% de confianza.

Tabla 4.9. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) para las ratas macho y hembra a los 160 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg ± DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	9.6 ± 6.6	a	15.6 ± 7.8	A
Control	7.4 ± 4.5	a	11.1 ± 3.9	A
Fructosa	22.4 ± 8.8	ab	57.3 ± 20.4	BC
Glucosa	46.6 ± 21.1	bc	80.5 ± 24.9	C
Mezcla ace:asp	5.3 ± 3.2	a	17.1 ± 6.0	A
Sacarina	54.4 ± 22.1	bc	25.0 ± 10.8	AB
Sacarosa	67.3 ± 27.3	c	38.1 ± 12.1	B
Sucralosa	30.5 ± 18.8	abc	29.1 ± 10.8	AB

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Para el caso de las ratas macho se encontraron diferencias significativas intergrupales ($p=0.0191$). De acuerdo con la prueba de Duncan los grupos que tuvieron niveles de actividad enzimática específica significativamente mayores que el control (7.4 ± 4.5 mU/mg) fueron los grupos de sacarina (54.4 ± 22.1 mU/mg), glucosa (46.6 ± 21.1 mU/mg) y sacarosa (67.3 ± 27.3 mU/mg). El valor del grupo control es similar a lo reportado por Nepokroeff et al. (1975), quienes reportaron en extractos crudos de hígados de ratas macho en ayuno una actividad de 5 mU/mg. En el caso de las ratas hembra los análisis de varianza indicaron igualmente la existencia de diferencias significativas ($p=0.0218$). La prueba de rangos múltiples indicó que

los tres grupos de edulcorantes nutritivos: fructosa (57.3 ± 20.4 mU/mg), glucosa (80.5 ± 24.9 mU/mg) y sacarosa (38.1 ± 12.1 mU/mg) tuvieron niveles significativamente más elevados que el control (11.1 ± 3.9 mU/mg). Adicionalmente, el análisis de varianza de dos vías (Tabla 4.9) reveló que no existieron diferencias significativas entre los niveles promedio de las ratas macho (30.5 ± 5.7 mU/mg) y las ratas hembra (34.2 ± 6.6 mU/mg). Igualmente, la Tabla 4.10 muestra que la interacción entre los factores grupo*género no resultó ser significativa; es decir, las ratas macho siguieron la misma tendencia que las ratas hembra. Lo anterior es claro si se observa que tanto en ratas macho como en ratas hembra los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos tuvieron los mayores niveles de actividad.

Tabla 4.10. Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la ácido graso sintasa FAS (mU/mg) de las muestras de la primera eutanasia

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Grupo	28731.0	7	4104.43	4.16	0.0008
B: Género	286.781	1	286.781	0.29	0.5917
Interacciones					
AB	10411.8	7	1487.4	1.51	0.1808
Residuos	63149.1	64	986.7		
Total (Corregido)	102579.0	79			

Gl: Grados de libertad

Los resultados correspondientes a los 480 días, tanto de las ratas macho como de las ratas hembra, se muestran en la Tabla 4.11. Los análisis de varianza indicaron la existencia de diferencias significativas intergrupales tanto en las ratas macho ($p=0.0065$) como las ratas hembra ($p=0.0110$). Además, en la Tabla 4.11 se muestran los resultados de la prueba de intervalos múltiples por el método de Duncan.

Tabla 4.11. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la sintasa de ácidos grasos (FAS) para las ratas macho y hembra a los 480 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	21.5 \pm 10.5	a	61.4 \pm 27.5	B
Control	13.5 \pm 6.6	a	14.8 \pm 8.1	A
Fructosa	232.9 \pm 70.7	c	87.1 \pm 28.5	BC
Glucosa	195.3 \pm 56.1	bc	141.8 \pm 53.8	C
Mezcla ace:asp	18.9 \pm 5.6	a	60.9 \pm 27.5	B
Sacarina	43.8 \pm 22.9	b	16.6 \pm 6.7	A
Sacarosa	72.6 \pm 26.8	b	108.8 \pm 58.8	BC
Sucralosa	37.2 \pm 13.2	a	85.5 \pm 36.5	BC

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

En el caso de las ratas macho los tres grupos de edulcorantes nutritivos sacarosa (72.6 ± 26.8 mU/mg), glucosa (195.3 ± 56.1 mU/mg) y fructosa (232.9 ± 70.7 mU/mg); así como el grupo que bebió sacarina (43.8 ± 22.9 mU/mg) tuvieron niveles estadísticamente superiores al control (13.5 ± 6.6 mU/mg).

En contraste, en las ratas hembra no solamente los grupos de edulcorantes nutritivos (glucosa, sacarosa y fructosa) fueron significativamente más elevados que el control (14.8 ± 8.1 mU/mg) sino también los grupos que consumieron acesulfamo de K (61.4 ± 27.5 mU/mg), la mezcla de acesulfamo de K con aspartamo (60.9 ± 27.5 mU/mg) y sucralosa (87.1 ± 28.5 mU/mg).

En la Tabla 4.12 se muestra el análisis de varianza de dos vías y se aprecia que solamente el factor grupo (tipo de edulcorante ingerido) resultó ser significativo. Contrariamente el factor género y la interacción de ambos factores no resultaron ser significativos.

Se ha asociado el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono simples con el incremento de la lipogénesis *de novo* hepática (Hudgins et al., 2008). De acuerdo con Hudgins et al. (1996) incluso las dietas eucalóricas (es decir, la dieta que aporta la misma cantidad que la energía que gasta el organismo) pero ricas en hidratos de carbono simples promueven una mayor lipogénesis *de novo* hepática. Asimismo, Hudgins et al. (1996) no solamente indican que el consumo de una dieta alta en hidratos de carbono simples incrementa la lipogénesis *de novo* sino que también cambia el perfil de los triglicéridos circulantes. De acuerdo con los autores, en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), provenientes del hígado y circulantes en el torrente sanguíneo, se disminuye la proporción de ácido linoleico (18:2) y se aumenta la proporción de ácido palmítico (16:0).

Tabla 4.12. Análisis de varianza de dos vías para la sintasa de ácidos graos (FAS) mU/mg a los 480 días

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Grupo	240493.0	7	34356.1	5.15	0.0001
B: Género	1062.01	1	1062.01	0.16	0.6913
Interacciones					
AB	78578.5	7	11225.5	1.68	0.1295
Residuos	420291.	63	6671.29		
Total (corregido)	740978.	78			

Gl: Grados de libertad

La razón por la que la fructosa estimula de manera contundente la lipogénesis *de novo* (*DNL*, por sus siglas en inglés) es que activa los factores transcripcionales lipogénicos *SREBP1c* y *ChREBP* en el hígado, estimulando cada paso de la lipogénesis *de novo*, incluida la sintasa de ácidos grasos, que convierte a la acetil-CoA en triglicéridos (Moore et al., 2014; Softic et al., 2016).

Los efectos de los edulcorantes sobre la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) no se encuentran elucidados. Pero se puede apreciar que en el caso de los extractos hepáticos provenientes de las ratas macho de la primera eutanasia que bebieron sacarina presentaron niveles significativamente mayores al control. Con respecto a lo anterior, Mendoza-Pérez (2017) menciona que el consumo de sacarina provocó un ligero incremento en la expresión relativa de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) y de la proteína de unión al elemento regulador al esteroil (*SRBP-1c*), determinados mediante Western blot en extractos hepáticos de ratas Wistar macho; sin embargo, no difirieron significativamente del control.

No obstante, se ha reportado extensamente en la literatura que el consumo crónico de sacarina puede provocar alteraciones hepáticas. Por ejemplo, Azeez et al. (2019) concluyeron en sus estudios que el consumo crónico de sacarina a dosis de 5 mg/kg o 10 mg/kg provocó alteraciones en indicadores hepáticos como las enzimas alanina transaminasa (*ALT*) y la aspartato transaminasa (*AST*). Andrejić et al. (2013) también reportaron que el consumo crónico de sacarina incrementaba los niveles circulantes de *AST*, sin distinción del sexo de las ratas. La *ALT* es una enzima que se encuentra en el hígado y que ayuda a convertir las proteínas en energía para las células hepáticas. Cuando el hígado está dañado, se libera *ALT* al torrente sanguíneo y aumentan sus niveles. Por su parte la *AST* es una enzima que ayuda a metabolizar los aminoácidos. Al igual que la *ALT*, la *AST* normalmente está presente en la sangre en niveles bajos. Un aumento en los niveles de *AST* puede indicar daño o enfermedad del hígado (Azeez et al., 2019). Asimismo, estos autores reportaron que el consumo de sacarina provocó un incremento de la 8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), la cual es uno de los principales productos de oxidación del ADN. Las concentraciones de 8-oxo-2'-desoxiguanosina dentro de una célula son una medida del estrés oxidativo. Lo anterior es de importancia ya que existió una rata macho que consumió sacarina y que, al momento de la eutanasia, su hígado se encontraba visiblemente dañado (Figura 4.1). Se requiere de análisis

histológicos, pero a simple vista y de acuerdo con comentarios del veterinario patólogo existen daños en el hígado.

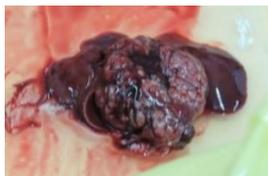


Figura 4.1. Hígado de rata macho No. 3 que consumió sacarina durante 480 días. Se aprecian posibles daños hepáticos

4.1.5. Acetil coenzima A carboxilasa (ACC)

La cuantificación de la actividad de la acetil coenzima A carboxilasa, a diferencia del resto de las enzimas, se basó en la cuantificación en los cambios de la absorbancia a 412 nm. Estos cambios corresponden a la reacción entre el ácido ditionitrozobenzoico y la coenzima A. La coenzima A fue producida en la reacción entre el oxaloacetato y la acetil-CoA, catalizada por la citrato sintasa. La acetil-CoA que emplea la citrato sintasa es uno de los remanentes de la reacción catalizada por la acetilcoenzima A carboxilasa, la cual cataliza la reacción de acetil-CoA a malonil-CoA.

En la Tabla 4.13 se muestran los niveles medios de actividad de la acetil coenzima A carboxilasa de las muestras de las ratas macho y hembras de la primera eutanasia (160 días). Los análisis de varianza indicaron que existieron diferencias significativas intergrupales tanto para las ratas macho ($p=0.0499$) como en las ratas hembra ($p=0.006$).

Tabla 4.13. Media por grupo de la actividad específica (mU/mg) de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC) para las ratas macho y hembra a los 160 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	1.7 \pm 0.6	a	1.1 \pm 0.6	AB
Control	2.3 \pm 1.0	a	0.6 \pm 0.3	A
Fructosa	3.7 \pm 1.7	ab	4.4 \pm 2.4	C
Glucosa	4.6 \pm 1.8	b	2.6 \pm 0.5	B
Mezcla ace:asp	2.3 \pm 1.4	a	1.8 \pm 0.8	AB
Sacarina	2.9 \pm 1.0	ab	2.2 \pm 0.9	B
Sacarosa	2.9 \pm 0.9	ab	2.0 \pm 0.1	B
Sucralosa	1.6 \pm 1.0	a	1.6 \pm 0.6	AB

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

En el caso de las ratas macho el único grupo que difirió significativamente del control (2.3 \pm 1.0 mU/mg) fue el grupo que ingirió glucosa (4.6 \pm 2.0 mU/mg). Los resultados del control fueron ligeramente inferiores a los reportados por Nakanishi y Numa (1970) quienes

reportaron que extractos crudos de hígado de ratas macho Wistar con una masa de 200-220 g tuvieron un nivel de actividad específica de la ACC de 4.4 mU/mg. Esta ligera discrepancia se podría deber, entre otros factores, al hecho de que Nakanishi y Numa (1970) utilizaron un método mucho más sensible para determinar la actividad de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC). Nakanishi y Numa (1970) utilizaron el método radioisotópico basado en cuantificar la fijación de ^{14}C del $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ a moléculas de malonil-CoA. No obstante, Majerus y Kilburn (1969) reportaron un nivel de actividad específica de la ACC de 1.9 mU/mg para ratas macho de una masa corporal de entre 170-200 g con un ayuno de 48 h también determinado mediante el método radioisotópico de ^{14}C . Como se aprecia los resultados de esta investigación se encuentran entre los niveles reportados por Nakanishi y Numa (1970) y Majerus y Kilburn (1969). Las pequeñas diferencias se podrían atribuir, tanto al método como a la edad de los especímenes. En este estudio las ratas tenían una edad mayor ya que contaban con una masa en promedio de entre 400-450 g.

En el caso de las ratas hembra los análisis estadísticos indicaron que los grupos de sacarina (2.2 ± 0.9 mU/mg), sacarosa (2.0 ± 0.1 mU/mg), glucosa (2.6 ± 0.5 mU/mg) y fructosa (4.4 ± 2.4 mU/mg) difirieron significativamente del control (0.6 ± 0.3 mU/mg). Lo anterior parece indicar que en las ratas hembra el edulcorante no nutritivo sacarina fue capaz de incrementar los niveles de la actividad de la ACC; aunque los mecanismos fisiológicos involucrados no están elucidados, un hallazgo para futuras investigaciones.

En la Tabla 4.14 se muestra el análisis de varianza de dos vías para corroborar el efecto de los factores grupo, género y la interacción de ambos factores. De acuerdo con la Tabla 4.14 ambos factores fueron significativos, pero la interacción de ambos factores no lo fue. En relación con el género los resultados muestran que las ratas macho tuvieron mayores niveles que las ratas hembra.

Tabla 4.14 Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la ACC (mU/mg) en muestras de la primera eutanasia (160 días)

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Efectos principales					
A: Grupo	6.84863e7	7	9.78375e6	4.84	0.0002
B: Género	1.02662e7	1	1.02662e7	5.08	0.0276
Interacciones					
AB	1.277e7	7	1.82429e6	0.90	0.5100
Residuos	1.29323e8	64	2.02067e6		
Total (corregido)	2.20845e8	79			

Gl: Grados de libertad

Los resultados correspondientes a la segunda eutanasia (480 días), tanto de hembras como de machos, se muestran en la Tabla 4.15. Los análisis de varianza correspondientes indicaron que no hubieron diferencias significativas intergrupales tanto en las ratas macho ($p=0.9620$) como como en las ratas hembra ($p=0.4327$). La Tabla 4.15 contiene las medias de los valores de actividad de los grupos de ratas macho y ratas hembra.

Tabla 4.15. Media por grupo de la actividad específica (U/mg) de la acetil coenzima A carboxilasa (ACC) para las ratas macho y hembra a los 480 días

Grupo	Actividad específica (mU/mg \pm DE)			
	Machos	Grupos homogéneos	Hembras	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	0.46 \pm 0.32	a	0.79 \pm 0.54	A
Control	0.29 \pm 0.11	a	1.01 \pm 0.70	A
Fructosa	0.80 \pm 0.47	a	0.80 \pm 0.47	A
Glucosa	0.78 \pm 0.43	a	0.95 \pm 0.27	A
Mezcla ace:asp	0.64 \pm 0.30	a	0.78 \pm 0.45	A
Sacarina	0.76 \pm 0.51	a	1.02 \pm 0.63	A
Sacarosa	1.11 \pm 0.78	a	0.82 \pm 0.49	A
Sucralosa	0.57 \pm 0.47	a	0.57 \pm 0.37	A

En el caso de las ratas macho el grupo control tuvo un nivel de actividad específica promedio de 0.29 ± 0.11 mU/mg, siendo el grupo con los menores niveles. En contraste el grupo con la mayor actividad específica fue el grupo que bebió agua con sacarosa (1.11 ± 0.78 mU/mg). Empero, ninguno fue significativamente diferente del control. En el caso de las hembras el grupo control tuvo un promedio de 1.01 ± 0.70 mU/mg. Los grupos que presentaron los menores y mayores niveles fueron sucralosa (0.57 ± 0.37 mU/mg) y sacarina (1.02 ± 0.63 mU/mg), respectivamente. No obstante, al igual que con lo ocurrido con las ratas macho, ningún grupo difirió significativamente del control.

El análisis de varianza de 2 vías para los datos correspondientes a los 480 días se muestra en la Tabla 4.16.

Tabla 4.16. Análisis de varianza de dos vías para los niveles de actividad de la ACC (mU/mg) en muestras de la segunda eutanasia (480 días)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
Efectos principales					
A: Grupo	1.10319e6	7	157599.	0.44	0.8721
B: Género	1.19059e6	1	1.19059e6	3.34	0.0724
Interacciones					
AB	1.89123e6	7	270176.	0.76	0.6247
Residuos	2.28268e7	64	356669.		
Total (corregido)	2.69361e7	79			

Gl: Grados de libertad

Los resultados de dicho análisis muestran que ninguno de los dos factores: género y grupo resultaron ser significativos. Asimismo, se aprecia que tampoco la interacción entre ambos factores logró significancia estadística. Las hembras tuvieron en promedio 0.74–1.11 mU/mg y las ratas macho un promedio de 0.49–0.87 mU/mg.

4.2. EFECTOS DE LA INGESTIÓN DE EDULCORANTES SOBRE SISTEMAS FISIOLÓGICOS: CANTIDAD DE TEJIDO ADIPOSEO RETROPERITONEAL, MASA CORPORAL Y PATRONES DE INGESTA DE ALIMENTO, BEBIDA Y ENERGÍA

4.2.1. Tejido adiposo retroperitoneal

El tejido adiposo retroperitoneal está íntimamente relacionado con el exceso de masa ('sobrepeso'²) y obesidad. Aquellos individuos que tienen un balance energético positivo tienden a almacenar estos excedentes energéticos en forma de tejido adiposo, que es la manera en que el organismo puede tener disponible una fuente de energía en caso de necesidad.

La Figura 4.2A muestra la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (TAR) de las ratas macho de la primera eutanasia (168 días). Los datos correspondientes a las ratas hembra se muestran en la Figura 4.2B.

Tanto en ratas hembra como en ratas macho los análisis de varianza indicaron que no hubieron diferencias significativas intergrupales en la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal. En las ratas macho, el grupo que ingirió glucosa presentó la mayor cantidad de TAR (8.89–13.76 g). En contraste, el grupo que ingería la mezcla de aspartamo con acesulfamo tuvo la menor cantidad de tejido adiposo (4.82–9.69 g). El grupo control tuvo 5.60–10.47 g de tejido adiposo. Para el caso de las ratas hembra el grupo que tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo fue el grupo de glucosa (3.44–5.31 g) y el grupo que tuvo la menor cantidad de tejido adiposo fue el grupo de acesulfamo de K (1.39–3.26 g). El grupo control de las ratas hembra tuvo 2.88–4.74 g.

² El peso y la masa NO son sinónimos. El peso es una fuerza y se mide en kg sujetos a una aceleración, $m^2 s^{-1}$ (Newton, N) y la masa se mide en kg. Por ello, no es correcto llamar 'sobrepeso' al exceso de masa corporal (nota de la tutora)

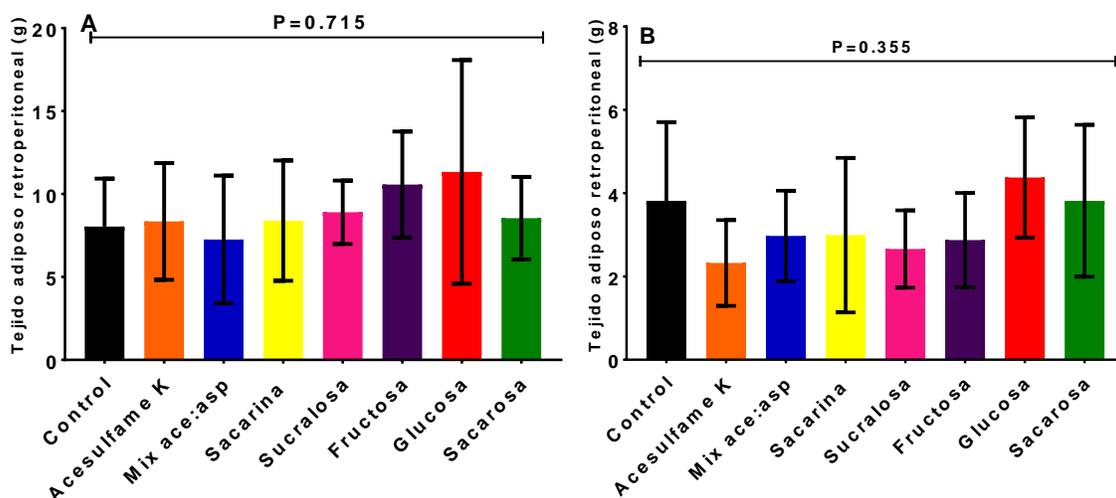


Figura 4.2. Masa de tejido adiposo retroperitoneal: A. Ratas macho. B. Ratas hembra Eutanasia realizada a los 168 días. Media ± DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren

Como se observa, de manera general, las ratas macho tuvieron una mayor cantidad de tejido adiposo (más del doble) en comparación de las ratas hembra. Adicionalmente, tanto en ratas macho como en ratas hembra se aprecia que existió una gran variabilidad en los resultados. Debido a lo anterior y para realizar una comparación más adecuada entre los valores obtenidos de las ratas macho y las ratas hembra se procedió a realizar la comparación de la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal por cada 100 g de masa corporal. Los resultados de este ajuste se observan en la Figura 4.3A para los machos y 4.3B para las hembras.

Al igual que con los análisis de la cantidad absoluta de tejido adiposo, los análisis de varianza de la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal por cada 100 g de masa corporal indicaron que no hubieron diferencias significativas ($p > 0.05$) tanto para las ratas macho como para las ratas hembra. Sin embargo, las tendencias cambiaron al compararlas con las tendencias de los valores absolutos de TAR.

En el caso de las ratas macho, el grupo de fructosa fue el que tuvo la mayor relación de tejido adiposo por cada 100 g de masa corporal (3.33–4.73 g TAR/ 100 g MC). Recordando que cuando se analizó la cantidad absoluta de tejido adiposo esta posición la ocupó el grupo de glucosa. En contraposición, el grupo de mezcla de aspartamo con acesulfamo de K tuvo la menor tasa (2.54–3.96 g de TAR/100 g M.C.). Para el caso de las ratas hembra no hubieron cambios significativos en las tendencias. Al igual que con los valores absolutos de tejido adiposo, el grupo que ingirió glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo por cada 100

g de masa corporal (2.48–4.06 g de TAR/ 100 g de MC). Al igual que con los valores absolutos, el grupo de acesulfamo de K fue el que tuvo la menor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal por cada 100 g de masa corporal (1.29–2.56 g de TAR/100 g de MC).

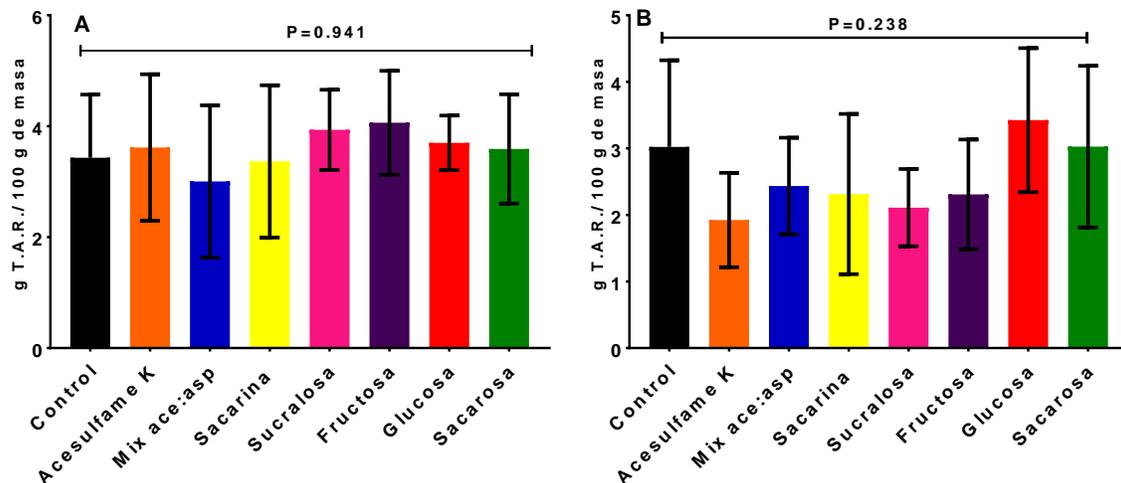


Figura 4.3. Masa de tejido adiposo retroperitoneal (T.A.R.) por cada 100 g de masa corporal: A. ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 168 días. Media \pm DE

Al comparar la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal considerando sus valores absolutos y sus valores por cada 100 g de masa corporal se apreció que ni en los grupos de ratas macho ni en los de ratas hembra hubieron diferencias significativas. Al realizar la comparación por cada 100 g de masa corporal se observa que la diferencia entre la cantidad de tejido adiposo para ratas macho y hembra no es tan grande como si se compararan únicamente los valores absolutos. En valores absolutos las ratas macho tuvieron en promedio 8.92 g *versus* 3.23 g de las hembras. En contraste, los valores por cada 100 g de masa corporal son los siguientes: Para los machos 2.6–4.7 g de TAR/100 g MC y para las hembras 1.55–3.59 g de TAR/100 g MC. Cuando se comparan las cantidades ajustadas por cada 100 g de masa corporal, no existen diferencias entre la cantidad de tejido adiposo de las ratas macho y las ratas hembra.

A continuación, se discutirán los resultados de la cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (total) de las ratas de la segunda eutanasia (realizada a los 480 días). En la Figura 4.4A se muestran los resultados correspondientes a las ratas macho y en la Figura 4.4B los de las ratas hembra.

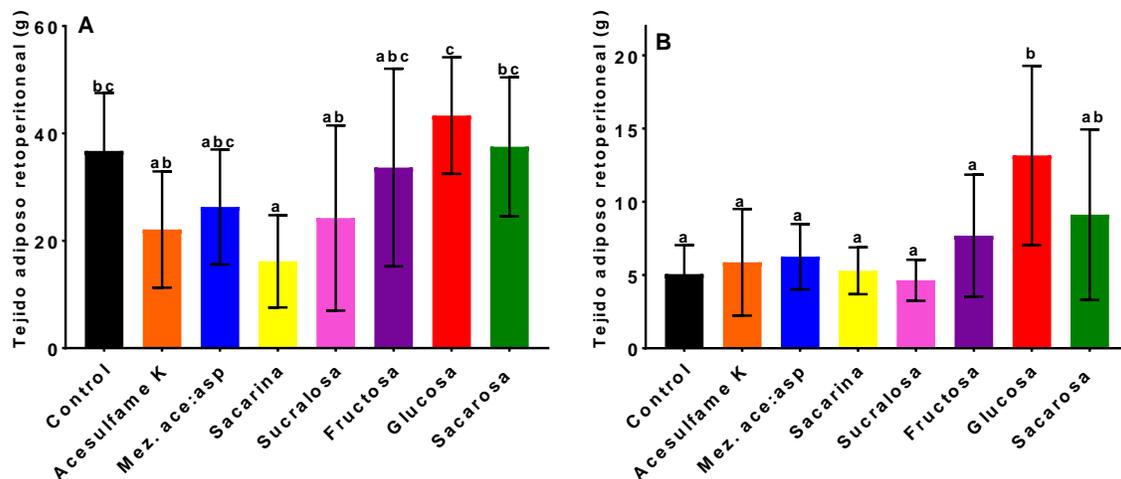


Figura 4.4. Masa de tejido adiposo retroperitoneal: A. ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 480 días. Media \pm DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan

En contraste con lo observado en la primera eutanasia, en la segunda eutanasia, tanto para las ratas macho como las ratas hembra hubieron diferencias intergrupales estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Para las ratas macho, el grupo que ingirió glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (32.45–54.19 g). Lo anterior puede relacionarse con la ingesta energética teórica como se verá más adelante (Figura 4.15A) donde se aprecia que precisamente el grupo de glucosa fue el que tuvo la mayor ingesta de energía.

Por otro lado, el grupo que ingirió sacarina tuvo la menor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (7.57–24.77 g). El grupo control por su parte tuvo, en promedio, 25.96–47.52 g. De la Figura 4.4A y de los resultados de la prueba de Duncan se puede concluir que solamente el grupo de sacarina difirió significativamente del control.

Para las ratas hembra, igualmente, el grupo que ingirió glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (7.01–19.28 g). El grupo que ingirió sucralosa tuvo la menor cantidad de tejido adiposo (3.24–6.04 g). Por su parte, el grupo control tuvo 3.08–7.04 g. La prueba de Duncan indicó que únicamente el grupo de glucosa difirió del grupo control. Al observar la cantidad de energía calculada por la ingesta por las ratas hembra (Figura 4.15B, más adelante) se aprecia que, precisamente, el grupo de glucosa fue el que mostró la mayor ingesta energética teórica. Como se observa en este caso y en los machos, los grupos que

mostraron mayor ingesta energética teórica tuvieron la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal.

Debido a que existe una gran variabilidad en la masa corporal dentro de cada uno de los grupos, al igual que con los datos de la primera eutanasia, se procedió a realizar el cálculo de contenido de tejido adiposo retroperitoneal por cada 100 g de masa corporal con la finalidad de realizar una comparación corregida por la cantidad de masa de cada espécimen. Los resultados de dicha corrección se aprecian en la Figura 4.5A para los machos y Figura 4.5B para las hembras.

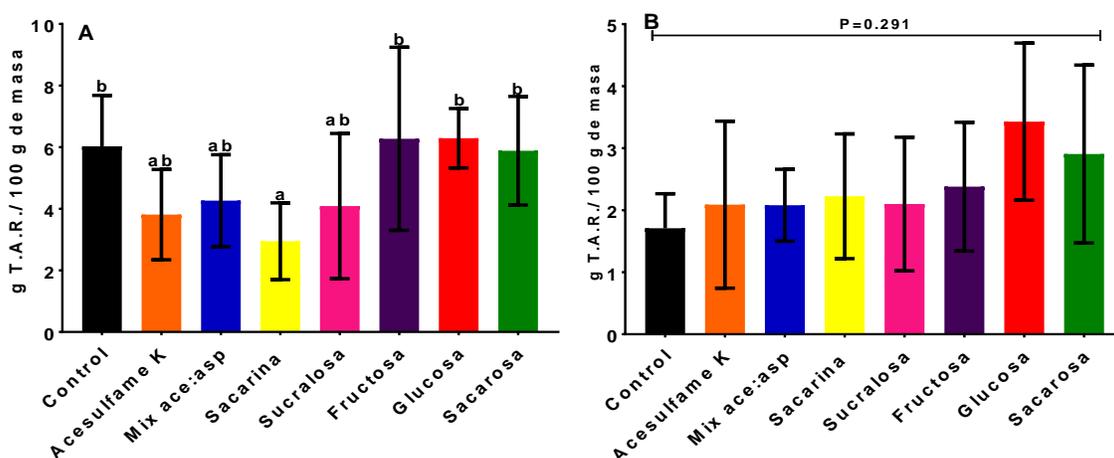


Figura 4.5. Masa de tejido adiposo retroperitoneal (T.A.R.) por cada 100 g de masa corporal: A. Ratas macho. B. Ratas hembra. Eutanasia realizada a los 480 días. Media ± DE. Grupos que no comparten las mismas letras difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan

El análisis de varianza indica, en el caso de las ratas macho, que existieron diferencias significativas intergrupales ($p < 0.05$). Se puede apreciar en la Figura 4.5A que el grupo que ingirió glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo por cada 100 g de masa corporal (5.19–7.39 g de TAR/ 100 g MC). El grupo que ingirió sacarina tuvo la menor cantidad de TAR por cada 100 g de masa corporal (1.71–4.17 g de TAR/ 100 g MC). El grupo control, por su parte, tuvo 4.93–7.12 g de TAR/ 100 g de MC. La prueba de Duncan indicó que el único grupo que difirió del control fue precisamente el grupo que ingirió sacarina. Lo anterior deberá indagarse más a fondo ya que si se observa la Figura 4.15A, presentada más adelante en el texto, la cantidad de energía ingerida calculada no difirió del grupo control y se esperaría que tuviera una cantidad de tejido adiposo similar a los ejemplares de este grupo. Sin embargo, posiblemente exista algún cambio metabólico que ocasione que, a pesar de ingerir

la misma cantidad de energía, tanto el grupo control como el grupo de sacarina, este último tenga menos tejido adiposo.

Para las ratas hembra, el análisis de varianza indica que no hubieron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de tejido adiposo retroperitoneal por cada 100 g de masa. Lo anterior, debido muy probablemente a la gran variabilidad que se observa dentro de cada grupo. El grupo de glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo por cada 100 g de masa (2.73–4.12 g de TAR/ 100g MC). En cambio, el grupo control tuvo la menor cantidad de tejido adiposo por cada 100 g de masa corporal (1.01–2.40 g de TAR/ 100g MC).

En los datos de tejido adiposo retroperitoneal corregidos por 100 g de masa corporal se observa que a los 480 días ya existe una diferencia significativa entre las ratas macho y las ratas hembra. Las ratas macho en promedio tuvieron 2.63–6.79 g de TAR/ 100 g MC contra los 1.26–3.46 g de las ratas hembra. Por lo tanto, a diferencia de lo ocurrido a los 168 días, a los 480 días la cantidad de tejido adiposo fue mayor en las ratas macho tanto en términos absolutos como en términos ponderados (g de TAR/ 100 g de MC).

4.2.2. Ganancia de masa corporal

A continuación, se describen los resultados obtenidos. Asimismo, se hace una pequeña discusión de estos. En la Figura 4.6A se muestra la ganancia de masa corporal de las ratas macho hasta el día 480. Los resultados de las ratas hembra se aprecian en la Figura 4.6B. En ambos casos se realizaron análisis de varianza (ANDEVA). El valor p del análisis de varianza de la ganancia de masa corporal de las ratas macho fue $p=0.0047$. Por tanto, sí hubieron diferencias significativas en la ganancia de masa corporal en las ratas macho. Como prueba de comparación múltiple se empleó la prueba de Duncan al 95% de confianza. Los resultados de dicha prueba y las medias de la ganancia de masa corporal de los grupos de ratas macho se muestran en la Tabla 4.17. las curvas de crecimiento reportadas por el proveedor Envigo se muestran en el Anexo B.

El único grupo en las ratas macho que tuvo una masa promedio significativamente más elevada que el control fue el grupo que ingirió glucosa. El grupo que presentó la menor ganancia de masa fue el grupo de fructosa. Debe mencionarse que en los últimos días de

experimentación algunos especímenes de este grupo presentaron una pérdida considerable de masa y, finalmente, murieron antes de terminar la experimentación. En uno de los casos la necropsia indicó la presencia de un hemangiosarcoma y en otro caso se presentó un adenoma en la hipófisis. Antes de presentarse estos cambios bruscos en la tendencia de ganancia de masa, el grupo de fructosa era el segundo con mayor ganancia de masa.

Tabla 4.17. Medias de la ganancia de masa por grupo de ratas macho con intervalos de confianza del 95%

Grupo	Intervalo de la media (g)	Grupos homogéneos
Fructosa	401.4–539.9	A
Sacarina	442.4–540.3	AB
Acesulfamo de K	471.3–558.9	AB
Sucralosa	474.5–562.2	AB
Control	507.8–595.5	AB
Mezcla ace:asp	514.3–601.9	AB
Sacarosa	536.9–634.8	B
Glucosa	661.9–759.9	C

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

En el caso de las ratas hembra el análisis de varianza tuvo un valor $p=0.3949$ y, por lo tanto, no existieron diferencias significativas inter-grupales en la ganancia de masa corporal de las ratas hembra. En la Tabla 4.18 se muestran la ganancia de masa corporal de los distintos grupos de ratas hembra. El grupo con la menor ganancia de masa fue el que ingirió acesulfamo de K. El grupo que ingirió glucosa presentó la mayor ganancia de masa. No obstante, ningún grupo difirió estadísticamente del control.

Tabla 4.18. Medias de la ganancia de masa de ratas hembra con intervalos de confianza del 95%

Grupo	Intervalo de la media (g)	Grupos homogéneos
Acesulfamo de K	209.0–251.0	A
Control	218.6–260.2	A
Mezcla ace:asp	218.9–260.9	A
Sucralosa	221.6–263.6	A
Sacarina	225.7–267.7	A
Sacarosa	232.9–278.7	A
Fructosa	235.5–280.9	A
Glucosa	258.6–304.1	A

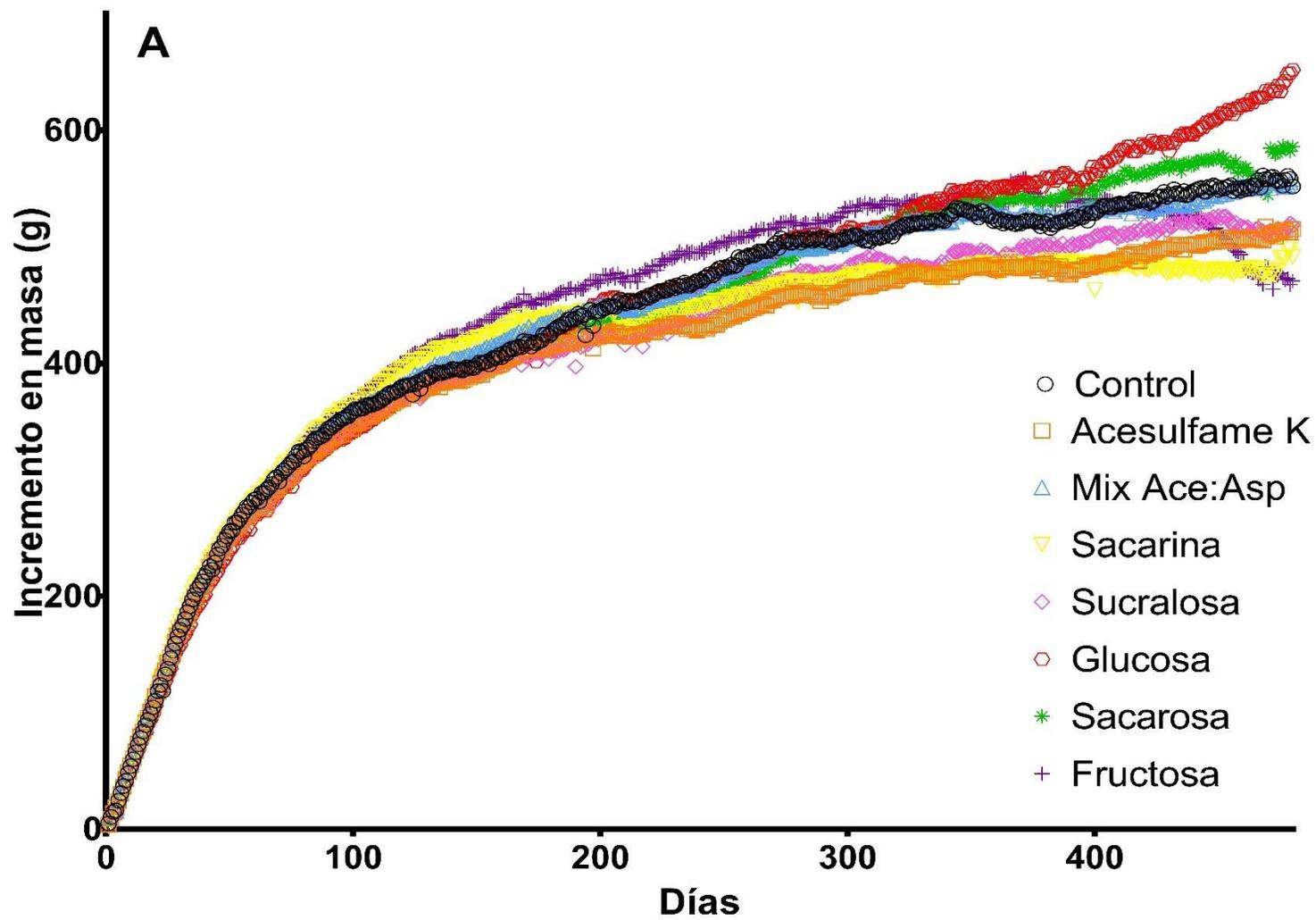


Figura 4.6A Ganancia de masa corporal de las ratas macho hasta el día 480

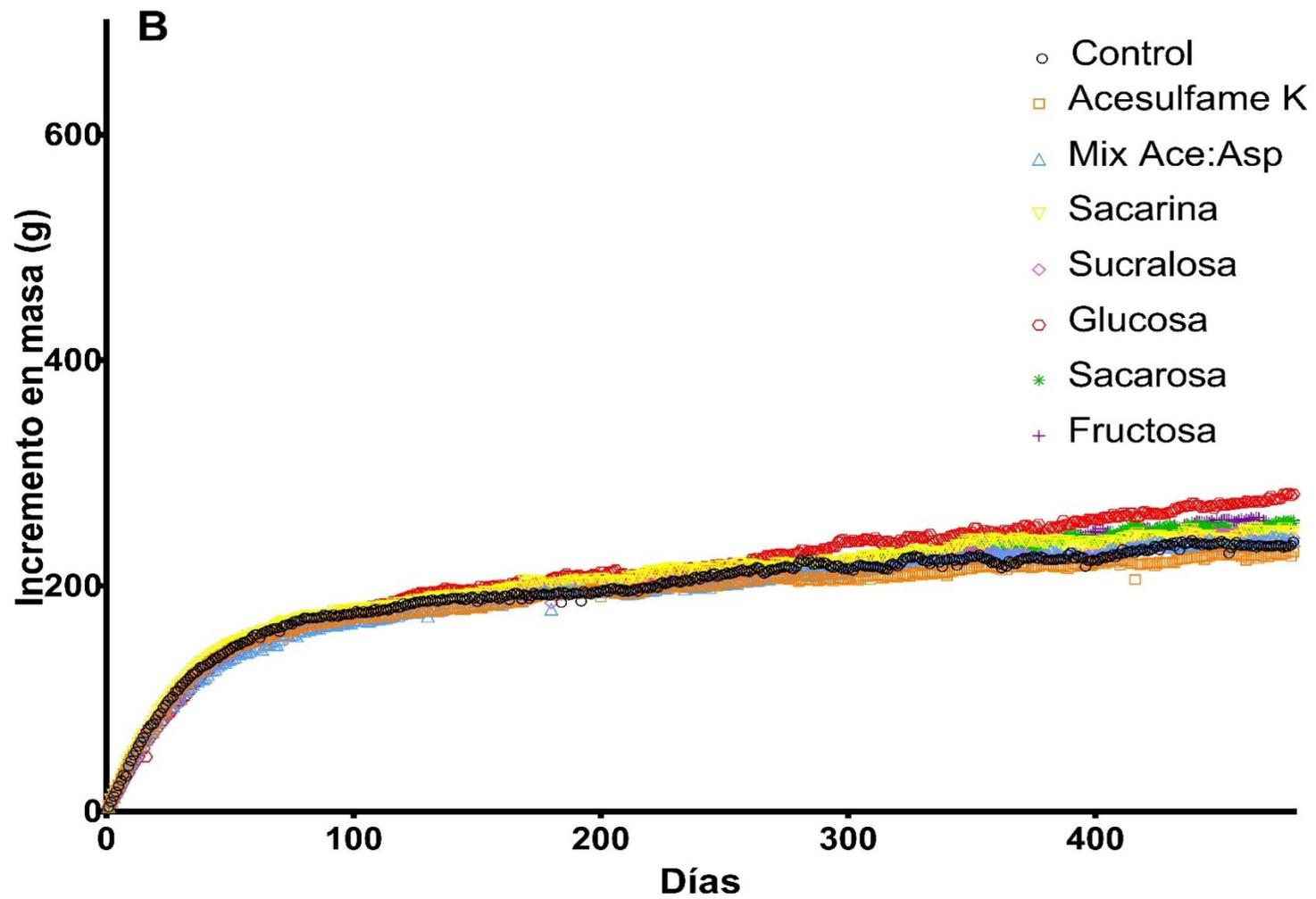


Figura 4.6B Ganancia de masa corporal de las ratas hembra hasta el día 480

Se debe mencionar que en el día 480, el grupo de ratas macho que ingería fructosa estaba constituido únicamente por 2 especímenes, el grupo de sacarosa por 4 y el grupo de sacarina por 4. Lo anterior fue debido a que 2 de las ratas murieron en el transcurso de la investigación y a las otras tres se les realizó la eutanasia ya que se había llegado al punto final humanitario debido a la pérdida de calidad de vida que presentaban.

A continuación, se detalla cada uno de estos cinco casos.

La rata macho # 73 del grupo que ingirió fructosa presentó heridas necróticas en la piel de su costado izquierdo y en la cola (Figuras 4.7A, 4.7B) y, debido a estas heridas y a su sufrimiento se decidió que se había llegado al punto final humanitario por lo que se procedió a realizar su eutanasia en el día 366. Sus órganos fueron llevados a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para su estudio.

La rata macho # 78 del grupo que ingirió fructosa fue encontrada muerta el día 373. La necropsia fue realizada por el patólogo de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), quien determinó que la causa de muerte fue un hemangiosarcoma vascular en el corazón. En la Figura 4.8 se aprecia el hemangiosarcoma en el corazón. Se enviaron también sus órganos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para los análisis histológicos posteriores.



Figura 4.7A. Heridas necróticas en la piel de la rata macho # 73 del grupo que ingirió fructosa



Figura 4.7B. Heridas necróticas en la piel de la cola de la rata macho # 73 del grupo que ingirió fructosa



Figura 4.8. Corazón de la rata macho # 78 del grupo que ingirió fructosa. En el círculo rojo se señala el hemangiosarcoma

Por otro lado, la rata macho # 34 fue encontrada muerta el día 469. La necropsia realizada indicó que en este caso la causa de muerte fue un adenoma en la hipófisis (Figura 4.9). Esta rata perdió masa de forma constante a partir del día 406 hasta el momento de su muerte. En este lapso el espécimen perdió un 30.7% de su masa corporal al pasar de tener una masa de 707.1 g a solamente una masa de 493 g.



Figura 4.9. Adenoma en la hipófisis de la rata macho 34 del grupo que ingirió fructosa. El adenoma es la estructura en el centro del cerebro de color rojo oscuro

De igual manera en el grupo de ratas macho que ingerían sacarosa fue necesario realizar la eutanasia de uno de los especímenes. La rata # 75 había perdido considerablemente masa corporal desde el día 413 hasta el día 470 (día en el que se realizó la eutanasia). En este lapso el espécimen perdió el 23.4% de su masa corporal pasando de 580.6 a 445.0 g de masa corporal. La necropsia realizada indicó la presencia de un adenoma en la hipófisis. Este hallazgo fue similar al observado en la rata # 34 del grupo que ingirió fructosa. En la Figura 4.10 se aprecia el adenoma en la hipófisis de la rata macho # 75.



Figura 4.10. Adenoma en la hipófisis de la rata macho #75 del grupo que ingería sacarosa

Se ha reportado una prevalencia de solamente el 0.5% de adenoma en la hipófisis de ratas macho Wistar de entre 47 a 87 semanas de edad. Después de las 88 semanas la prevalencia de adenomas en la hipófisis se eleva hasta el 13% (Barsoum et al., 1985). La edad de las ratas que en esta investigación presentaron adenoma en la hipófisis fue de aproximadamente 68 semanas. Como se aprecia, estaban en una edad en donde Barsoum et al. (1985) reportaron baja presencia de adenomas en la hipófisis. Actualmente, no está del todo claro cuáles son las causas que conllevan al desarrollo de los adenomas en la hipófisis. Debido a lo anterior se deberá indagar en futuras investigaciones si el consumo de edulcorantes influyó o no en el desarrollo de estos adenomas en la hipófisis.

La rata macho # 33 del grupo que ingirió sacarina, al día 210, presentaba signos de gran dolor en la parte baja de su cavidad abdominal. En los días subsecuentes dejó de comer y empezó a presentar cada vez más signos de gran dolor, por lo que se decidió que se había llegado al punto final humanitario y se decidió realizar la eutanasia. La autopsia reveló que este espécimen presentó una obstrucción, así como inflamación y sangrado en su vejiga (Figura 4.11). Se realizarán estudios histológicos posteriores al tejido de la vejiga ya que se ha reportado que el consumo de sacarina provoca cáncer de vejiga en ratas (Reuber, 1975).



Figura 4.11. Vejiga de la rata macho # 33 del grupo de sacarina. Se observa la vejiga inflamada por acumulación de orina y sangre por obstrucción de esta

Aunque este espécimen no está dentro de los cinco mencionados arriba es un caso que debe informarse. Dentro del grupo de las ratas macho que ingerían glucosa, se observó en la rata # 12 el desarrollo de un tumor en el costado derecho del tórax (Figura 4.12). Dicho tumor fue creciendo a lo largo de 10 semanas, alcanzando un diámetro aproximado de 17 cm. El espécimen nunca mostró signos de dolor al manipularlo, ni tampoco disminuyó su masa corporal o se vio afectado su apetito. El día 26 de noviembre de 2019 que se realizó la eutanasia de su grupo, de acuerdo con el personal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, este tumor era un sarcoma de tejido conjuntivo. Al momento de la eutanasia el tumor tuvo una masa de 238.2 g. Lo anterior representó el 26.8% de la masa corporal del espécimen. Se harán análisis histológicos en esta dependencia para corroborar este diagnóstico.



Figura 4.12. Rata macho # 12 que ingirió glucosa. Se observa el desarrollo de un tumor en el costado derecho del tórax

4.2.3. Cambio de masa corporal expresado en porcentaje

Otra forma de cuantificar los efectos que tienen diversas sustancias sobre la masa corporal de los individuos es mediante la evaluación del incremento de masa expresado en porcentaje en lugar de realizarlo en términos absolutos de ganancia de masa. En la Tabla 4.19 se muestran las medias de la ganancia de masa tanto para las ratas macho como para las ratas hembra a los 480 días de experimentación.

En las ratas macho el grupo control tuvo en promedio un incremento de masa de 1135.8%. El grupo que ingirió glucosa tuvo un incremento de masa del 1242.9%. En contraste el grupo que presentó el menor porcentaje de incremento de masa fue el grupo de fructosa con solamente un incremento del 927.3%. No obstante, ningún grupo difirió significativamente del control ($p=0.590$).

En el caso de las ratas hembra el análisis de varianza proporciona un resultado similar, obteniéndose en el análisis de varianza un valor p de 0.106. Puesto que este valor p fue superior a 0.05 no existieron diferencias significativas intergrupales. El grupo control de las ratas hembra presentó un incremento de masa del 443.8%. Nuevamente, el grupo de glucosa presentó los mayores incrementos con un 582.8% y el menor incremento se observó en el grupo de acesulfamo de K 407.7%. Empero, como ya se mencionó previamente el análisis de varianza indica que ningún grupo difirió significativamente del control.

Tabla 4.19. Media por grupo del incremento de masa (%) para las ratas macho y hembra a los 480 días

	Machos (NS)	Hembras (NS)
Grupo	Media \pm DE (%)	
Acesulfamo de K	1035.6 \pm 118.5	407.7 \pm 98.9
Control	1135.8 \pm 220.9	443.8 \pm 97.5
Fructosa	927.3 \pm 224.4	479.0 \pm 47.3
Glucosa	1242.9 \pm 463.8	582.8 \pm 116.4
Mix ace:asp	1117.5 \pm 253.2	483.5 \pm 152.5
Sacarina	960.8 \pm 205.4	523.1 \pm 110.2
Sacarosa	1132.3 \pm 225.5	574.0 \pm 89.8
Sucralosa	1007.0 \pm 210.9	550.9 \pm 74.1

NS: No hubieron diferencias significativas

En la Figura 4.13 se muestran el incremento en masa corporal de las ratas macho. En contraparte, en la Figura 4.14 se observa el crecimiento diario de las ratas hembra. Tanto en las ratas macho como en las ratas hembra se aprecia que en los primeros días se tiene el mayor crecimiento.

El incremento de masa disminuye notablemente hasta valores inferiores al 1% a partir del día 50 de experimentación (74 de vida) tanto en las ratas macho como en las ratas hembra. Conforme se avance en el tiempo este incremento de masa corporal tiende a ser 0%. También es de destacar que existen días en donde hay cambios bruscos en la ganancia de masa cuando las ratas son adultas (después de los 100 días), estos cambios se deben a peleas entre los especímenes. Debe recordarse que compartían la misma caja. También podría deberse a que los roedores tiraron sus bebederos en las peleas. Lo anterior resalta la importancia de trabajar con los datos acumulados de parámetros como ganancia de masa, ingesta de alimento y bebida ya que de esta forma se evitan posibles sesgos por esos días de alta fluctuación que se salen de la tendencia normalmente observada y que se deben a peleas entre los roedores o a derrames del bebedero.

4.2.4. Velocidad de crecimiento

Como se aprecia en las Figuras 4.13 y 4.14, tanto las ratas macho como las ratas hembra presentan un crecimiento acelerado en los primeros 40 días de experimentación. De acuerdo con Sengupta (2014) las ratas macho alcanzan a ser jóvenes adultos a los 63 días de edad. Se debe recordar que la experimentación se realizó con ratas recién destetadas, es decir, con una edad promedio de 21 días. Por lo tanto, en el día 40 de experimentación estarían muy cerca de ser jóvenes adultas y de terminar con su etapa de crecimiento acelerado.

En la Tabla 4.20 se muestran las medias del crecimiento en esta etapa de desarrollo para las ratas macho. El análisis de varianza indicó un valor $p=0.5833$ y, por lo tanto, no hubieron diferencias significativas en las tasas de crecimiento de las ratas macho.

Tabla 4.20. Velocidad de crecimiento promedio (g/día) en ratas macho durante la etapa de crecimiento acelerado

Grupo	Intervalo de la media (g/día)	Grupos homogéneos
Glucosa	4.78–5.26	A
Sacarosa	4.94–5.42	A
Fructosa	5.00–5.48	A
Acesulfamo de K	5.03–5.50	A
Sucralosa	5.07–5.54	A
Control	5.09–5.57	A
Mezcla ace:asp	5.14–5.61	A
Sacarina	5.21–5.79	A

El grupo que presentó la menor velocidad de crecimiento fue el grupo de glucosa (4.78–5.26 g/día). El grupo con la mayor tasa de crecimiento fue el que ingirió sacarina (5.21–5.79 g/día). Por otro lado, el control presentó una velocidad de crecimiento de 5.09–5.57 g/día.

No hubieron diferencias inter-grupales, ni diferencias con respecto del control. De lo anterior se deduce que el consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos acompañado de una dieta balanceada no afectó la tasa de crecimiento de las ratas macho en la etapa de desarrollo exponencial (primeras etapas de la vida).

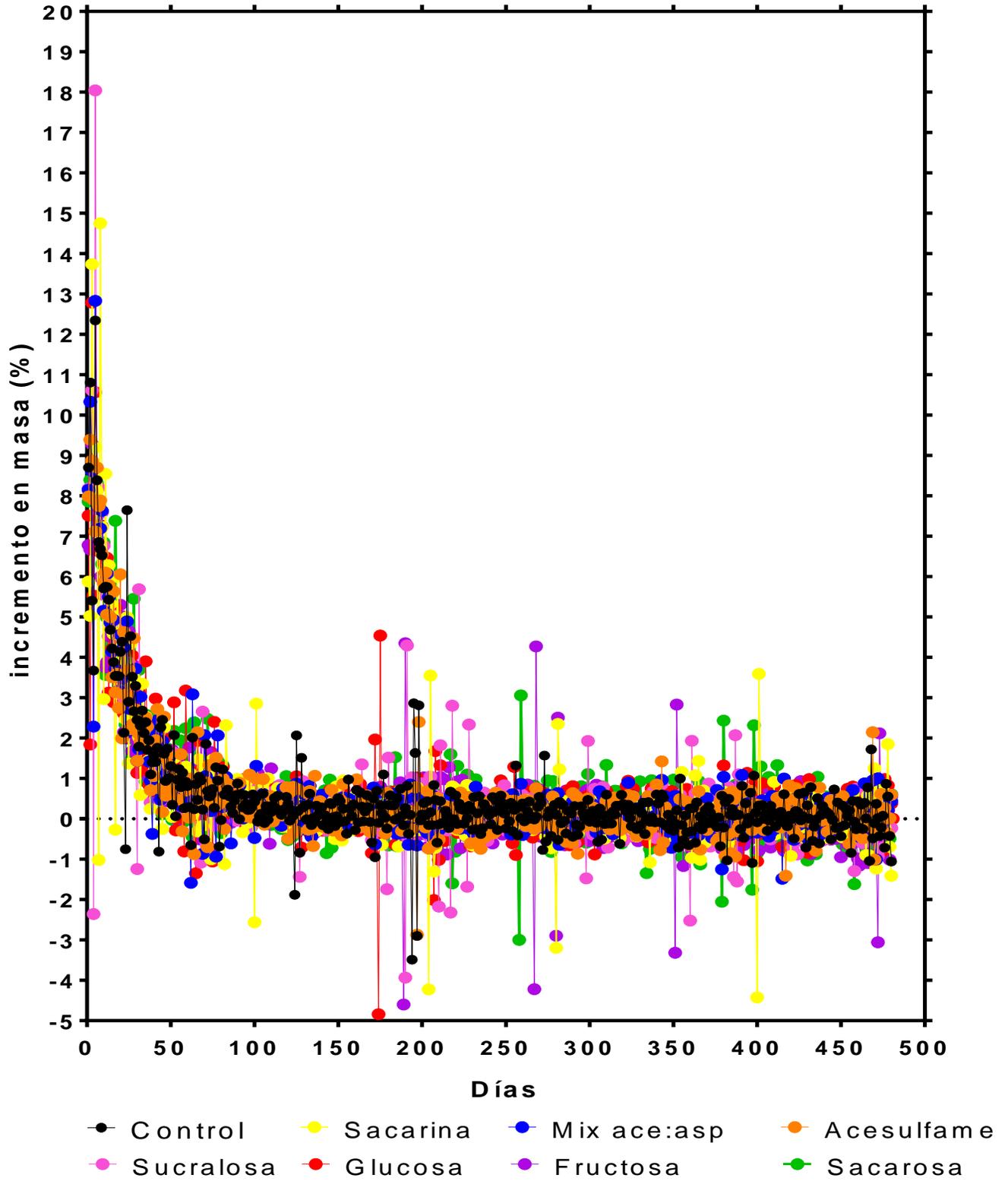


Figura 4.13. Porcentaje de incremento en masa diario de las ratas macho

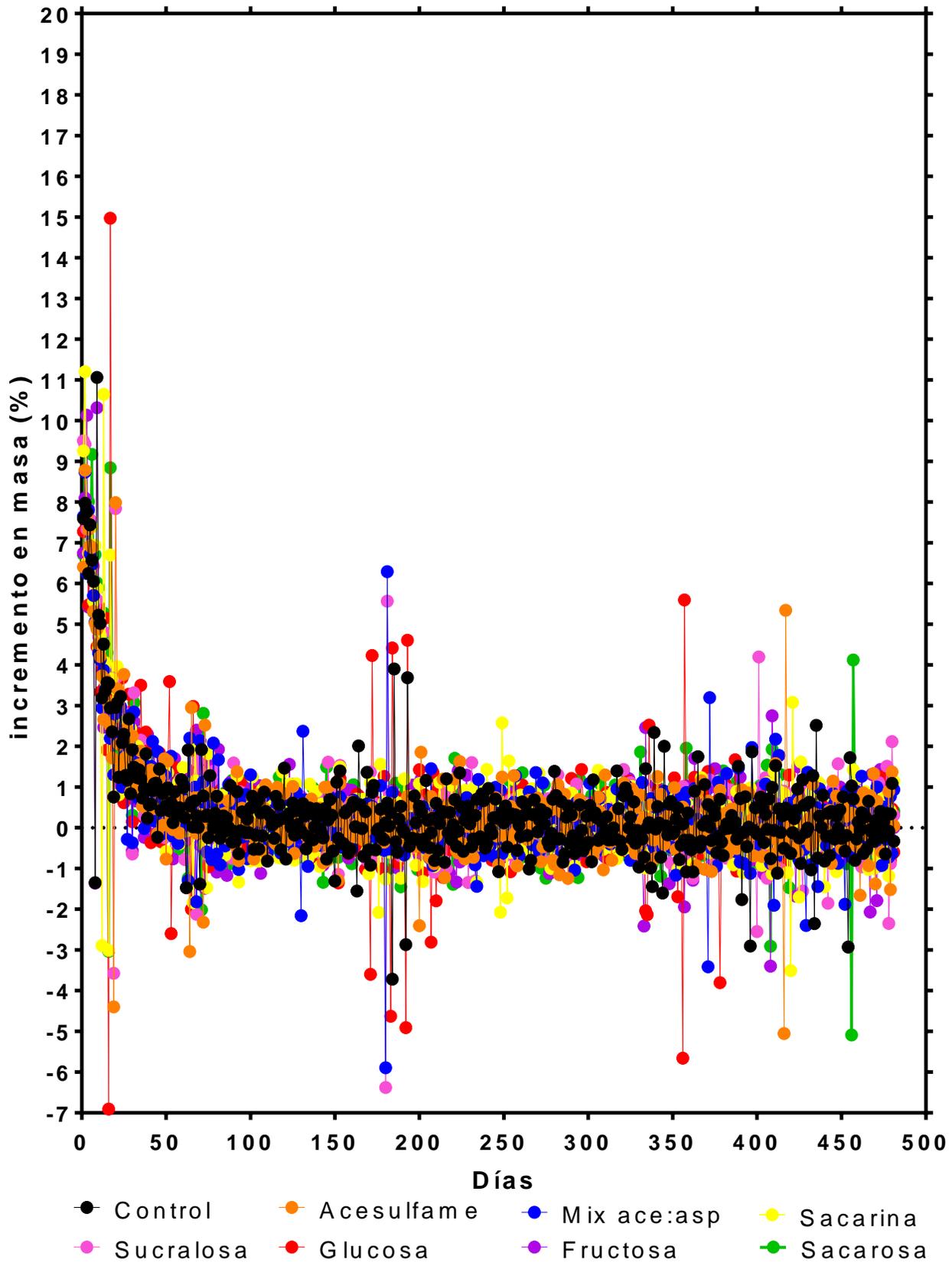


Figura 4.14. Porcentaje de incremento en masa diario de las ratas hembra

Para el caso de las ratas hembra las velocidades de crecimiento promedio en la etapa exponencial se muestran en la Tabla 4.21. El análisis de varianza tuvo un valor $p=0.1156$. Por lo tanto, al igual que con las ratas macho, no hubieron diferencias significativas en las tasas de crecimiento.

Tabla 4.21. Velocidad de crecimiento promedio (g/día) en ratas hembra durante la etapa de crecimiento acelerado

Grupo	Intervalo de la media (g/día)	Grupos homogéneos
Mezcla ace:asp	2.67–2.93	A
Glucosa	2.85–3.11	A
Fructosa	2.87–3.14	A
Acesulfamo de K	2.92–3.18	A
Sucralosa	2.92–3.20	A
Control	2.97–3.23	A
Sacarina	3.05–3.31	A
Sacarosa	3.05–3.32	A

El grupo de ratas hembra que ingirió la mezcla de aspartamo con acesulfamo de K presentó la menor velocidad de crecimiento exponencial (2.67–2.93 g/día). En contraste, la mayor velocidad de crecimiento se observó en el grupo que ingirió sacarosa (3.05–3.32 g/día). Por su parte el grupo control de las ratas hembra presentó una velocidad de crecimiento exponencial de (2.97–3.23 g/día). Al igual que en ratas macho, en las ratas hembra no hubo diferencias inter-grupales, ni diferencias con respecto del control. Nuevamente, el consumo de edulcorantes calóricos e hipocalóricos junto con una dieta balanceada no afectó la velocidad de crecimiento de las ratas hembra en la etapa de desarrollo exponencial (primeras etapas de la vida).

Al comparar las velocidades de crecimiento de las ratas macho (Tabla 4.20) y las velocidades de crecimiento de las ratas hembra (Tabla 4.21) se observa que las velocidades de crecimiento en la etapa juvenil de las ratas hembra son menores a las velocidades de crecimiento de las ratas macho. Lo anterior también se ve claramente reflejado en el crecimiento final de los especímenes (Figuras 4.5A y 4.5B) donde las ratas macho alcanzan prácticamente el doble de masa corporal.

4.2.5. Alimento ingerido

Los resultados de la cantidad de alimento ingerido acumulado, la suma de todo el alimento que se ha consumido, se aprecian en la Figura 4.15. La Figura 4.15A muestra los resultados

para las ratas macho y la Figura 4.15B los de las ratas hembra. El análisis de varianza para los datos de las ratas macho presentó un valor $p=0.000$. Por consiguiente, existieron diferencias significativas en las medias del alimento ingerido por cada grupo. El único grupo que consumió significativamente más alimento que el grupo control fue el grupo de acesulfamo (valores acumulados de 11,368.6-11,70.9 g) con los del grupo control que tuvo un consumo acumulado de 10,964.0-11,301.2 g. Los tres grupos de edulcorantes calóricos consumieron menos alimento que el grupo control.

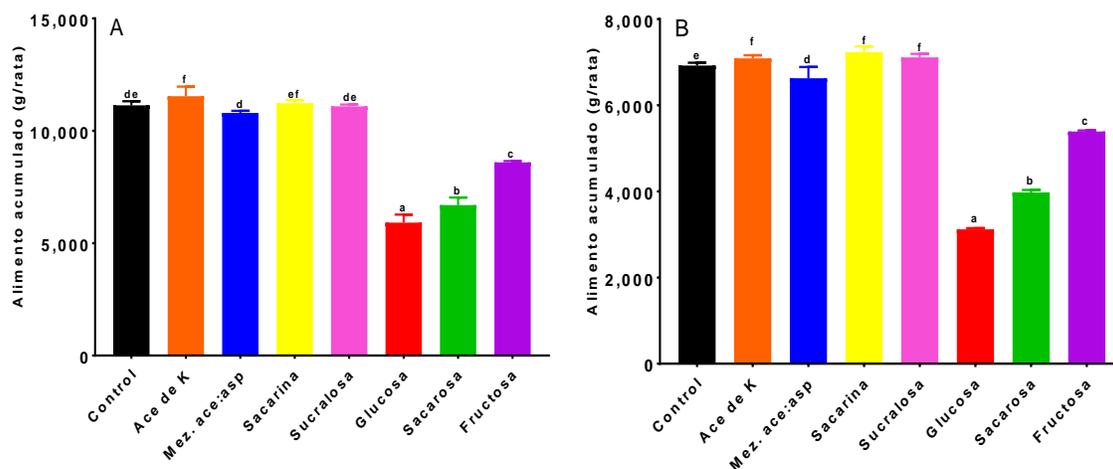


Figura 4.15. Alimento consumido acumulado hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan

En el análisis de varianza del alimento ingerido por las ratas hembra también se obtuvo un valor $p=0.000$ indicando que sí existieron diferencias significativas. Los grupos de ratas hembra que consumieron más alimento que el grupo control (acumulado de 6,847.1-6,995.8 g) fueron las que ingirieron acesulfamo de K con el agua potable (7,014.8-7163.5 g), sucralosa (7,035.9-7184.6 g) y sacarina (7,157.0-7184.6 g). El grupo que ingirió la menor cantidad de alimento fue el grupo de glucosa, bebiendo únicamente 3,045.0-3,193.8 g.

4.2.6. Bebida ingerida

La tendencia observada para el consumo de bebida fue la contraria a la del alimento. Lo anterior se puede apreciar en las Figuras 4.16A y 4.16B, donde se muestran las medias de la bebida ingerida acumulada por los especímenes macho y hembra, respectivamente.

Los análisis de varianza indicaron para ambos casos la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$). Se aprecia de manera muy notoria, tanto en ratas macho como en ratas hembra, que los grupos de edulcorantes calóricos ingirieron la mayor cantidad de bebida.

En las ratas macho todos los grupos ingirieron más bebida que el grupo control excepto el grupo de sucralosa. El grupo control ingirió de manera acumulada 16,515.7-19,296.3 mL. El grupo que más bebida ingirió fue el grupo que tomaba glucosa (38,601.2-41,382.0 mL). En ratas hembra todos los grupos que ingerían edulcorantes, calóricos e hipocalóricos, bebieron significativamente más que el grupo control (11,579.0-12,097.8 mL).

En contraste con los machos, el grupo de ratas hembra que bebía sacarosa y no el de fructosa fue el que consumió la mayor cantidad de bebida ingerida hasta el día 480. Es de llamar la atención esta inversión en el orden de predilección, mientras para los machos la bebida favorita de las ratas fue la solución endulzada con glucosa, para hembras fue la solución endulzada con sacarosa. En experimentos anteriores donde solamente se estudiaron sacarosa y fructosa y solamente con ejemplares macho ocurrió exactamente el mismo fenómeno, existió una mayor predilección de la sacarosa que por la fructosa (Martínez et al., 2010, Guzmán-Gómez, 2013).

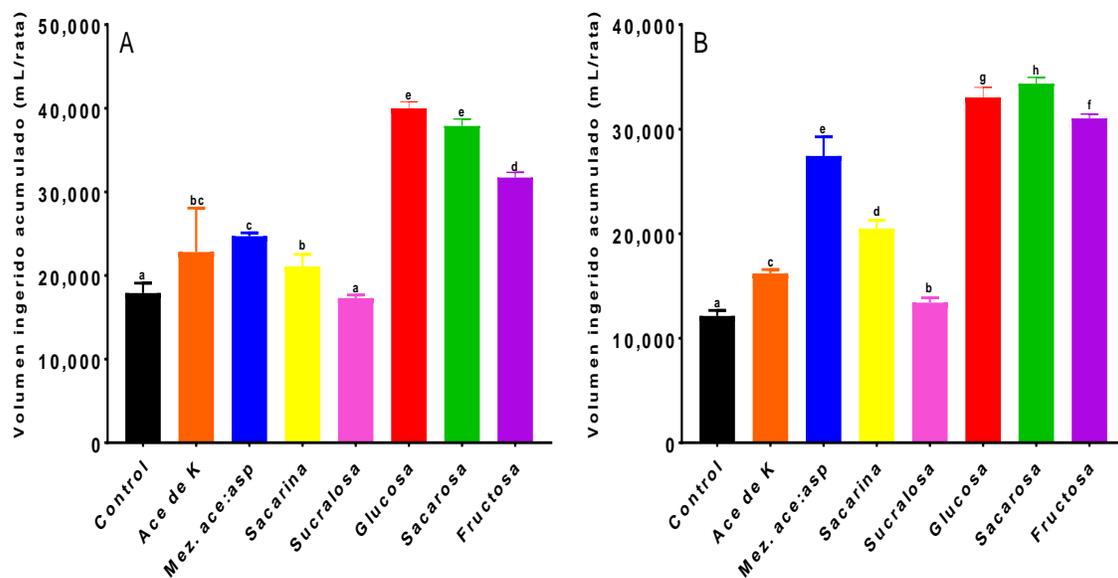


Figura 4.16. Bebida ingerida acumulada hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente al 95% de confianza. Método de Duncan

4.2.7. Energía ingerida teórica

Los resultados de la energía ingerida acumulada, que es la suma de la energía aportada por el alimento más la energía aportada por la bebida, se observan en la Figura 4.17.

Tanto para las ratas macho (Figura 4.17A) como para las ratas hembra (Figura 4.17B) se observa que las ratas realizaron un ajuste energético debido a que no se aprecian grandes cambios en las cantidades de energía ingerida. Los grupos de ratas que bebían soluciones calóricas disminuyeron la cantidad de alimento ingerido y, de esta forma, trataron de regular el ingreso energético. En ambos casos el valor *p* de los análisis de varianza fue menor a 0.05. Lo anterior indica que sí existieron diferencias significativas en la cantidad media de energía ingerida. Como se aprecia en las Figuras 4.17A y 4.17B, tanto en ratas macho como en ratas hembra, los grupos que bebieron agua endulzada con glucosa fueron los que teóricamente ingirieron la mayor cantidad de energía.

En el caso de las ratas macho los grupos que, teóricamente, ingirieron más energía que el control fueron: acesulfamo de K, fructosa, sacarosa y glucosa. Los grupos de ratas hembra que ingirieron más energía que el control fueron los que ingerían la mezcla de ace:asp, sacarina, sucralosa, fructosa, sacarosa y glucosa.

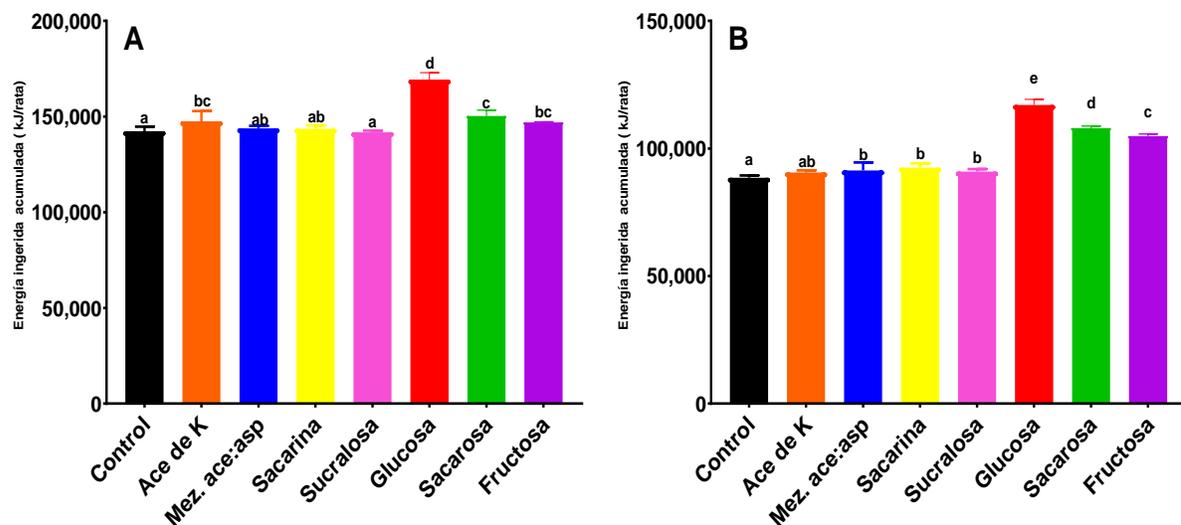


Figura 4.17. Energía ingerida consumida acumulada hasta el día 480: A. Machos. B. Hembras. Media \pm DE. Grupos con diferente letra difieren estadísticamente. Método de Duncan al 95% de confianza

4.3. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

4.3.1. Niveles séricos de glucosa

Uno de los parámetros más importantes en la homeostasis energética del organismo son los niveles séricos de glucosa. En las Figuras 4.18 y 4.19 se muestran los niveles séricos de las ratas macho y las ratas hembra, respectivamente.

Los resultados mostrados corresponden a los niveles séricos de glucosa a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h, n=10 para los meses 2 y 4, n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. Los análisis de varianza indicaron, para el caso de las ratas macho, que hubieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles séricos de glucosa a los 9, 14 y 16 meses. Sin embargo, en ningún caso se sobrepasaron los niveles considerados como normales. Lo anterior demuestra que si bien, en ciertos periodos existieron diferencias significativas estas no fueron de relevancia clínica.

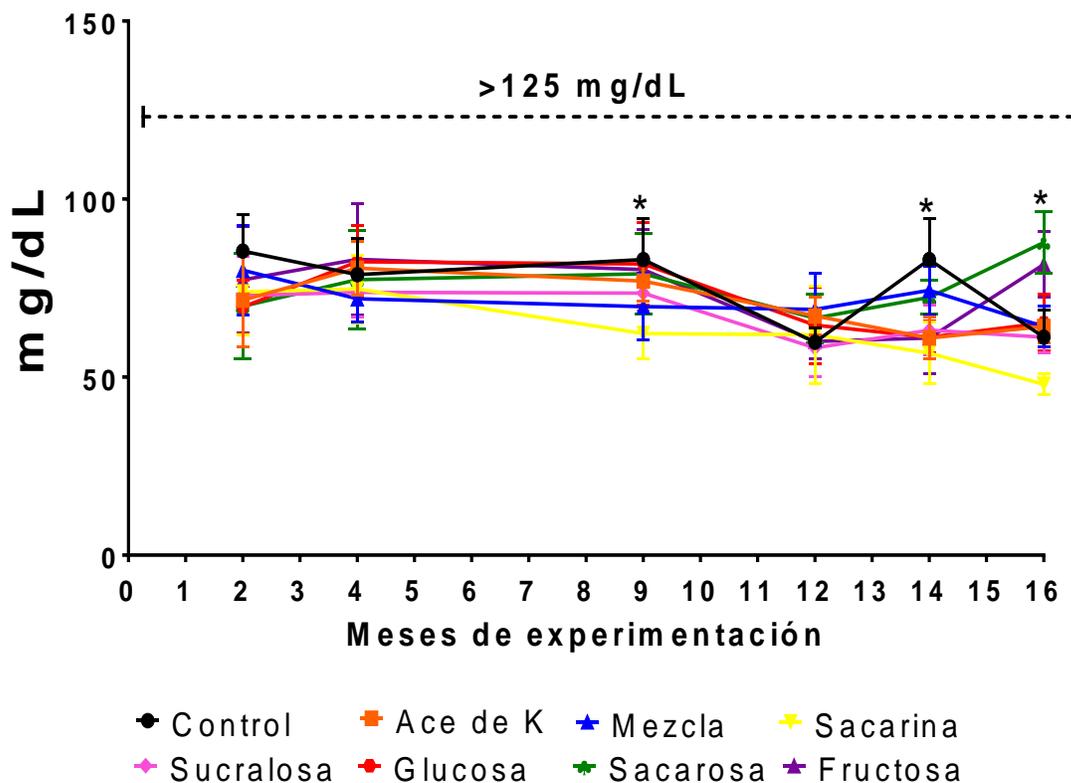


Figura 4.18. Niveles séricos de glucosa en ratas macho a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales

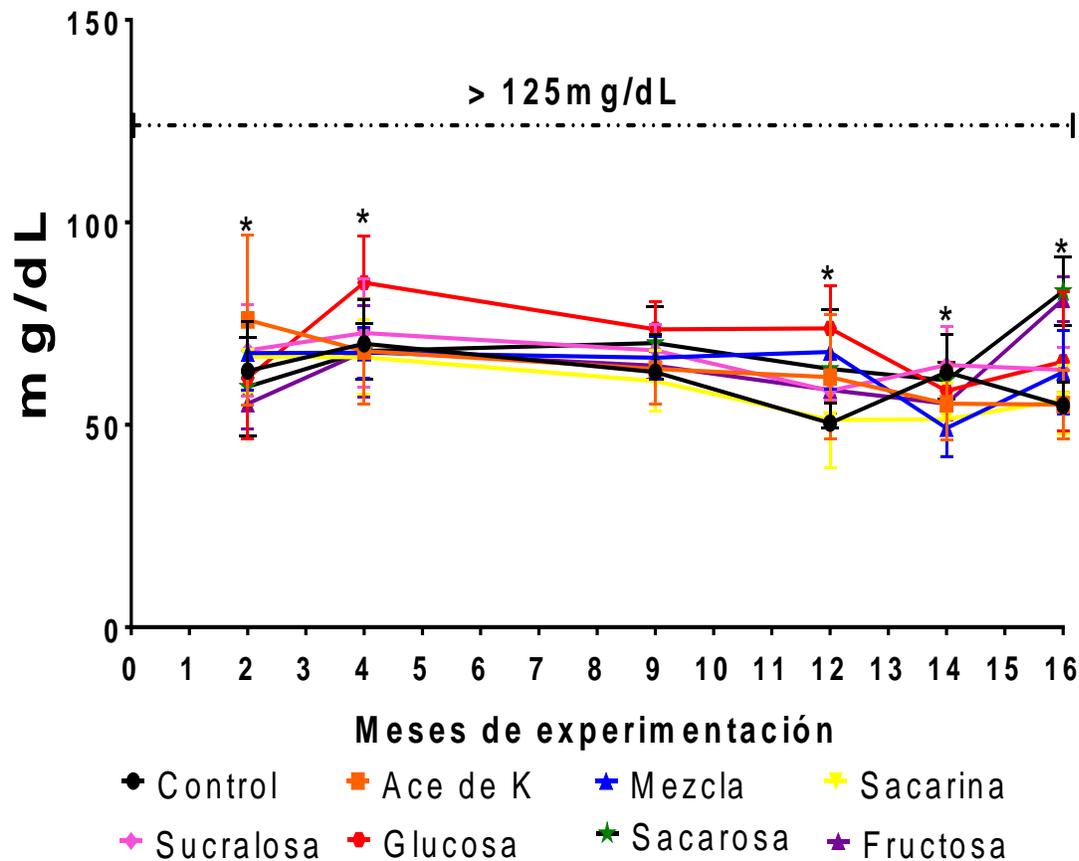


Figura 4.19. Niveles séricos de glucosa en ratas hembra a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales

En el caso de las ratas hembra las diferencias significativas ($p < 0.05$) ocurrieron en las tomas realizadas a los 2, 4, 12, 14 y 16 meses. En ningún grupo ni en ningún periodo se alcanzaron niveles que puedan considerarse patológicos ($> 125 \text{ mg/dL}$) (Envigo, 2018).

4.3.2. Niveles séricos de triglicéridos

Otro de los parámetros relacionados con el estado energético del organismo son los niveles séricos de triglicéridos. En las Figuras 4.20 y 4.21 se muestran los resultados de los niveles séricos de las ratas macho y hembra, respectivamente.

Los análisis de varianza indican que sí existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en las medias de los niveles séricos de triglicéridos tanto en ratas macho como hembra. Lo anterior se observó en todas las tomas de muestra realizadas (2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses). De manera

general se aprecia, tanto en ratas macho como hembra, que los grupos que ingerían soluciones de edulcorantes calóricos presentaron los mayores niveles. De acuerdo con Envigo (2018) y de forma general se considera que los niveles de triglicéridos en ayunas se deben de encontrar en un intervalo de 25-200 mg/dL.

Al observar las Figuras 4.20 y 4.21 se ve que solamente los grupos de edulcorantes calóricos se encontraron fuera de este intervalo. En el caso de las ratas hembra (Figura 3.18) se aprecia que únicamente los grupos de sacarosa y glucosa presentaron niveles séricos de triglicéridos superiores al intervalo considerado como normal (Envigo, 2018).

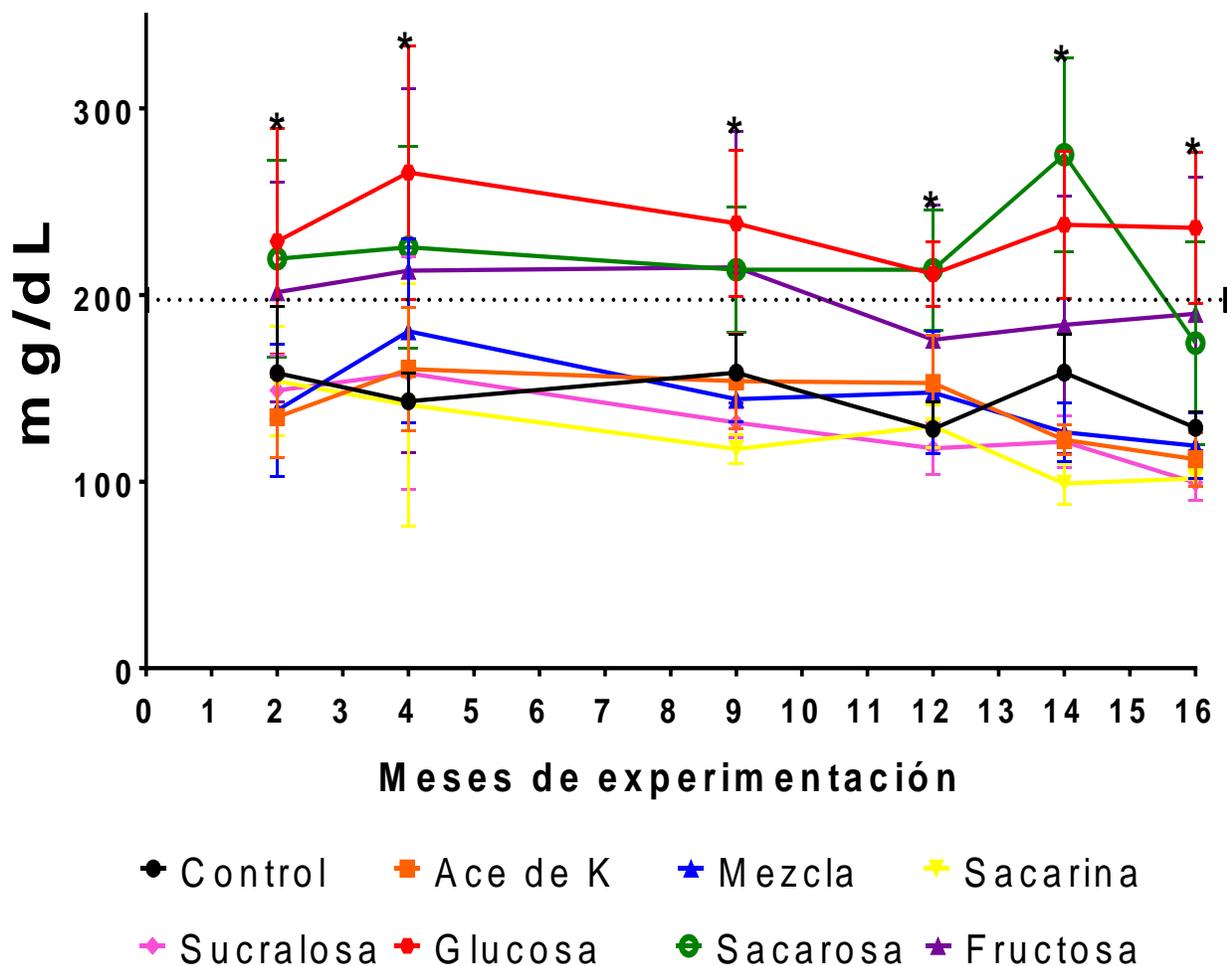


Figura 4.20 Niveles séricos de triglicéridos en ratas macho a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales

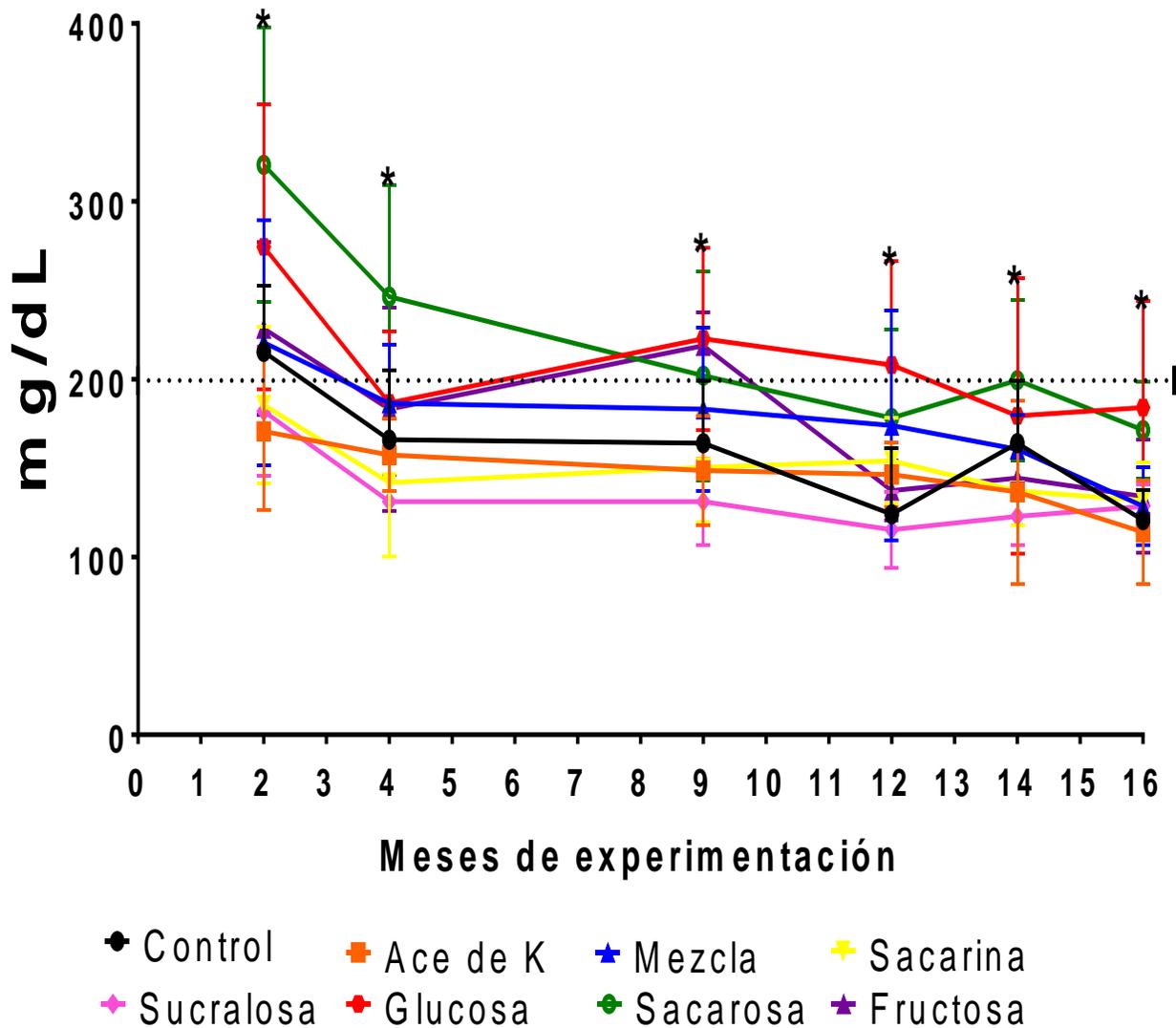


Figura 4.21 Niveles séricos de triglicéridos en ratas hembra a los 2, 4, 9, 12, 14 y 16 meses después del comienzo de la experimentación y un ayuno de 8 h; n=10 para los meses 2 y 4; n=5 a los 9, 12, 14 y 16 meses. *Existen diferencias $p < 0.05$. El asterisco indica los meses en los cuales existieron diferencias significativas intergrupales

El consumo excesivo de edulcorantes nutritivos provocó una mayor lipogénesis *de novo* repercutiendo en el desarrollo de hipertrigliceridemia de los especímenes pertenecientes a los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos. Esto concuerda con lo reportado por la literatura donde mencionan que el consumo de dietas ricas en glúcidos simples (mono y diglúcidos) estimula la lipogénesis *de novo* y el desarrollo de hipertrigliceridemia (Ameer et al., 2014; Chong et al., 2007; Moore et al., 2014; Welsh et al., 2010).

En relación con los edulcorantes artificiales, se observó en esta experimentación que como son consumidos acompañados con una dieta balanceada no provocaron el incremento de los triglicéridos a niveles que pudiesen considerarse patológicos.

4.3.3. Niveles de insulina

La determinación de insulina se realizó mediante fluoroinmunoensayos en el Lumix Magpix System®. Los resultados de dichas determinaciones de muestran en las Tablas 4.22 y 4.23.

La Tabla 4.22 muestra los resultados correspondientes a la primera eutanasia (160 días) tanto de las ratas macho como de las ratas hembra. En ambos casos los análisis de varianza indicaron la existencia de diferencias significativas intergrupales con valores de $p=0.0002$ para las ratas macho y $p =0.044$ para las ratas hembra. Como prueba *post hoc* se realizó la prueba de Duncan con un 95% de confianza. En el caso de las ratas macho existieron 3 grupos homogéneos designados por las letras a, b, c.

Tabla 4.22. Niveles séricos de insulina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

	Machos	Hembras
Grupo	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	1,561.8 ± 630.0a	542.032 ± 127.8A
Control	2,196.6 ± 1,179.1ab	489.886 ± 89.9A
Fructosa	3,939.3 ± 1,588.4 c	556.191 ± 43.8A
Glucosa	3,438.4 ± 1,602.8 bc	739.187 ± 100.1B
Mix ace:asp	3,820.8 ± 1,908.5 c	555.349 ± 215.6A
Sacarina	2,225.9 ± 601.6 ab	552.046 ± 157.0A
Sacarosa	2,471.4 ± 1,027.3 ab	487.759 ± 219.9A
Sucralosa	2,094.1 ± 897.9 a	446.045 ± 145.2A

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

De lo anterior se puede deducir que los únicos grupos que difirieron estadísticamente del control (2,196.6 ± 1,179.1 pg/mL) fueron los grupos que ingirieron fructosa (3,939.3 ± 1,588.4 pg/mL) y la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K (3,820.8 ± 1,908.5).

Los resultados anteriores contrastan con los reportados en investigaciones previas por Mendoza-Pérez (2017). En dicha investigación todos los grupos de ratas macho y el grupo control presentaron menores niveles de insulina. Por ejemplo, el control tuvo una concentración de 1,029.3 pg/mL. Sin embargo, debe considerarse que la edad de los especímenes fue distinta. En la investigación de Mendoza-Pérez (2017) los especímenes

tenían aproximadamente 143 días de edad, mientras que los resultados aquí reportados corresponden a ratas de 183 días de edad. Los resultados concuerdan parcialmente con lo reportado por Mendoza-Pérez et al. (2020) quienes concluyeron que el grupo que ingería la mezcla comercial de aspartamo con acesulfamo de K difirió significativamente con respecto del control tras 197 días de ingesta de edulcorantes.

Estos hallazgos indican que, probablemente haya otros parámetros que estén influyendo. Habría que buscar las diferencias en los experimentos y constatar si esto pudiera estar causándolas.

En el caso de las ratas hembra, la Tabla 4.22 muestra que únicamente el grupo que ingirió glucosa (739.2 ± 100.1 pg/mL) presentó diferencias significativas en comparación con el control (489.9 ± 89.9 pg/mL). Al comparar los resultados entre machos y hembras se nota que hay diferencias atribuibles al género. Mientras que en los machos es la fructosa el edulcorante que eleva en mayor medida los niveles de insulina, en las ratas hembra fue la glucosa. Lo anterior concuerda con lo reportado por Galipeau et al. (2002) quienes concluyen que “las ratas hembra no desarrollan hipertensión o hiperinsulinemia con una dieta alta en fructosa, excepto después de la ovariectomía, lo que sugiere que las hormonas sexuales femeninas pueden conferir protección contra los efectos de una dieta alta en fructosa”. Si bien se sugiere que los mecanismos responsables de esta protección parecen estar relacionados con las hormonas sexuales femeninas, no se conocen exactamente dichos mecanismos.

Los niveles de insulina obtenidos en la segunda eutanasia a los 480 días de experimentación (aproximadamente 504 días de edad) se muestran en la Tabla 4.23 En la segunda eutanasia, en las ratas macho no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En las ratas hembra sí existieron diferencias significativas. Los grupos que ingirieron acesulfamo de K (545.2 ± 81.6 pg/mL), sacarosa (530.0 ± 213.6 pg/mL) y glucosa (649.0 ± 33.3 pg/mL) difirieron significativamente del control (339.0 ± 173.7 pg/mL). Con la edad, el metabolismo de los especímenes cambia, en especial en las hembras. Estos resultados parecen indicar que las hembras que han alcanzado su senescencia reproductiva son más susceptibles a cambios metabólicos provocados por el consumo de acesulfamo de K, sacarosa y glucosa y su

consumo puede elevar los niveles de insulina. Deberán indagarse las consecuencias de esta elevación de los niveles séricos de insulina.

Tabla 4.23. Niveles séricos de insulina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

Grupo	Machos (NS)	Hembras
	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	2833.9 ± 1339.0	545.2 ± 81.6 bc
Control	2810.5 ± 2004.7	339.0 ± 173.7 a
Fructosa	2570.5 ± 1538.7	491.2 ± 201.4 ab
Glucosa	3111.0 ± 1327.3	649.0 ± 33.3 c
Mix ace:asp	2702.4 ± 1861.4	411.8 ± 130.6 ab
Sacarina	2172.8 ± 922.1	465.5 ± 128.4 ab
Sacarosa	2254.2 ± 1162.4	530.0 ± 213.6 bc
Sucralosa	3094.6 ± 957.2	477.8 ± 145.7 ab

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

4.3.4. Niveles de glucagón

En la Tabla 4.24 se muestran los niveles séricos de glucagón determinados tras 12 horas de ayuno a ratas macho y hembra que consumieron durante 160 días edulcorantes. Los análisis de varianza indicaron la existencia de diferencias significativas tanto en ratas macho como en ratas hembra ($p < 0.05$).

En las ratas macho, la prueba de Duncan designó únicamente 2 grupos homogéneos designados por las letras a, b. No obstante, ningún grupo difirió con respecto del grupo control. Lo anterior concuerda con lo reportado en investigaciones previas, donde a pesar de encontrar diferencias significativas intergrupales ningún grupo difirió del control (Mendoza-Pérez, 2017). Los valores reportados en esta investigación son similares a los reportados previamente. En la investigación de Mendoza-Pérez (2017), el grupo control tuvo niveles de glucagón de 59.2 pg/mL. En la presente investigación se tuvieron niveles de glucagón para el grupo control de 43.3 ± 6.8 pg/mL.

Tabla 4.24. Niveles séricos de glucagón en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

Grupo	Machos	Hembras
	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	40.3 ± 6.4 ab	22.4 ± 6.9 A
Control	43.3 ± 6.8 ab	43.4 ± 11.6 D
Fructosa	39.1 ± 12.8 ab	23.6 ± 2.4 AB
Glucosa	36.4 ± 5.9 a	37.3 ± 9.4 CD
Mix ace:asp	45.2 ± 3.8 b	39.1 ± 10.6 CD
Sacarina	37.1 ± 11.0 a	31.6 ± 13.4 BC
Sacarosa	36.8 ± 6.0 a	53.9 ± 12.2 E
Sucralosa	39.6 ± 5.2 ab	39.3 ± 7.1 CD

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

En contraste, en las ratas hembra sí existieron grupos que difirieron significativamente del control. El grupo de acesulfamo K tuvo niveles significativamente inferiores al control. El grupo que ingirió sacarosa tuvo una elevación significativa en los niveles de glucagón en comparación con el control. De acuerdo con Kendig et al. (2015) y Mendoza-Pérez (2017), las ratas hembra son muy susceptibles a alteraciones metabólicas debidas al consumo excesivo de soluciones de sacarosa.

En la Tabla 4.25 se muestran los niveles séricos promedio de glucagón, tanto de ratas hembra como de ratas macho tras 480 días de consumo de edulcorantes. Tanto en las ratas macho como en las ratas hembra existieron diferencias intergrupales significativas ($p < 0.05$). En el caso de las ratas macho únicamente el grupo que ingirió glucosa tuvo niveles significativamente mayores al grupo control. Ningún grupo de ratas hembra tuvo concentraciones sanguíneas de glucagón superiores al control. Pero los grupos de acesulfamo de K, sacarina y sucralosa presentaron niveles significativamente inferiores. Lo anterior parece indicar que el consumo crónico de estos edulcorantes durante 480 días promovió una disminución en la secreción de glucagón. Se deberán indagar en investigaciones futuras las posibles consecuencias fisiológicas de esta disminución en los niveles de glucagón.

Tabla 4.25. Niveles séricos de glucagón en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

	Machos	Hembras
Grupo	Media \pm DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	37.9 \pm 14.9 a	35.3 \pm 7.1 a
Control	51.0 \pm 11.6 ab	47.1 \pm 9.0 b
Fructosa	42.2 \pm 1.42 ab	37.0 \pm 11.6 a
Glucosa	74.3 \pm 30.8 c	35.5 \pm 6.7 a
Mix ace:asp	37.2 \pm 16.5 a	41.4 \pm 6.6 ab
Sacarina	46.6 \pm 9.5 ab	35.8 \pm 5.3 a
Sacarosa	54.8 \pm 18.0 b	54.1 \pm 3.2 b
Sucralosa	47.3 \pm 11.5 ab	40.4 \pm 6.1 a

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

4.3.5. Niveles de grelina

A continuación, en la Tabla 4.26, se muestran los niveles de la hormona grelina, que regula el apetito, tanto de las ratas macho como de las ratas hembra tras 160 días de experimentación. Los análisis de varianza indicaron que no existieron diferencias estadísticamente significativas intergrupales ni en ratas macho ni en ratas hembra. Lo anterior concuerda con lo reportado por Mendoza-Pérez (2017).

Tabla 4.26. Niveles séricos de grelina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

	Machos (NS)	Hembras (NS)
Grupo	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	7.6± 1.2	6.8± 0.4
Control	7.2 ± 1.8	6.9 ± 0.3
Fructosa	6.8 ± 0.3	6.9± 0.2
Glucosa	6.7 ± 0.7	6.7 ± 0.3
Mix ace:asp	6.5 ± 1.0	6.9 ± 0.9
Sacarina	6.8 ± 1.0	6.9 ± 0.6
Sacarosa	6.8± 0.4	6.3 ± 1.1
Sucralosa	6.9 ± 0.8	7.0 ± 0.6

La grelina es una hormona de carácter cíclico y sus niveles fluctúan a lo largo del día. Estas fluctuaciones son a corto plazo y están íntimamente relacionadas con la ingesta de alimentos. Los niveles de grelina disminuyen con la ingesta de alimento y aumentan en los momentos de ayuno (Müller et al., 2015; Overduin et al., 2012). Por lo tanto, al tener todas las ratas el mismo tiempo de ayuno, los niveles de apetito en todos los grupos fueron similares independientemente del edulcorante que se ingiriese.

Los niveles de grelina tras 480 días de consumo de edulcorantes se muestran en la Tabla 4.27. Al igual que con la primera eutanasia, los análisis de varianza indicaron que no existieron diferencias significativas intergrupales ni en las ratas macho ni en las ratas hembra. Lo anterior se debe a que los cambios en los niveles de grelina son a corto plazo y responden principalmente a la ingesta de alimentos y el ayuno.

Tabla 4.27. Niveles séricos de grelina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

	Machos (NS)	Hembras (NS)
Grupo	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	7.1± 1.3	7.0± 0.1
Control	7.3 ± 1.0	7.2± 0.9
Fructosa	6.6 ± 0.8	6.9± 0.4
Glucosa	6.6± 0.5	6.7± 0.5
Mix ace:asp	7.0± 0.7	6.9± 0.9
Sacarina	6.3± 1.1	6.9± 0.4
Sacarosa	6.6± 0.5	6.4 ±0.7
Sucralosa	6.8 ± 0.9	6.8± 0.6

4.3.6. Niveles de leptina

Contrario a la grelina, la hormona leptina es conocida como la hormona de la saciedad. Los cambios en las concentraciones de leptina son a largo plazo y se ha descubierto que están

íntimamente relacionados con la cantidad de tejido adiposo. A mayor cantidad de tejido adiposo existen mayores niveles de leptina en sangre (Myers et al., 2008). Los niveles de leptina de las ratas macho y hembra de la primera eutanasia se muestran en la Tabla 4.28.

Tabla 4.28. Niveles séricos de leptina en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

	Machos	Hembras
Grupo	Media ± DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	1,026.5± 360.9a	1143.4± 424.8a
Control	1,343.0± 853.7a	1133.1± 284.8a
Fructosa	2,112.8± 354.3a	1953.7± 243.2bc
Glucosa	3,634.4± 996.1b	1905.7±761.8bc
Mix ace:asp	2,159.0± 917.1a	2126.4± 474.2c
Sacarina	1,093.2± 611.0a	1594.5± 182.5b
Sacarosa	2,059.7± 621.2a	3002.8± 649.5d
Sucralosa	1,798.4± 396.9a	2196.1± 281.6c

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Los análisis de varianza indicaron que existieron diferencias intergrupales tanto en las ratas macho como en las ratas hembra ($p<0.05$). En las ratas macho únicamente el grupo que ingería la solución de glucosa tuvo niveles mayores de leptina. Esto era de esperarse ya que este grupo fue el que tuvo la mayor ingesta energética. El exceso de energía es almacenado por los mamíferos en forma de tejido adiposo y a mayor cantidad de tejido adiposo mayor cantidad de leptina, ya que es el principal tejido que lo segrega (Myers et al., 2008). En la Figura 4.2 pudo apreciarse precisamente que el grupo que ingería glucosa tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal.

En el caso de las ratas hembra se observa que todos los grupos de edulcorantes, tanto calóricos como no calóricos, con excepción del acesulfamo de K, tuvieron niveles de grelina superiores al control. En la misma Figura 4.1 se aprecia precisamente que el grupo de acesulfamo de K fue el grupo con la menor cantidad de tejido adiposo.

Los resultados correspondientes a la segunda eutanasia (480 días) se muestran en la Tabla 4.29. Los análisis de varianza indicaron que tanto en las ratas hembra y macho existieron diferencias significativas ($p<0.05$). En las ratas macho el grupo que ingirió glucosa tuvo los mayores niveles de leptina lo cual concuerda con ser el grupo que tuvo la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal (ver Figura 3.3). No obstante, ni en los niveles de leptina ni en la cantidad de tejido adiposo se difirió significativamente del control.

Para el caso de las ratas hembra todos los grupos de edulcorantes, con excepción de los grupos que ingirieron acesulfamo de K y sacarina, tuvieron niveles significativamente mayores con respecto del control. No obstante, únicamente los grupos de edulcorantes nutritivos tuvieron mayores niveles de tejido adiposo retroperitoneal. Se deberá indagar más acerca de cuál fue la causa de la elevación de los niveles de leptina en el resto de los grupos.

Tabla 4.29. Niveles séricos de leptina en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

Grupo	Machos	Hembras
	Media \pm DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	1,203.5 \pm 666.2 a	813.2 \pm 146.5 a
Control	1,572.0 \pm 781.3 ab	551.7 \pm 268.8 a
Fructosa	1,314.5 \pm 544.5 a	2310.4 \pm 705.3 b
Glucosa	2,240.7 \pm 991.6 b	2282.1 \pm 459.1 b
Mix ace:asp	1,511.4 \pm 667.9 ab	2133.9 \pm 229.5 b
Sacarina	1,307.9 \pm 512.5 a	660.8 \pm 172.6 a
Sacarosa	1,506.3 \pm 845.8 ab	2789.3 \pm 634.0 c
Sucralosa	1,918.9 \pm 528.9 ab	2115.7 \pm 251.8 b

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

4.3.7. Niveles de *GIP*

En la Tabla 4.30 se muestran los resultados de los niveles séricos de la hormona *GIP* tras un consumo de 160 días. Los análisis de varianza realizados indicaron la existencia de diferencias intergrupales estadísticamente significativas ($p < 0.05$), tanto en machos como en hembras.

Tabla 4.30. Niveles séricos de *GIP* en ratas macho y hembra tras 160 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

Grupo	Machos	Hembras
	Media \pm DE (pg/mL)	
Acesulfamo de K	22.1 \pm 5.2 ab	1143.4 \pm 424.8 a
Control	29.6 \pm 3.1 bc	1133.1 \pm 284.8 a
Fructosa	40.5 \pm 4.7 d	1953.7 \pm 243.2 bc
Glucosa	30.6 \pm 4.9 c	1905.7 \pm 761.8 bc
Mix ace:asp	24.5 \pm 5.2 abc	2126.4 \pm 474.2 c
Sacarina	21.5 \pm 3.7 a	1594.5 \pm 182.5 b
Sacarosa	30.1 \pm 5.5 c	3002.8 \pm 649.5 d
Sucralosa	25.5 \pm 3.4 abc	2196.1 \pm 281.6 c

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

Para el caso de las ratas macho se encontró que únicamente el grupo que ingirió fructosa tuvo niveles significativamente mayores en comparación con el control. Lo anterior concuerda con lo reportado con la literatura. Se ha reportado que la secreción de la hormona *GIP* se

estimula por la ingesta de glúcidos simples y en especial por la fructosa (Baggio y Drucker, 2007).

En el caso de las ratas hembra, el grupo que ingirió sacarosa fue el que presentó los mayores niveles de esta hormona. Esto concuerda con lo reportado en investigaciones previas (Mendoza-Pérez, 2017). Lo anterior parece sugerir que las ratas hembra son metabólicamente más susceptibles a los efectos del consumo excesivo de sacarosa.

Tanto en las ratas hembra como en las ratas macho se encontró la existencia de diferencias intergrupales significativas (Tabla 4.31) ($p < 0.05$). En el caso de las ratas macho, los grupos que tuvieron niveles de *GIP* significativamente mayores fueron aquellos que ingirieron fructosa y glucosa. Para el caso de las hembras fueron los grupos de acesulfamo de K, glucosa y sacarosa. De acuerdo con Brown y Rother (2012), los edulcorantes artificiales no logran un estímulo suficiente para aumentar la secreción de la hormona *GIP*. Asimismo, se sabe que la secreción de la hormona *GIP* es estimulada por los glúcidos simples (Baggio y Drucker, 2007).

Tabla 4.31. Niveles séricos de *GIP* en ratas macho y hembra tras 480 días de consumo de edulcorantes y un ayuno de 12 horas

Grupo	Machos	Hembras
	Media \pm DE	
Acesulfamo de K	21.9 \pm 13.0 a	44.1 \pm 3.2 b
Control	23.8 \pm 8.5 a	29.3 \pm 9. 2a
Fructosa	45.9 \pm 10.2 bc	31.2 \pm 4.9 ab
Glucosa	47.6 \pm 13.8 c	36.4 \pm 4.4 b
Mix ace:asp	37.6 \pm 13.8 abc	26.7 \pm 6. 5a
Sacarina	27.0 \pm 7.5 abc	28.3 \pm 7. 5a
Sacarosa	42.2 \pm 10.2 abc	46.9 \pm 6.0 b
Sucralosa	25.3 \pm 12.2 ab	32.8 \pm 5.2 ab

Nota: Grupos que no comparten la misma letra difieren estadísticamente, método de Duncan al 95% de confianza

4.4. Discusión integrada de los resultados

Con base en los resultados y la discusión de estos, a continuación, se realiza un análisis integrador de los niveles de actividad de las diversas enzimas. En el caso de la glucoquinasa se apreció que en las ratas macho a los 480 días los grupos que bebieron sacarosa y fructosa difirieron significativamente con el control (Tabla 4.3). Al observar los niveles séricos de glucosa (Figura 4.18) se aprecia que los grupos que bebieron sacarosa y fructosa tuvieron niveles elevados. Lo anterior probablemente esté relacionado con el hecho de que la

glucoquinasa está sujeta a regulación por la proteína reguladora de la glucoquinasa (*GKRP*). La *GKRP* transporta al núcleo a la *GK* cuando los niveles de glucosa son bajos y la libera en el citosol cuando son elevados (Matschinsky et al., 2006; van Schaftigen, 2020). Por lo tanto, se puede plantear la hipótesis de que en los grupos de sacarosa y fructosa la glucoquinasa se encontró en una mayor proporción en el citoplasma de las células en comparación con los otros grupos de edulcorantes. Sin embargo, se debe recordar que la regulación de estas enzimas es muy compleja e involucra otras vías de regulación. Por ejemplo, se sospecha que la insulina puede aumentar la actividad de la glucoquinasa a través del factor de transcripción *SREBP-1c*. En las ratas macho no se encontraron diferencias significativas en los niveles de insulina (Tabla 4.23). Por ello ha sido importante estudiar también a las ratas hembra, ya su metabolismo es muy diferente.

En el caso de las ratas hembra se observó esta misma relación entre los niveles de glucosa sérica y la glucoquinasa. El grupo que presentó los mayores niveles séricos de glucosa fue el grupo que bebió sacarosa. Asimismo, los extractos hepáticos de las ratas hembra que bebieron sacarosa presentaron los mayores niveles de actividad. Lo anterior parece indicar que probablemente exista una correlación entre los niveles séricos de glucosa y los niveles de la glucoquinasa en los extractos hepáticos.

Asimismo, en las ratas hembra el grupo que bebió glucosa sí presentó niveles de actividad de la glucoquinasa superiores al control. Al analizar sus niveles de glucosa sérica estos no difirieron con los del grupo control, pero los niveles de insulina de este grupo sí fueron superiores. Por lo tanto, en este caso se puede suponer que el incremento en la actividad de la glucoquinasa se debió a la regulación por insulina. Sin embargo, se deben realizar futuras investigaciones para corroborar estas nuevas hipótesis.

En el caso de la fosfofructoquinasa-1 se observa que existieron diferencias significativas en las 2 eutanasias y para ambos géneros. Pero, de manera general, se puede decir que los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos tuvieron los mayores niveles de actividad. La *PFK-1* está sujeta a una compleja regulación alostérica, por la acción de las hormonas insulina y glucagón y a nivel transcripcional por los factores de transcripción *SREBP-1c* y *ChREBP* (Berg et al., 2002a; Mor et al., 2011). Como se aprecia en la Tabla 4.22 los niveles de insulina

de los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos fueron más elevados que el control a los 160 días. Probablemente esta pudiera ser la causa de la mayor actividad enzimática de la *PFK-1* observada en sus extractos hepáticos. Adicionalmente, se observa en la Tabla 4.24 que estos grupos tuvieron niveles de glucagón similares al control. Sin embargo, esta hipótesis debe corroborarse con futuras investigaciones.

Los niveles de actividad de la piruvato quinasa hepática (*PKL*) siguen una tendencia similar a los de la *PFK-1*. De forma general, los grupos de edulcorantes nutritivos (glucosa, fructosa y sacarosa) presentaron los mayores niveles de actividad en sus extractos hepáticos, tanto a los 160 días como a los 480 días. Nuevamente, esto parece relacionarse con los niveles de insulina. Se debe recordar que la insulina activa la transcripción de los genes codificantes para *PKL* y, además, está involucrada en la activación/desactivación de la *PKL* mediante fosforilaciones y desfosforilaciones (Uyeda, 2021). No obstante, los niveles de insulina de las ratas macho a los 480 días no difirieron significativamente del control (Tabla 4.23). Sin embargo, sí existieron diferencias significativas en los niveles de actividad de los extractos hepáticos. Por lo tanto, algún otro mecanismo fuera del alcance de los resultados de la presente investigación podría ser el responsable de este incremento, por lo que deberán realizarse futuras investigaciones encaminadas a tratar de encontrar los mecanismos involucrados en este incremento.

En el caso de la acetil coenzima A carboxilasa, *ACC*, únicamente se encontraron diferencias significativas en las muestras de extractos hepáticos de la primera eutanasia. La *ACC* es regulada por fosforilaciones/desfosforilaciones. El glucagón inhibe la *ACC* y la insulina la estimula. De nueva cuenta esto podría explicar los mayores niveles de actividad de la *ACC* en los extractos hepáticos, ya que los niveles de insulina fueron superiores en los grupos de edulcorantes nutritivos. En relación con el glucagón, los resultados no mostraron una tendencia clara debido que se sabe que el glucagón inhibe a esta enzima, pero los grupos que ingirieron edulcorantes nutritivos también presentaron niveles elevados de glucagón en su suero sanguíneo. Este hallazgo también indica que deben seguirse estudiando los posibles mecanismos de acción de estos edulcorantes.

Otro factor importante en la regulación de la ACC es el estado energético de las células. La ACC se inactiva cuando la carga energética de las células es baja. Al observar la Figura 4.17 se puede apreciar que estos grupos fueron los que teóricamente ingirieron la mayor cantidad de energía. Por tanto, se puede plantear la hipótesis de que la relación *ATP/AMP* era elevada en estos grupos. Esto cambia la actividad de la quinasa dependiente de AMP. Lo anterior deberá corroborarse con otras investigaciones a futuro.

Finalmente, con relación a la sintasa de ácidos grasos (FAS) se siguió la misma tendencia observada de forma general con las demás enzimas: Los grupos de edulcorantes nutritivos tuvieron los mayores niveles de actividad enzimática en los extractos hepáticos. En este caso, la regulación se da principalmente por los factores de transcripción como *SREBP-1c*, *ChREBP*, entre otros. Un estado energético positivo promueve también una mayor actividad de la FAS. Lo anterior se debe a que los excedentes energéticos son almacenados como ácidos grasos.

Destacan ciertos casos puntuales de edulcorantes no nutritivos que, si bien no provocaron un incremento tan elevado como los edulcorantes nutritivos, su consumo si provocó que existieran niveles de actividad de la FAS superiores a los de los grupos control. Tal fue el caso de la sacarina en las ratas macho a los 160 días o la sucralosa y el acesulfame de K en las ratas hembra a los 480 días. Los mecanismos implicados en este incremento no están elucidados y deberán indagarse en futuras investigaciones.

Adicionalmente, se puede apreciar que aquellos grupos que presentaron los mayores niveles de actividad de la sintasa de ácidos grasos, FAS, fueron los grupos que presentaron los niveles más elevados de triglicéridos en sangre y con una mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal. A su vez, los grupos con la mayor cantidad de tejido adiposo retroperitoneal fueron los que presentaron las mayores concentraciones de la hormona leptina.

De forma general se puede apreciar que los incrementos de los niveles de actividad de las enzimas se pueden correlacionar con las diferencias encontradas en los niveles de la hormona insulina.

En algunas de las enzimas analizadas los grupos de ratas que bebieron edulcorantes no nutritivos mostraron incrementos en los niveles de actividad enzimática. Esto demuestra que los edulcorantes no nutritivos no son metabólicamente inertes y que sí pueden influir, aunque en menor medida que los nutritivos, en los niveles de actividad específica de las enzimas analizadas. Los mecanismos por lo que esto ocurre no están elucidados y escapan del alcance de la presente investigación. Por lo tanto, en futuras investigaciones se deberán seguir indagando.

Los factores de transcripción *SREBP-1c* y *ChREBP* inducen la expresión de genes codificantes de las enzimas de la glucólisis y lipogénesis (Ameer et al., 2014; Baraille et al., 2015; López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2014). Muy probablemente estos factores influyeron en las diferencias observadas de los niveles de actividad de las diversas enzimas analizadas. Es por ello por lo que en futuras investigaciones se les deberá prestar especial énfasis y elucidar si su transcripción es estimulada por el consumo de edulcorantes no nutritivos.

Con base en estos resultados y la discusión derivada de ellos en el siguiente y último capítulo se dan las conclusiones derivadas de esta investigación y las perspectivas de investigación futura que permitan elucidar algunas incógnitas encontradas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis, el objetivo general y los objetivos particulares, puede concluirse lo siguiente:

Los niveles de actividad enzimática de la glucoquinasa, la fosfofructoquinasa-1, la piruvato quinasa, la acetil coenzima A carboxilasa en los extractos hepáticos dependieron del tipo de edulcorante ingerido.

La tendencia general observada fue que los grupos que consumieron edulcorantes nutritivos (glucosa, fructosa y sacarosa) presentaron los mayores niveles de actividad enzimática de todas las enzimas estudiadas en los extractos hepáticos.

Los grupos que ingirieron sacarina tuvieron significativamente mayores niveles, con respecto al control, de actividad enzimática de la fosfofructoquinasa-1, la piruvato quinasa-1, la sintasa de ácidos grasos y la acetil coenzima A carboxilasa.

El consumo crónico de sucralosa solamente incrementó los niveles de actividad de la glucoquinasa.

El consumo de la mezcla de aspartame con acesulfame incrementó significativamente, con respecto del control, los niveles de actividad de la piruvato quinasa y de la sintasa de ácidos grasos.

Todos los incrementos en los niveles de actividad ocasionados por los edulcorantes no nutritivos fueron menores a los incrementos provocados por el consumo de los edulcorantes nutritivos.

De forma general la mayor parte de estos incrementos se pueden correlacionar con las concentraciones de insulina.

Los incrementos en los niveles de actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la acetilcoenzima A carboxilasa (ACC) en los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos estuvo en concordancia con aquellos grupos que presentaron los mayores niveles séricos de triglicéridos, tejido adiposo retroperitoneal y niveles de la hormona leptina.

Existió una correlación positiva entre los niveles de glucosa sérica y los niveles de actividad de la glucoquinasa. A mayores niveles de glucosa sérica mayores niveles de actividad de la *GK* en los extractos hepáticos.

El consumo excesivo de edulcorantes nutritivos conlleva al desarrollo de hipertrigliceridemia.

Los especímenes fueron capaces de regular su ingesta energética ya que en aquellos grupos en donde la bebida aportaba una cantidad considerable de energía (edulcorantes nutritivos) se reducía considerablemente la ingesta de alimento.

La mortalidad dependió del tipo de edulcorante ingerido y del género, siendo mayor en los machos que bebieron fructosa.

Existieron incrementos significativos intergrupales en los distintos parámetros evaluados debidos al consumo de edulcorantes. Sin embargo, estos incrementos significativos aparentemente no propiciaron el desarrollo patologías relevantes.

El consumo de una dieta balanceada junto con los edulcorantes probablemente atenuó los posibles efectos adversos.

5.2. Recomendaciones

Considerando los resultados obtenidos experimentalmente, las limitaciones experimentales debidas a la pandemia de COVID-19 y los análisis estadísticos de los datos y las nuevas incógnitas obtenidas en torno a los posibles efectos del consumo de edulcorantes nutritivos y no nutritivos se proponen las siguientes recomendaciones:

Determinar la expresión relativa de estos factores de transcripción *SREBP-1c* y *ChREBP* mediante el método de Western blot en los extractos hepáticos.

Correlacionar los niveles de *SREBP-1c* y *ChREBP* con los diversos niveles de actividad enzimática de las enzimas reguladoras de la glucólisis y lipogénesis. Lo anterior con la finalidad de poder determinar si pueden atribuirse los cambios en niveles de actividad a los niveles de expresión de estos factores de transcripción.

Realizar análisis de componentes principales para conocer cuáles son los principales factores que contribuyen a la variación de los niveles de actividad enzimática.

Indagar el efecto del consumo de edulcorantes sobre enzimas de otras rutas metabólicas como lo son la gluconeogénesis y gluconeogénesis.

Evaluar el efecto de la interacción de la dieta con el consumo de edulcorantes ya que, aparentemente, a pesar de existir diferencias significativas en diversos parámetros no se desarrollaron patologías. No obstante, de acuerdo con la literatura el consumo de edulcorantes junto con dietas desbalanceadas provoca alteraciones mucho más graves.

Realizar los estudios histológicos de los diversos órganos, con especial énfasis en aquellos grupos de ratas que fallecieron antes de la eutanasia, incluida la rata con aparente daño en el hígado (Figura 3.1).

Corroborar mediante estudios histológicos la presencia de hemangiosarcoma en un espécimen macho que bebió fructosa, el sarcoma de tejidos blandos de la rata que bebió

glucosa y los adenomas de hipófisis observados en ratas macho que bebieron fructosa y sacarosa.

Realizar la determinación de los niveles de la AST, la ALT y del 8-OHdG en sangre ya que, de acuerdo con Azeez et al. (2019) y Andrejić et al. (2013), son indicadores de daño hepático. En sus estudios encontraron que el consumo de sacarina elevaba dichos indicadores.

Indagar en futuras investigaciones si existe una relación causa-efecto entre el consumo de edulcorantes y la aparición de los adenomas de hipófisis.

Continuar con la experimentación en ambos géneros de roedores ya que el género resultó ser un factor significativo.

ANEXOS

ANEXO A. Descripción detallada de la determinación de insulina, glucagón, leptina, grelina y GIP

Para realizar la determinación de las hormonas se descongelaron por completo las muestras de suero sanguíneo de las 160 ratas. Una vez descongeladas se agitó en un equipo vortex durante 30s a una velocidad de 3200 rpm y, posteriormente, se centrifugaron a 3000 rpm ($700 \times g$) durante cinco minutos antes de la realización de las pruebas de las hormonas. Todas las muestras fueron almacenadas en microtubos de centrifuga de 1.5mL a 4°C durante el desarrollo de la determinación.

a) Preparación de los reactivos para la técnica de fluoroinmunoensayo

1. Preparación de las perlas con anticuerpos inmovilizados

Para la preparación de las microesferas con anticuerpos inmovilizados cada vial de perlas con anticuerpos fue sometido a un baño de sonicación durante 30 s y se agitó en un *vórtex* a 3200 rpm ($700 \times g$) durante 1 min. Se añadieron 150 μ L de cada vial de perlas con anticuerpos a la botella de mezclado (incluida en el MILLIPLEX® MAP Kit) y se llevó a un volumen final de 3.0 mL con diluyente para perlas (reactivo suministrado por el proveedor). Una vez mezcladas las perlas se agitaron muy bien en un *vórtex* a 3200 rpm ($700 \times g$) durante 30 s.

2. Preparación de los controles de calidad

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

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

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

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

4. Preparación de la matriz de suero

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

5. Preparación del estándar de la hormona metabólica de rata

Para la preparación del estándar se reconstituyeron los estándares de las hormonas de rata con 250 μL de agua desionizada y se agitaron los viales en un equipo *vórtex* a 3200 rpm (800 \times g) durante 30 segundos. Se dejó que los viales reposaran durante 10 minutos. Posteriormente, se volvieron a agitar en el *vórtex* para luego transferir los estándares a tubos Eppendorf® de 1.5mL. Éstos fueron utilizados como el estándar No. 7.

6. Preparación de los estándares de trabajo

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

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

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

Procedimiento del fluoroinmunoensayo

Para realizar el fluoroinmunoensayo se siguen los pasos siguientes:

1. Se añadieron 200 μL de *buffer* de ensayo en cada pocillo de la placa de ensayo. Se selló y se mezcló con un agitador de placas a 50 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
2. Se decantó el *buffer* de ensayo y se eliminó la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándola sobre toallas absorbentes varias veces.
3. Se colocaron 25 μL de la solución matriz a los blancos, los estándares y los pocillos de control.
4. Se adicionaron 25 μL de *buffer* de ensayo al blanco (0 pg/mL estándar) y a los pocillos de las muestras.

5. Se añadieron 25 μL de cada estándar en los pocillos correspondientes en la placa de ensayo y se incorporaron 25 μL de muestra en los pocillos apropiados. Posteriormente se agitó en un equipo *vórtex* a 3200 rpm la botella de mezclado y se añadieron 25 μL a cada pocillo.
7. Se selló la placa con un sellador de placas (proporcionado en el MILLIPLEX® MAP Kit) y, posteriormente, se envolvió la placa con papel aluminio y se incubó con agitación en un agitador de placas a 50 rpm durante toda la noche (20 horas) a 4°C.
8. Pasadas las 20 horas los reactivos y la placa de ensayo se atemperaron a 20-25°C. Se retiró el contenido de los pocillos y se lavó la placa por 3 veces, con el *buffer* de lavado.
9. Después de los lavados se añadieron 50 μL de anticuerpos de detección en cada pocillo.
10. Se selló y se cubrió la placa con papel de aluminio incubándose en un agitador de placas a 50 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
11. Se añadieron 50 μL de estreptavidina-ficoeritrina a cada uno de los pocillos que contienen los 50 μL de anticuerpos de detección.
12. Se reselló y se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó incubar con agitación en un agitador de placas durante otros 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Se retiró con cuidado el contenido de los pocillos y se lavó la placa con el *buffer* de lavado.
14. Posteriormente a los lavados se les añadieron 100 μL de *sheath fluid* (reactivo suministrado por el proveedor) a todos los pocillos y se re-suspendieron las perlas en un agitador de placas a 50 rpm durante 5 minutos.
15. Después de la resuspensión de las perlas se leyó la placa en un equipo Luminex 200™, empleando el software FLEXMAP 3D™ para cuantificar el nivel de fluorescencia emitido por cada una de las muestras.
16. Una vez leídas las muestras se analizaron los datos de intensidad de fluorescencia media (*MFI* en inglés) utilizando el método de curvas logísticas para el cálculo de las concentraciones de *GIP* en las muestras (EMD Millipore, 2018). Una vez obtenidos los datos se procedió a su análisis estadístico

ANEXO B. Curva de crecimiento de las ratas macho y hembra de la estirpe Wistar

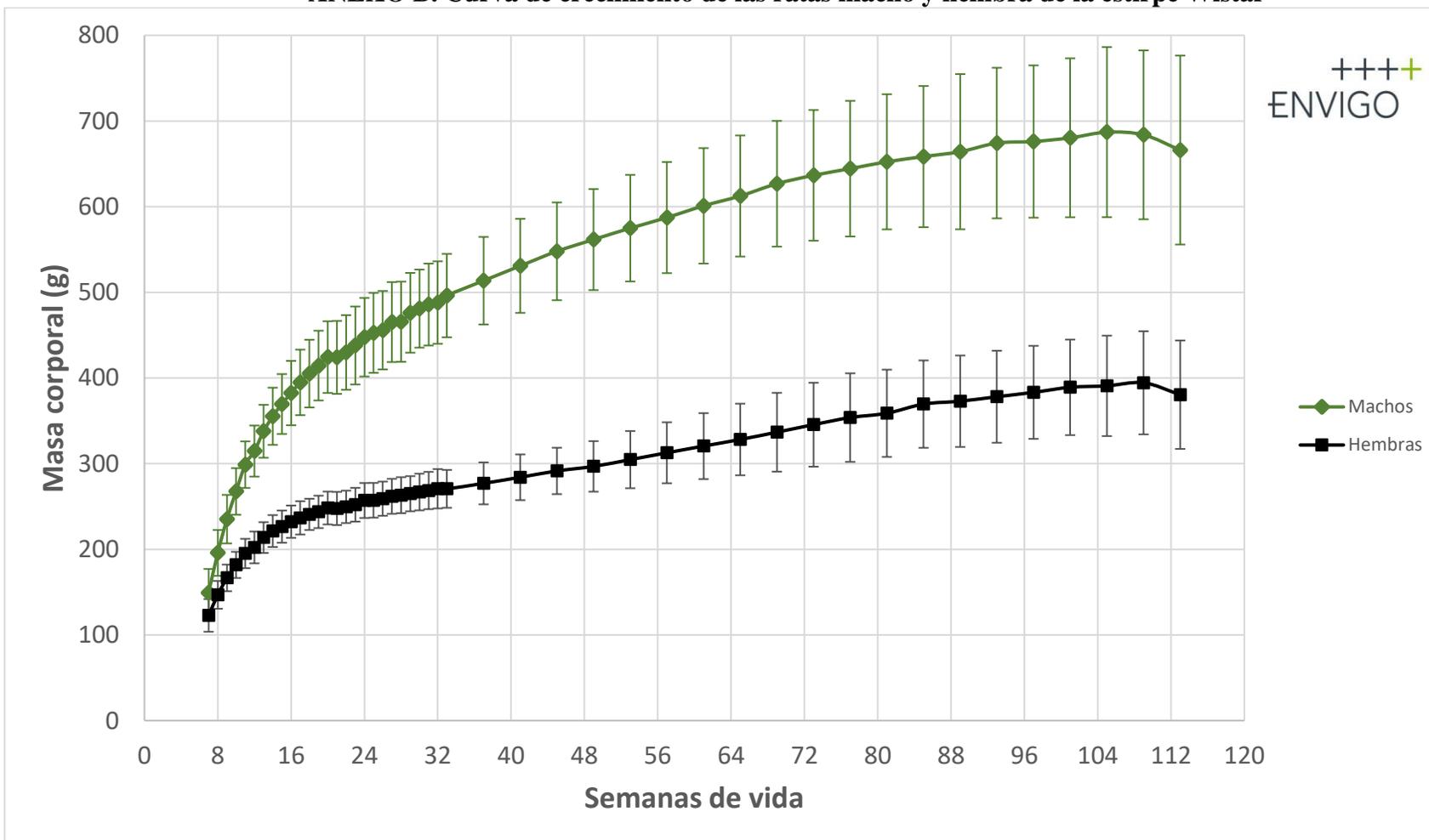


Figura B.1. Curva de crecimiento de ratas estirpe Wistar (RccHan®: Wist) durante 104 semanas (la determinación comienza en la semana 7 de vida y termina en la 113). Media ± 2 DE. Adaptada de Envigo (2008) y Envigo (2016)

ANEXO C. Disposición de residuos de la investigación

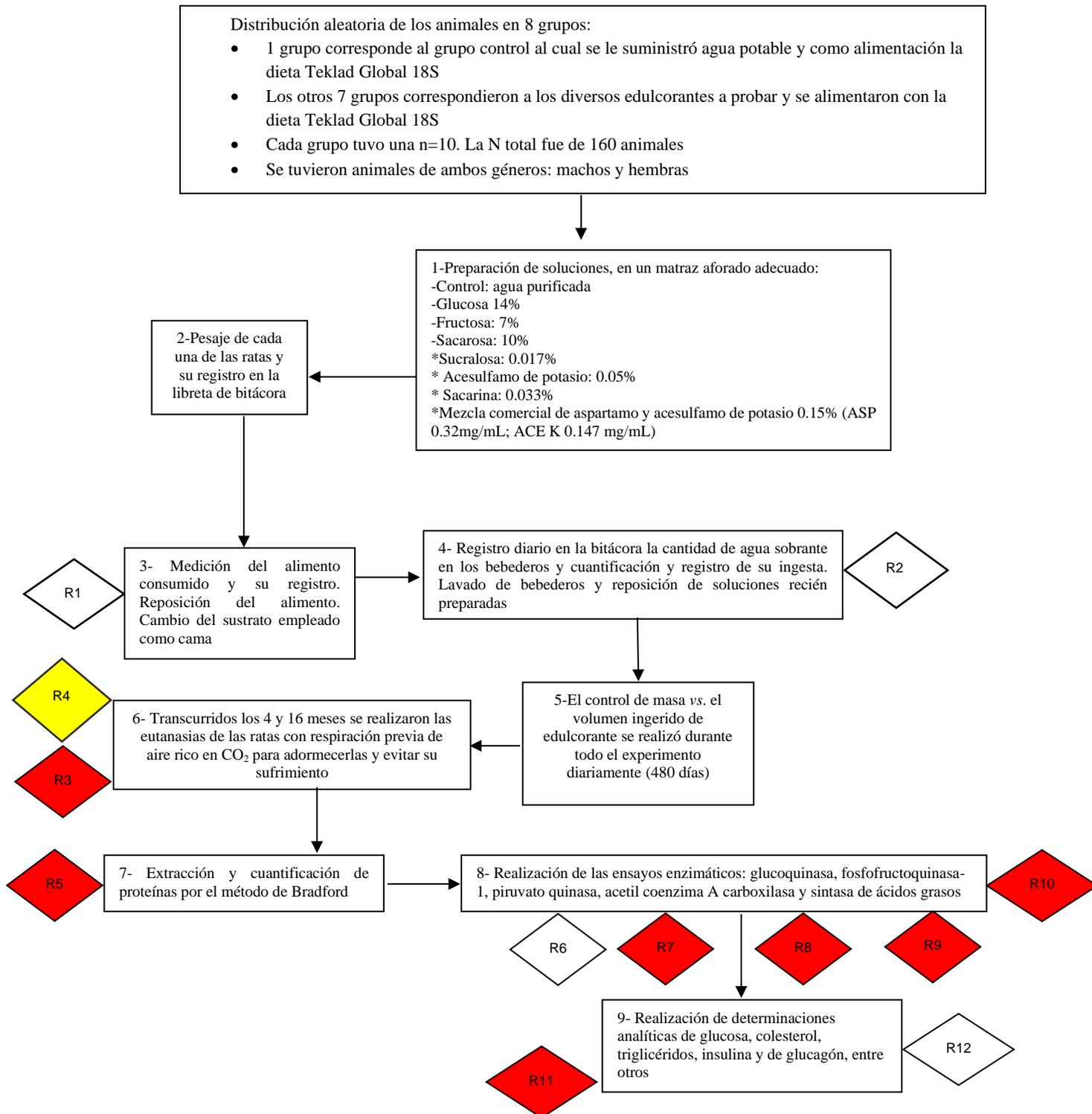


Figura C.1 Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación

R1: El sustrato empleado como cama (aserrín) y restos de heces de los roedores. Son residuos orgánicos no peligrosos y son desechados por el personal de la UNEXA en el depósito correspondiente.

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

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

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

R5: Solución amortiguadora de lisis RIPA: NaCl 137mM, KCl 2mM, K_2HPO_4 8.1mM, KH_2PO_4 1.5 mM, octilfenoxi poli (etilenoxi)etanol 0.1%, deoxicolato de sodio 0.5%, dodecilsulfato de sodio 0.1%, NaF 1mM, Na_3VO_4 2mM, azida de sodio 0.006%; reactivo de Bradford: H_3PO_4 10%, etanol 5%, azul de Coomassie G 0.01%. Se etiqueta con todos los datos requeridos y se entrega al personal del Laboratorio 301 del Conjunto E para ser entregado en las recolectas periódicas de los residuos para su gestión por parte de la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química de la UNAM.

R6: Mezcla de reacción para la determinación de la glucoquinasa: Tris 60mM, MgCl_2 20mM, ATP 5mM, glucosa 12mM, 0.9 mM NADP^+ y 10 U/mL de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa. Residuos no peligrosos.

R7: Mezcla de reacción para la determinación de la fosfofructoquinasa-1: 25mM de glicilglicina, 25mM β -glicerodifosfato de sodio, 6 mM MgCl_2 , 1mM fructosa-6-fosfato, 1 mM ATP, 0.25 mM NADH, 0.1 mM ditiotreititol, 0.6 U/mL de aldolasa, 0.3 U/mL de triosafosfato isomerasa (*TPI*) y 0.3 U/mL de glicerofosfato deshidrogenasa (*GPDH*). Se etiqueta con todos los datos requeridos y se entrega a personal del laboratorio 301 del conjunto E para ser entregado en las recolectas periódicas de los residuos para su gestión por parte de la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química de la UNAM.

R8: Mezcla de reacción para la determinación de la piruvato quinasa: 45 mM imidazol-HCl, 108 mM KCl, 5.6 mM MgSO_4 , 1.5mM ADP, 0.22mM NADH, 1.5mM fosfoenolpiruvato y 1 U/mL de LDH. Se etiqueta con todos los datos requeridos y se entrega al personal del Laboratorio 301 del Conjunto E para ser entregado en las recolectas periódicas de los residuos para su gestión por parte de la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química de la UNAM.

R9: Mezcla de reacción para la determinación de la acetil coenzima A carboxilasa: K_2HPO_4 81mM, KH_2PO_4 15 mM, KHCO_3 15mM, MgCl_2 5mM, ATP 5mM, acetil coenzima A 1mM, biotina 3mg/L, albúmina sérica bovina 1 mg/mL, CF_3COOH 1.4%, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) 0.1 mg/mL, oxaloacetato 20mM. Se etiqueta con todos los datos requeridos y se entrega al personal del Laboratorio 301 del Conjunto E para ser entregado en las recolectas periódicas de los residuos para su gestión por parte de la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química de la UNAM.

R10: Mezcla de reacción para la determinación de la sintasa de ácidos grasos: 210 mM de KH_2PO_4 , 290 mM de K_2HPO_4 , 33 μM de acetil-Coenzima A, 100 μM de malonil-CoA, 100 μM de NADPH, 1mM de EDTA, 1 mM de β -mercaptoetanol. Se etiqueta con todos los datos requeridos y se entrega al personal del Laboratorio 301 del conjunto E para ser entregado en las recolectas periódicas de los residuos para su gestión por parte de la Unidad de Gestión Ambiental (UGA) de la Facultad de Química de la UNAM

R11: Tiras reactivas Acutrend Plus® de Roche® para la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos con restos de sangre. Se almacenan en bolsas rojas de residuos biológico-infecciosos y son colocados en los contenedores adecuados en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA). Se almacenan temporalmente hasta que una compañía recolectora, a través de la UGA de la Facultad de Química de la UNAM, los lleva a incineración.

R12: Reactivos suministrados en el Milliplex Map Kit para la determinación de las hormonas insulina, glucagón, leptina, grelina. Se almacena en un recipiente adecuado. Se etiqueta con todos los datos requeridos y es gestionado por personal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

REFERENCIAS

- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N. 2014. *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism*, 63, 895-902
- Andrejić, B. M., Mijatović, V.M., Samojlik, I.N., Horvat, O.J., Čalasan, J.D., Đolai, M.A. 2013. The influence of chronic intake of saccharin on rat hepatic and pancreatic function and morphology: Gender differences. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(2), 94-99. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2013.2372>.
- Ascensia. 2017. Guía del usuario. Sistema de monitoreo de glucosa en sangre Contour TS. Consultado el 12 de junio de 2021. Recuperado de https://www.ascensia.com.mx/siteassets/products/contour-ts/85676148_cntrts_ug_es_fpbp_v3_c.pdf.
- Azeez, O.H., Alkass, S.Y., Persike, D.S. 2019. Long-term saccharin consumption and increased risk of obesity, diabetes, hepatic dysfunction, and renal impairment in rats. *Medicina (Lithuania)*, 55(10), 681. <https://doi.org/10.3390/medicina55100681>.
- Baduń, S. 2006. *Química de los Alimentos*. Pearson Education. 4ª ed., pp. 528-531. Ciudad de México, México.
- Baggio, L.L., Drucker, D.J. 2007. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132, 2131-2157. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.054>.
- Bakal, A.I., O'Brien-Nabors, L. 2011. Saccharin. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3ª ed., pp.151-170. Nueva York, EE. UU.
- Baraille, F., Planchais, J., Dentin, R., Guilmeau, S., Postic, C. 2015. Integration of ChREBP-mediated glucose sensing into whole body metabolism. *Physiology*, 30, 428-437. <https://doi.org/10.1152/physiol.00016.2015>.
- Barsoum, N.J., Moore, J.D., Gough, A.W., Sturgess, J.M., De la Iglesia, F.A. 1985. Morphofunctional investigations on spontaneous pituitary tumors in Wistar rats. *Toxicologic Pathology*, 13(3), 200–208.
- Bassoli, A., Merlini, L. 2003. Sweeteners | Intensive. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., ed., Academic Press, 2ª ed., pp. 5688–5695. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01172-x>.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002a. The glycolytic pathway is tightly controlled. En *Biochemistry*, W.H. Freeman, 5ª ed., Sección 16.2. Nueva York, EE. UU. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22395/>.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. 2002b. Acetyl coenzyme A carboxylase plays a key role in controlling fatty acid metabolism. En *Biochemistry*, W. H. Freeman, 5ª ed., Sección 22.5. Nueva York, EE. UU. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22381/>.
- Bergmeyer, H.U., Grassl, M., Walter, H.E. 1983. Reagents for enzymatic analysis. En *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. ed., Verlag Chemie, 3ª ed., Vol. II, pp. 222-223. Deerfield Beach, EE. UU.
- Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., Lu, K. 2017a. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLOS ONE*, 12(6), 1–16.
- Bian, X., Tu, P., Chi, L., Gao, B., Ru, H., Lu, K. 2017b. Saccharin induced liver inflammation in mice by altering the gut microbiota and its metabolic functions. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 530–539.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., Popkin, B. M. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537-543 <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>.

- Brown, R., Rother, K.I. 2012. Non-nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 97(8), 2597-2605.
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., Lee, W.M. 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 34(2), 223–227. <https://doi.org/10.1042/bst0340223>.
- Cardenas, J.M., Dyson, R.D. 1973. Bovine pyruvate kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(20), 6938–6944.
- Castrejón, V., Carbó, R., Martínez, M. 2007. Mecanismos moleculares que intervienen en el transporte de la glucosa. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, 26(2), 49-57.
- Chong, M.F.F., Fielding, B.A., Frayn, K.N. 2007. Metabolic interaction of dietary sugars and plasma lipids with a focus on mechanisms and *de novo* lipogenesis. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(1), 52–59.
- Cohen, S. M., Cano, M., Garland, E.M., John, M.S., Arnold, L.L. 1995. Urinary and urothelial effects of sodium salts in male rats. *Carcinogenesis*, 16(2), 343–348. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.2.343>.
- Cohen, S.M. 2010. The role of cell proliferation in the etiology of neoplasia. En *Comprehensive Toxicology*, McQueen, C.A., ed., Elsevier, 2ª ed., Vol. 14, pp. 229-253. Ámsterdam, Países Bajos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.01412-3>.
- Cong, W., Wang, R., Cai, H., Daimon, C. M., Scheibye-Knudsen, M., Bohr, V. A., Turkin, R., Wood, W. H., Becker, K. G., Moaddel, R., Maudsley, S., Martin, B. 2013. Long-Term artificial sweetener acesulfame potassium treatment alters neurometabolic functions in C57BL/6J mice. *PLOS ONE*, 8(8), e70257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070257>.
- Creative Diagnostics. 2018. Total protein extraction by RIPA. Recuperado el 17 de mayo de 2018. [En línea]. Disponible en <https://www.creative-diagnostics.com/total-protein-extraction-by-ripa.htm>
- Díaz-Hernández, D.P., Herrera-Burgos, L.C. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA*, 15(3), 179-189.
- Denechaud, P.D., Dentin, R., Girard, J., Postic, C. 2008. Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Letters*, 582(1), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.084>.
- 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. Ciudad de México, México.
- Dunaway, G.A., Weber, G. 1974. Rat liver phosphofructokinase isozymes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 162(2), 620–628.
- Dybkaer, R. 2002. The tortuous road to the adoption of katal for the expression of catalytic activity by the general conference on weights and measures. *Clinical Chemistry*, 48(3), 586–590. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.3.586>.
- Elcock, M., Morgan, R.W. 1993. Update on artificial sweeteners and bladder cancer. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 17(1), 35–43. <https://doi.org/10.1006/rtph.1993.1004>.

- Elkatry, O. 2011. Nonalcoholic fatty liver disease: Regulation of glucose and fat metabolism in the liver by Carbohydrate Response Element Binding Protein (ChREBP) and impact of dietary influence. (Tesis de Doctorado en Ciencias). Technische Universität Berlin. Berlín, Alemania. <http://dx.doi.org/10.14279/depositonce-2986>.
- Ellwein, L.B., Cohen, S. M. 1990. The health risks of saccharin revisited. *Critical Reviews in Toxicology*, 20(5), 311–326. <https://doi.org/10.3109/10408449009089867>.
- EMD Millipore. 2018. Rat metabolic magnetic bead panel 96 well plate assay #RMHAG-84K. Billerica, EE. UU.
- Envigo. 2008. Historical control data of body weights, food consumption and water consumption in Hsd Rcc HanTM: WIST, Wistar Hannover Rats. Recuperado el 21 de junio 2019. [En línea]. Disponible en <https://www.envigo.com/products-services/research-models-services/models/research-models/rats/outbred/wistar-han-outbred-rat/hsdhanwist/>.
- Envigo. 2016. Curva de crecimiento. Recuperado el 21 de junio 2019 [En línea]. Disponible en <https://www.Envigo.com/resources/growth-curves/wi-gc-sept2015.pdf>.
- Envigo. 2018. Historical control data of clinical biochemistry in Hsd Rcc HanTM: WIST, Wistar Hannover Rats. Recuperado el 23 de octubre de 2018. [En línea]. Disponible en https://www.envigo.com/resources/data-sheets/hcd_clinical-biochemistry_kopiervorlage.pdf.
- Farid, A., Hesham, M., El-Dewak, M., Amin, A. 2020. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(10), 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.019>.
- Feijó, F. de M., Ballard, C.R., Foletto, K.C., Batista, B.A.M., Neves, 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.
- Ferreira, E.B., de-Assis-Rocha-Neves, F., Duarte-da-Costa, M.A., Alves-do-Prado, W., de-Araújo-Funari-Ferri, L., Bazotte, R.B. 2006. Comparative effects of *Stevia rebaudiana* leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis. *Planta Medica*. 72(8), 691–696.
- Foletto, K.C., Batista, B.A.M., Neves, A.M., Feijó, F. de M., Ballard, C.R., Ribeiro, M.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.
- Fox, S.I. 2011. *Fisiología Humana*. McGraw-Hill, 12^a ed., pp. 106-108. Ciudad de México, México.
- Fu, Z., R. Gilbert, E., Liu, D. 2013. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Current Diabetes Reviews*, 9(1), 25–53. <https://doi.org/10.2174/1573399811309010025>.
- Gaisano, H.Y., MacDonald, P., Vranic, M. 2012. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Frontiers in Physiology*, 3(349), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00349>.
- Galipeau, D., Verma, S., McNeill, J.H. 2002. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 283(6), H2478–H2484. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00243.2002>.
- Goldsmith, L.A., Merkel C.M. 2011. Sucralose. En *Alternative Sweeteners*. O'Brien Nabors, L., ed., Editorial Marcel Dekker, 3^a edición, pp.185-209. Nueva York, EE. UU.

- Goward, C.R., Hartwell, R., Atkinson, T., Scawen, M.D. 1986. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemical Journal*, 237(2), 415–420.
- Griffin, M.J., Sul, H.S. 2004. Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: Roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life*, 56(10), 595–600. <https://doi.org/10.1080/15216540400022474>.
- Gupta, S., Kalra, S., Bharihoke, V., Dhurandhar, D. 2014. Sucralose induced pancreatic toxicity in albino rats: Histomorphological evidence. *Journal of Morphological Sciences*, 31(02), 123–127. <https://doi.org/10.4322/jms.073614>.
- Gutiérrez, J.P., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M. 2012. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Guzmán-Gómez, M.B. 2013. Efecto de la ingesta crónica de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo animal en la ganancia de masa corporal a lo largo de 270 días. (Tesis profesional de Química de Alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Gwak, M. J., Chung, S. J., Kim, Y. J., Lim, C. S. 2012. Relative sweetness and sensory characteristics of bulk and intense sweeteners. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 889–894. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0115-0>.
- Habegger, K., Heppner, K.M., Geary, N., Bartness, T.J., DiMarchi, R., Tschöp, M.H. 2010. The metabolic actions of glucagon revisited. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(12), 689-697.
- Haber, B., Lipinski, G., Rathjen, S. 2012. Acesulfame K. En *Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology*, Mitchell, H., ed., Blackwell Publishing, 4^a ed., pp. 65-83. Nueva York, EE.UU.
- Hofmann, E., Kopperschlager, G. 1982. Phosphofructokinase from yeast. En *Methods in Enzymology*, Wood, W.A., ed., Academic Press, Vol. 90, pp. 49-60. Nueva York, EE.UU.
- Hotta, M., Ohwada, R., Akamizu, T., Shibasaki, T., Takano, K., Kangawa, K. 2009. Ghrelin increases hunger and food intake in patients with restricting-type *Anorexia nervosa*: A pilot study. *Endocrine Journal*, 56 (9), 1119-1128.
- Howe, G.R., Burch, J.D., Miller, A.B., Morrison, B., Gordon, P., Weldon, L., Chambers, L. W., Fodor, G., Winsor, G.M. 1977. Artificial sweeteners and human bladder cancer. *The Lancet*, 310(8038), 578–581. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91428-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91428-3).
- Hudgins, L.C., Hellerstein, M., Seidman, C., Neese, R., Diakun, J., Hirsch, J. 1996. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *Journal of Clinical Investigation*, 97(9), 2081–2091. <https://doi.org/10.1172/JCI118645>.
- Hudgins, L.C., Baday, A., Hellerstein, M.K., Parker, T.S., Levine, D.M., Seidman, C.E., Neese, R.A., Tremaroli, J.D., Hirsch, J. 2008. The effect of dietary carbohydrate on genes for fatty acid synthase and inflammatory cytokines in adipose tissues from lean and obese subjects. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(4), 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.02.013>.
- Hui, Y.S., Bin, W.L., Fong, C.F. 2014. Metabolism of hexoses. En *Dietary Sugars and Health*, Goran M.I., Tappy, L., Lê, K., eds., CRC Press, pp. 157-168. Boca Raton, EE. UU.
- Iizuka, K., Horikawa, Y. 2008. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome. *Endocrine Journal*, 55(4), 617–624.

- <https://doi.org/10.1507/endocrj.K07E-110>.
- Israelsen, W.J., vander Heiden, M.G. 2015. Pyruvate kinase: Function, regulation, and role in cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 43, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.08.004>.
- Jensen-Urstad, A.P.L., Semenkovich, C.F. 2012. Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: Housekeeper or messenger? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), 747–753. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.09.017>.
- Johnson, J.M., Conforti, F.D. 2003. Fructose. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., ed., Academic Press, 2^a ed., pp. 2748-2752. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00529-0>.
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., Mantzoros, C. S. 2010. Narrative review: The role of leptin in human physiology: Emerging clinical applications. *Annals of Internal Medicine*, 152(2), 93–100. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-152-2-201001190-00008>.
- Kendig, M. D., Ekayanti, W., Stewart, H., Boakes, R.A., Rooney, K. 2015. Metabolic effects of access to sucrose drink in female rats and transmission of some effects to their offspring. *PLOS ONE*, 10(7), e0131107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131107>.
- Keim, N.L., Havel, P.J. 2013. Fructose: Absorption and metabolism. En *Encyclopedia of Human Nutrition*, Caballero, B., ed., Academic Press, 3^a ed., Vol. 2, pp. 361-365. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00128-8>.
- Kemp, R.G. 1975. Phosphofructokinase from rabbit liver. En *Methods in Enzymology*, Wood, W.A., ed., Academic Press, Vol. 42, pp. 67-71. Nueva York, EE. UU.
- Kim, J., Egan, J.M. 2008. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*, 60(4), 470-502.
- Klug, C., von Rymon-Lipinski, G.W. 2011. Acesulfame potassium. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed., CRC Press, 4^a ed., pp. 13-30. Boca Raton, EE. UU.
- Kohlmeier, M. 2003. Glucose. En *Nutrient Metabolism*, Kohlmeier, M., ed., Academic Press, pp. 193–210. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50036-3>.
- Kruger, N.J. 2002. The Bradford method for protein quantitation. En *The Protein Protocols Handbook*, Walker, J.M., ed., Human Press, 2^a ed., pp. 15-21. Totowa, EE. UU.
- Lawrence, J. F. 2003. Acesulfame | Acesulphame. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., ed., Academic Press, 2^a ed., Vol. 1, pp. 1-3. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00002-X>.
- Lenzen, S. 2014. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: History and current status. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12189–12194. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.557314>.
- Lelevich, S.V., Khrustalev, V.V., Barkovsky, E.V. 2013. Inhibition of rat muscle and liver phosphofructokinases by high doses of ethanol. *Biochemistry Research International*, 2013, Article ID 495135. <https://doi.org/10.1155/2013/495135>.
- Li, M.V., Chang, B., Imamura, M., Pongvarin, N., Chan, L. 2006. Glucose-dependent transcriptional regulation by an evolutionarily conserved glucose-sensing module. *Diabetes*, 55(5), 1179–1189. <https://doi.org/10.2337/db05-0822>.
- Li, X.B., Gu, J.D., Zhou, Q.H. 2015. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6(1), 17–24. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.12148>.

- Lima-Martínez, M.M., Betancourt, L., Bermúdez, A. 2011. Glucagón: ¿un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes? *Avances en Diabetología*, 27(5), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.avdiab.2011.09.002>.
- Lipinski, G., Hanger, L. 2011. Acesulfame K. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3ª ed., pp. 13-31. Nueva York, EE. UU.
- López-Oliva M.E., Muñoz-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.
- Majerus, P.W., Kilburn, E. 1969. Acetyl coenzyme A carboxylase. The roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6254–6262. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63531-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63531-8)
- Marroquí, L., Alonso-Magdalena, P., Merino, B., Fuentes, E., Nadal, A., Quesada, I. 2014. Nutrient regulation of glucagon secretion: Involvement in metabolism and diabetes. *Nutrition Research Reviews*, 27, 48-62.
- Martínez, C., González, E., García, R.S., Salas, G., Constantino-Casas, F., Macías, L., Gracia, I., Tovar, C., Durán-de-Bazúa, C. 2010. Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *The Open Obesity Journal*, 2, 116–124.
- Matschinsky, F.M., Magnuson, M.A., Zelent, D., Jetton, T.L., Doliba, N., Han, Y., Taub, R., Grimsby, J. 2006. The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. *Diabetes* 55(1), 1–12. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.01.06.db05-0926>.
- Mayer, J.P., Zhnag, F., DiMarchi, R.D. 2007. Insulin structure and function. *Biopolymers (Peptide Science)*, 88(5), 687-713. <https://doi.org/10.1002/bip.20734>.
- Mendoza-Pérez, S. 2017. Efecto de la ingesta de diferentes edulcorantes sobre la liberación de las hormonas de la saciedad GIP y GLP-1 y su efecto sobre la lipogénesis a largo plazo. (Tesis de Maestría en Ciencias). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Mendoza-Pérez, S., Guzmán-Gómez, M.B., García-Gómez, R.S., Ordaz-Nava, G., Gracia-Mora, M.I., Macías-Rosales, L., Morales-Rico, H., Salas-Garrido, G., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2020. Effects on weaned male Wistar rats after 104, 197, and 288 days of chronic consumption of nutritive and non-nutritive additives in water. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2349–2359 <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04746-2>
- Molinary, S.V., Quinlan, M.E. 2011. Sucralose. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3ª ed., pp. 130-145. Nueva York, EE. UU.
- Moore, J., Gunn, P., Fielding, B., Moore, J.B., Gunn, P.J., Fielding, B.A. 2014. The role of dietary sugars and *de novo* lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 6(12), 5679–5703.
- Mor, I., Cheung, E. C., Vousden, K.H. 2011. Control of glycolysis through regulation of PFK1: Old friends and recent additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 211–216. <https://doi.org/10.1101/sqb.2011.76.010868>
- Müller, T.D., Nogueiras, R., Andermann, M.L., Andrews, Z.B., Anker, S.D., Argente, J., Batterham, R.L., Benoit, S.C., Bowers, C.Y., Broglio, F., Casanueva, F.F., D'Alessio, D., Depoortere, I., Geliebter, A., Ghigo, E., Cole, P.A., Cowley, M., Cummings, D.E., Dagher, A., Diano, S., Dickson, S.L., Diéguez, C., Granata, R., Grill, H.J., Grove, K., Habegger, K.M., Heppner, K., Heiman, M.L., Holsen, L., Holst, B., Inui, A., Jansson, J.A., Kirchner, H., Kornbonits, M., Laferrère, B., LeRoux, C.W., Lopez, M., Morin,

- S., Nakazato, M., Nass, R., Pérez-Tilve, D., Pfluger, P.T., Schwartz, T.W., Seeley, R.J., Sleeman, M., Sun, Y., Sussel, L., Tong, J., Thorner, M.O., van der Lely, A.J., van der Ploeg, L.H.T., Zigman, J.M., Kojima, M., Kangawa, K., Smith, R.G., Horvath, T., Tschöp, M.H. 2015. Ghrelin. *Molecular Metabolism*, 4:437-460.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., Münzberg, H. 2008. Mechanism of leptin action and leptin resistance. *The Annual Review of Physiology*, 70, 537-556. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707>.
- Nakanishi, S., Numa, S. 1970. Purification of rat liver acetyl coenzyme A carboxylase and immunochemical studies on its synthesis and degradation. *European Journal of Biochemistry*, 16, 161-173.
- Nelson, D., Cox, M. 2009. *Lehninger. Principios de Bioquímica*. Omega, 5ª ed., pp. 527-569; 805-851. Barcelona, España.
- Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Porter, J.W. 1975. Fatty acid synthase from rat liver. En *Methods in Enzymology*, Kaplan, N., Kaplan, C., eds., Academic Press, Vol. 35, pp. 37-44. Nueva York, EE. UU.
- Olivares, J.A., Arellano, A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(1), 9-18.
- OMS. 2017. Obesidad y sobrepeso. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>
- Oswal, A., Yeo, G. 2010. Leptin and the control of body weight: A review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity*, 18, 221-229.
- Overduin, J., Figlewicz, D.P., Bennett-Jay, J., Kittleson, S., Cummings, D.E. 2012. Ghrelin increases the motivation to eat, but does not alter food palatability. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(3), R259-R269.
- Palmnäs, M.S.A., Cowan, T.E., Bomhof, M. R., Su, J., Reimer, R.A., Vogel, H.J., Hittel, D.S., Shearer, J. 2014. Low-Dose aspartamo consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLOS ONE*, 9(10), e109841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>.
- Peng, I.C., Chen, Z., Sun, W., Li, Y.S., Marin, T.L., Hsu, P.H., Su, M.I., Cui, X., Pan, S., Lytle, C.Y., Johnson, D.A., Blaeser, F., Chatila, T., Shyy, J. Y.J. 2012. Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CAMKK β /AMPK pathway. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 302(12), E1560. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00504.2011>.
- Pilkis, S.J. 1975. Glucokinase of rat liver. Ed *Methods in enzymology*, Wood, W.A., ed., Academic Press, Vol. 42, pp. 31-39. Nueva York, EE. UU.
- Pilkis, S.J., Chrisman, T.D., El-Maghrabi, M.R., Colosia, A., Fox, E., Pilkis, J., Claus, T. H. 1983. The action of insulin on hepatic fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 258(3), 1495-1503. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)33012-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)33012-6).
- Raben, D.M., Wolfgang, M.J. 2013. Phosphofructokinase-2/Fructose Bisphosphatase-2. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, pp. 456-458. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.11340-6>.
- Raghow, R., Yellaturu, C., Deng, X., Park, E.A., Elam, M.B. 2008. SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 19(2), 65-73.
- Real Academia Española. 2020. Definición de edulcorante - Diccionario panhispánico del español jurídico - RAE. <https://dpej.rae.es/lema/edulcorante>.

- Real Academia Española 2021. Definición de serendipia – Diccionario de la lengua española – RAE. <https://dle.rae.es/serendipia>
- Reinhart, G.D., Lardy, H.A. 1980. Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near-physiological conditions. *Biochemistry*, 19(7), 1477–1484.
- Reuber, M.D. 1975. Carcinogenicity of saccharin. *Environmental Health Perspectives*, 25,173-200.
- Roche. 2014. Accutrend Triglycerides. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania.
- Santoro, N., Brtva, T., Roest, S. Vander, Siegel, K., Waldrop, G. L. 2006. A high-throughput screening assay for the carboxyltransferase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Analytical Biochemistry*, 354(1), 70–77.
- Scafoglieri, A., Tresignie, J., Provyn, S., Clarys, J.P., Bautmans, I. 2012. Reproducibility, accuracy, and concordance of Accutrend® Plus for measuring circulating lipid concentration in adults. *Biochemia Medica*, 22(1), 100–108. <https://doi.org/10.11613/bm.2012.011>.
- Sengupta, P. 2014. The laboratory rat: Relating its age with human's. *International Journal of Preventive Medicine*, 4(6), 624–630.
- Simon, B.R., Parlee, S., Learman, B., Mori, H., Scheller, E., Cawthorn, W., Niang, X., Gallagher, K., Tyrberg, B., Assadi-Porter, F., Evans, C., McDougald, O. 2013. Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(45), 32475–32489.
- Softic, S., Cohen, D.E., Kahn, C.R. 2016. Role of dietary fructose and hepatic *de novo* lipogenesis in fatty liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(5), 1282–1293. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>.
- Stein, O., Granot, D. 2019. An overview of sucrose synthases in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00095>.
- 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, 181–186.
- Swithers, S.E., Davidson, T.L. 2008. A role for sweet taste: calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behavioral Neuroscience*, 122(1), 161–173.
- Swithers, S.E., Baker, C.R., Davidson, T.L. 2009. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*. 123, 772–780.
- Swithers, S.E., Martin, A.A., Davidson, T.L. 2010. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & Behavior*, 100(1), 55–62.
- 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.
- Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F., Morimura, H. 1967. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinase isolated from rat tissues. *The Journal of Biochemistry*, 62(1), 71–91.
- Thorgeirsson, U.P., Dalgard, D.W., Reeves, J., Adamson, R.H. 1994. Tumor incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 130–151. <https://doi.org/10.1006/rtph.1994.1013>.
- Uyeda, K. 2021. Pyruvate Kinase. En *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Jez, J., ed., Elsevier, 3^a ed., Vol. 1, pp. 166-169. Amsterdam, Países Bajos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21272-7>.

- Vakilian, M., Tahamtani, Y., Ghaedi, K. 2019. A review on insulin trafficking and exocytosis. *Gene*, 706, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.063>.
- Valdés-Martínez, S.E. 2006. Hidratos de carbono. En Baduí, S. *Química de los Alimentos*, 4^a ed. Ciudad de México: Pearson Education, pp. 48-50.
- van Schaftingen, E. 2020. Hexokinase/Glucokinase. En *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Jez, J., ed., Elsevier 3^a ed., Vol. 1, pp. 149-161. Amsterdam, Países Bajos <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819460-7.00034-7>.
- Varzakas, T. 2012. Low calorie nonnutritive sweeteners. En *Sweeteners. Nutritional Aspects, Application and Production*, Varzakas T., Labropoulos, A., Anestis, S., eds., CRC Press, pp. 79-118. Boca Raton, EE. UU.
- Walker, D.G., Parry, M.J. 1966. Glucokinase. En *Methods in enzymology*, Wood, W.A., ed. Academic Press. Vol. 9, pp. 381-388. Nueva York, EE. UU.
- Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S., Sul, H.S. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(11), 678-689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>.
- Wang, Q.P., Lin, Y.Q., Zhang, L., Wilson, Y.A., Oyston, L.J., Cotterell, J., Qi., Y., Khuong, T., Bakhshi, N., Planchenault, Y., Browman, D., Lau, M., Cole, T., Wong, A., Simpson, S., Cole, A., Penninger, J., Herzog, H., Neely, G.G. 2016. Sucralose promotes food intake through NPY and a neuronal fasting response. *Cell Metabolism*, 24(1), 75–90.
- Welsh, J.A., Sharma, A., Abramson, J.L., Vaccarino, V., Gillespie, C., Vos, M.B. 2010. Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *Journal of the American Medical Association*, 303(15), 1490–1497.
- White, J.S., Osberger, T.F. 2011. Crystalline fructose. En *Alternative Sweeteners*. O'Brien Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3^a ed., pp. 367-390. Nueva York, EE. UU.
- Wilcox, G. 2005. Insulin and insulin resistance. *The Clinical Biochemist Reviews*, 26, 19-39.
- Willis, L.B., Omar, W.S.W., Thamurthi, R.S., Sinskey, A.J. 2008. Non-radioactive assay for acetyl-CoA carboxylase activity. *Journal of Oil Palm Research*, 2, 30–36.

Consumption of sweeteners at different stages of life: effects on body mass, food and drink intake in male and female Wistar rats

Samuel Mendoza-Pérez^a, Rolando Salvador García-Gómez^a, Guillermo Ordaz-Nava^b,
María Isabel Gracia-Mora^c, Lucía Macías-Rosales^c, Héctor Morales-Rico^c, Gerardo Salas-Garrido^d,
Elia Martha Pérez-Armendáriz^e, Ruth Bustamante-García^f and María-del-Carmen
Durán-Domínguez-de-Bazúa^a

^aLaboratories of Environmental Chemical Engineering and Chemistry, Chemical Engineering Department, Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City, Mexico; ^bDepartment of Nutrition Physiology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), Mexico City, Mexico; ^cAnimal Experimentation Unit, Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City, Mexico; ^dDepartment of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UNAM, Mexico City, Mexico; ^eElectrical Synapse Laboratory, Cell and Tissue Biology Department, Faculty of Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico; ^fBiology Department, Faculty of Chemistry, UNAM, Mexico City, Mexico

ABSTRACT

The consumption of non-nutritive sweeteners has increased in the last decades. However, there are doubts about its consumption and its impact on body mass and metabolic alterations. For this reason, this study investigates the effects of the consumption of nutritive and non-nutritive sweeteners on body mass in different life stages of male and female Wistar rats: Childhood, adolescence, young adult, adulthood, and aged. For this purpose, 8 groups of male and female rats were used (10 per group/gender): sucrose 10%, glucose 14%, fructose 7%, acesulfame K 0.05%, aspartame:acesulfame mixture 1.55%, sucralose 0.017%, saccharin 0.033%, and a control group. Only in aged male rats (504 days) there were significant differences in body mass. In both genders, there were differences in food, drink, and energy intake along all life stage. It is concluded that non-nutritive sweeteners when consumed together with a balanced diet did not cause a greater body mass gain.

ARTICLE HISTORY

Received 16 December 2020
Revised 2 February 2021
Accepted 5 February 2021

KEYWORDS

Body mass; food intake; energy intake; non-nutritive sweeteners; nutritive sweeteners; Wistar rats

Introduction

The consumption of non-nutritive sweeteners has been raising in the last decades (Drewnowski and Rehm 2015; Sylvestsky and Rother 2016). Approximately 40% of adults in the United States consume at least one food or drink that contains non-nutritive sweeteners daily (Sylvestsky et al. 2017; Malek et al. 2018). Research has revealed that approximately 25% of children consume non-nutritive sweeteners or some food or drink that contains non-nutritive sweeteners (Sylvestsky et al. 2017). The global prevalence of obesity has been increased rapidly in the last years. Researchers suggest that one of the main causes is excessive consumption of ultra-processed foods (Monteiro et al. 2011; Moubarac et al. 2013; Juul et al. 2018). The food industry has decided to replace nutritive sweeteners (monosaccharides and disaccharides) with non-nutritive sweeteners and chemical compounds for preservation.

However, emerging research suggests that this substitution of monosaccharides and disaccharides has not worked. Some research even affirms that the consumption of non-nutritive sweeteners is related to a greater gain in body mass (Martínez et al. 2010; Davidson et al. 2011; Foletto et al. 2016). In addition, it is suspected that chronic consumption of a sweet/energy imbalance triggers various metabolic responses such as (a) greater motivation to eat, (b) positive energy balance, and (c) weak predictive relationship between sweet taste and caloric consequences (Swithers et al. 2010; Davidson et al. 2011; Foletto et al. 2016; Wang et al. 2016).

The physiological mechanisms that explain the metabolic alterations caused by the consumption of non-nutritive sweeteners are not completely elucidated. However, it has been suggested that non-nutritive sweeteners can alter the gut microbiota and that this could be one of the possible mechanisms

(Palmnäs et al. 2014; Suez et al. 2014; Bian, Chi, et al. 2017; Bian, Tu, et al. 2017). In contrast, some studies conclude that the consumption of non-nutritive sweeteners does not have any impact on body mass gain (Boakes et al. 2016) or have not effects if they are consumed together with a balanced diet (Mendoza-Pérez et al. 2020), or that the evidence is not enough to link the use of NNSs with glucose metabolism, obesity or diabetes (Alsunni 2020).

Since the consumption of sweeteners has increased at all ages, it is important to know its impact at each stage of life. For this, in the present investigation, male and female Wistar rats were used to evaluate the effect on the body mass of the consumption of various sweeteners.

The comparison between the age of rats and the age of humans is not entirely clear. Some parameters already defined are weaning which occurs 21 days after birth (Quinn 2005; Sengupta 2014; Agoston 2017). The second phase of rat-life is its puberty (adolescent). Sexual maturation in laboratory rats typically occurs between 30 and 50 days (Evans 1986; Sengupta 2014; Agoston 2017). However, like humans, rats go through a period of adolescence characterised by behaviours such as increased risk-taking and social play. This period goes beyond reaching sexual maturity and extends on average until the 63rd day after birth (Sengupta 2014). Musculoskeletal maturity is used to determine the adulthood of the rats. Therefore the adulthood in rats occurs approximately 210 days after birth (Quinn 2005; Sengupta 2014; Agoston 2017). The reproductive senescence occurs between days 450 and 600 (between 15 and 20 months), on average it is considered day 525 (Sengupta 2014; Agoston 2017). Based on the above, for this research, the life stages for Wistar rats were defined as follows: childhood (days 21 to 35), adolescence (days 36 to 63), young adult (days 64-210), adulthood (days 211-503), and aged (>504 days).

Materials and methods

Model animals

Female and male rats ($n=160$) just weaned (body mass between 35 and 45 g) of the HsdHan:WIST line from Envigo® were used to perform the experiment for 483 days (total life span was 504 days). After weaning the rats were conditioned to solid food for 3 days. After that the sweeteners were supplied for 480 days. The female and male rats were randomly divided into 8 groups ($n=10$ per group and gender): Acesulfame K, aspartame and acesulfame mixture, saccharin,

sucralose, fructose, sucrose, and control (drinking water without sweetener). The animals were housed in groups in transparent polysulfone cages, brand Tecniplast® model 2000 P, measuring $612 \times 435 \times 216$ mm, with controlled humidity (65–70%), ventilation and temperature (22 ± 1 °C), and a 12 h light-dark cycle. Procedures were conducted in accordance with guidelines of the National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council 2011) and by applicable local legislation. This study's protocols were approved by the Institutional Committee for the Care and Use of Laboratory Animals (CICUAL, in Spanish) of National Autonomous University of Mexico (UNAM, in Spanish).

Diets provided

All the specimens consumed the balanced diet Teklad Global 18S®, which supplies all the macro and micronutrients necessary for the proper development of the rodents during the first 330 days. After day 330 the LabRodent Diet 5001® was used because Envigo™ left the market in Mexico. The change between Teklad Global Diet® and LabRodent Diet 5001® was made gradually over several weeks. Both diets contained similar levels of macro and micronutrients as well as their energy intake. The diets were supplied without time restrictions during the 480 days of experimentation. The control of food intake was daily conducted by subtraction of the quantity remaining (g) from the quantity daily supplied (100 g) using an electronic precision balance (SPE601, OHAUS™).

Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Acesulfame K, fructose, glucose, saccharin, sucralose and sucrose were obtained from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, United States). The commercial mixture of aspartame with acesulfame was obtained from Merisant company (Mexico City, Mexico). Accutrend triglycerides test strips and Accutrend glucose test strips were purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany).

Sweetened beverages

The supplied drinks had the following concentrations: Acesulfame 0.05%, commercial mixture of aspartame and acesulfame 1.55%, saccharin 0.033%, sucralose

0.019%, glucose 14%, sucrose 10% and fructose 7%. The concentrations of solutions of artificial sweeteners were determined as iso-sweet in humans to sucrose 10% which was taken as a reference. All values are below the acceptable daily intakes established for each of them. The drinks were supplied without time restriction. Drinks were replenished daily with freshly prepared solutions in clean bottles. The water intake was determined every 24 h by subtracting the remaining amount of the daily supplied amount (250 mL).

Energy intake

Energy intake was determined by the sum of energy from food plus energy from drink. The energy contribution of Teklad Global 2018S[®] diet was 13 kJ/g and for LabRodent Diet 5001[®] was 14 kJ/g. The energy contribution of nutritive beverages (glucose, fructose, and sucrose) was 1.16 kJ/mL for fructose beverage, 2.34 kJ/mL for glucose beverage and 1.67 kJ/mL for sucrose beverage. For the commercial mixture of aspartame with acesulfame K the energy contribution by beverages was 0.256 kJ/mL. For the non-nutritive sweeteners its energetic contribution was considered negligible.

Glucose and triglycerides measurements

Glucose and triglyceride determinations were carried out at 2, 4, 9, 12, and 16 months of experimentation. The specimens were fasted for a period of 8 h to avoid a bias due to food consumption. A sterile needle was used for each rat to perform the tests. A puncture was made in the tail of each rat and blood drops were extracted for the determinations. The measurement of glucose and triglycerides was carried out through reflectance photometry using the Accutrend[®] Plus system meter by Roche[™] Brand.

Euthanasia

Euthanasia was carried out after a 12 hour fasting. To do this, each rat was individually placed in a chamber with air rich in CO₂ (70% minimum). Then, the rats were decapitated with a guillotine for rodents. All experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines of the National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (National Research Council 2011) and applicable local laws. At the beginning of the experimentation, each group consisted of 10 specimens until the first euthanasia (day 160). In the first euthanasia, organs and blood samples were collected from half of the specimens and stored for future research. The other half of the specimens were left until 480 days of experimentation, when they reached reproductive senescence.

Statistical analyses

Statistical analyses of body mass, food, drink, and energy intake were carried out on days 21, 35, 63, 210, and 504, which correspond to the beginning of the different life stages of the rats: childhood, adolescence, young adult, adulthood, and old age, respectively. Statistical analyses of serum glucose and triglycerides levels were performed at 2, 4, 9, 12, 14, and 16 months after weaning. All results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The analysis of variance (ANOVA) and *post hoc* analysis using Duncan's multiple comparisons was performed using the software Stat Graphics Centurion version XVI (StatPoint Technologie, Inc, Warrenton, VA, United States). Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Body mass

Table 1 shows the body mass at the beginning of each of the life stages of male rats and Table 2 shows the body mass of female rats. At the beginning of infancy

Table 1. Body mass (g) at the beginning of each life stage of male rats that drank sweeteners.

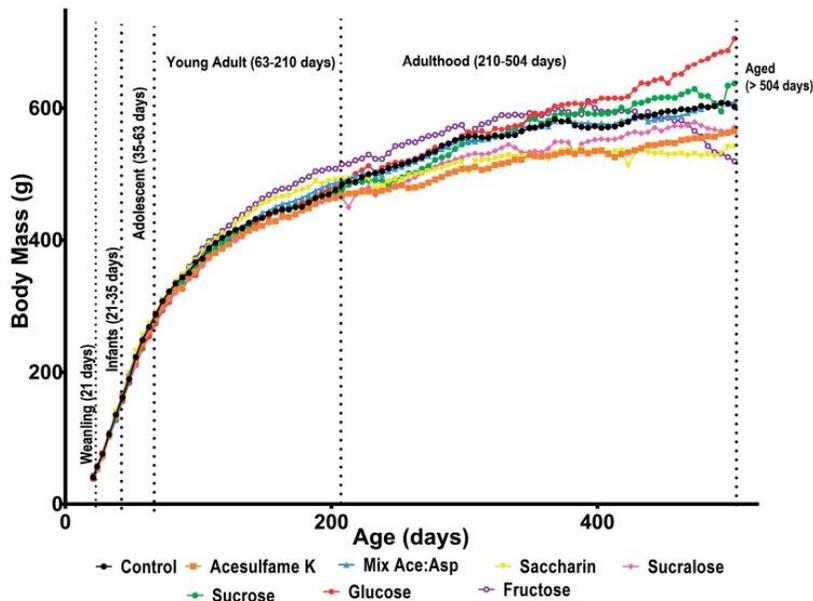
Group	Childhood (21 days)	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
	NS	NS	NS	NS	
Control	40.4 \pm 9.1	105.8 \pm 19.8	268.7 \pm 34.1	484.5 \pm 41.9	602.2 \pm 46.3 ab
Acesulfame	38.8 \pm 4.7	104.1 \pm 12.9	262.0 \pm 19.8	467.7 \pm 49.8	565.0 \pm 58.9 ab
Mix aspartame	39.0 \pm 6.8	106.5 \pm 10.6	267.6 \pm 16.9	493.4 \pm 61.7	609.6 \pm 84.9 ab
Saccharin	39.4 \pm 5.2	105.4 \pm 11.7	273.1 \pm 21.3	492.7 \pm 55.5	541.3 \pm 68.8 ab
Sucralose	37.4 \pm 6.5	101.7 \pm 13.6	259.7 \pm 22.2	464.1 \pm 61.2	570.9 \pm 68.6 ab
Glucose	39.0 \pm 6.8	102.5 \pm 12.7	253.6 \pm 22.8	485.2 \pm 62.1	764.3 \pm 96.3 c
Fructose	43.3 \pm 8.3	108.8 \pm 16.3	265.4 \pm 29.2	515.1 \pm 57.1	520.9 \pm 40.3 a
Sucrose	39.3 \pm 4.6	102.5 \pm 12.7	257.5 \pm 28.1	476.6 \pm 24.2	637.6 \pm 42.9 b

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

Table 2. Body mass (g) at the beginning of each life stage of female rats that drank sweeteners.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days) NS	Young adult (63 days) NS	Adulthood (210 days) NS	Reproductive senescence (504 days) NS
Control	42.1 ± 6.7	98.4 ± 4.8	182.8 ± 13.7	249.7 ± 17.8	294.4 ± 22.1
Acesulfame	43.7 ± 7.2	102.0 ± 13.4	183.6 ± 7.0	251.5 ± 10.9	287.8 ± 26.7
Mix aspr:ace	42.3 ± 8.5	98.2 ± 12.9	172.5 ± 18.5	247.2 ± 19.3	292.5 ± 36.9
Saccharin	39.6 ± 8.3	98.5 ± 15.9	183.6 ± 23.2	252.3 ± 24.6	296.1 ± 29.2
Sucralose	38.4 ± 7.4	92.4 ± 10.2	175.7 ± 7.1	244.8 ± 10.9	287.3 ± 13.9
Glucose	37.7 ± 4.8	87.4 ± 6.7	173.1 ± 11.7	256.4 ± 32.8	328.6 ± 56.7
Fructose	41.4 ± 7.4	94.2 ± 12.5	177.0 ± 14.9	252.8 ± 26.6	311.3 ± 39.6
Sucrose	36.7 ± 7.4	91.4 ± 10.2	177.8 ± 16.5	242.7 ± 22.6	300.2 ± 47.9

n = 10 for childhood, adolescence and young adult, *n* = 5 for adulthood and reproductive senescence. NS = no significant differences.

**Figure 1.** Growth curve of the different groups of male rats throughout the different stages of life.

(day 21) in male rats, there were no intergroup differences. Also, there were no significant intergroup differences in female rats (Table 1).

The end of childhood was established at day 35. The rapid growth throughout childhood can be observed in Figure 1 for male rats and in Figure 2 for female rats. The group with the greatest mass was the fructose group and the group with the least was the sucralose group. In contrast, in female rats the groups with the greatest and lowest mass were acesulfame K and glucose, respectively. However, at the end of childhood there were no significant differences between the groups of male and female rats that drank different sweeteners ($p > 0.05$). Also, at the end of childhood there were no differences between male and female rats.

At the end of adolescence and beginning of young adult life (day 63), male rats had an average mass of 263.5 ± 24.5 g. The saccharin group had the highest

body mass, in contrast the glucose group had the lowest body mass (Table 2). However, no group differed from the control. The female rats at the end of their adolescent stage had an average mass of 178 ± 15.0 g. As in male rats, no group differed from the control (see Table 2). The male and female rats upon reaching the young adult stage differed significantly ($p < 0.05$) in body mass. Males had a greater mass compared to females.

Adulthood is reached in rats on average on day 210, at this day male rats had an average mass of 484.9 ± 51.2 g. The male control had a mass of 484.5 ± 41.9 g, in contrast the fructose group had the highest mass (515.1 ± 57.1 g) and the sucralose group had the lowest mass (464.1 ± 61.2 g). Nevertheless, within the groups of adult male rats there were no significant differences. On the other hand, female rats when they reached adulthood had a significantly ($p < 0.05$) lower mass (249.7 ± 20.6 g) than male rats. At

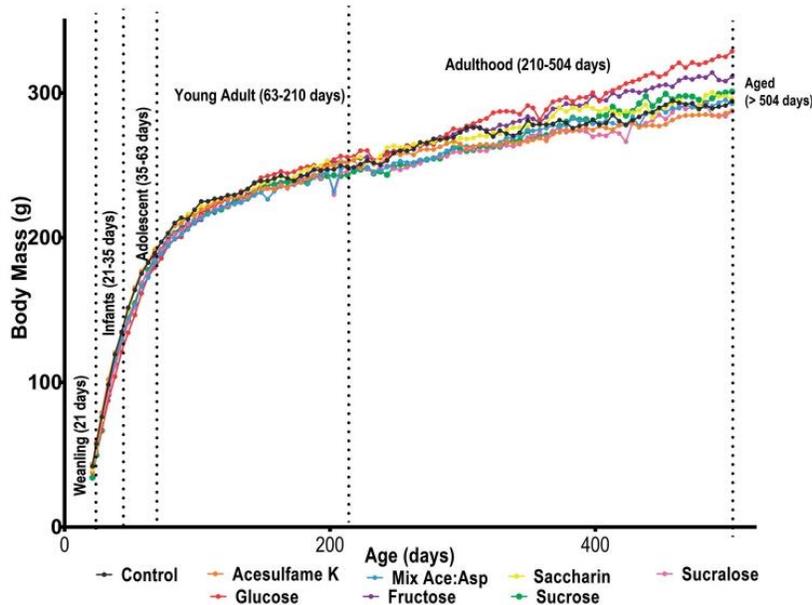


Figure 2. Growth curve of the different groups of female rats throughout the different stages of life.

Table 3. Average of the daily food intake (g) at the beginning of each stage of the life of male rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	9.1 ± 0.6	16.6 ± 0.4 b	23.7 ± 1.2 c	23.6 ± 0.2 ef	26.0 ± 2.6 c
Acesulfame	8.4 ± 1.3	18.1 ± 1.5 de	26.7 ± 3.6 d	23.7 ± 0.2 ef	29.2 ± 2.3 d
Mix asp:ace	8.5 ± 1.1	17.1 ± 1.0 bc	22.7 ± 0.1 c	21.1 ± 0.1 d	26.9 ± 1.7 cd
Saccharin	8.7 ± 0.2	18.6 ± 0.3 e	23.4 ± 0.7 c	24.0 ± 0.2 f	25.9 ± 1.5 c
Sucralose	8.2 ± 0.3	17.5 ± 0.4 cd	23.3 ± 0.8 c	22.7 ± 0.4 e	26.8 ± 6.1 cd
Glucose	8.0 ± 0.5	13.7 ± 0.3 a	14.0 ± 1.9 a	13.6 ± 0.1 a	14.2 ± 0.8 a
Fructose	8.1 ± 0.4	13.7 ± 1.3 a	18.5 ± 0.4 b	17.7 ± 0.1 c	17.5 ± 0.6 b
Sucrose	8.2 ± 0.4	13.7 ± 0.5 a	15.2 ± 0.9 a	14.7 ± 0.1 b	14.7 ± 1.6 a

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e, ...) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

the beginning of adulthood of female rats the glucose group had the highest body mass (256.4 ± 32.8 g) and, on the contrary, the sucrose group had the lowest mass (242.7 ± 22.6 g). However, no group differed from the control (249.7 ± 17.8 g).

For the purposes of this research, day 504 was taken as the beginning of old age. At this day there were significant differences in the body mass between male rats (602.1 ± 90.4 g) and the female rats (299.9 ± 35.7 g). In addition to the above, in male rats, there were significant intergroup differences in body mass ($p < 0.05$). The results of the Duncan test (Table 1) indicate that only the glucose group (764.3 ± 96.3 g) had a significantly higher mass compared to the control (602.2 ± 46.3 g). In contrast, in female rats neither nutritive nor non-nutritive sweetener group differed significantly from the control group (294.4 ± 22.1 g).

Food intake

The average daily food intake at the beginning of each stage of the life of male and female rats are shown in Tables 3 and 4, respectively. After weaning in early infancy, the control of male rats consumed an average of 9.1 ± 0.6 g of food. The food intake of the control in females (8.7 ± 0.4 g) did not differ significantly from that of the males. Neither in male rats nor in female rats were there intergroup differences.

At the end of childhood (day 35) there were significant differences ($p < 0.05$) in daily food intake. Duncan's test indicated that in male rats the three groups that consumed nutritive sweeteners: fructose, sucrose, and glucose ingested significantly less food than the control). In contrast, the specimens of the following non-nutritive sweeteners groups consumed significantly more food than the control: Acesulfame

Table 4. Average of the daily food intake (g) at the beginning of each stage of the life of female rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	8.7 ± 0.4	13.7 ± 0.4 c	16.2 ± 0.8 d	13.6 ± 0.1 e	14.6 ± 1.1 cd
Acesulfame	8.9 ± 1.1	14.2 ± 1.5 cd	18.8 ± 1.0 e	13.5 ± 0.3 e	15.8 ± 0.7 d
Mix aspartame	8.6 ± 0.2	14.1 ± 0.8 cd	16.8 ± 1.7 d	12.7 ± 0.1 d	14.9 ± 0.9 cd
Saccharin	9.1 ± 0.5	15.7 ± 0.1 e	18.5 ± 1.7 e	14.4 ± 1.1 ef	15.6 ± 1.1 cd
Sucralose	8.3 ± 0.4	14.5 ± 0.1 d	17.8 ± 0.1 e	14.1 ± 0.1 ef	14.9 ± 0.9 cd
Glucose	8.5 ± 0.2	9.1 ± 0.4 a	6.1 ± 0.4 a	5.7 ± 0.3 a	7.0 ± 1.7 a
Fructose	8.5 ± 0.2	10.6 ± 0.6 b	12.5 ± 0.5 c	9.5 ± 0.1 c	13.4 ± 1.6 c
Sucrose	8.4 ± 0.3	11.1 ± 0.2 b	7.9 ± 0.8 b	6.8 ± 0.5 ef	10.4 ± 1.2 b

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

Table 5. Average of the daily beverage intake (mL) at the beginning of each stage of the life of male rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	16.0 ± 0.6	22.3 ± 1.4 a	37.7 ± 3.7 a	34.2 ± 3.1 a	26.0 ± 2.6 a
Acesulfame	15.9 ± 0.2	29.8 ± 0.9 b	57.0 ± 2.7 b	45.6 ± 8.9 b	72.1 ± 4.0 c
Mix aspartame	16.0 ± 0.4	33.9 ± 3.9 d	68.4 ± 0.2 c	54.8 ± 9.9 c	63.9 ± 3.9 bc
Saccharin	15.6 ± 1.1	27.9 ± 1.7 b	40.3 ± 6.4 a	50.0 ± 7.2 bc	61.6 ± 13.3 bc
Sucralose	16.1 ± 4.9	29.5 ± 2.3 b	36.6 ± 5.9 a	35.4 ± 3.3 a	48.5 ± 6.9 b
Glucose	15.8 ± 2.7	47.8 ± 0.4 a	86.4 ± 8.5 d	83.0 ± 4.7 f	116.0 ± 10.9 d
Fructose	18.1 ± 3.2	39.0 ± 3.9 d	69.2 ± 1.1 c	73.8 ± 4.3 d	59.1 ± 2.7 bc
Sucrose	17.3 ± 2.6	48.6 ± 0.5 e	69.6 ± 8.0 c	78.4 ± 0.4 ef	110.4 ± 16.9 d

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e ...) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

K, saccharin, and sucralose (see Table 3). In female rats, as with males, the three groups that ingested nutritive sweeteners ate less food than the control: Fructose (10.6 ± 0.6 g), glucose (9.1 ± 0.4 g), and sucrose (11.1 ± 0.2 g). In contrast, the groups that drank saccharin (15.7 ± 0.2 g) and sucralose (14.5 ± 0.1 g) consumed more food than the control (13.7 ± 0.4 g). It was observed that female rats (12.8 ± 2.3 g) ingested significantly less food than male rats (16.1 ± 2.1 g).

In both male and female rats, at the end of adolescence (day 63), there were intergroup significant differences ($p < 0.05$) in daily food intake. As in late infancy, male rats that drank nutritive sweeteners: Glucose, fructose, and sucrose ate less food than the control. At this stage only the acesulfame group consumed more food than control (see Table 3). Female rats ingesting nutritive sweeteners ate significantly ($p < 0.05$) less food than the control group. In contrast to male rats, at the end of adolescence of female rats, the three groups consuming non-nutritive sweeteners: Acesulfame K, saccharin, and sucralose ingested significantly more food than the control ($p < 0.05$).

At 210 days, upon reaching adulthood, there were significant differences in the amount of food ingested in both male and female rats. In male rats, as in all previous stages, the groups that drank nutritious sweeteners ate less food than the control. The glucose group ingested the least amount of food, eating 42% less than the control. In contrast, in early adulthood, no non-nutritive sweetener group ate more than the

control. The trend described above was also observed in female rats. The nutritive sweetener groups and the commercial mix of aspartame with acesulfame group ingested significantly less food than the control. In contrast, the acesulfame K, saccharin and sucralose groups did not differ from the control (Table 4).

Finally, upon reaching reproductive senescence (day 504), the male rats that ingested glucose, fructose and sucrose ate significantly less food than the control. Only the acesulfame K group consumed more food than the control (Table 3). When females reached reproductive senescence, the trend was different from the males: only the glucose and sucrose differed from the control. The sucrose and fructose groups ate significantly ($p < 0.05$) less food than control (Table 4).

Beverage intake

In a simplified way, the trend in the intake of sweetened beverages was the opposite to that of food intake. At all stages except early infancy (beginning of sweetener supply) the nutritive sweetener groups drank much more than the non-nutritive sweetener groups and the control (Tables 5 and 6). At the beginning of infancy, neither male nor female rats had significant differences ($p < 0.05$) in the amount of water drunk.

In male rats, at the end of childhood and beginning of adolescence (day 35), all groups ingested

Table 6. Average of the daily beverage intake (mL) at the beginning of each stage of the life of female rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	13.6 ± 1.7	18.6 ± 1.9 a	19.8 ± 2.8 a	23.2 ± 6.4 a	28.8 ± 4.4 a
Acesulfame	13.9 ± 1.3	29.1 ± 1.7 a	38.4 ± 2.8 c	28.2 ± 3.0 a	44.2 ± 8.3 b
Mix aspartame	13.8 ± 0.7	28.5 ± 2.0 c	61.6 ± 3.7 e	48.6 ± 7.6 b	61.4 ± 8.7 c
Saccharin	14.9 ± 1.6	32.4 ± 1.3 ef	53.2 ± 6.5 d	51.9 ± 9.8 b	42.2 ± 9.9 b
Sucralose	13.1 ± 2.1	23.8 ± 1.9 b	31.4 ± 3.4 b	23.8 ± 2.6 a	28.3 ± 6.9 a
Glucose	14.2 ± 1.4	46.8 ± 2.8 g	72.3 ± 5.1 f	78.7 ± 9.9 d	82.0 ± 7.5 d
Fructose	14.8 ± 2.1	32.8 ± 9.5 ef	58.9 ± 7.7 e	62.5 ± 7.1 c	73.9 ± 6.6 d
Sucrose	13.6 ± 2.3	34.0 ± 2.1 b	61.9 ± 2.6 e	78.6 ± 2.4 d	72.5 ± 3.6 d

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e, ...) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

Table 7. Average of the daily energy intake (kJ) at the beginning of each stage of the life of male rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	118.3 ± 7.8	215.8 ± 5.2 a	308.1 ± 15.6 a	306.8 ± 2.6 bc	364.0 ± 36.4 ab
Acesulfame	109.2 ± 16.9	235.3 ± 19.5 abc	347.1 ± 46.8 ab	308.1 ± 2.6 bc	408.8 ± 32.2 bc
Mix aspartame	110.5 ± 14.3	230.9 ± 13.9 abc	312.6 ± 1.4 a	288.3 ± 3.8 a	392.9 ± 24.8 b
Saccharin	113.1 ± 1.3	241.8 ± 3.9 c	304.2 ± 9.1 a	312.0 ± 2.6 c	362.6 ± 21 b
Sucralose	106.6 ± 3.9	227.5 ± 5.2 b	302.9 ± 10.4 a	295.1 ± 5.2 ab	375.2 ± 85.4 abc
Glucose	104.0 ± 6.5	289.9 ± 4.8 e	384.2 ± 44.6 b	371.0 ± 12.1 e	470.2 ± 36.7 c
Fructose	105.3 ± 5.2	223.3 ± 21.4 abc	320.8 ± 6.5 a	315.7 ± 6.3 cd	313.6 ± 11.5 a
Sucrose	106.6 ± 5.2	259.3 ± 7.4 d	313.8 ± 25.0 a	322.0 ± 2.0 d	390.2 ± 45.8 bc

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e, ...) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

significantly ($p < 0.05$) more drink than the control group (22.3 ± 1.4 mL). The sweetener that was drunk the most was sucrose (48.6 ± 0.5 mL). Similarly, in female rats all sweetener groups drank significantly more than the control (18.6 ± 1.9 mL). In this case, the glucose group was the one that drank the most drink (46.8 ± 2.8 mL).

At the end of adolescence (day 63), all the sweetener groups of the male rats drank significantly ($p < 0.05$) more than the control, except the saccharin and sucralose groups (Table 5). In contrast, in the late adolescence of the female rats all groups ingested significantly ($p < 0.05$) more drink than the control (See Table 6). But the nutritive sweeteners drank the largest volumes of beverage.

Upon reaching adulthood (day 210), all male rat sweetener groups, except for the sucralose group, drank significantly ($p < 0.05$) more than the control group. As in adolescence, the group that drank the most was the glucose group. The acesulfame and sucralose female rat groups did not differ significantly from the control. The other groups drank more than the control in the following order: Mixture of aspartame with acesulfame \approx saccharin $<$ fructose $<$ sucrose \approx glucose.

At day 504, early old age, in male rats all sweetener groups drank significantly ($p < 0.05$) more than the control group (Table 5). The order of beverage intake was as follows: control $<$ sucralose $<$ fructose $<$ saccharin $<$ aspartame: acesulfame mixture $<$ acesulfame $<$ sucrose

\approx glucose. In the case of females, the sucralose group was the only one that did not differ significantly ($p > 0.05$) from the control. The order of the volume of drink ingested was as follows: Sucralose \approx control $<$ saccharin \approx acesulfame $<$ aspartame: acesulfame mix $<$ sucrose \approx fructose \approx glucose.

Energy intake

Tables 7 show the average energy intake by male rats (both the energy intake of food and beverages is considered). Table 8 shows the data for female rats. At the beginning of childhood there was no significant difference in the amount of energy ingested, it should be remembered that the recently weaned rats had an adaptation period of 3 days to the solid food during which no sweetener was supplied.

At day 35, end of infancy, the results of the Duncan test showed that the sucralose, saccharin, sucrose and glucose groups had a significantly higher energy intake than the control (Table 7). In the case of females, it was observed that only the saccharin, sucrose and glucose groups had a higher energy intake than the control (Table 8).

At the end of the adolescent period and the beginning of their young adult stage of male rats, only the glucose group had a significantly higher ($p < 0.05$) energy intake than the control (Table 7). Approximately 25% more energy ingested daily. In the case of females, the trend was different since the

Table 8. Average of the daily energy intake (kJ) at the beginning of each stage of the life of female rats.

Group	Childhood (21 days) NS	Adolescence (35 days)	Young adult (63 days)	Adulthood (210 days)	Reproductive senescence (504 days)
Control	113.1 ± 5.2	178.1 ± 5.2 a	210.6 ± 10.4 ab	176.8 ± 1.3 a	204.4 ± 15.4 a
Acesulfame	115.7 ± 14.3	184.6 ± 19.5 ab	244.4 ± 13.0 c	175.5 ± 3.9 a	221.2 ± 9.8 a
Mix aspartame	111.8 ± 2.6	190.6 ± 10.9 ab	234.2 ± 23.0 abc	177.5 ± 3.2 a	224.3 ± 16.4 a
Saccharin	118.3 ± 6.5	204.1 ± 1.3 c	240.5 ± 22.1 bc	187.2 ± 7.2 abc	218.4 ± 15.4 a
Sucralose	107.9 ± 5.2	188.5 ± 1.3 b	231.4 ± 1.3 c	183.3 ± 1.3 b	208.6 ± 12.6 a
Glucose	110.5 ± 2.6	227.8 ± 11.7 d	248.5 ± 17.3 c	258.3 ± 27.1 e	289.9 ± 41.4 b
Fructose	110.5 ± 2.6	175.8 ± 18.8 ab	230.8 ± 15.4 abc	196.0 ± 9.5 c	273.3 ± 25.3 b
Sucrose	109.2 ± 3.9	201.1 ± 6.1 c	204.2 ± 13.9 a	219.7 ± 10.5 d	266.7 ± 22.8 d

$n = 10$ for childhood, adolescence and young adult, $n = 5$ for adulthood and reproductive senescence. Means with the different letter within a column (a, b, c, d, e, ...) are significantly different ($p < 0.05$). NS = no significant differences.

sucralose, acesulfame and glucose groups ingested more energy than the control.

In early adulthood (day 210), there were significant differences in energy intake. In male rats the sucrose and glucose groups ingested more energy than the control. In contrast, the group of aspartame:acesulfame mixture ingested significantly less energy. In the case of female rats at day 210, the sucralose, fructose, sucrose, and glucose groups had a significantly ($p < 0.05$) higher energy intake than the control.

Finally, at day 504, designated as the beginning of old age, the analyses of variance indicated that there were significant intergroup differences in the amount of energy ingested. In the case of male rats only the glucose group differed significantly from the control ($p < 0.05$). The group that ingested glucose had an energy intake approximately 35% higher. In contrast, in female rats, the three groups of nutritive sweeteners had a higher energy intake compared to the control. On average, the sucrose group ingested 35% more energy, the fructose group 37% more and the glucose group 49% more.

Glucose and triglycerides serum levels

Glucose serum levels

Figure 3 shows serum glucose levels, Figure 3(a) corresponds to male rats and Figure 3(b) to female rats. Samples were taken at 2, 4, 9, 12, 14, and 16 months after weaning. Therefore, the takings at 2 and 4 months correspond to data from the young adult stage. The samples from months 9, 12, and 14 correspond to the adult stage. Finally, taking at 16 months corresponds to the end of adulthood and the beginning of old age. In male rats at 9 months of the experiment, there were significant intergroup differences in serum glucose levels, but no group that ingested sweetener differed from the control (82 ± 11 mg/dL). In contrast, at 14 months the groups of male rats that ingested acesulfame K (61 ± 6 mg/dL), sucralose (63 ± 7 mg/dL), and saccharin (57 ± 9 mg/dL) had levels

significantly lower than the control (83 ± 11 mg/dL). Finally, at 16 months, those groups that ingested saccharin (48 ± 3 mg/dL), fructose (82 ± 9 mg/dL) and sucrose (87 ± 8 mg/dL) differed significantly from the control (61 ± 8 mg/dL). In contrast, in female (Figure 3(b)) rats the differences existed for months 2, 4, 12, 14, 16. At 2 months, only the group that ingested acesulfame K (76 ± 20 mg/dL) differed from the control (63 ± 12 mg/dL). At 4 months only the glucose group (85 ± 11 mg/dL) differed from the control (70 ± 10 mg/dL). Again, at 12 months, only the glucose group (74 ± 10 mg/dL) differed from the control (50 ± 5 mg/dL). At 14 months the situation changed and the only group that differed from the control (63 ± 9 mg/dL) was the group ingesting aspartame:acesulfame mixture (49 ± 7 mg/dL). Lastly, at 16 months, the groups that ingested sucrose (83 ± 8 mg/dL) and fructose (81 mg/dL) differed from the control (55 ± 6 mg/dL). However, in all cases the average did not exceed the concentration of 100 mg/dL established for this rat species (Envigo, 2019).

Triglycerides serum levels

Contrary to what it was observed for glucose levels, there were significant differences in triglyceride levels in all evaluated periods (Figures 4a,b). The general trend observed in both male and female rats was that the three groups of nutritive sweeteners had the highest levels, differing significantly from the control in all samplings. In male rats the highest concentration was in the group with glucose drink, with average triglyceride levels (236 ± 17 mg/dL), then followed by the sucrose group with triglyceride levels of 220 ± 32 mg/dL and finally the fructose group with 206 ± 16 mg/dL. In the same way, in female rats, these three groups had concentrations higher than 200 mg/dL in all the periods evaluated, differing significantly from the control. The only non-nutritive sweetener group that had significant differences respect to the control group was the aspartame:acesulfame mix group. At 2 months, this group had levels of 220 ± 59 mg/dL.

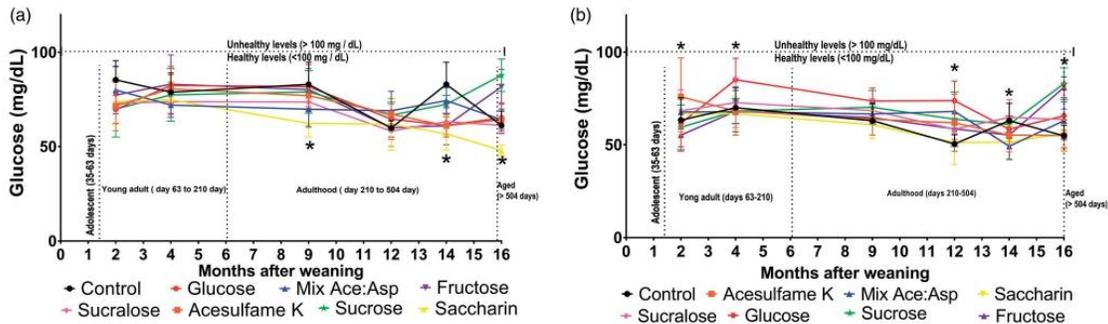


Figure 3. Average of fasting blood glucose at 2, 4, 9, 12, 14, and 16 months. (a) Male rats' glucose levels. (b) Female rats' glucose levels. Mean \pm SD. *Indicates the existence of significant differences ($p < 0.05$), $n = 10$ at 2 and 4 months, $n = 5$ at 9, 12, 14, and 16 months.

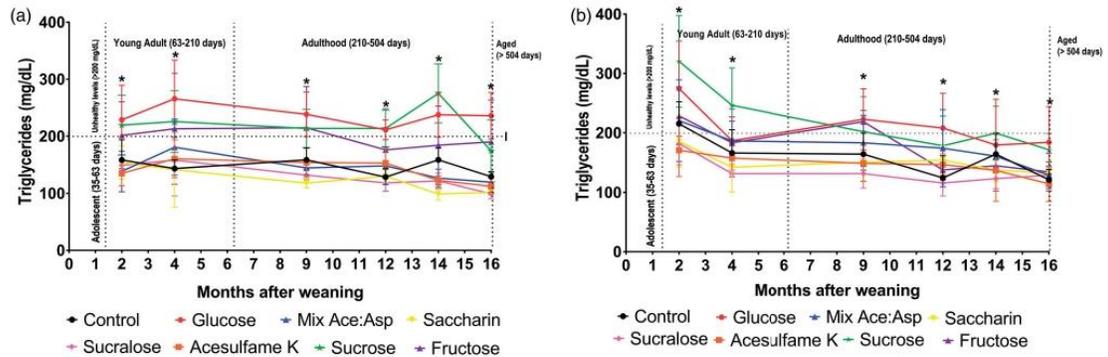


Figure 4. Average of fasting triglycerides levels at 2, 4, 9, 12, 14 and 16 months. (a) Male rats' triglycerides levels. (b) Female rats' triglycerides levels. Mean \pm SD. *Indicates the existence of significant differences ($p < 0.05$), $n = 10$ at 2 and 4 months, $n = 5$ at 9, 12, 14, and 16 months.

Discussion

Various investigations have indicated that the idea that non-nutritive sweeteners are metabolically inert should be left behind. They have been linked to mass gain and various metabolic disorders (Martínez et al. 2010; Davidson et al. 2011; Suez et al. 2014; Palmnäs et al. 2014; Foletto et al. 2016; Wang et al., 2016; Bian, Chi et al. 2017; Bian, Tu et al. 2017; Mendoza-Pérez 2020). However, there is very little information on the effects of the consumption of sweeteners in each of the stages of life.

This study investigated the effect of sweetener consumption on mass gain at different life stages of male and female Wistar rats. The results of this investigation indicated that in male rats there were only differences in body mass at the end of adulthood. Only the glucose group (764.3 \pm 96.3 g) had a higher mass compared to the control (602.2 \pm 46.3 g). In female rats, it was found that the consumption of sweeteners of any type, nutritious or non-nutritive, do not cause

significant changes in body mass at any stage of life, if and only if they are consumed together with a balanced diet.

These results are relevant since there is currently concern about the consumption of sweeteners during childhood and adolescence (Brown et al. 2010; Sylvetsky et al. 2017). The results of this research indicate that when sweeteners, nutritious or non-nutritive, are consumed together with a balanced diet, it did not impact the body mass of infant and adolescent model animals.

Martínez et al. (2010) found that in male rats that consumed sweeteners for 73 days, after weaning, the fructose group differed significantly from its control. This contrasts with our results, since in the young adult stage no difference was found in body mass. This may be because Martínez et al. (2010) supplied a much more concentrated 15% fructose solution versus that used in the present study of only 7%.

The results of this investigation differed from the results of a previous investigation of our work group.

In the research by Mendoza-Pérez et al. (2020) it was found that in young adult male rats of 128 days the fructose group presented a significantly higher mass. In this research, statistical significance was not achieved, but adult male rats that consumed fructose had the highest mass gain during that period. Various researches relate fructose consumption with the increase in adipose tissue, the development of the obesity, and the metabolic syndrome (Stanhope and Havel 2009, Tappy and Lê 2010, Sheludiakova et al. 2012).

Investigations by Foletto et al. (2016) found that male rats that ingested saccharin had a greater body mass. Our research did not find significant differences at any stage of life between the rats that consumed saccharin and the control group. A possible explanation for this discrepancy is that Foletto et al. (2016) supplied the sweetener in yogurt while in the present investigation it was supplied in drinking water. The second explanation is the age at which the supply of the sweeteners began. In the Foletto et al. (2016) investigation, the supply of sweeteners began with male rats with an age of 72 days, whereas in our study the supply began at 24 days of age. Foletto et al. (2016) began the supply of sweeteners with young adult rats, in our research the supply began in the infancy stage. The foregoing reveals that both the food matrix where the sweetener is supplied and the starting age of the supply of sweeteners may play a fundamental role.

Rats ingest less food in the nutritive sweetener groups and drank much more beverage. In all stages of life, the nutritive sweetener groups consumed significantly less food. But the behaviour of non-nutritive sweeteners changed at every stage of life. For example, in male rats at the end of their infancy, the acesulfame, saccharin, and sucralose groups ate more than the control. In contrast, at the end of their adolescence, only the acesulfame group ate more than the control. As adulthood, no non-nutritive sweetener group ingested more food than the control.

Finally, when they reached old age, only the acesulfame group consumed more food than the control. With female rats the trend was slightly different. Only in early adolescence and young adulthood did the non-nutritive sweetener groups ate more food than the control. In early adolescence it was the saccharin and sucralose groups. In the young adult stage, there were the acesulfame, saccharin and sucrose groups. The results of the evaluation of the effect of the consumption of sweeteners on the food intake varies depending on the age of the specimens. This has been

little studied and should be considered in future research. The foregoing is relevant. This increase in food intake could have repercussions on health if unbalanced diets were ingested. In this experimental research, since the specimens ingested a balanced diet, there were no repercussions on body mass or on glucose levels. But the above cannot be assured if the simultaneous consumption of sweeteners is given together with unbalanced hypercaloric diets. Triglycerides were higher for groups that ingested nutritive sweeteners during the whole experiment. This finding should be assessed with further future studies of the relevant internal organ such as liver as well as of peritoneal tissue.

The highest energy intake in the nutritive sweetener groups is due to the energy provided by the beverage itself. The food eaten by groups of nutritive sweeteners decreased, thus compensating for the excess energy from the drink. This compensation in the reduction of food intake when drinking a beverage with energy content has been reported in the investigations of Martínez et al. (2010) and Mendoza-Pérez et al. (2020). However, the reduction in food intake was not enough and the nutritive sweetener groups generally ingested more energy in all life stages than the control (see Tables 7 and 8). In the case of hypocaloric sweeteners, the slight increases in the amount of energy ingested were because they promoted a slight increase in food intake. These results agree with those found by Martínez et al. (2010) and Mendoza-Pérez et al. (2020). In all cases where there was a higher energy intake, a body composition analysis is necessary because probably despite the absence of a greater gain in body mass, there may be an increase in the amount of adipose tissue in the specimens (Sheludiakova 2012). Body mass is not the only parameter that should be evaluated, body composition is of vital importance for health. Two individuals may have the same body mass but different body composition, the one that contains a greater amount of adipose tissue will be more prone to the development of various diseases or comorbidities¹.

For male rats (Figure 3(a)), there were only significant differences ($p < 0.05$) in glucose levels in the samples taken at 9, 4, and 16 months. For female rats (Figure 3(b)), there were significant differences ($p < 0.05$) at 2, 4, 12, 14, and 16 months. Nevertheless, no group of male rats reached levels that could be considered pathological (Envigo 2019). This is

¹Comorbidity means more than one disease or condition is present in the same person at the same time. Conditions described as **comorbidities** are often chronic or long-term conditions

consistent with meta-analyses of randomized controlled trials in humans conducted by Nichol et al. (2018). They concluded that in humans the NNSs consumption was not found to elevate blood glucose level. According to Alsunni (2020) "It is concluded that while it is not possible to claim that non-nutritive sweeteners are metabolically inert, at the moment the evidence is not enough to link their use with glucose metabolism".

In general, it is observed that the groups that ingested nutritive sweeteners had the highest serum levels of triglycerides. The glucose group had the highest triglyceride levels throughout the experimentation. It should be remembered that the group that ingested glucose had the drink with the highest concentration of nutritive sweetener. In male rats, no non-nutritive sweetener differs from the control nor did it exceed the levels considered normal (<200 mg/dL) (Envigo 2019). In nutritive sweeteners, serum triglyceride levels agreed with the concentrations of the beverages. That is, as the concentration of the drink ingested decreased, the triglyceride levels decreased. The excessive consumption of simple carbohydrates is associated with alterations in energy, glucose, and triglyceride homeostasis. Disproportionate glucose, fructose, and sucrose intake promotes *de novo* lipogenesis in the liver, hypertriglyceridaemia and the development of a non-alcoholic fatty liver (Bocarsly et al. 2010; Sheludiakova et al. 2012; Lowndes et al. 2014).

Although the consumption of nutritive sweeteners did not have a significant impact on mass gain in the early stages of life, it did have a significant impact on triglyceride levels. Elevated triglyceride levels are a risk factor for the development of metabolic syndrome. Therefore, excessive consumption of beverages containing simple carbohydrates should be limited and further studies should be done.

Conclusions

Our study found that the consumption of non-nutritive sweeteners did not promote greater mass gain in either male or female rats. But it must be remembered that this applies if and only if these sweeteners are consumed in conjunction with a balanced diet.

It was found that the groups of nutritive sweeteners consumed the least amount of food in contrast to non-nutritive sweeteners, which promote a slight increase in food intake in both male and female rats, but it also depends on the life stage of the specimen.

The results indicate neither nutritious nor non-nutritive sweeteners altered serum glucose levels, if they are consumed together with a balanced diet.

The data indicate that nutritive sweeteners increase triglyceride levels in male and female rats. Non-nutritive sweeteners did not raise triglyceride levels except for the aspartame:acesulfame mix group in female rats at 2 months. Therefore, future research is necessary to elucidate the physiological mechanisms that might explain these observations.

Finally, it is demonstrated that to evaluate the effects of the consumption of sweeteners in animal models, the life stage of the models as well as the gender must be considered. Starting the supply of sweeteners at one stage or another will impact the results obtained.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This research was financed by the Support Program for Research and Technological Innovation Projects (PAPIIT, in Spanish) through the project IN217619 of the General Directorate of Academic Personnel of the National Autonomous University of Mexico (Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, in Spanish). First author received a scholarship from Mexico's National Council of Science and Technology (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, in Spanish) for graduate studies. Also, the financial support of UNAM through the Support Program for Research and Graduate Studies of the Faculty of Chemistry (Programa de Apoyo para la Investigación y el Posgrado, PAIP, Facultad de Química, in Spanish) is acknowledged (50009067).

References

- Agoston DV. 2017. How to translate time? The temporal aspect of human and rodent biology. *Front Neurol.* 8: 17–19.
- Alsunni AA. 2020. Effects of artificial sweetener consumption on glucose homeostasis and its association with type 2 diabetes and obesity. *Int J Gen Med.* 13:775–785.
- Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. 2017. The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS One.* 12(6):e0178426–16.
- Bian X, Tu P, Chi L, Gao B, Ru H, Lu K. 2017. Saccharin induced liver inflammation in mice by altering the gut microbiota and its metabolic functions. *Food Chem Toxicol.* 107(Pt B):530–539.

- Boakes RA, Kendig MD, Martire SI, Rooney KB. 2016. Sweetening yoghurt with glucose, but not with saccharin, promotes weight gain and increased fat pad mass in rats. *Appetite*. 105:114–128.
- Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. 2010. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: Increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav*. 97(1):101–106.
- Brown RJ, De Banate MA, Rother KI. 2010. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes*. 5 (4):305–312.
- Davidson TL, Martin AA, Clark K, Swithers SE. 2011. Intake of high-intensity sweeteners alters the ability of sweet taste to signal caloric consequences: implications for the learned control of energy and body weight regulation. *Q J Exp Psychol (Hove)*. 64(7):1430–1441.
- Drewnowski A, Rehm CD. 2015. Socio-demographic correlates and trends in low-calorie sweetener use among adults in the United States from 1999 to 2008. *Eur J Clin Nutr*. 69(9):1035–1041.
- Envigo 2019. Historical Control Data of Clinical Biochemistry in HsdRccHan TM : WIST, Wistar Hannover Rats [Internet]. [accessed 2020 Nov 5]. https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/hcd_clinical-biochemistry_kopiervorlage.pdf.
- Evans AM. 1986. Age at puberty and first litter size in early and late paired rats. *Biol Reprod*. 34(2):322–326.
- Foletto KC, Melo Batista BA, Neves AM, Feijó F de M, Ballard CR, Ribeiro MFM, Bertoluci MC. 2016. Sweet taste of saccharin induces weight gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*. 96:604–610.
- Juul F, Martinez-Steele E, Parekh N, Monteiro CA, Chang VW. 2018. Ultra-processed food consumption and excess weight among US adults. *Br J Nutr*. 120(1):90–100.
- Lowndes J, Sinnott S, Pardo S, Nguyen V, Melanson K, Yu Z, Lowther B, Rippe J. 2014. The effect of normally consumed amounts of sucrose or high fructose corn syrup on lipid profiles, body composition and related parameters in overweight/obese subjects. *Nutrients*. 6(3): 1128–1144.
- Malek AM, Hunt KJ, DellaValle DM, Greenberg D, St. Peter JV, Marriott BP. 2018. Reported consumption of low-calorie sweetener in foods, beverages, and food and beverage additions by US adults: NHANES 2007–2012. *Curr Dev Nutr*. 2(9):nzy054.
- Martínez C, González E, García RS, Salas G, Constantino-Casas F, Macías L, Gracia I, Tovar C, Durán-de-Bazúa C. 2010. Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *TOOBESJ*. 2(1):116–124.
- Mendoza-Pérez S, Guzmán-Gómez MB, García-Gómez RS, Ordaz-Nava G, Gracia-Mora MI, Macías-Rosales L, Morales-Rico H, Salas-Garrido G, Durán-Domínguez-de-Bazúa MdC. 2020. Effects on weaned male Wistar rats after 104, 197, and 288 days of chronic consumption of nutritive and non-nutritive additives in water. *J Food Sci Technol*. DOI:10.1007/s13197-020-04746-2
- Monteiro CA, Levy RB, Claro RM, De Castro IRR, Cannon G. 2011. Increasing consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health: evidence from Brazil. *Public Health Nutr*. 14(1):5–13.
- Moubarac JC, Martins APB, Claro RM, Levy RB, Cannon G, Monteiro CA. 2013. Consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health. Evidence from Canada. *Public Health Nutr*. 16(12):2240–2248.
- National Research Council 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. Washington (DC): The National Academies Press.
- Nichol AD, Holle MJ, An R. 2018. Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr*. 72(6):796–804.
- Palmnäs MSA, Cowan TE, Bomhof MR, Su J, Reimer RA, Vogel HJ, Hittel DS, Shearer J. 2014. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS One*. 9(10):e109841.
- Quinn R. 2005. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 21(6):775–777.
- Sengupta P. 2014. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 4(6):624–630.
- Sheludiakova A, Rooney K, Boakes RA. 2012. Metabolic and behavioural effects of sucrose and fructose/glucose drinks in the rat. *Eur J Nutr*. 51(4):445–454.
- Stanhope KL, Havel PJ. 2009. Fructose consumption: Considerations for future research on its effects on adipose distribution, lipid metabolism, and insulin sensitivity in humans. *J Nutr*. 139(6):1236S–1241S.
- Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, et al. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 514(7521): 181–186.
- Swithers SE, Martin AA, Davidson TL. 2010. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol Behav*. 100(1): 55–62.
- Sylvetsky AC, Jin Y, Clark EJ, Welsh JA, Rother KI, Talegawkar SA. 2017. Consumption of Low-calorie sweeteners among children and adults in the United States. *J Acad Nutr Diet*. 117(3):441–448.
- Sylvetsky AC, Rother KI. 2016. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav*. 164(Pt B): 446–450.
- Tappy L, Lê KA. 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev*. 90 (1):23–46.
- Wang QP, Lin YQ, Zhang L, Wilson YA, Oyston LJ, Cotterell J, Qi Y, Khuong TM, Bakhshi N, Planchenault Y, et al. 2016. Sucralose promotes food intake through NPY and a neuronal fasting response. *Cell Metab*. 24(1): 75–90.