



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL CONSUMO CRÓNICO DE EDULCORANTES SOBRE  
LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ÁCIDO GRASO  
SINTASA (FAS)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**RODOLFO ROBLES SÁNCHEZ**

**ASESORA: DRA. MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** MARÍA DEL CARMEN DURÁN DOMÍNGUEZ DE BAZÚA

**VOCAL:** AGUSTÍN REYO HERRERA

**SECRETARIO:** LANDY IRENE RAMÍREZ BURGOS

**1er SUPLENTE:** MARISELA BERNAL GONZÁLEZ

**2do SUPLENTE:** ROLANDO SALVADOR GARCÍA GÓMEZ

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

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

### **ASESORA DEL TEMA:**

---

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

### **SUSTENTANTE:**

---

**Rodolfo Robles Sánchez**

## **DECLARACIÓN**

"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"

---

**Rodolfo Robles Sánchez**

## RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** y a la **Facultad de Química** por darme la experiencia, los aprendizajes necesarios y la motivación para ser alguien mejor en la vida.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM** por el apoyo financiero otorgado para la adquisición de los materiales y reactivos empleados en esta investigación a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**) número **IN-217619** “Efecto del consumo de edulcorantes sobre la actividad de las enzimas reguladoras de la glucólisis y la lipogénesis en extractos de hepatocitos y sus implicaciones metabólicas sobre el exceso de masa corporal y la obesidad”.

Con respeto, estimación y admiración a la **Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa** por su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo experimental. Gracias Doctora por aceptarme en este proyecto.

Al **M. en C. Rolando Salvador García Gómez** por el apoyo incondicional en todo momento, su valiosa asesoría técnica brindada durante toda la realización de este trabajo en los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAyQA). Y por su amistad. GRACIAS PROFE!!!!!!

Agradezco al **Dr. Samuel Mendoza Pérez** por su increíble ayuda, asesoría, sus consejos y su gran paciencia para realizar esta tesis. ¡Enhorabuena Sr. Dr. Lic. Sam. Cumple tus sueños y más!

Al personal académico y administrativos de los Laboratorios 301, 302 y 303. Por la entrega de material y siempre tener los laboratorios limpios al momento de llegar a realizar la parte experimental de la tesis.

A mis compañeros y amigos del proyecto de edulcorantes en los Laboratorios de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAyQA) y de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA).

## DEDICATORIAS

A **mi madre**, que me dio la fuerza y la creatividad para poder seguir cumpliendo mis sueños y ambiciones. Con su lema de siempre: “Si eres un pen\*\*\*o, sé el mejor pen\*\*\*o”. Gracias mamá por ser mi soporte en todos estos años para poder tener un buen estudio, buen juicio y poder ser un honorable ser humano.

A **MJ**, que sin ti no podría haber encontrado el camino adecuado para seguir adelante, con las discusiones, por las peleas, los buenos ratos y la mejor comunicación que tenemos. Gracias por ser mi hermana.

A **Diana** por ser mi titán, sin ti la luz me habría invadido y no disfrutaria de la oscuridad. Te amo y siempre lo haré. Gracias por compartir la comida, por las pláticas, por amarme y soportar mis tonterías. Por ser mi pilar para seguir adelante.

A mis amigos **Alejandra, Omar, Montse**, que a pesar de los años y de la distancia, los sigo amando, agradezco tenerlos en mi vida. **Val, Gus, Ale, Netz y Dany** espero que nuestra amistad nunca se termine en los años por venir. A mis camaradas **Daniel, Tania y Pacoso** por empezar este nuevo resurgimiento.

Para mi familia y abuelos, gracias por siempre hacer que me supere a mí mismo. Hacer mi vida imposible y estar ahí para hacerme mi día más ameno.

A mi padre por estar en algún lugar de mi presente.

A mis profesores que me enseñaron a crear un nuevo mundo de conocimiento y amistad.

A mí por haber logrado lo que muchos ni siquiera se atrevieron hacer, por seguir cazando mis sueños y lograr tenerlos en mis manos.

*“La devoción inspira valentía. La valentía inspira el sacrificio. El sacrificio conduce a la muerte”- El orador*

## ÍNDICE

	Página
<b>DECLARACIÓN</b>	II
<b>RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS</b>	III
<b>DEDICATORIAS</b>	IV
<b>GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	XIV
<b>CAPÍTULO 1. Planteamiento del problema</b>	1
1.1. Introducción	1
1.2. Justificación	2
1.3. Hipótesis de trabajo	3
1.4. <b>OBJETIVOS</b>	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos	3
<b>CAPÍTULO 2. Antecedentes</b>	4
2.1. Ácido graso sintasa ( <i>FAS</i> , en inglés)	4
2.2. Lipogénesis <i>de novo</i>	5
2.3. Hígado graso no alcohólico	6
2.4. Edulcorantes	7
2.4.1. Edulcorantes nutritivos	7
2.4.1.1. Glucosa	8
2.4.1.2. Fructosa	8
2.4.1.3. Sacarosa	10
2.4.2. Edulcorantes no nutritivos	10
2.4.2.1. Acesulfame de potasio	11
2.4.2.2. Mezcla comercial de aspartame con acesulfame K	11
2.4.2.3. Sacarina	12
2.4.2.4. Sucralosa	12
2.5. Efecto saciador de los edulcorantes artificiales y naturales	13
<b>CAPÍTULO 3. Metodología</b>	14
3.1. Estrategia experimental	15
3.2. Extracción de proteínas	15
3.3. Cuantificación de proteínas	16
3.4. Actividad enzimática de la ácido graso sintasa ( <i>FAS</i> , en inglés)	16
<b>CAPÍTULO 4. Resultados y discusión</b>	19
4.1. Extracción de proteínas	19
4.2. Cuantificación de proteínas	20
4.3. Determinación de la actividad enzimática de la ácido graso sintasa ( <i>FAS</i> , en inglés)	22
<b>CAPÍTULO 5. Conclusiones y recomendaciones</b>	34
5.1. Conclusiones	34
5.2. Recomendaciones	35
<b>Anexos</b>	36
<b>Anexo A. Datos experimentales completos</b>	36
<b>Anexo B. Cálculos de los valores de <i>FAS</i></b>	40

		Página
	<b>Anexo C. Acervo fotográfico</b>	43
	<b>Anexo D. Disposición de residuos de la investigación</b>	49
	<b>Bibliografía</b>	51
<b>I.</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>Tabla 4.1.</b>	Solución amortiguadora de lisis	19
<b>Tabla 4.2.</b>	Promedio de proteína en ratas hembra de la estirpe <i>HSD: Han Wistar</i>	21
<b>Tabla 4.3.</b>	Promedio de proteína en ratas macho de la estirpe <i>HSD: Han Wistar</i>	21
<b>Tabla 4.4</b>	Cambios (delta, $\Delta$ ) de absorbancias, comparando el grupo de edulcorante suministrado	30
<b>Tabla 4.5.</b>	Concentración de proteína de algunas muestras hepáticas	31
<b>Tabla 4.6.</b>	Actividad específica de las muestras de los grupos de edulcorantes control y glucosa	31
<b>Tabla 4.7.</b>	ANDEVA de una vía para los niveles <i>FAS</i> (mU/mg) de las ratas macho <sup>1</sup>	31
<b>Tabla 4.8.</b>	ANDEVA de una vía para los niveles <i>FAS</i> (mU/mg) de las ratas hembra	32
<b>Tabla 4.9.</b>	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	32
<b>Tabla A.1.</b>	Niveles de actividad enzimática de la <i>FAS</i> (mU/mg) de cada rata hembra de la segunda eutanasia	36
<b>Tabla A.2.</b>	ANDEVA de una vía para los niveles de actividad enzimática de <i>FAS</i> de las ratas hembra de la segunda eutanasia	36
<b>Tabla A.3.</b>	Niveles de actividad enzimática de la <i>FAS</i> (mU/mg) de cada rata macho de la segunda eutanasia	38
<b>Tabla A.4.</b>	ANDEVA de una vía para los niveles de actividad enzimática de <i>FAS</i> de las ratas macho de la segunda eutanasia	38
<b>Tabla A.5.</b>	Análisis de varianza de dos vías para los niveles de <i>FAS</i> (mU/mg) en la segunda eutanasia	39
<b>Tabla B.1.</b>	Absorbancia a 340 nm. Promedio de muestras para determinar la actividad enzimática	40
<b>Tabla B.2.</b>	Cambios (delta, $\Delta$ ) de absorbancias a 340 nm	40
<b>II.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>Figura 2.1.</b>	Estructura de la ácido graso sintasa ( <i>FAS</i> , por sus siglas en inglés) (Maier et al. 2006)	4
<b>Figura 2.2.</b>	Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)	8
<b>Figura 2.3.</b>	Estructura química de la fructosa (Voet et al., 2009)	8
<b>Figura 2.4.</b>	Metabolismo de la fructosa (Mendoza-Pérez, 2021)	9
<b>Figura 2.5.</b>	Estructura química de la sacarosa (Mendoza-Pérez, 2021)	10
<b>Figura 2.6.</b>	Estructura química del acesulfame de potasio (Lipinski y Hanger, 2011)	11
<b>Figura 2.7.</b>	Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011)	12
<b>Figura 2.8.</b>	Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)	13

<sup>1</sup> Los colores azul y rosa resaltan la información de esta investigación (nota de autor)



	Página	
<b>Figura 3.1.</b>	Esquema de bloques de la estrategia experimental	14
<b>Figura 4.1.</b>	Preparaciones para homogeneización de tejido	19
<b>Figura 4.2.</b>	Homogeneización de tejido con <i>PELLET PESTLE</i> <sup>®</sup>	19
<b>Figura 4.3.</b>	Muestras del extracto hepático centrifugadas	19
<b>Figura 4.4.</b>	Curva patrón de obtención de concentración de proteína por el método de Bradford con base en la Albúmina Bovina Sérica (en inglés <i>BSA</i> )	20
<b>Figura 4.5.</b>	Tubos Eppendorf con reactivo de Bradford para la cuantificación de proteína	20
<b>Figura 4.6.</b>	Separación del extracto con micropipeta	20
<b>Figura 4.7.</b>	Muestra con reactivo de Bradford para su posterior cuantificación	20
<b>Figura 4.8.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 19 del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	23
<b>Figura 4.9.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 19 del grupo control en ausencia de la malonil-CoA	23
<b>Figura 4.10.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 14 del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	25
<b>Figura 4.11.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 14 del grupo control en ausencia de malonil-CoA	26
<b>Figura 4.12.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 72 del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	26
<b>Figura 4.13.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 72 del grupo control en ausencia de malonil-CoA	27
<b>Figura 4.14.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 54 del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	27
<b>Figura 4.15.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 54 del grupo glucosa en ausencia malonil-CoA	28
<b>Figura 4.16.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 69 del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	28
<b>Figura 4.17.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 69 del grupo glucosa en ausencia de malonil-CoA	29
<b>Figura 4.18.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 75 del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA	29
<b>Figura 4.19.</b>	Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 75 del grupo glucosa en ausencia de malonil-CoA	30
<b>Figura A.1.</b>	Gráfica de los niveles de actividad enzimática de la <i>FAS</i> en ratas hembra (mU/mg) por grupos. Cada punto es el dato de cada espécimen	37
<b>Figura A.2.</b>	Gráfica de los niveles de actividad enzimática de la <i>FAS</i> en ratas macho (mU/mg) por grupos. Cada punto es el dato de cada	39

	Página
	especimen
<b>Figura C.1.</b>	Rata Wistar adulta 43
<b>Figura C.2.</b>	(A) Especímenes de ratas Wistar del grupo de sacarosa alojados en grupo en la caja de polisulfonato. (B) Especimen alimentándose del comedero 43
<b>Figura C.3.</b>	Especimen en la cámara rica de CO <sub>2</sub> durante la eutanasia 44
<b>Figura C.4.</b>	Armado de mesa de trabajo para disección de cada especimen, pesaje y separación de muestras 44
<b>Figura C.5.</b>	Disección de especimen realizado por el M. en C. Gerardo Salas de la FMVZ de la UNAM 44
<b>Figura C.6.</b>	Localización del hígado para su posterior disección del especimen 44
<b>Figura C.7.</b>	Separación del hígado de la rata para proceder con el pesaje del órgano 45
<b>Figura C.8.</b>	Pesaje del hígado, corte y acomodo para su almacenamiento a -20°C 45
<b>Figura C.9.</b>	Muestra de tejido hepático distribuida en tubos Eppendorf 45
<b>Figura C.10.</b>	Fragmentos de tejido hepático con medio de montaje para tejidos Tissue-Tek <sup>®</sup> y envuelto en aluminio para su conservación a -20°C 46
<b>Figura C.11.</b>	Tejido hepático con solución amortiguadora de lisis activada (RIPA <sup>®</sup> ) en hielo para su conservación antes de la homogeneización 46
<b>Figura C.12.</b>	Ruptura mecánica del tejido hepático en solución amortiguadora de lisis 46
<b>Figura C.13.</b>	Extracto crudo hepático conservado en hielo para su posterior análisis 46
<b>Figura C.14.</b>	Preparación de muestra para la determinación de actividad enzimática de la FAS 47
<b>Figura C.15.</b>	Celdas de polimetilmetacrilato (PMMA) con muestra y reactivo de Bradford para la cuantificación de proteínas 47
<b>Figura C.16.</b>	Muestras para la determinación de actividad enzimática de la FAS en el espectrofotómetro UV/VIS marca RAYLEIGH modelo UV-1800 47
<b>Figura C.17.</b>	Personal académico, compañeros y amigos del proyecto Edulcorantes en el Laboratorio de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAYQA) 48
<b>Figura C.18.</b>	Dra. María del Camen Durán Domínguez de Bazúa, Dr. Samuel Mendoza Pérez y el M. en C. Rolando Salvador García Gómez junto con el personal académico y compañeros del LIQAYQA 48
<b>Figura D.1.</b>	Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación 49

**Nota:** Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009), así como los símbolos % y °C junto al guarismo o letra. Las abreviaturas de *et altere* y *et cetera* no van con cursivas

## GLOSARIO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

<b>ACC</b>	Acetil-Coenzima A carboxilasa
<b>Acesulfame K</b>	Ace de K o E950. Es un derivado del ácido acetoacético, y es la sal de potasio del 6-metil-1, 2,3-oxatiazina-4-(3 H)-1,2, 2-dióxido. Es 130-220 veces más dulce que el azúcar
<b>ACL</b>	En inglés <i>Adenosine triphosphate citrate lyase</i> . Adenosina trifosfato citrato liasa
<b>ADI</b>	En inglés <i>Acceptable Daily Intake</i> . Ingesta Diaria Admisible
<b>ALT</b>	Alanina transaminasa en inglés
<b>ANDEVA (ANOVA)</b>	Análisis de varianza en español. Por sus siglas en inglés <i>Analysis of variance</i> . Técnica que permite calcular la probabilidad de encontrar medias muestrales dispares entre sí (Prieto-Valiente et al., 2010)
<b>AST</b>	Aspartato transaminasa en inglés
<b>AT</b>	Adipose tissue en inglés. Tejido adiposo
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina en inglés
<b>ChREBP</b>	En inglés <i>Carbohydrate response element binding protein</i> . Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
<b>CICUAL</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la Facultad de Química de la UNAM. Creado con el propósito de promover y verificar el cuidado humanitario de los animales utilizados en la investigación biomédica
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b>	Fórmula condensada de la glucosa
<b>°C</b>	Grado Celsius. Unidad de temperatura que, por definición, es igual en magnitud al kelvin
<b>DNL</b>	Lipogénesis <i>de novo</i> por sus siglas en inglés
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetona fosfato en inglés
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético por sus siglas en inglés
<b>Esteatosis hepática</b>	Es una enfermedad hepática grasa no alcohólica. Su prevalencia aumenta con la edad, la obesidad y está fuertemente asociada con la presencia de síndrome metabólico y aumento de la mortalidad cardiovascular y por enfermedades malignas. Se produce por una acumulación de triglicéridos en los hepatocitos relacionada con insulinoresistencia hepática y muscular (Graffigna et al., 2017)

<b>FA</b>	<i>Fatty acids</i> en inglés. Ácidos grasos
<b>FAO</b>	En inglés <i>Food and Agriculture Organization</i> . Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
<b>FAS</b>	En inglés <i>Fatty Acid Synthase</i> . Sintasa de ácidos grasos
<b>FDA</b>	En inglés <i>Food and Drug Administration</i> . Administración de Alimentos y Fármacos. Agencia del Gobierno de los Estados Unidos de América responsable de la regulación de alimentos y medicamentos
<b>FMVZ, UNAM</b>	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México
<b>GA3P</b>	Gliceraldehído-3-fosfato por sus siglas en inglés
<b>H</b>	Ratas hembra
<b>HSD</b>	Harlan Sprague-Dawley, Inc. en 1993 (nomenclatura HsdHan <sup>®</sup> :WIST) (Envigo, 2008)
<b>Índice de Masa Corporal (IMC)</b>	Es un número que se calcula con base en la masa y la estatura de una persona. Para la mayoría, el IMC es un indicador confiable de la gordura y se usa para identificar las categorías del exceso de masa que pueden llevar a problemas de salud. Sin embargo, es un parámetro poco específico que no debe ser usado para instaurar políticas gubernamentales (Nuttall, 2015)
<b>JECFA</b>	<i>Joint Expert Committee on Food Additives</i> (por sus siglas en inglés). Es el 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)
<b>kg</b>	Kilogramo, medida de masa del Sistema Internacional de Unidades
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Abreviatura química del monofosfato de potasio
<b>L</b>	Litro. Unidad de volumen del Sistema internacional
<b>Lipogénesis</b>	La lipogénesis es un proceso metabólico que ocurre principalmente en el hígado y en el tejido adiposo y es estimulada por una dieta alta en carbohidratos y por la acción de la insulina. La lipogénesis se deriva principalmente de carbohidratos y es un contribuyente relativamente menor a las reservas de lípidos de todo el cuerpo, contribuyendo 1–3% del equilibrio total de grasa en los seres humanos que consumen una dieta típica (Tsiloulis y Watt, 2015)
<b>M</b>	Ratas macho
<b>Mezcla comercial acesulfame-aspartame</b>	Una combinación de aspartame y acesulfame cuya composición es de 1:2, respectivamente, 350 veces más dulce que el azúcar y un 75% más dulce que sus dos principales componentes por separado

<b>mg</b>	Miligramo, unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades
<b>MIX</b>	Mezcla comercial de acesulfame y aspartame
<b>mM</b>	miliMol, milésima parte de un mol o cantidad de sustancia igual a una milésima de un mol
<b>mU</b>	Miliunidad de actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto
<b>m/v</b>	Porcentaje de masa volumen
<b>µg</b>	Microgramo. Unidad de masa equivalente a una millonésima parte de un gramo
<b>µL</b>	Microlitro. Unidad de volumen equivalente a la millonésima parte de un litro
<b>µM</b>	MicroMolar
<b>µmol</b>	MicroMol. Cantidad de sustancia equivalente a una millonésima de mol
<b>NaCl</b>	Abreviatura química del Cloruro de sodio
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, por sus siglas en inglés
<b>NaF</b>	Abreviatura química para el fluoruro sódico
<b>NAFLD</b>	Siglas en inglés para la enfermedad del hígado graso no alcohólico
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Abreviatura química de difosfato de sodio
<b>Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></b>	Abreviatura química para el ortovanadato de sodio
<b>nm</b>	Nanómetro. Unidad de longitud del SIU que equivale a una mil millonésima parte de un metro
<b>NP-40</b>	Nombre comercial del nonil-fenol-polietilenglicol éter. Detergente. Utilizado como tensoactivo no iónico y puede actuar como agente emulsionante. Puede también usarse para romper todas las membranas dentro de una célula
<b>Obesidad</b>	Acumulación anormal o excesiva de grasa con un índice de masa corporal $\geq 30$ kg/m <sup>2</sup> ; es una enfermedad crónica caracterizada por el almacenamiento en exceso de tejido adiposo en el organismo, acompañado de alteraciones metabólicas, que predisponen a la presentación de trastornos que deterioran el estado de salud
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PDH</b>	Piruvato deshidrogenasa
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno, medida para determinar el grado de alcalinidad o acidez

	de una disolución
<b>PMMA</b>	Abreviatura del polimetilmetacrilato, el cual es un polímero termoplástico altamente transparente, considerado como alternativa del cristal
<b>Poder edulcorante</b>	Valor que se obtiene al comparar los edulcorantes por su capacidad de causar dulzor con respecto de la sacarosa
<b>RIPA<sup>®</sup></b>	En inglés <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> . La solución RIPA <sup>®</sup> es una solución amortiguadora de lisis que extrae proteínas de manera eficaz a partir de células de mamíferos
<b>rpm</b>	Abreviatura de revolución por minuto. Unidad de frecuencia utilizada para expresar velocidad angular o el número de rotaciones completadas cada minuto por un cuerpo que gira alrededor
<b>Sacarina</b>	Sulfamida, cuyo átomo de hidrógeno es algo ácido y forma sales fácilmente. La sacarina es aproximadamente 300 veces más dulce que el azúcar, tiene un índice glucémico cero, pero presenta un gusto metálico en altas concentraciones
<b>SDS</b>	En inglés <i>sodium dodecylsulfate</i> . Dodecil sulfato de sodio
<b>SCF</b>	En inglés <i>Scientific Committee on Food</i> . Comité Científico sobre la Alimentación Humana
<b>SREBP1c</b>	En inglés <i>Sterol regulatory element-binding protein</i> . Proteína de unión al elemento regulador de los esteroides
<b>Sucralosa</b>	Es un compuesto de 1,6-dicloro-1,6-dideoxy-β-D-fructofurano-sil-4-cloro-4-deoxy-α-D-galactopiranosido, obtenido por la halogenación selectiva de la molécula de sacarosa. Es 600 veces más dulce que el azúcar
<b>TBS</b>	Solución salina amortiguadora con <i>tris</i> en inglés ( <i>tris buffer saline solution</i> )
<b>TCA</b>	En inglés <i>Tricarboxylic acid</i> . Ácido tricarbóxico
<b>Teklad Global 18S</b>	Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable), es una dieta de fórmula fija, esterilizable en autoclave, fabricada con ingredientes de alta calidad y diseñada para apoyar la gestación, la lactancia y el crecimiento de roedores (Envigo, 2015)
<b>Tris</b>	Nombre abreviado del compuesto orgánico tri(hidroximetil)aminometano, de la fórmula (HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> . Nombre IUPAC 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
<b>U</b>	Unidad de actividad enzimática, cantidad de enzima que cataliza la conversión de un micromol de sustrato por minuto
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía, proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible. Radiación longitud de onda que comprende de los 160 a los 780 nm

## Letras griegas

$\lambda$

Longitud de onda

## RESUMEN

El exceso de masa y la obesidad son enfermedades de etiología multifactorial. Recientemente se ha declarado, en México, una epidemia de estos padecimientos. Como medida para reducir el contenido energético de los productos ultraprocesados y, al mismo tiempo, reducir los costos de producción, los grandes consorcios industriales en las últimas décadas sustituyeron parcial o totalmente a los glúcidos simples por edulcorantes no nutritivos. A pesar del amplio uso de los edulcorantes no nutritivos y de la aprobación por parte de organismos reguladores como la *FDA* aún existen dudas sobre los efectos del consumo crónico de este tipo de aditivos alimentarios. Diversas investigaciones han mostrado que los edulcorantes no nutritivos no son la respuesta a la problemática del exceso de masa y obesidad y que incluso pueden estarlo agravando al modificar la microbiota intestinal, desregular el metabolismo energético y promover un mayor apetito y ganancia de masa. Por esta razón en este estudio se investigaron los efectos del consumo crónico de edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre los niveles de actividad de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) en extractos hepáticos. Para ello, se emplearon 8 grupos de ratas macho y hembra recién destetadas (5 ratas por grupo/género) sacarosa 10%, glucosa 14%, fructosa 7%, acesulfame de K 0.05%, mezcla aspartame con acesulfame de K 1.55%, sacarina 0.033%, sucralosa 0.017% y un grupo control. Durante 480 días se les suministraron a las ratas soluciones acuosas de cada edulcorante y fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta balanceada. Al finalizar la experimentación animal se realizó una eutanasia humanitaria y se disectó el hígado y otros órganos y tejidos. De cada muestra de hígado se realizó un extracto crudo de proteínas. En cada extracto se determinaron los niveles de actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos mediante un ensayo enzimático espectrofotométrico registrando los cambios de la absorbancia a 340 nm en la curva de avance de reacción. Los análisis de varianza indicaron la existencia de diferencias significativas, tanto en ratas macho como en hembras, con respecto del grupo control. Para las ratas macho los grupos que consumieron fructosa ( $232.9 \pm 70.7$  mU/mg), glucosa ( $195.3 \pm 56.1$  mU/mg), sacarosa ( $72.6 \pm 26.8$  mU/mg) y sacarina ( $43.8 \pm 22.9$  mU/mg) tuvieron niveles de actividad enzimática específica significativamente mayores que el grupo control ( $13.5 \pm 6.6$  mU/mg). Para el caso de las ratas hembra los grupos que bebieron fructosa ( $87.1 \pm 28.5$  mU/mg), glucosa ( $141.8 \pm 53.8$  mU/mg), sacarosa ( $108.8 \pm 58.8$  mU/mg), acesulfame de K ( $61.4 \pm 27.5$  mU/mg), la mezcla de aspartame con acesulfame ( $60.9 \pm 27.5$  mU/mg) y sucralosa ( $85.5 \pm 36.5$  mU/mg) tuvieron niveles de actividad enzimática específica significativamente mayores con respecto del grupo control ( $14.8 \pm 8.1$  mU/mg). Con lo anterior se puede concluir que los niveles de actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) en los extractos hepáticos dependieron del tipo de edulcorante ingerido, así como del sexo de los especímenes. La tendencia general observada es que los mayores niveles de actividad se observaron en los grupos que bebieron edulcorantes nutritivos (fructosa, glucosa y sacarosa). Asimismo, se observó que las ratas hembra fueron más susceptibles a los efectos de los edulcorantes no nutritivos. Finalmente, se observó que el consumo de edulcorantes, tanto nutritivos como no nutritivos, modifica a una de las enzimas de la lipogénesis, la cual es una de las principales rutas del metabolismo energético.

**Palabras clave:** Ácido graso sintasa (*FAS*), lipogénesis de *novo*, edulcorantes no nutritivos y nutritivos, acesulfame K, mezcla comercial acesulfame-aspartame, fructosa, glucosa, sacarina, sucralosa, ratas Wistar macho, ratas Wistar hembra



# CAPÍTULO 1. Planteamiento del problema

## 1.1. Introducción

El exceso de masa corporal se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. Entre los factores para estos padecimientos, según la OMS (2020a), se encuentra un aumento de la ingesta de alimentos de alto contenido energético y un descenso en la actividad física, debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de vida y trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización. Un exceso de masa corporal trae consigo un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades no transmisibles como son las enfermedades cardiovasculares, las cuales fueron la principal causa de muerte en el 2012.

Manzur-Jattin et al. (2020) comentan que en el pasado se pensaba que el uso de edulcorantes hipocalóricos aportaba beneficios en la salud de los consumidores debido a su supuesta inactividad metabólica. Sin embargo, desde hace varios años este concepto ha cambiado y en muchos estudios se ha cuestionado la idea de que estos edulcorantes sean metabólicamente inertes. Diversas investigaciones han evidenciado una asociación entre el uso de edulcorantes no nutritivos y alteraciones metabólicas, como intolerancia a la glucosa, eventos cardiovasculares, síndrome metabólico, etc. (Suez et al., 2014).

Swithers (2015) comunicó que las causas de exceso de masa corporal, mal llamada sobrepeso<sup>2</sup>, y obesidad son multifactoriales; no obstante, con su rápido incremento de la prevalencia, la evidencia científica ha implicado una serie de factores dietéticos como posibles contribuyentes. Entre estos se encuentra el consumo excesivo de glúcidos simples y muchos aditivos alimentarios. Figlewicz et al. (2009) comentaron que el uso de bebidas endulzadas con glúcidos simples como fructosa o glucosa o diglúcidos como la sacarosa o la lactosa han sido asociadas de manera creciente con el exceso de masa, la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico.

---

<sup>2</sup> Peso y masa no son sinónimos. El peso es una fuerza y se mide en newton y la masa es una propiedad de la materia y se mide en kg. El error provino de usar una báscula para pesarse y se usó la palabra peso en vez de la palabra masa o las palabras masa corporal (nota de la asesora)

Como consecuencia de lo anterior cada vez se hace más común el uso de endulzantes hipocalóricos o artificiales, que siempre deben ir acompañados de agentes conservadores al adicionarse a los alimentos o bebidas no alcohólicas, entre otros aditivos.

Los edulcorantes, también conocidos como sustitutos de azúcar, son sustancias que se utilizan en lugar de la sacarosa para endulzar bebidas y alimentos, aunque no para otorgarles su poder conservador. Al contar con un mayor poder edulcorante requieren cantidades menores en su empleo, aunque deben siempre ir acompañados de conservadores químicos. Se ha señalado que los edulcorantes artificiales impactan sobre el apetito, la saciedad, el balance energético corporal, las alteraciones en la microbiota intestinal, alteraciones en las hormonas como la insulina, glucagón, etc. (Bian et al., 2017; Carraro-Foletto et al., 2016; de-Matos-Feijó et al., 2013; García-Almeida et al., 2013; Martínez et al., 2010; Mendoza-Pérez, 2017; Palmnäs et al., 2014; Suez et al., 2014; Swithers et al., 2009; Swithers et al., 2013).

Por ello, en la presente investigación se determinó si existe una sobre-estimulación de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) encargada de catalizar la lipogénesis en hepatocitos provocada por el consumo de edulcorantes y que, a su vez, pudiera estar relacionada con los problemas de obesidad y exceso de masa corporal en seres humanos.

## **1.2. Justificación**

Según los medios de comunicación el uso de edulcorantes artificiales, especialmente en bebidas, puede ser de utilidad para reducir el consumo de energía y disminuir el riesgo del síndrome metabólico. Sin embargo, se necesitan estudios a largo plazo, pues su uso se hace cada vez más habitual y falta conocer los diversos efectos sobre el metabolismo que conllevaría su consumo crónico. No se ha caracterizado por completo la influencia de los edulcorantes calóricos e hipocalóricos en la lipogénesis. Sin embargo, se sospecha que el consumo crónico de edulcorantes nutritivos y no nutritivos puede provocar una alteración del metabolismo energético sobre-estimulando la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) con respecto de un grupo control que no ingiere ningún edulcorante.

### **1.3. Hipótesis de trabajo**

En los extractos hepáticos de ratas macho y hembra que consumieron durante 16 meses edulcorantes nutritivos y no nutritivos se incrementarán los niveles en la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) en comparación con el grupo control que no ingirió edulcorantes.

### **1.4. OBJETIVOS**

#### **1.4.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto del consumo crónico durante 16 meses de edulcorantes artificiales y naturales sobre los niveles de actividad de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) en extractos de hepatocitos de 40 ratas macho y 40 ratas hembra de la estirpe Wistar.

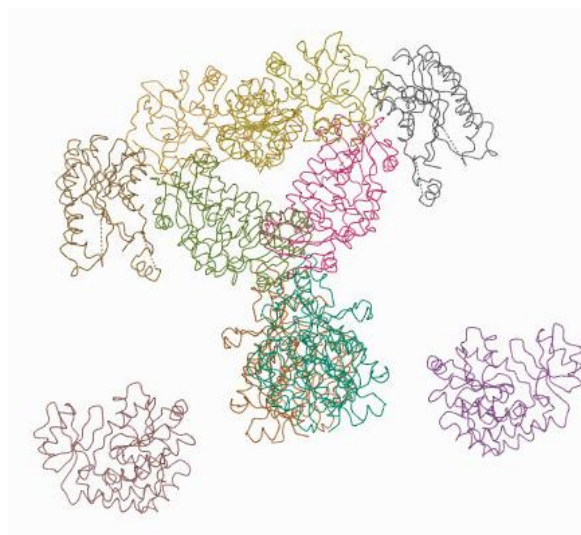
#### **1.4.2. Objetivos específicos**

1. Extraer y cuantificar las proteínas de las muestras de las 40 ratas macho y 40 hembras que consumieron edulcorantes nutritivos y no nutritivos
2. Cuantificar los niveles de actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) en los extractos de hepatocitos de 80 ratas que consumieron edulcorantes
3. Relacionar la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) con la masa corporal y la masa del hígado de cada espécimen
4. Relacionar la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) con los factores: Edulcorante ingerido, género del espécimen y masa corporal para saber si existe un aumento en el apetito por la ingesta del consumo crónico de edulcorantes.

## CAPÍTULO 2. Antecedentes

### 2.1. Ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés)

La enzima ácido graso sintasa (*FAS*, por sus siglas en inglés) es una enzima multifuncional con una masa molar de 333.13 kDa (Maier et al., 2006). Su estructura se muestra en la Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Estructura de la ácido graso sintasa (*FAS*, por sus siglas en inglés) (Maier et al., 2006)

La enzima es clave debido a que cataliza una de las reacciones de la biosíntesis de ácidos grasos (lipogénesis) en el citoplasma de células del tejido adiposo (adipocitos) y del hígado (hepatocitos) (Lehninger et al., 2007). Los ácidos grasos saturados o monoinsaturados, se sintetizan mediante la acción de la ácido graso sintasa (*FAS*, por sus siglas en inglés). Esta enzima es una proteína multifuncional que cataliza la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga a partir de la acetil-CoA y la malonil-CoA (Bloch y Vance, 1977; Campbell y Cronan, 2001). Su actividad está correlacionada con la tasa de síntesis de los ácidos grasos produciendo una serie de reacciones iterativas, necesarias para producir ácidos grasos (Beld et al., 2014). La ácido graso sintasa construye, a partir de la condensación de la acetil-CoA y de la malonil-CoA, una cadena de ácido graso en elongación en dos carbonos y dos pasos de reducción, requiriendo electrones, donados por el fosfato del dinucleótido de adenina nicotinamida reducido (*NADPH*, por sus siglas en inglés). Se forma un ácido graso saturado de 16 carbonos, el ácido palmítico, el cual servirá de

precursor de otros ácidos grasos (Bazin y Ferré, 2001; Lehninger et al., 2007). La carboxilación de la acetil-CoA dará como producto la malonil-CoA, mediante la reacción catalizada por la enzima acetil-coenzima A carboxilasa (*ACC*). La reacción anterior es el paso limitante en la biosíntesis de ácidos grasos. Además, reduce las tasas de lipogénesis *de novo* (*DNL*), dando una retroalimentación negativa adicional sobre el proceso.

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

La insulina promueve la expresión de *FAS* mediante la activación de factores de transcripción como *SREBP1c* (proteína de unión al elemento regulador de los esteroides) (López-Oliva-Muñoz y Muñoz-Martínez, 2014). Asimismo, *FAS* es regulada transcripcionalmente por los niveles de glucosa a través del factor de transcripción *ChREBP* (proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos). A concentraciones elevadas de glucosa *ChREBP* promueve la transcripción del gen codificante para la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) y otros genes de enzimas de la lipogénesis y glucólisis (Jensen-Urstad y Semenkovich, 2012; López-Oliva-Muñoz y Muñoz-Martínez, 2014).

## **2.2. Lipogénesis *de novo***

La deposición de grasa en el tejido adiposo (*AT*, por sus siglas en inglés) es un aspecto importante del metabolismo energético que se origina a partir de ácidos grasos ingeridos (*FA*, por sus siglas en inglés) o de una síntesis *de novo*. La síntesis de *FA* es activa en varios tejidos (hígado, glándula mamaria, pulmón, intestino, tejido adiposo marrón y blanco) (Softic et al., 2016). La lipogénesis *de novo* (*DNL*, por sus siglas en inglés) es un proceso mediante el cual los lípidos se sintetizan de manera endógena a partir de fuentes dietéticas, generalmente hidratos de carbono o depósitos de energía almacenada (Ameer et al., 2014).

El proceso se puede dividir en tres pasos secuenciales: Síntesis de ácidos grasos, elongación/desaturación de ácidos grasos y ensamblaje de triacilglicéridos. Los carbohidratos de la dieta, que se consumen principalmente como almidones (polímeros de glucosa) o azúcar de mesa (sacarosa, un diglúcido formado por glucosa y fructosa), se descomponen en los monoglúcidos de seis carbonos, glucosa o fructosa, cuyo metabolismo converge en la producción de dos intermediarios de carbono, gliceraldehído-3-fosfato (*GA3P*) y fosfato de dihidroxiacetona (*DHAP*). Estos intermediarios pueden ser convertidos internamente o metabolizados adicionalmente a piruvato, el cual es el producto final de la glucólisis (Softic et al., 2016).

Por su parte Zakim (1972) describe que la fructosa es convertida a fructosa-1-fosfato por la fructoquinasa (*KHK*, por sus siglas en inglés) y, posteriormente, metabolizada a triosa-fosfato, entrando a la vía glicolítica y sirviendo como una fuente no regulada de glicerol-3-fosfato y de acetil-CoA, favoreciendo el proceso de lipogénesis *de novo*. El piruvato puede entrar en las mitocondrias, donde es convertido en acetil-CoA por acción del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (*PDH*), para usarse en el ciclo del ácido tricarbóxico (*TCA*, por sus siglas en inglés) para la producción de energía. Cuando las reservas de energía son abundantes, los intermediarios del *TCA* se acumulan y el citrato se transporta de nuevo al citoplasma mediante el sistema de transporte de tricarbóxilato mitocondrial. El citrato es convertido en acetil-CoA y oxaloacetato, por la acción de la adenosina trifosfato citrato liasa (*ACL*, por sus siglas en inglés). Posteriormente, la acetil-CoA es transformada en la malonil-CoA por acción de la acetil coenzima A carboxilasa (*ACC*) y, finalmente, la enzima ácido graso sintasa (*FAS*, por sus siglas en inglés) transformando la acetil-CoA y la malonil-CoA a palmitato, terminando en la síntesis del ácido graso complejo (Ameer et al., 2014). La malonil-CoA es la principal fuente de carbono utilizada para la síntesis endógena de ácidos grasos (Fullerton et al., 2013).

### **2.3. Hígado graso no alcohólico**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (*NAFLD*, por sus siglas en inglés), se define como una acumulación excesiva de lípidos hepáticos que exceden del 5 al 10% de la masa del hígado. El síndrome metabólico es un importante predictor del *NAFLD*. Se ha estimado que, en hombres con síndrome metabólico, el riesgo de hígado graso no alcohólico es cuatro veces mayor y en

mujeres es once veces más (Roesch-Dietlen et al., 2006). A pesar de que hacen falta más estudios, el *NAFLD* afecta tanto a niños como a adultos y su prevalencia en la población general se estima se encuentra entre un 2.8 y 24%.

En México, estudios poblacionales han estimado una prevalencia de alrededor de 17.05% en una población asintomática. La prevalencia y severidad del *NAFLD* se correlacionan con el grado de obesidad. En diversos estudios se ha demostrado una relación entre el índice de masa corporal, el grado de esteatosis y la gravedad de la lesión hepática (Méndez-Sánchez et al., 2010, Postic y Girard, 2008).

## **2.4. Edulcorantes**

El término edulcorante es un término muy amplio que abarca distintas sustancias de diversa naturaleza pero que poseen la característica común de provocar el sabor dulce. De acuerdo con el diccionario panhispánico del español jurídico el termino edulcorante se define como “sustancia que se emplea para dar un sabor dulce a los alimentos” (Real Academia Española, 2020).

Existen diversas formas de clasificarlos pero, para fines prácticos, en la presente tesis se clasificaron en edulcorantes nutritivos y no nutritivos.

### **2.4.1. Edulcorantes nutritivos**

Los edulcorantes nutritivos o calóricos son un conjunto de carbohidratos, compuestos polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas, que se encuentran en alimentos de la dieta básica humana como frutos, verduras y hortalizas (Gil-Hernández, 2010).

Este grupo comprende glúcidos como el azúcar refinada (sacarosa), jarabes, dextrosa, lactosa, maltosa, glúcidos invertidos y los polioles como el sorbitol, manitol, xilitol, etc. (Velásquez-Uribe, 2006).

### 2.4.1.1. Glucosa

La glucosa es el monoglúcido más abundante en la naturaleza. Se encuentra en frutas y su concentración depende del grado de madurez en el que se está el fruto. También es posible encontrarla en la miel de abeja. La glucosa es la principal fuente de energía para la mayoría de los seres vivos; por lo tanto, es el combustible por excelencia de la célula. Es un monoglúcido de fórmula general  $C_6H_{12}O_6$  (Figura 2.2). Su poder edulcorante es menor al de la sacarosa siendo de 0.7 (Valdés-Martínez, 2006).

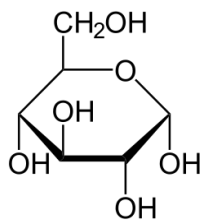


Figura 2.2. Estructura química de la glucosa (Valdés-Martínez, 2006)

### 2.4.1.2. Fructosa

La fructosa es un monoglúcido al igual que la glucosa. Tiene la misma fórmula molecular pero diferente estructura y, por lo tanto, se trata de un isómero de la glucosa (Figura 2.3). En la naturaleza se encuentra presente en una gran cantidad de frutas, de ahí deriva su nombre, en la miel e incluso en algunos vegetales. Este edulcorante es más dulce que la sacarosa, cuenta con un poder edulcorante de entre 1.3 a 1.5. No obstante, la mayor parte de la fructosa que se consume en la dieta humana y que se usa industrialmente 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)

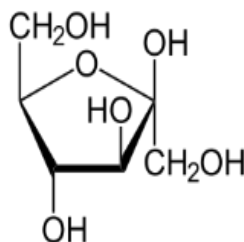


Figura 2.3. Estructura química de la fructosa (Voet et al., 2009)



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 vía de la fructosa-1-fosfato se salta los principales puntos de control de la glucólisis y conlleva a que casi la totalidad de la fructosa ingerida sea metabolizada hasta la síntesis de ácidos grasos promoviendo una lipogénesis *de novo*, el desarrollo de hígado graso no alcohólico y la esteatosis hepática (Bray et al., 2004; Hui et al., 2014; Keim y Havel, 2013; Riveros et al., 2014). En la Figura 2.4 se muestra el metabolismo de la fructosa.

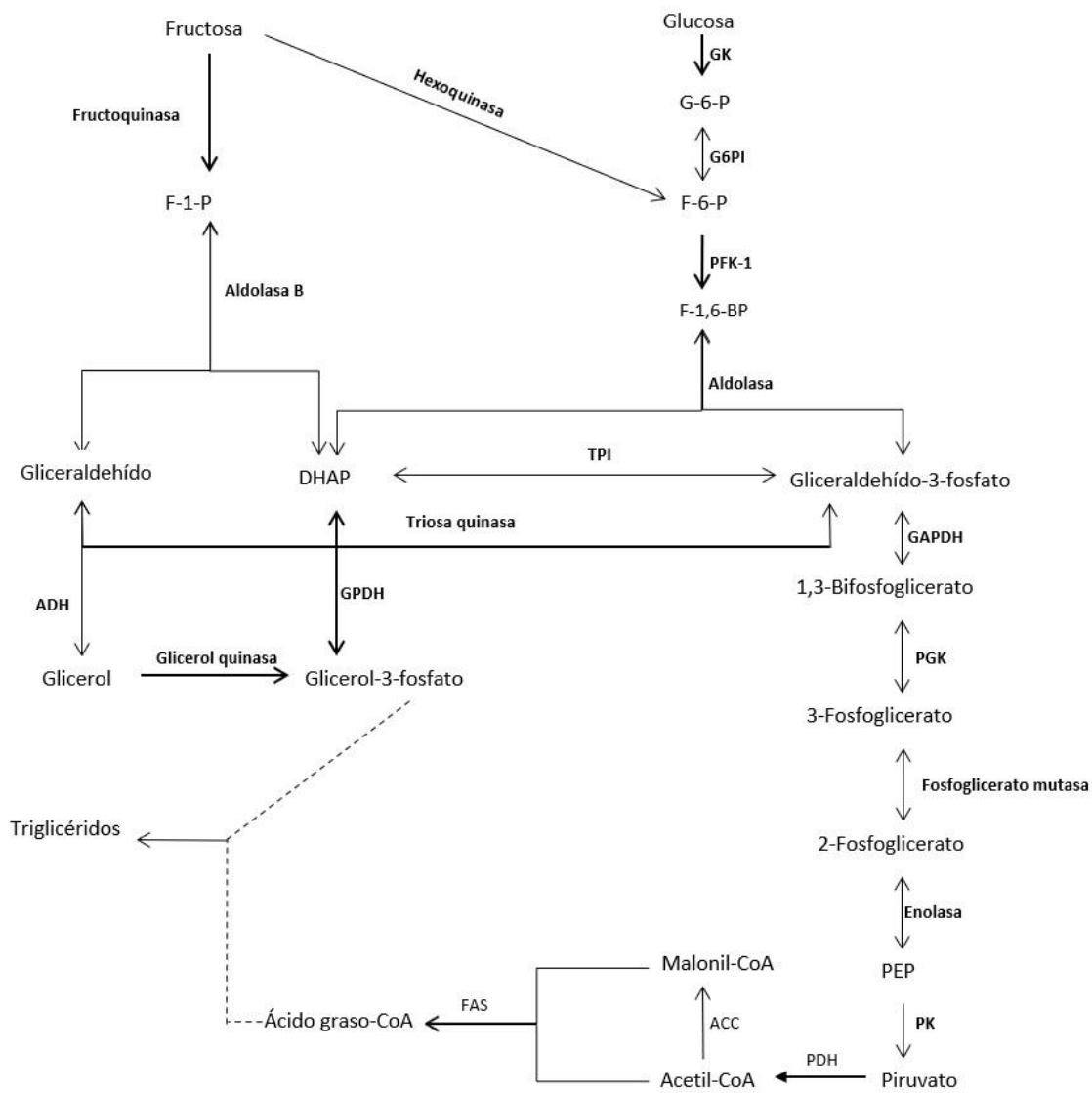


Figura 2.4. Metabolismo de la fructosa (Mendoza-Pérez, 2021)

### 2.4.1.3. Sacarosa

La sacarosa, comúnmente conocida como azúcar, azúcar de mesa o azúcar de caña o remolacha, es un diglúcido formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de fructosa mediante un enlace glucosídico (Figura 2.5). Debido a este enlace este disacárido no posee poder reductor, debido a que en su estructura carece de grupos aldehído o cetonas a diferencia de los monoglúcidos que la componen. La sacarosa es extraída de la caña de azúcar, de la remolacha o del maíz y generalmente es purificada y cristalizada. La sacarosa es tomada como referencia para la equidulzura y se le asigna el valor de 1 (Gwak et al., 2012).

Al igual que la glucosa y la fructosa se encuentra en una gran cantidad de frutos. En los humanos y los mamíferos la sacarosa es hidrolizada en el intestino por la enzima sacarasa. Tras la hidrolisis cada uno de los monosacáridos, glucosa y fructosa, seguirán sus rutas metabólicas correspondientes (Fox, 2011).

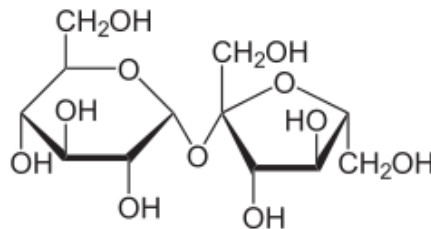


Figura 2.5. Estructura química de la sacarosa (Mendoza-Pérez, 2021)

### 2.4.2. Edulcorantes no nutritivos

Los edulcorantes no nutritivos son aquellos que no son metabolizados por el organismo, de acuerdo con sus fabricantes, no aportando energía o haciéndolo en cantidades insignificantes. Otra característica distintiva de estos edulcorantes es que tienen un poder edulcorante muy alto, por lo que también se les denomina edulcorantes de alta intensidad (Durán et al., 2013).

### 2.4.2.1. Acesulfame de potasio

El acesulfame de potasio (Acesulfame K, ace de K o E950) es un edulcorante no nutritivo que es 200 veces más dulce que la sacarosa; sin embargo, a concentraciones elevadas presenta un resabio amargo-metálico. La estructura química del acesulfame K se presenta en la Figura 2.6. Se utiliza ampliamente en la industria en diferentes productos como bebidas refrescantes, néctares de fruta, edulcorantes de mesa, productos lácteos, productos horneados, pasta de dientes y productos farmacéuticos (Lipinski y Hanger, 2011).

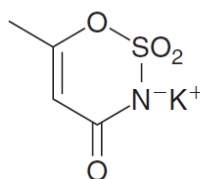


Figura 2.6. Estructura química del acesulfame de potasio (Lipinski y Hanger, 2011)

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

### 2.4.2.2. Mezcla comercial de aspartame con acesulfame K

Debido al sabor amargo-metálico del acesulfame de K generalmente se emplea en mezcla junto con otros edulcorantes como el aspartame o la sucralosa. La mezcla más común es la mezcla elaborada con el aspartame. La mezcla comercial de aspartame con acesulfame de K es 300 veces más dulce que una solución de sacarosa al 10%. El principal excipiente de estas mezclas es la dextrosa (otro nombre de la glucosa), pero también se suelen emplear la maltodextrina o algún polialcohol o mezclas de estos (Klug y von Rymon-Lipinski, 2011).

### 2.4.2.3. Sacarina

La sacarina (Figura 2.7) fue el primer edulcorante no nutritivo en ser descubierto. Es 300 veces más dulce que la sacarosa. Desde principios de 1900 se empleaba este edulcorante, pero fue hasta 1970 que la *FDA* autorizó su uso. Actualmente la IDA (Ingesta Diaria Admisible) establecida por la *FDA* (*Food Drug Administration*) es de 5 mg/kg de masa corporal. Las soluciones de sacarina son percibidas con un resabio amargo. La sacarina de sodio es la forma más comúnmente empleada debido a su alta solubilidad, estabilidad y bajos costos de producción (Bassoli y Merlini, 2003).

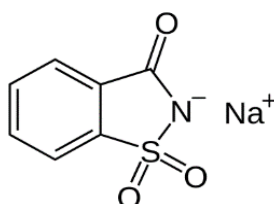


Figura 2.7. Estructura química de la sacarina de sodio (Bakal y O'Brien-Nabors, 2011)

El uso de la sacarina es uno de los más debatidos. A finales de la década de 1970, la *FDA* trató de prohibir su uso ya que estudios en ratas asociaban su consumo con la aparición de cáncer de vejiga (Howe et al., 1977; Reuber, 1975). Sin embargo, estudios de cohorte epidemiológico no encontraron una relación clara entre el consumo de sacarina y la prevalencia de cáncer de vejiga (Elcock y Morgan, 1993). Por lo tanto, 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 (Bassoli y Merlini, 2003).

### 2.4.2.4. Sucralosa

La sucralosa es un edulcorante no nutritivo fabricado por halogenación selectiva de sacarosa. En este proceso químico se reemplazan tres grupos hidroxilo de la molécula de sacarosa por tres átomos de cloro. La molécula resultante (Figura 2.8) es 600 veces más dulce que la sacarosa. En 1991 se le asignó una IDA de 0 a 15 mg/kg/día (OMS, 2020b). En contraste la *FDA* asignó una IDA de 0-5 mg/kg/día (*FDA*, 2018).

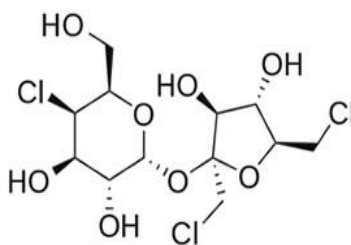


Figura 2.8. Estructura química de la sucralosa (Goldsmith y Merkel, 2011)

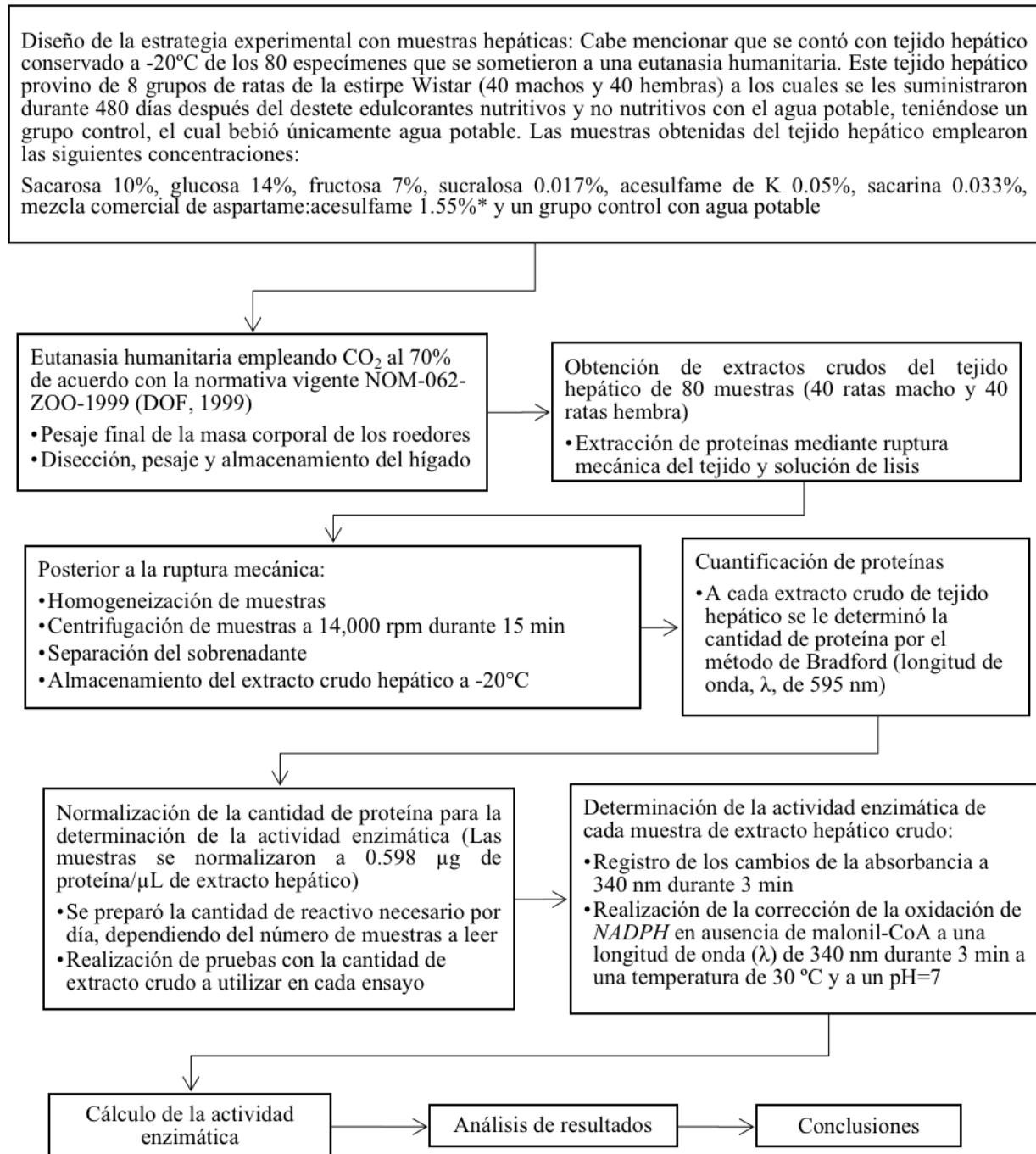
## 2.5. Efecto saciador de los edulcorantes artificiales y naturales

De acuerdo con Ma et al. (2009), los edulcorantes no nutritivos no poseen la capacidad de proporcionar saciedad como el azúcar. Algunas investigaciones han señalado que inclusive podrían causar la sensación de hambre e incrementar el apetito, estimulando el consumo de alimento en exceso, además de estimular los receptores del gusto creando una adicción al sabor dulce. Recientemente se ha iniciado el debate sobre si el consumo de edulcorantes no nutritivos aumenta el apetito y la masa corporal (Arcella et al., 2004). La estrategia de sustituir el azúcar por edulcorantes para el control de la masa corporal ha dado resultados contradictorios (Bellisle y Drewnowski, 2007; Blundell y Hill, 1986). El hambre, la saciedad y el balance energético son reguladas por un sistema neuroendocrino redundante, integrado a nivel del hipotálamo. Algunas hormonas participan en la saciedad y el apetito como son la leptina y la grelina, respectivamente. Estas hormonas son péptidos producidos predominantemente en el estómago, las cuales, regulan la ingesta de alimento (González-Hita et al., 2006). Swithers et al. (2010) comentan que en algunos estudios en humanos a corto plazo se ha demostrado una disminución en la ingesta energética resultante de una compensación, solamente parcial de la energía no ingerida frente a la sacarosa como comparador principal. Asimismo, existen datos epidemiológicos que asocian el uso de edulcorantes a la ganancia de masa corporal. Al parecer, la disociación de la sensación del sabor dulce y el aporte energético deficiente producido por los edulcorantes, podría condicionar un incremento en el apetito, dando lugar a un mayor consumo energético y ganancia de masa corporal. Esta hipótesis de condicionamiento operativo o Modelo de Pavlov ha podido demostrarse con modelos animales (Pavlov, 1975).

En el siguiente capítulo se presenta la metodología seguida en esta investigación.

## CAPÍTULO 3. Metodología

En la Figura 3.1 se expone el diagrama de bloques general de la investigación.



**Figura 3.1. Esquema de bloques de la estrategia experimental**

(\*Este valor no es realmente de la mezcla aspartame:acesulfame sino de la mezcla comercial “Canderel®” que fue lo que se le dió a los especímenes)

### 3.1. Estrategia experimental

El Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (*CICUAL*) de la Facultad de Química de la UNAM, aprobó el proyecto relacionado con un experimento multifactorial categórico. Se tuvo como primer factor el género de los especímenes y como segundo factor el edulcorante consumido. Como variable de respuesta se tuvo la actividad enzimática (expresada como mU/mg). Las muestras de tejido hepático provinieron de ratas macho y hembra de la estirpe *HSD: Han Wistar*, recién destetadas de masa corporal entre 40 a 60 g proveídas por la empresa *ENVIGO*. Los roedores fueron alimentados con una dieta normal Teklad Global 18S. 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 salió de México y el bioterio ya no pudo suministrar la dieta Teklad Global 18S. El suministro de la nueva dieta, Rodent Diet<sup>®</sup> 500I, se dosificó en forma paulatina 100-0, 75-25, 50-50, 25-75 y 0-100% con la dieta anterior. El alimento Rodent Diet<sup>®</sup> 500I, también aportó todos los macro y micro nutrientes necesarios para el mantenimiento de los roedores. Junto con el alimento se suministraron soluciones de edulcorantes nutritivos y no nutritivos durante 480 días con el agua potable. Las concentraciones a las cuales fueron dados los edulcorantes a los distintos grupos fueron las siguientes, todas expresadas en m/v: Sacarosa 10%, glucosa 14%, fructosa 7%, sacarosa 0.017%, acesulfame de K 0.05%, sacarina 0.033%, mezcla comercial de aspartame: acesulfame 1.55% y el grupo control que solamente bebió agua potable. Las concentraciones propuestas fueron las que comúnmente se encuentran en las bebidas comerciales, tomando como referencia la ingesta diaria admisible (*ADI*) (Mendoza-Pérez, 2017).

### 3.2. Extracción de proteínas

Se preparó una solución amortiguadora de lisis *RIPA*<sup>®</sup>, la cual contiene: *TBS* (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM a un pH= 7.6), *NP-40* al 0.1% (nonil-fenol-polietilenglicol éter), desoxicolato de sodio al 0.5%, *SDS* al 0.1% (dodecil sulfato de sodio) y azida de sodio al 0.006%. En tubos de microcentrífuga Ependorf<sup>®</sup> de 1.5 mL y sobre una cama de hielo se añadieron 500 µL de solución amortiguadora de lisis: *RIPA*<sup>®</sup> activado (más una pastilla de inhibidores de proteasa (Complete mini, Roche<sup>®</sup>), 100 µL de solución de NaF 100 mM y 200 µL de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM).

Posteriormente, se colocó en cada tubo entre 100 a 500 mg de tejido hepático congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se homogeneizó, utilizando un homogeneizador de proteínas de la marca *PELLET PESTLE*<sup>®</sup>, agregando 500  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de lisis activada a cada microtubo que contenía la muestra de tejido hepático. A continuación, se realizó una agitación en un equipo *VórtexGenie-2* a 3200 rpm durante 5 segundos. Después se centrifugó en una microcentrífuga *Eppendorf modelo 540* a 14,000 rpm durante 15 minutos, con la finalidad de separar la grasa y los restos de tejido. Una vez separados los sobrenadantes se almacenaron  $-20^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

### **3.3. Cuantificación de proteínas**

Para determinar la cantidad de proteína presente en cada extracto crudo de tejido hepático se realizó una curva patrón con albúmina sérica bovina (*BSA* por sus siglas en inglés), con las siguientes concentraciones 0, 0.00930, 0.01872, 0.03745, 0.05617, 0.07490 y 0.09303  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Una vez teniendo la curva patrón de proteínas se cuantificó por triplicado el contenido proteico de cada uno de los extractos hepáticos, en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se añadieron 1000  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (elaborado con 100 mg de Azul de Coomassie, disuelto en 50 mL de etanol al 95% y mezclado con 100 mL de ácido fosfórico al 85%, ajustado a 1 L de agua) y 100  $\mu\text{L}$  de muestra (con una dilución adecuada) registrando los valores de absorbancia a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 595 nm, con una corrección a 450 nm leída en un espectrofotómetro *UV/VIS Rayleigh UV-1800*.

### **3.4. Actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés)**

La determinación de la actividad enzimática de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*, en inglés) se realizó bajo una adaptación del método espectrofotométrico de Nepokroeff et al. (1975). Las cantidades empleadas fueron estimadas por día de trabajo y dependía de la cantidad de muestras que se emplearían al momento.

- 1) Utilizando la balanza analítica AT21 Comparador marca *METTLER TOLEDO*<sup>®</sup>, se pesaron las cantidades de: 0.296 mg de acetyl-CoA, 0.888 mg de malonyl-CoA, 0.866 mg de *NADPH*. Las cantidades variaron por día dependiendo de la cantidad de muestras que



se procesaron, debido a que muchos de estos reactivos se descomponen con rapidez, debiendo prepararse solamente lo justo para la cantidad de muestras que se procesaban cada día

- 2) Con ayuda de la micropipeta marca *BRAND*<sup>®</sup> *Transferpette*<sup>®</sup> digital 100 a 1000  $\mu\text{L}$  y la micropipeta *Rainin Classic PR-200* de 20 a 200  $\mu\text{L}$ , se preparó la mezcla de reacción. Se tomaron 281.4  $\mu\text{L}$  de la mezcla preparada recientemente (154.8  $\mu\text{L}$  solución amortiguadora de fosfatos, a un  $\text{pH} = 7$  (la cual contiene  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [654.55 mM],  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  [416.035 mM] y *EDTA* [2.15 mM]), 51.6  $\mu\text{L}$  de acetil-CoA [212.96  $\mu\text{M}$ ], 51.6  $\mu\text{L}$  de *NADPH* [645.35  $\mu\text{M}$ ], 23.4  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol), 167  $\mu\text{L}$  de la dilución del extracto hepático con 0.598  $\mu\text{g}$  de proteína/ $\mu\text{L}$  del extracto hepático
- 3) Se colocó en celdas (*BRAND*<sup>®</sup> UV-Vis, de 70 a 850  $\mu\text{L}$ ) la cantidad de 281.4  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción más 167  $\mu\text{L}$  de la dilución de extracto hepático
- 4) Previamente la mezcla de reacción fue incubada a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 minutos
- 5) Se agitó la celda suavemente por inversión para mezclar su contenido
- 6) Se registró la absorbancia de la mezcla de reacción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm, en el espectrofotómetro *UV/VIS RAYLEIGH UV-1800*. Lo anterior es denominado la línea base de cada uno de los ensayos
- 7) Pasando 3 segundos y todavía registrando los cambios en la absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro, se le adicionaron 51.6  $\mu\text{L}$  de malonil-CoA [645.35  $\mu\text{M}$ ], registrando la oxidación de *NADPH* a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 340 nm por 3 min con las siguientes condiciones establecidas:  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 30 \pm 2^\circ\text{C}$
- 8) Se hicieron 6 repeticiones para cada muestra (3 con malonil-CoA correspondiente a la absorbancia de la muestra y 3 sin malonil-CoA, obviando el paso 7, correspondiente a la absorbancia de corrección). Con las condiciones establecidas previamente de  $\text{pH} = 7$ ,  $T = 30 \pm 2^\circ\text{C}$
- 9) El blanco utilizado para la calibración de la lectura en el espectrofotómetro fue agua desionizada
- 10) Se construyeron las curvas de avance de reacción una en presencia de malonil-CoA y otra en ausencia de malonil-CoA
- 11) Se obtuvieron las pendientes de las curvas de avance de reacción. Estas pendientes corresponden a las velocidades iniciales de la reacción

12) Una vez obtenidas las velocidades iniciales de cada reacción se aplicó la Ec. 1 para determinar los niveles de actividad en cada uno de los extractos hepáticos

$$\frac{U}{mL} = \frac{|\Delta Abs muestra| - |\Delta Abs corrección| * Factor de dilución * Volumen final}{Coeficiente de extinción molar * Volumen de la muestra} \quad \text{Ec. 1.}$$

Y, para determinar la actividad específica se dividen los niveles de actividad de cada extracto entre la concentración de proteínas de este, obteniéndose la Ecuación 2:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{mg}{mL}} \quad \text{Ec. 2.}$$

En esta ecuación **U** se define como la cantidad de ácido graso sintasa (*FAS*) que cataliza 1  $\mu\text{mol}$  de *NADPH* por minuto a 30°C y a un pH de 7.

## CAPÍTULO 4. Resultados y discusión

### 4.1. Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas fue necesario preparar la solución amortiguadora de lisis *RIPA*<sup>®</sup>. La composición de dicha solución que se describió en el capítulo anterior se presenta en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Solución amortiguadora de lisis

Para 10 mL de solución amortiguadora de lisis <i>RIPA</i> <sup>®</sup> , se agrega lo siguiente:		
Reactivos	Concentración final	Cantidad
Pastilla de inhibidores	1 x	1 pastilla Complete Mini <sup>®</sup>
NaF 100 mM	1 mM	100 $\mu$ L
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 100 mM	2 mM	200 $\mu$ L

Para la extracción de proteínas se prepararon 10 mL de la solución de lisis por cada 10 muestras. Posteriormente, con la solución de lisis y con la ayuda del homogeneizador *PELLET PESTLE*<sup>®</sup> se realizó la ruptura mecánica del tejido hepático (Figuras 4.1, 4.2). Acto seguido, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm por 15 minutos (Figura 4.3) para separar la grasa y los restos de tejido del extracto crudo.



Figura 4.1. Preparaciones para homogeneización de tejido



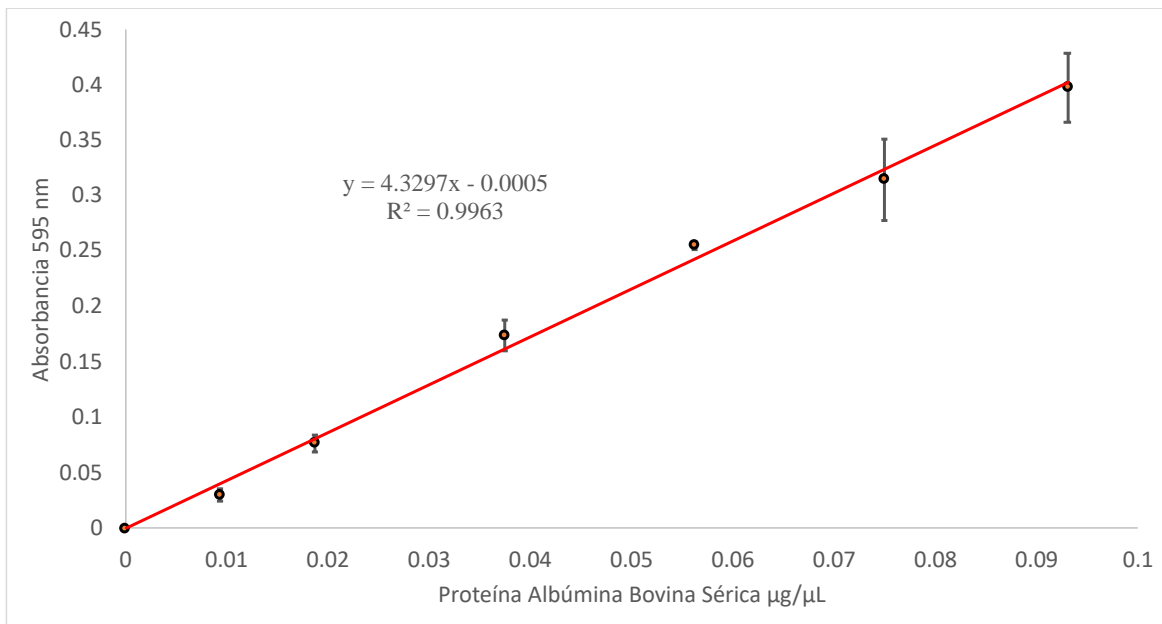
Figura 4.2. Homogeneización de tejido con *PELLET PESTLE*<sup>®</sup>



Figura 4.3. Muestras del extracto hepático centrifugadas

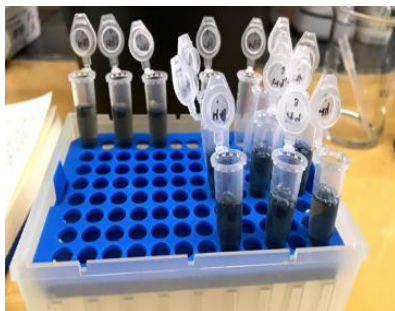
## 4.2. Cuantificación de proteínas

Con la finalidad de cuantificar las proteínas presentes en los extractos de tejido hepático, se construyó una curva patrón con albúmina bovina sérica de 7 puntos (Figura 4.4), obteniéndose un  $r^2 = 0.9963$ , siendo el coeficiente de determinación aceptable (Kruger, 2009).



**Figura 4.4. Curva patrón de obtención de concentración de proteína por el método de Bradford con base en la Albúmina Bovina Sérica (en inglés BSA)**

Una vez teniendo la curva patrón de proteínas se cuantificó por triplicado el contenido proteico de cada uno de los extractos hepáticos como se muestra en las Figuras 4.5, 4.6 y 4.7.



**Figura 4.5. Tubos Eppendorf con reactivo de Bradford para cuantificación de proteína**



**Figura 4.6. Separación del extracto con micropipeta**



**Figura 4.7. Muestra con reactivo de Bradford para su posterior cuantificación**

Se cuantificó el contenido de proteína del tejido hepático por cada grupo de edulcorante (de las 80 ratas). En las Tablas 4.2 y 4.3 se muestra la concentración promedio de proteínas por grupo y por género.

**Tabla 4.2. Promedio de proteína en ratas hembra de la estirpe *HSD: Han Wistar***

<b>Grupo de edulcorante</b>	<b>Sexo</b>	<b>Concentración de proteína promedio (mg/mL)</b>
Control	H	97.41
Glucosa	H	62.07
Sacarosa	H	91.32
Fructosa	H	77.43
Mezcla de Aspartame:acesulfame	H	85.05
Sacarina	H	78.12
Acesulfame K	H	62.41
Sucralosa	H	128.12

Donde H= Ratas hembra

**Tabla 4.3. Promedio de proteína en ratas macho de la estirpe *HSD: Han Wistar***

<b>Grupo de edulcorante</b>	<b>Sexo</b>	<b>Concentración de proteína promedio(mg/mL)</b>
Control	M	59.47
Glucosa	M	49.37
Sacarosa	M	137.57
Fructosa	M	105.81
Mezcla de aspartame:acesulfame	M	79.39
Sacarina	M	66.98
Acesulfame K	M	107.57
Sucralosa	M	79.39

Donde M= Ratas macho

La respuesta del edulcorante y del género dio un contenido de proteína diferente. Esta variabilidad se debe a factores como, por ejemplo, el tiempo de extracción, la cantidad de tejido empleada en la extracción, entre otras.

Los machos presentaron un contenido de proteína mayor que las hembras, dando otro factor para la realización de la respuesta de la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*). Pero,

debido a que se reportó la actividad como específica (U/mg de proteína), no se afecta el resultado final.

De la curva patrón se obtuvo la Ecuación 3, donde “y” es la absorbancia:

$$Abs = 4.3297x - 0.0005 \quad \text{Ec. 3.}$$

De la ecuación 3, al despejar la “x” y multiplicarla por su respectivo factor de dilución, se obtuvo la Ecuación 4 y, a partir de la Ecuación 4, se calculó el contenido de proteínas de cada extracto.

$$Concentración \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(Abs - 0.0005)}{4.3297} * Factor \ de \ dilución \quad \text{Ec. 4.}$$

A continuación, se muestra un ejemplo del cálculo para la muestra M19 (rata macho, 19, grupo control) mediante la Ecuación 4:

$$Concentración \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.014204 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 7.913 \frac{mg}{mL}$$

Una vez cuantificado el contenido de proteínas de los extractos se determinó la actividad enzimática de la enzima ácido graso sintasa presente en cada muestra.

#### **4.3. Determinación de la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (FAS, en inglés)**

A continuación, se muestran en las Figuras 4.8 y 4.9, que son las curvas de avance de reacción de la muestra de la rata macho 19, correspondiente al grupo control.

De cada una de las curvas de avance de reacción, en presencia del malonil-CoA y de la corrección de la oxidación del *NADPH* (fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida reducido) en ausencia de la malonil-CoA, se obtuvo la pendiente de la recta tangente correspondientes a la velocidad inicial.

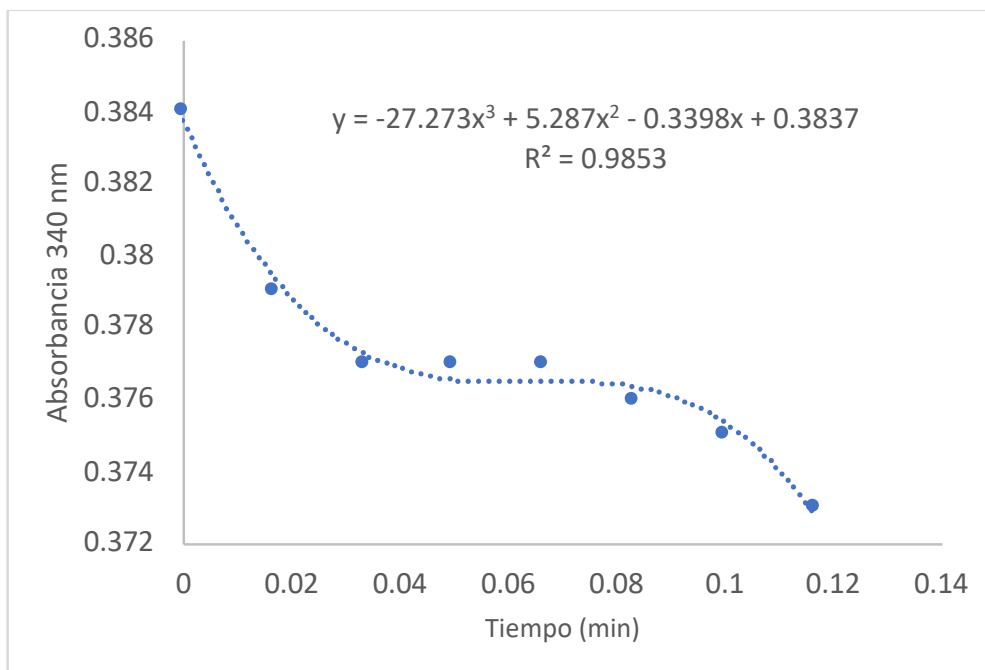


Figura 4.8. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 19 del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA

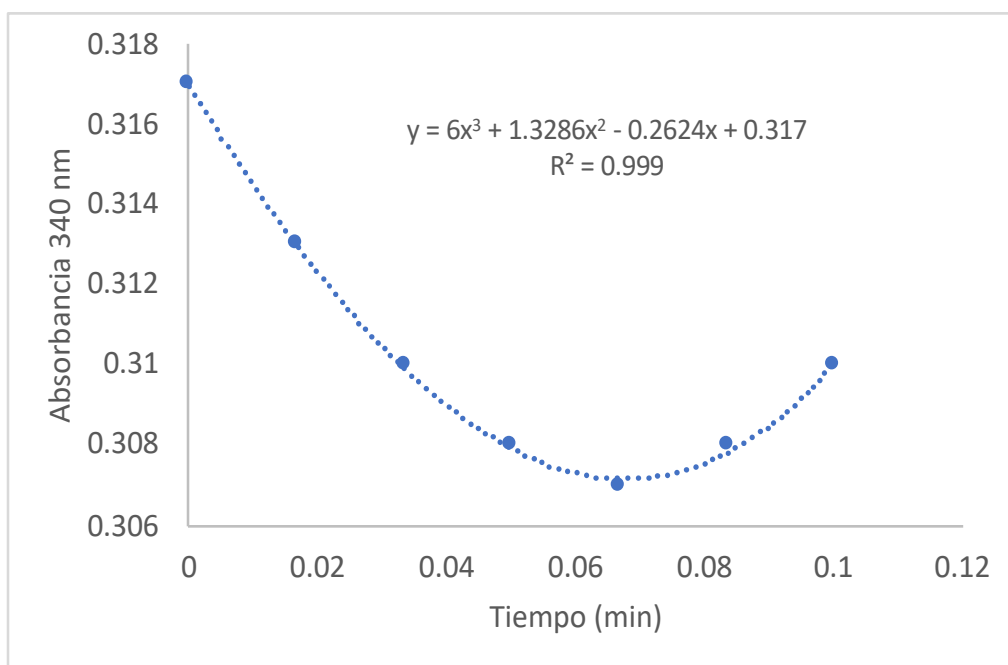


Figura 4.9. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 19 del grupo control en ausencia de la malonil-CoA

Posteriormente, se obtuvo la ecuación de la recta tangente a dichas curvas a través de la primera derivada. Para el caso de la Figura 4.8, esta recta tangente corresponde al valor " $\Delta$  Absorbancia de la muestra" y la pendiente de la recta tangente de la Figura 4.9 corresponde al valor " $\Delta$  Absorbancia corrección". Estos valores fueron colocados en la Ecuación 5 para calcular la actividad del extracto en U/mL:

$$\frac{U}{mL} = \frac{|\Delta Abs\ muestra| - |\Delta Abs\ corrección| * volumen\ de\ la\ mezcla\ de\ reacción * factor\ de\ dilución}{Coeficiente\ de\ extinción\ molar * Volumen\ de\ la\ muestra} \quad \text{Ec. 5.}$$

En esta ecuación U se define como la cantidad de ácido graso sintasa (*FAS*, en inglés) que cataliza 1  $\mu$ mol de *NADPH* por minuto a 30°C, a un pH de 7.

La actividad específica de la enzima fue calculada por mg al dividirse la actividad en U/mL entre la cantidad de proteína total del extracto hepático (Ecuación 6).

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{mg}{mL}} \quad \text{Ec. 6.}$$

A continuación, se muestra un ejemplo de cálculo con los datos obtenidos de las Figuras 4.8 y 4.9 de la muestra de hígado de una rata macho 19 del grupo control.

Sustituyendo los valores en la Ecuación 5, se obtuvo una actividad de **0.00221 U/mL** en el extracto hepático

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-0.3398| - |-0.2624| * 0.5 * 0.0593814}{6.22 * 0.167} = 0.00221 \frac{U}{mL}$$

Por tanto, para calcular la actividad específica, se sustituyeron los datos en la Ecuación 4. El extracto hepático de la rata 19 tuvo una concentración de proteínas de 7.913 mg/mL y, al aplicar la ecuación 6, se obtuvo una actividad específica de **0.28 mU/mg**.

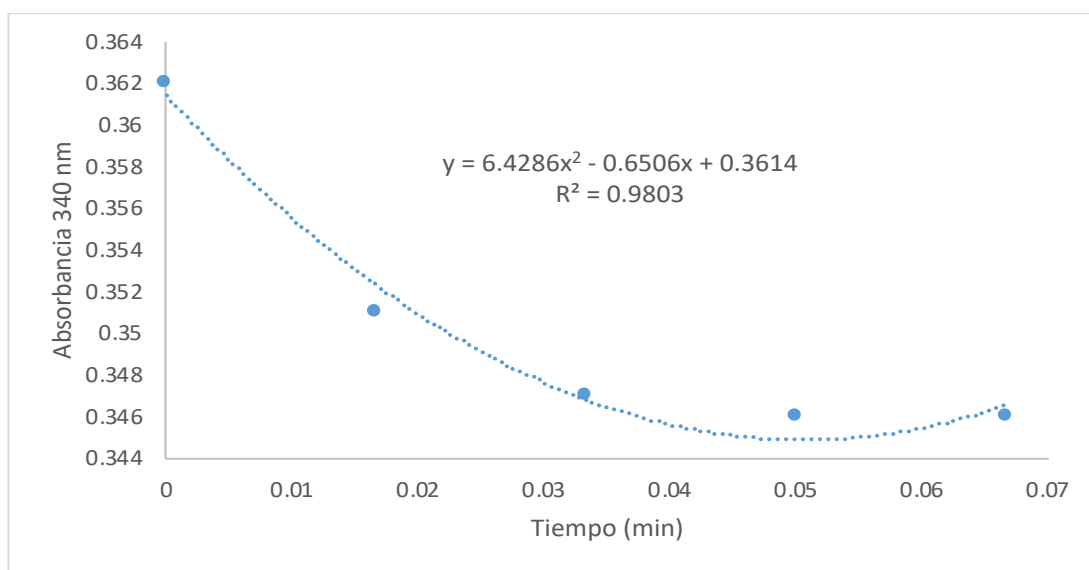


$$\frac{U}{mg} = \frac{0.00221 \frac{U}{mL}}{7.913 \frac{mg}{mL}} = 0.00028 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 0.28 \frac{mU}{mg}$$

A continuación, se muestran algunas de las curvas de avance de reacción de diversas muestras más representativas.

Las Figuras superiores (4.10, 4.12, 4.14, 4.16 y 4.18) representan la curva de avance de reacción para la primera pendiente de la cinética de la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*) del extracto hepático de la rata analizada junto con el grupo de edulcorante al que pertenece, mientras que las Figuras (4.11, 4.13, 4.15, 4.17 y 4.19) son la corrección de la oxidación de *NADPH* de ausencia de la malonil-CoA.

La tendencia observada en todas ellas era la esperada, es decir, una disminución de la absorbancia conforme pasa el tiempo (por ello las pendientes son negativas). Cabe recordar que se está registrando la disminución en la concentración de uno de los reactivos de la reacción (*NADPH*). La pendiente de la disminución en cada una de ellas depende del contenido de enzima en la muestra, es decir a mayor pendiente, mayor cantidad de enzima *FAS*.



**Figura 4.10.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 14** del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA

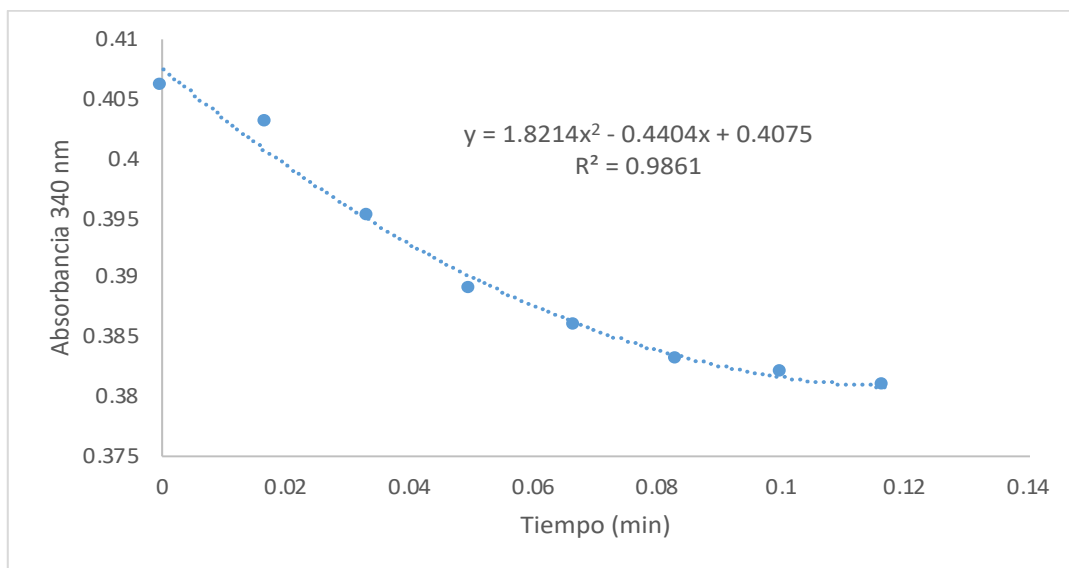


Figura 4.11. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 14** del grupo control en ausencia de malonil-CoA

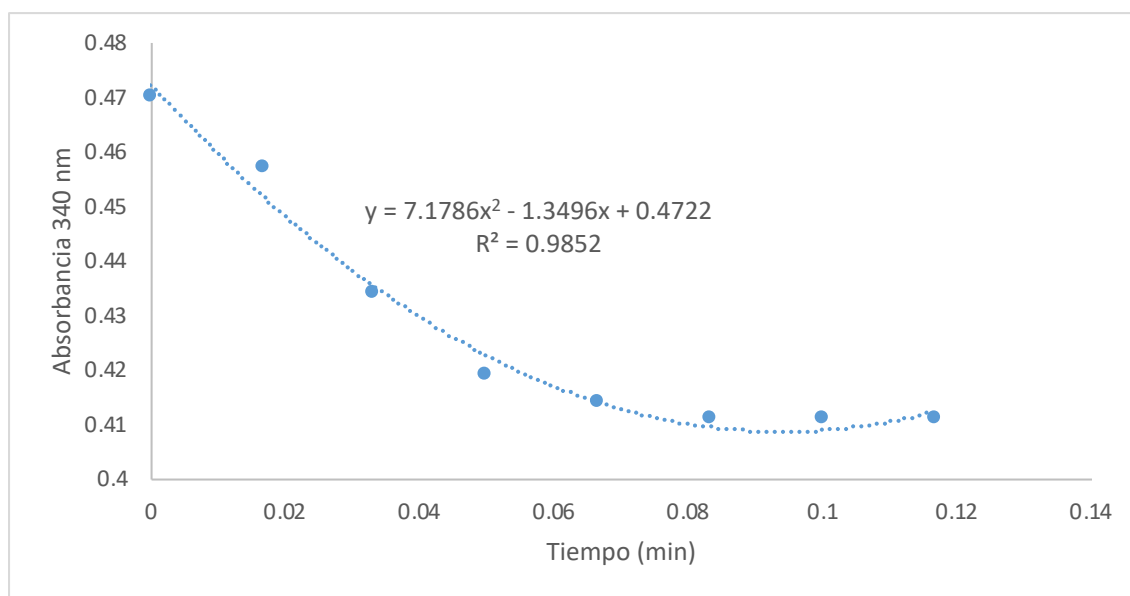


Figura 4.12. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **macho 72** del grupo control en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA

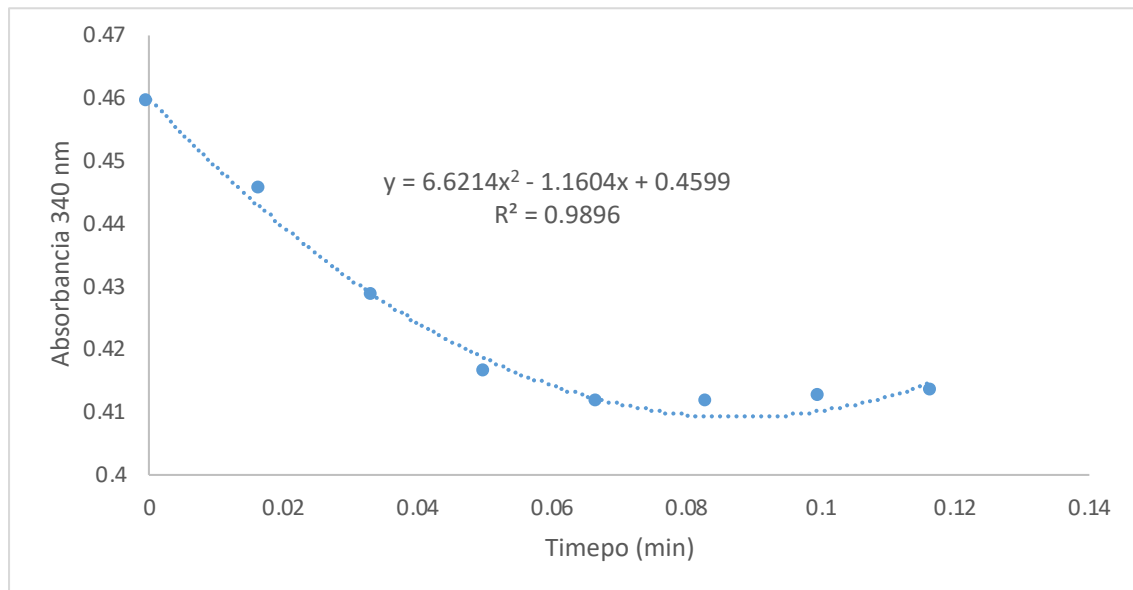


Figura 4.13. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata macho 72 del grupo control en ausencia de malonil-CoA

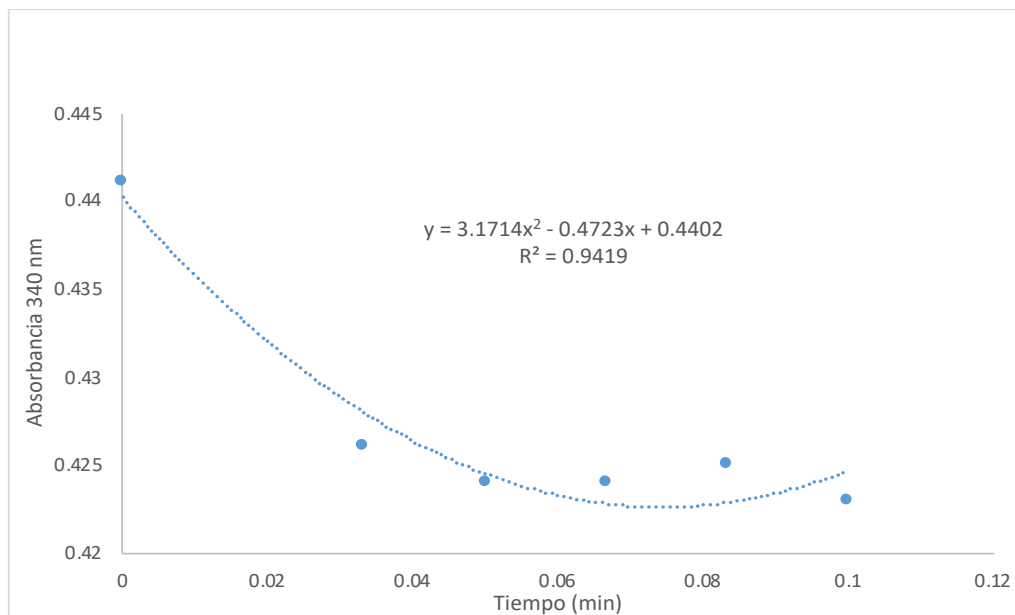
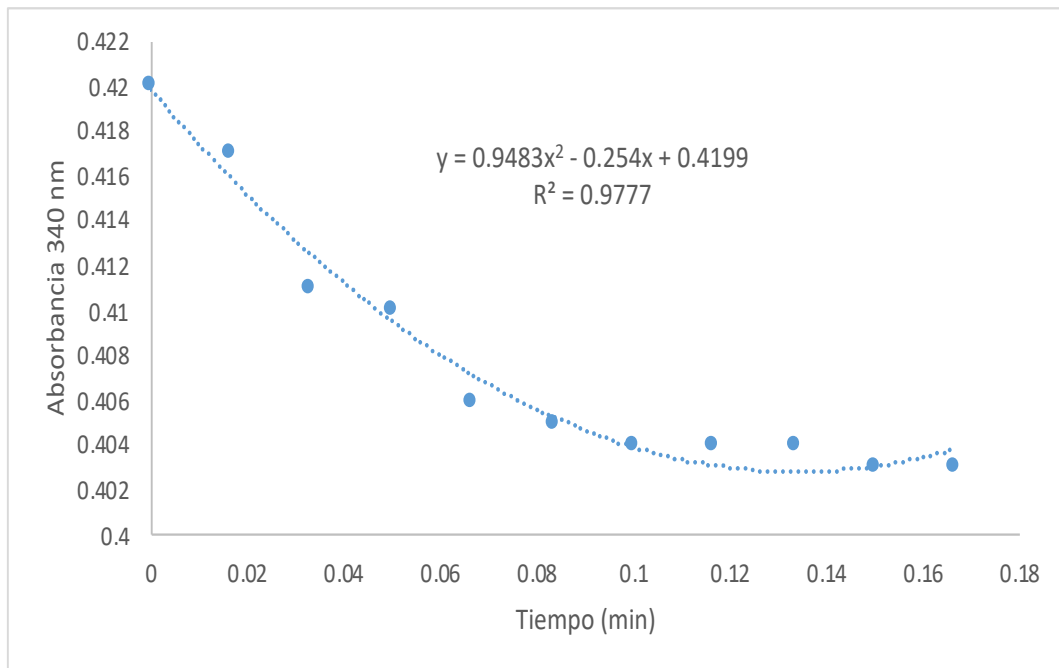
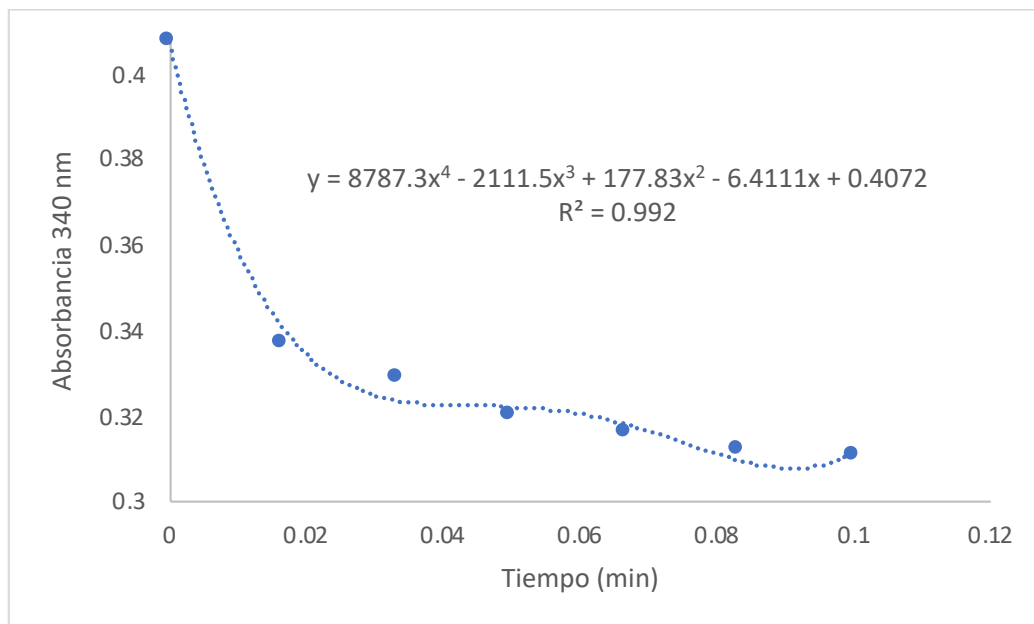


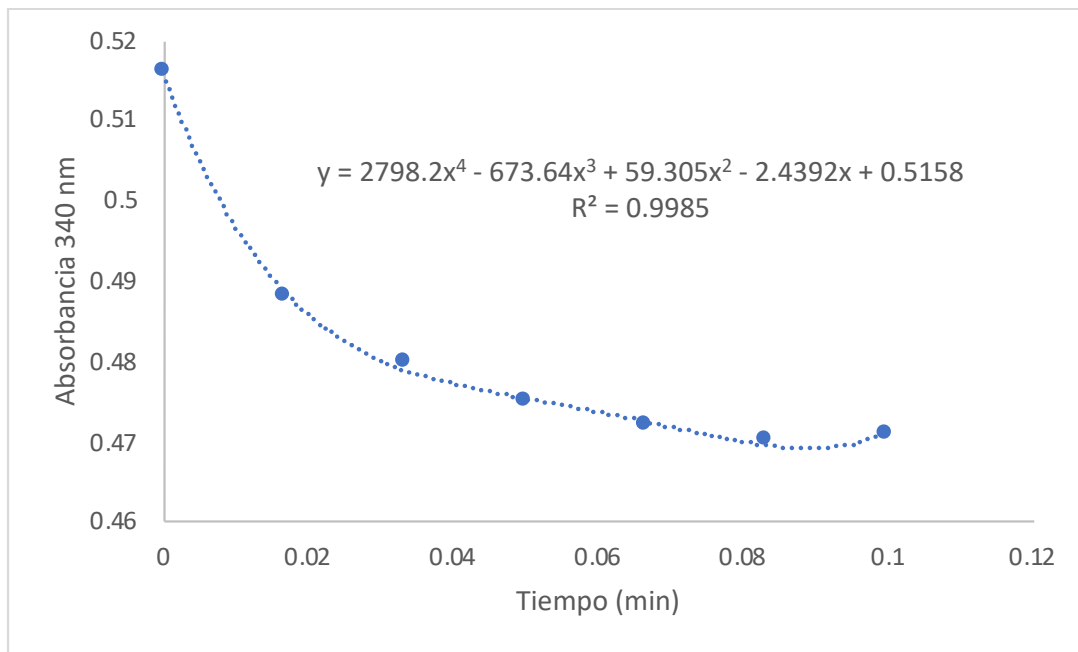
Figura 4.14. Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata hembra 54 del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA



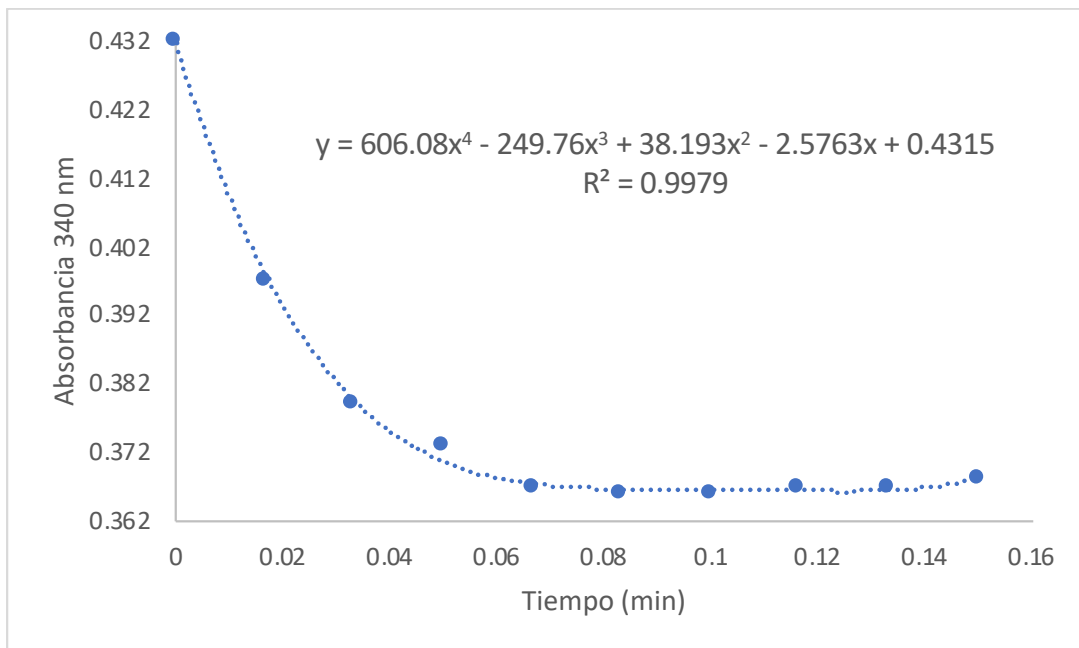
**Figura 4.15.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 54** del grupo glucosa en ausencia malonil-CoA



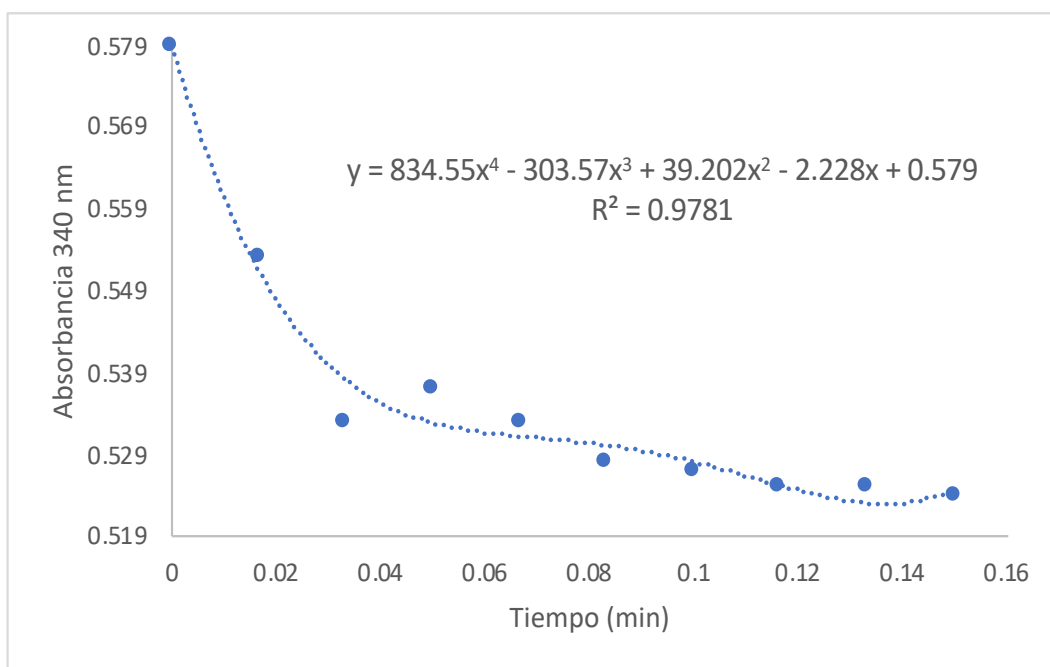
**Figura 4.16.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 69** del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA



**Figura 4.17.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 69** del grupo glucosa en ausencia de malonil-CoA



**Figura 4.18.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 75** del grupo glucosa en presencia de acetil-CoA y malonil-CoA



**Figura 4.19.** Curva de avance de reacción de la ácido graso sintasa de la rata **hembra 75** del grupo glucosa en ausencia de malonil-CoA

En la Tabla 4.4 se colocaron los cambios (delta,  $\Delta$ ) de las absorbancias de la primera pendiente de la cinética de la actividad enzimática de la ácido graso sintasa (*FAS*), representada como absorbancia de la muestra; la primera pendiente de la corrección de la oxidación de *NADPH* en la cinética en ausencia de la malonil-CoA, representada como absorbancia de corrección. Todo esto fue separado por grupo de edulcorante. Como se puede apreciar en la Tabla 4.4 se muestran las pendientes obtenidas de los gráficos anteriores.

**Tabla 4.4** Cambios (delta,  $\Delta$ ) de absorbancias, comparando el grupo de edulcorante suministrado

Sexo y codificación	Edulcorante	$\Delta$ Absorbancia de la muestra	$\Delta$ Absorbancia de corrección
M19	Control	-0.3398	-0.2624
H14		-0.6506	-0.4404
M72		-1.3496	-1.1604
H54	Glucosa	-0.4723	-0.2540
H69		-6.4111	-2.4392
H75		-2.5763	-2.228

La concentración de proteínas se muestra en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5. Concentración de proteína de algunas muestras hepáticas**

Muestra	C[mg/mL]
H14	47.787
M72	15.159
H54	13.292
H69	13.959
H75	13.781

La actividad específica resultante para los grupos de edulcorantes tratados se muestra en la Tabla 4.6, resultando la muestra H69 (rata hembra, 69, grupo glucosa) la que presentó la mayor actividad específica en las muestras usadas como ejemplo, por lo que esta tendencia era la esperada, ya que el consumo excesivo de glúcidos simples promueve la lipogénesis.

**Tabla 4.6. Actividad específica de las muestras de los grupos de edulcorantes control y glucosa**

Edulcorante	Muestra	Actividad específica (mU/mg)
Control	M19	0.28
	H14	0.73
	M72	0.67
Glucosa	H54	0.78
	H69	14.18
	H75	1.24

Una vez analizadas todas las muestras se procedió a realizar el análisis de varianza para conocer si existieron diferencias intergrupales significativas en los niveles de actividad específica de la FAS. El análisis de varianza correspondiente a las ratas macho (Tabla 4.7) indicó que se tuvo un valor P de 0.0065. Asimismo, el análisis de varianza (Tabla 4.8) indicó la existencia de diferencias significativas en las ratas hembra ( $p > 0.0110$ ). Debido a que este valor fue menor que 0.05 pudiendo concluirse que sí hubieron diferencias intergrupales significativas.

**Tabla 4.7. ANDEVA de una vía para los niveles FAS (mU/mg) de las ratas macho**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	257317.	7	36759.5	3.52	0.0065
Intra grupos	334120.	32	10441.2		
Total (Corr.)	591436.	39			

**Tabla 4.8. ANDEVA de una vía para los niveles FAS (mU/mg) de las ratas hembra**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	62688.5	7	8955.49	3.22	0.0110
Intra grupos	86171.8	31	2779.73		
Total (Corr.)	148860.	38			

Para conocer el comportamiento entre grupos se realizó la prueba de Duncan (Tabla 4.9). Se aprecia que existieron tres grupos homogéneos designados por las letras a, b y c. En la misma tabla se pueden apreciar que, para las ratas hembra, igualmente existieron tres grupos homogéneos, designados por las letras A, B y C.

**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 480 días**

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

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

Para el caso de las ratas macho, el grupo que ingirió fructosa fue el que presentó los mayores niveles de actividad ( $232.9 \pm 70.7$  mU/mg). Lo anterior era lo esperado ya que la fructosa durante su metabolismo es convertida a fructosa-1-fosfato por la fructoquinasa y, posteriormente, es metabolizada a triosas fosfato, entrando a la vía glucolítica. Sirve de esta manera como una fuente no regulada de glicerol-3-fosfato y acetaldehído, favoreciendo el proceso de lipogénesis *de novo* (LDN) (ver Figura 2.4) (Bray et al., 2004; Hui et al., 2014; Keim y Havel, 2013).

Asimismo, otra de las causas por la que la fructosa incrementó los niveles de actividad de FAS 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 (*FAS*), que convierte a la acetil-CoA en triglicéridos (Moore et al., 2014; Softic et al., 2016).

Los demás grupos que fueron distintos al control ( $13.5 \pm 6.6$  mU/mg) fueron aquellos que bebieron agua con glucosa ( $195.3 \pm 56.1$  mU/mg), sacarosa ( $72.6 \pm 26.8$  mU/mg) y sacarina ( $43.8 \pm 22.9$  mU/mg). En el caso de los grupos que ingirieron glucosa y sacarosa también era esperada esta tendencia. De acuerdo con Hudgins et al. (2008) “el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono simples se ha asociado con el incremento de la lipogénesis *de novo* hepática”.

Lo novedoso de estos resultados es lo observado en el grupo que bebió sacarina. Si bien sus niveles de *FAS* en hígado fueron inferiores a los grupos que bebieron fructosa, glucosa y sacarosa, sus niveles fueron significativamente superiores al control. No está del todo claro cuál es el mecanismo por el cual la sacarina provocó este incremento de *FAS* en hígado. No obstante, en algunos estudios como los de Andrejić et al. (2013) y Azeez et al. (2019) han reportado que el consumo crónico de sacarina provocó alteraciones en indicadores hepáticos como las enzimas alanina transaminasa (*ALT*) y la aspartato transaminasa (*AST*). Los niveles elevados de *ALT* y *AST* son indicadores de daño o enfermedad hepática. Lo anterior señala que el consumo crónico de sacarina sí altera el metabolismo hepático. En México, todos los dentífricos tienen sacarina, así que deberían tener un letrero del daño que podrían causar si se ingiere.

En el caso de las ratas hembra el grupo que bebió glucosa fue el que presentó los mayores niveles ( $141.8 \pm 53.8$  mU/mg) de *FAS* en los extractos hepáticos. El resto de los edulcorantes nutritivos, sacarosa y fructosa, también tuvieron niveles significativamente mayores al control. A diferencia de los machos, en las ratas hembra todos los grupos que bebieron edulcorantes no nutritivos, con excepción del grupo que bebió sacarina, tuvieron niveles significativamente mayores al control. Lo anterior hace plantear la hipótesis de que las hembras probablemente sean más susceptibles a los efectos adversos del consumo de edulcorantes no nutritivos.

## CAPÍTULO 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

Con respecto del objetivo general propuesto inicialmente de “Evaluar el efecto del consumo crónico de edulcorantes artificiales y naturales sobre los niveles de actividad de la ácido graso sintasa (*FAS*) en extractos de hepatocitos de 80 ratas de la estirpe Wistar” se puede concluir lo siguiente:

- Los niveles de la sintasa de ácidos grasos (*FAS*) en los extractos hepáticos dependió del tipo de edulcorante ingerido
- La tendencia general observada fue que los grupos que presentaron los mayores niveles de *FAS* fueron aquellos que ingirieron edulcorantes nutritivos como era esperado ya que fue un consumo crónico
- En el caso de las ratas macho el grupo de fructosa fue el edulcorante que provocó el mayor incremento de la actividad enzimática a pesar de ser el de menor concentración entre los edulcorantes nutritivos (7% versus 10 y 14% con respecto del azúcar y la glucosa)
- En contraste, en las ratas hembra la mayor actividad de enzimática de *FAS* se registró en el grupo que bebió agua potable con glucosa
- Los edulcorantes no nutritivos no son inertes pues alteraron el metabolismo hepático al incrementar los niveles de *FAS*
- La tendencia de los niveles de *FAS* en los extractos hepáticos parece depender del sexo. En las ratas macho las ratas que ingirieron sacarina tuvieron niveles significativamente superiores al control. En contraparte, en las ratas hembra el grupo que bebió sacarina fue el único grupo que no difirió del control, pero los otros edulcorantes artificiales (no nutritivos) fueron superiores al control.

## 5.2. Recomendaciones

Considerando los resultados obtenidos se proponen las siguientes recomendaciones:

- Analizar otras enzimas relacionadas con la lipogénesis como lo son la acetil coenzima A carboxilasa (*ACC*, por sus siglas en inglés)
- Evaluar los niveles de *AST* y *ALT* en ratas que consuman crónicamente edulcorantes. Estos son indicadores de daño hepático y, de acuerdo con Andrejić et al. (2013) y Azeez et al. (2019), el consumo de sacarina incrementó estos indicadores
- Correlacionar los niveles de triglicéridos, la cantidad de tejido adiposo y los niveles de actividad de la enzima *FAS*.

## ANEXOS

### ANEXO A. Datos experimentales completos

**Tabla A.1. Niveles de actividad enzimática de la FAS (mU/mg) de cada rata hembra de la segunda eutanasia**

GRUPO	ID	mU/mg	GRUPO	ID	mU/mg
ACE	H3	62.36	MIX	H15	125.11
ACE	H7	127.21	MIX	H21	94.11
ACE	H46	72.20	MIX	H23	39.53
ACE	H8	22.39	MIX	H26	37.93
ACE	H59	22.90	MIX	H12	7.69
CONTROL	H39	20.91	SACARINA	H20	12.40
CONTROL	H65	9.09	SACARINA	H4	18.44
CONTROL	H14	22.67	SACARINA	H37	27.72
CONTROL	H76	6.79	SACARINA	H38	12.71
FRUCTOSA	H67	66.70	SACARINA	H61	11.89
FRUCTOSA	H74	38.47	SACAROSA	H49	216.61
FRUCTOSA	H62	43.09	SACAROSA	H60	107.25
FRUCTOSA	H77	107.80	SACAROSA	H47	176.15
FRUCTOSA	H13	179.57	SACAROSA	H51	17.33
GLUCOSA	H43	97.76	SACAROSA	H42	26.87
GLUCOSA	H35	122.24	SUCRALOSA	H66	132.47
GLUCOSA	H63	163.20	SUCRALOSA	H2	11.99
GLUCOSA	H75	100.02	SUCRALOSA	H27	100.98
GLUCOSA	H69	225.94	SUCRALOSA	H2	41.74

**Tabla A.2. ANDEVA de una vía para los niveles de actividad enzimática de FAS de las ratas hembra de la segunda eutanasia**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	62688.5	7	8955.49	3.22	0.0110
Intra grupos	86171.8	31	2779.73		
Total (Corr.)	148860.	38			

*Gl:* Grados de libertad

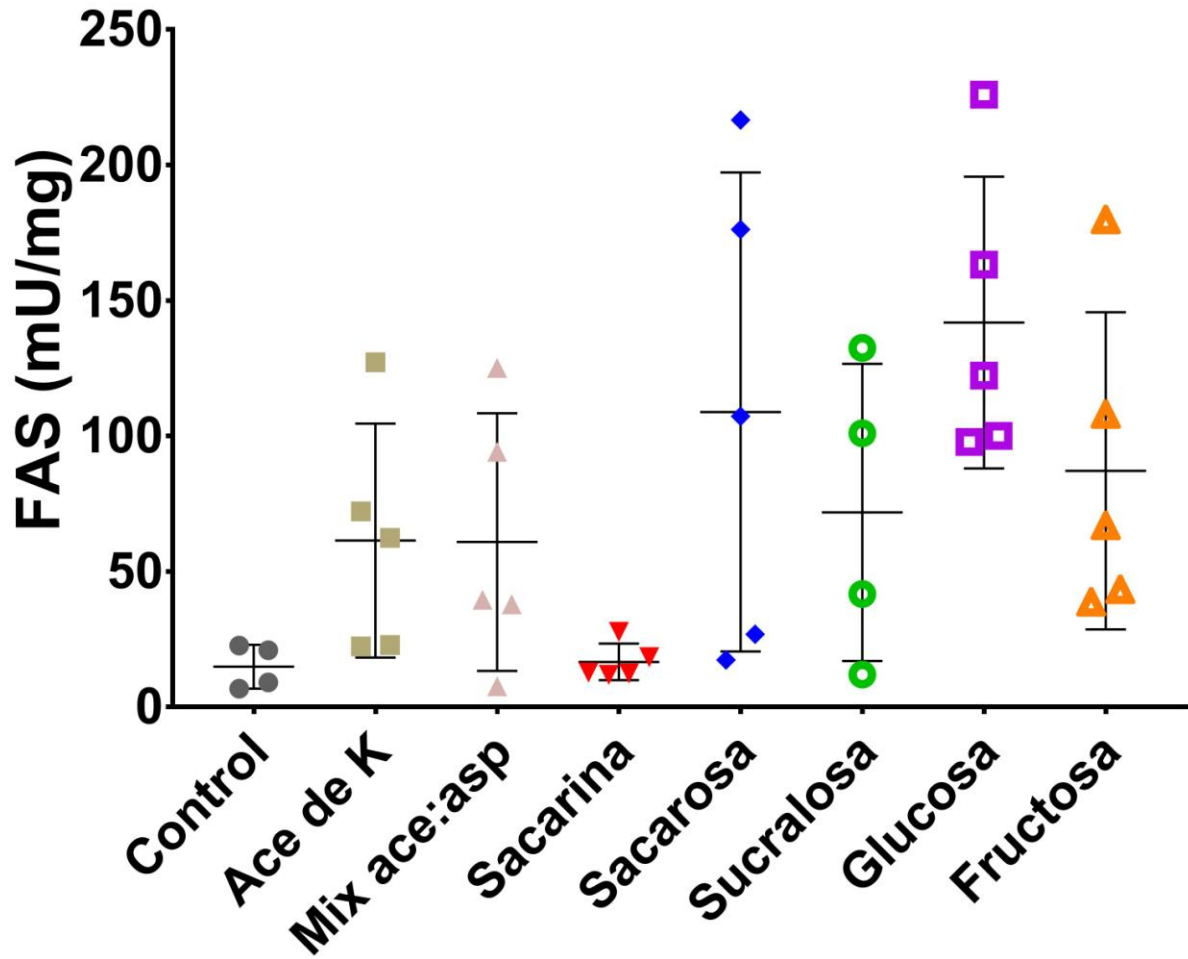


Figura A.1. Gráfica de los niveles de actividad enzimática de la *FAS* en ratas hembra (mU/mg) por grupos. Cada punto es el dato de cada espécimen

**Tabla A.3. Niveles de actividad enzimática de la FAS (mU/mg) de cada rata macho de la segunda eutanasia**

<b>Grupo</b>	<b>ID</b>	<b>mU/mg</b>	<b>GRUPO</b>	<b>ID</b>	<b>mU/mg</b>
ACE	M74	52.45	MIX	M47	28.57
ACE	M24	9.00	MIX	M5	39.88
ACE	M26	5.78	MIX	M10	7.40
ACE	M50	31.91	MIX	M62	1.28
ACE	M65	8.58	MIX	M21	17.36
CONTROL	M37	6.60	SACARINA	M40	15.40
CONTROL	M69	2.71	SACARINA	M79	53.73
CONTROL	M20	5.75	SACARINA	M3	60.59
CONTROL	M19	34.64	SACARINA	M22	23.33
CONTROL	M72	17.98	SACARINA	M33	65.88
FRUCTOSA	M70	309.66	SACAROSA	M6	30.76
FRUCTOSA	M31	78.55	SACAROSA	M75	125.15
FRUCTOSA	M73	251.11	SACAROSA	M77	53.97
FRUCTOSA	M78	468.66	SACAROSA	M52	59.84
FRUCTOSA	M34	56.92	SACAROSA	M59	93.08
GLUCOSA	M4	579.75	SUCRALOSA	M29	70.51
GLUCOSA	M46	219.63	SUCRALOSA	M36	53.90
GLUCOSA	M54	71.70	SUCRALOSA	M15	21.96
GLUCOSA	M12	44.96	SUCRALOSA	M43	20.07
GLUCOSA	M9	60.48	SUCRALOSA	M53	19.55

**Tabla A.4. ANDEVA de una vía para los niveles de actividad enzimática de FAS de las ratas macho de la segunda eutanasia**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	257317.	7	36759.5	3.52	0.0065
Intra grupos	334120.	32	10441.2		
Total (Corr.)	591436.	39			

Gl: Grados de libertad

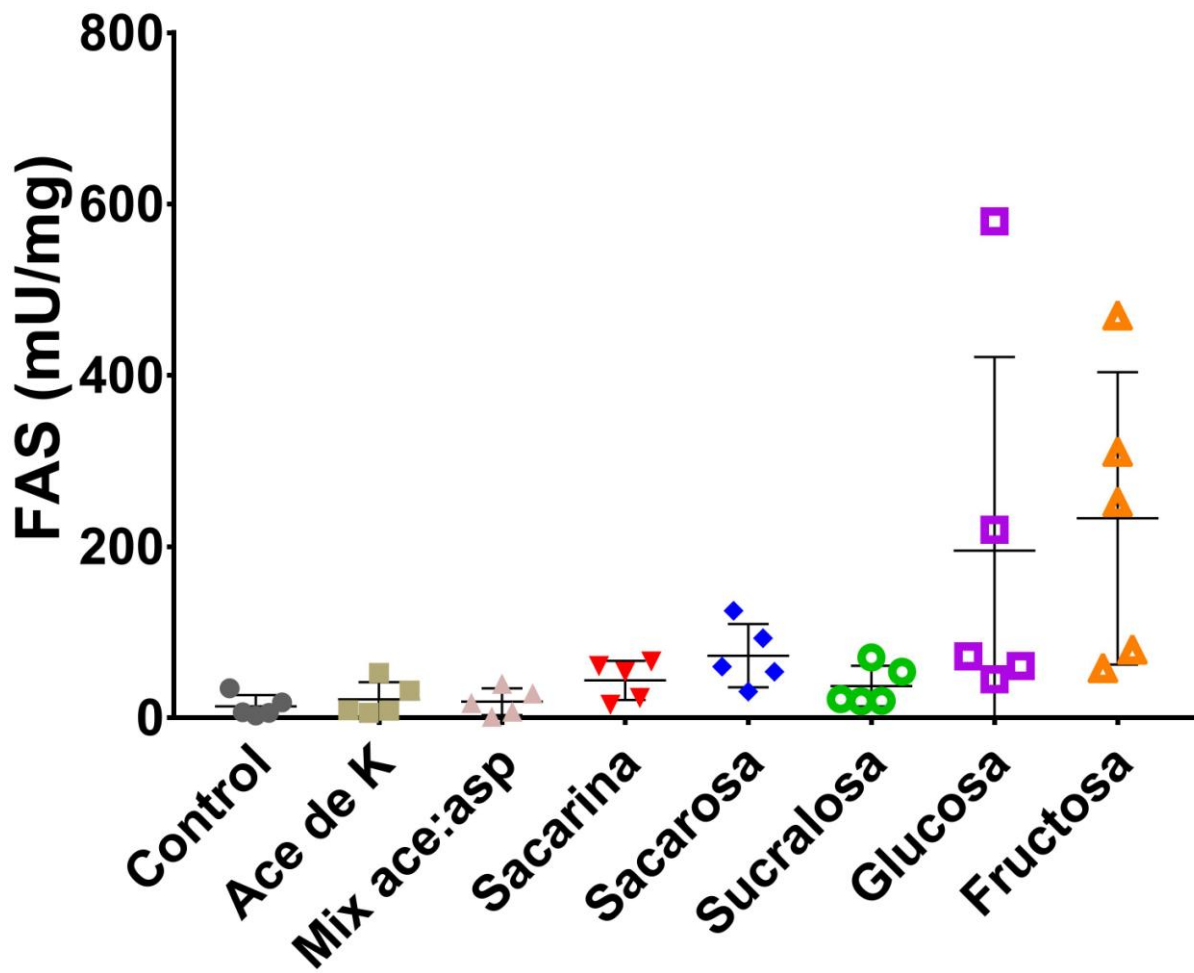


Figura A.2. Gráfica de los niveles de actividad enzimática de la *FAS* en ratas macho (mU/mg) por grupos. Cada punto es el dato de cada espécimen

Tabla A.5. Análisis de varianza de dos vías para los niveles de *FAS* (mU/mg) en la segunda eutanasia

<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	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	420291.0	63	6671.29		
Total (corregido)	740978.0	78			

*Gl*: Grados de libertad. Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## ANEXO B. Cálculos de los valores de FAS

Ecuación 4

$$x = C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(Abs - 0.0005)}{4.3297} * \text{Factor de dilución}$$

Ecuación 5

$$\frac{U}{mL} = \frac{|\Delta Abs muestra| - |\Delta Abs corrección| * volumen de la mezcla de reacción * factor de dilución}{Coeficiente de extinción molar * Volumen de la muestra}$$

Ecuación 6

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{U}{mL}}{\frac{mg}{mL}}$$

**Tabla B.1. Absorbancia a 340 nm. Promedio de muestras para determinar la actividad enzimática**

Muestra	Abs promedio
M19	0.014204
H14	0.083262
M72	0.026753
H54	0.023520
H69	0.024675
H75	0.024367

**Tabla B.2. Cambios (delta, Δ) de absorbancias a 340 nm**

Sexo y codificación	Edulcorante	Δ Absorbancia de la muestra	Δ Absorbancia de corrección
M19	Control	-0.3398	-0.2624
H14		-0.6506	-0.4404
M72		-1.3496	-1.1604
H54	Glucosa	-0.4723	-0.2540
H69		-6.4111	-2.4392
H75		-2.5763	-2.228



MUESTRA H14

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.083262 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 47.787 \frac{mg}{mL}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-0.6506| - |-0.4404| * 0.5 * 0.348087}{6.22 * 0.167} = 0.3522 \frac{U}{mL}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{0.3522 \frac{U}{mL}}{47.787 \frac{mg}{mL}} = 0.00073701 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 0.73701 \frac{mU}{mg}$$

MUESTRA M72

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.026753 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 15.1587 \frac{mg}{mL}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-1.3496| - |-1.1604| * 0.5 * 0.111845}{6.22 * 0.167} = 0.01022 \frac{U}{mL}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{0.01022 \frac{U}{mL}}{15.1587 \frac{mg}{mL}} = 0.00067 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 0.67 \frac{mU}{mg}$$

MUESTRA H54

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.023520 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 13.2919 \frac{mg}{mL}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-0.4723| - |-0.2540| * 0.5 * 0.098323}{6.22 * 0.167} = 0.01033 \frac{U}{mL}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{0.01033 \frac{U}{mL}}{13.2919 \frac{mg}{mL}} = 0.00078 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 0.78 \frac{mU}{mg}$$

MUESTRA H69

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.024675 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 13.9588 \frac{mg}{mL}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-6.4111| - |-2.4392| * 0.5 * 0.1032}{6.22 * 0.167} = 0.1979 \frac{U}{mL}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{0.1979 \frac{U}{mL}}{13.9588 \frac{mg}{mL}} = 0.01418 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 14.18 \frac{mU}{mg}$$

MUESTRA H75

$$C \left( \frac{mg}{mL} \right) = \frac{(0.024367 - 0.0005)}{4.3297} * 2500 = 13.7809 \frac{mg}{mL}$$

$$\frac{U}{mL} = \frac{|-2.5763| - |-2.228| * 0.5 * 0.10187}{6.22 * 0.167} = 0.01713 \frac{U}{mL}$$

$$\frac{U}{mg} = \frac{0.01713 \frac{U}{mL}}{13.7809 \frac{mg}{mL}} = 0.001243 \frac{U}{mg} * \frac{1000 mU}{U} = 1.243 \frac{mU}{mg}$$

## ANEXO C. Acervo fotográfico

A continuación, se muestran algunas fotografías de especímenes, metodologías empleadas y equipos utilizados en el experimento.



Figura C.1. Rata Wistar adulta

A



B



Figura C.2. (A) Especímenes de ratas Wistar del grupo de sacarosa alojados en grupo en la caja de polisulfonato. (B) Especímen alimentándose del comedero



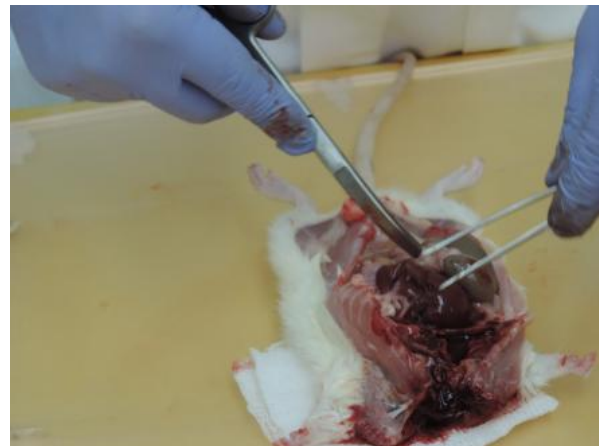
**Figura C.3. Especimen en la cámara rica de CO<sub>2</sub> durante la eutanasia**



**Figura C.4. Armado de mesa de trabajo para disección de espécimen, pesaje y separación de muestras**



**Figura C.5. Disección de espécimen realizado por el M. en C. Gerardo Salas de la FMVZ de la UNAM**



**Figura C.6. Localización del hígado para su posterior disección del espécimen**



**Figura C.7. Separación del hígado de la rata para proceder con el pesaje del órgano**



**Figura C.8. Pesaje del hígado, corte y acomodo para su almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$**



**Figura C.9. Muestra de tejido hepático distribuida en tubos Eppendorf**



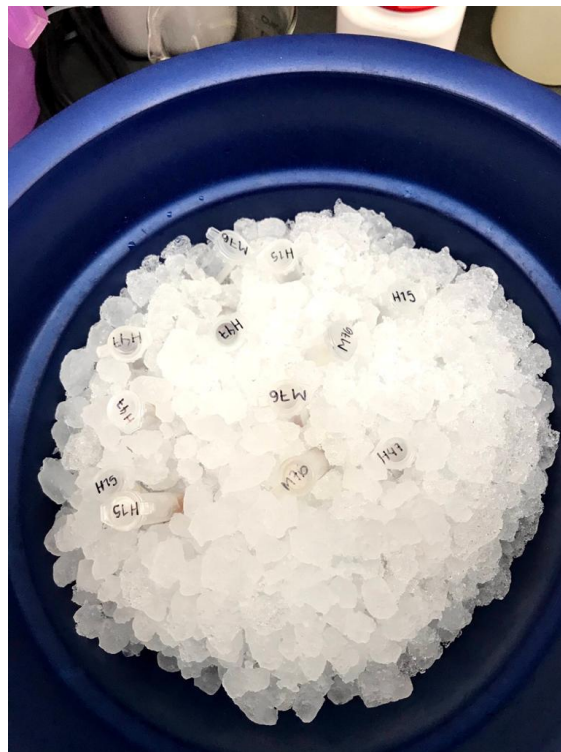
**Figura C.10.** Fragmentos de tejido hepático con medio de montaje para tejidos Tissue-Tek® y envuelto en aluminio para su conservación a -20°C



**Figura C.11.** Tejido hepático con solución amortiguadora de lisis activada (RIPA®) en hielo para su conservación antes de la homogeneización



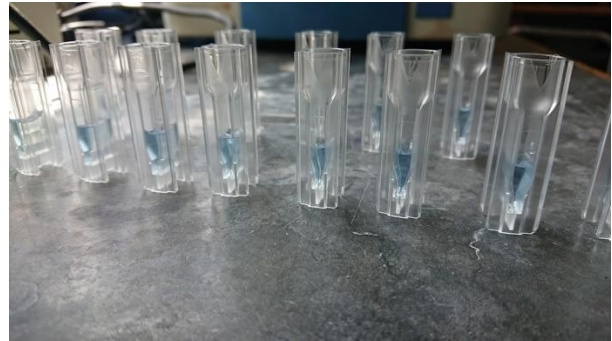
**Figura C.12.** Ruptura mecánica del tejido hepático en solución amortiguadora de lisis



**Figura C.13.** Extracto crudo hepático conservado en hielo para su posterior análisis



**Figura C.14. Preparación de muestra para la determinación de actividad enzimática de la *FAS***



**Figura C.15. Celdas de polimetilmetacrilato (PMMA) con muestra y reactivo de Bradford para la cuantificación de proteínas**



**Figura C.16. Muestras para la determinación de actividad enzimática de la *FAS* en el espectrofotómetro UV/VIS marca RAYLEIGH modelo UV-1800**



**Figura C.17. Personal académico, compañeros y amigos del proyecto Edulcorantes en el Laboratorio de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental (LIQAyQA)**



**Figura C.18. Dra. María del Camen Durán Domínguez de Bazúa, Dr. Samuel Mendoza Pérez y el M. en C. Rolando Salvador García Gómez junto con el personal académico y compañeros del LIQAyQA**



## ANEXO D. Disposición de residuos de la investigación

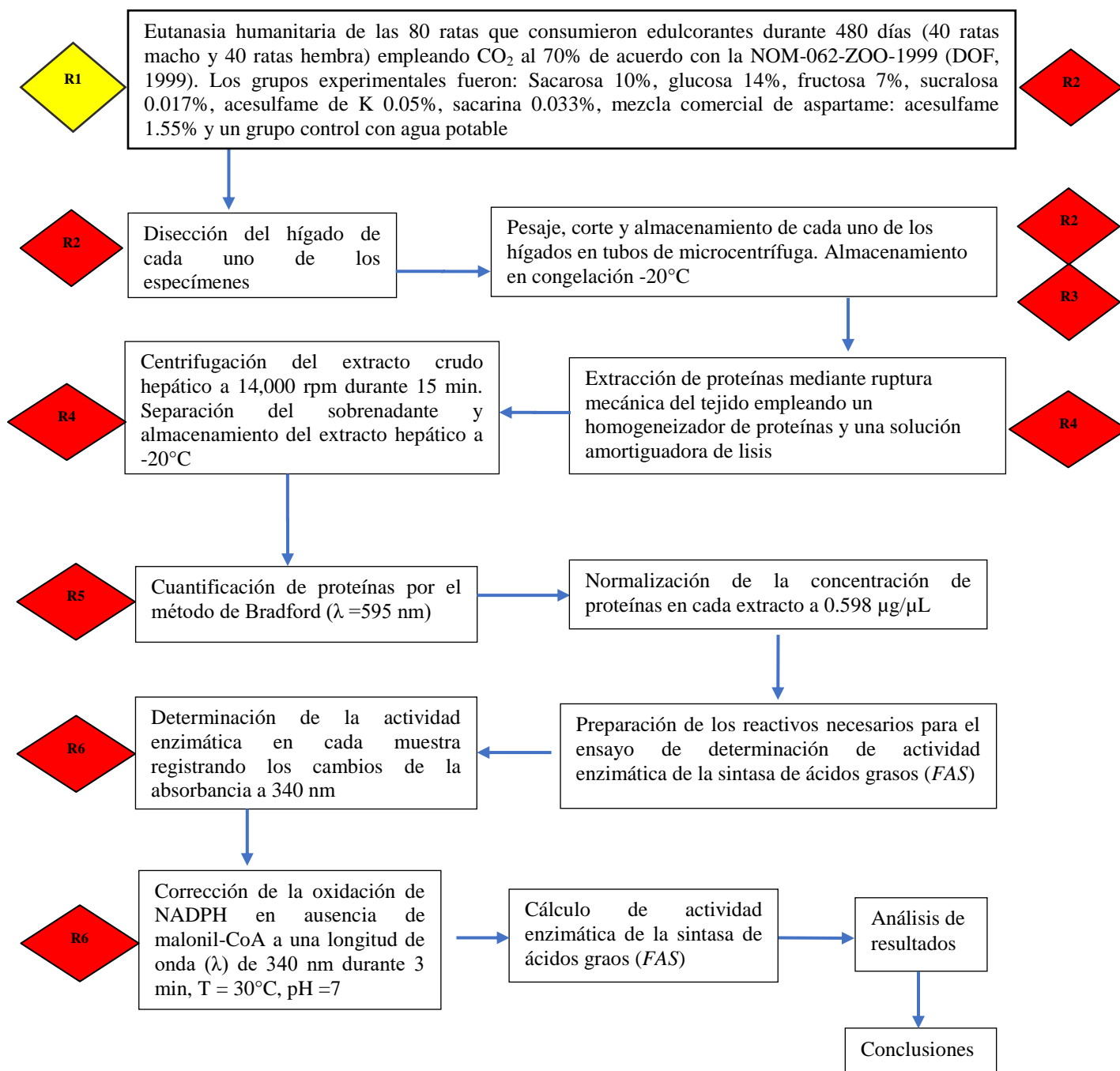


Figura D.1. Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación

**R1:** Partes de tejido y restos anatómicos. Se almacenan en bolsas amarillas para residuos biológico-infecciosos y se almacenan temporalmente a  $-20^{\circ}\text{C}$  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.

**R2:** 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.

**R3:** Navajas para disección de hígado. Se depositan en un recipiente especial para objetos punzocortantes con residuos biológicos 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 su disposición final.

**R4:** Solución amortiguadora de lisis *RIPA*<sup>®</sup>: NaCl 137 mM, KCl 2 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8.1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM, octilfenoxi poli (etilenoxi)etanol 0.1%, deoxicolato de sodio 0.5%, dodecilsulfato de sodio 0.1%, NaF 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  2 mM, azida de sodio 0.006%; reactivo de Bradford:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  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.

**R5:** Reactivo de Bradford [azul de Coomassie 100 mg/L, ácido fosfórico 8.5% (v/v), etanol 5% (v/v)]. 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 sintasa de ácidos grasos: 210 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 290 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 33  $\mu\text{M}$  de acetil-Coenzima A, 100  $\mu\text{M}$  de malonil-CoA, 100  $\mu\text{M}$  de NADPH, 1 mM de EDTA, 1 mM de  $\beta$ -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.

## Bibliografía

- 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>.
- Ameer, F., Scandiuzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H., Zaidi, N. 2014. *De novo* lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 63(7): 895-902.
- Arcella, D., Le Donne, C., Piccinelli, R., Leclercq, C. 2004. Dietary estimated intake of intense sweeteners by Italian teenagers. Present levels and projections derived from the INRAN-RM 2001. Food survey. *Food and Chemical Toxicology*. 42(4): 677-685.
- 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>.
- Bakal, A.I., O'Brien-Nabors, L. 2011. Saccharin. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3<sup>a</sup> ed., pp.151-170. Nueva York, EE. UU.
- Bassoli, A., Merlini, L. 2003. Sweeteners | Intensive. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Caballero, B., ed. Academic Press, 2<sup>a</sup> ed., pp. 5688–5695. Nueva York, NY, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/b0-12-227055-x/01172-x>.
- Bazin R., Ferré P. 2001 Assays of Lipogenic Enzymes. En *Adipose Tissue Protocols. Methods in Molecular Biology*, Ailhaud, G., ed., Springer, Vol 155., pp. 121-127. Totowa, NJ, EE. UU. <https://doi.org/10.1385/1-59259-231-7:121>
- Beld, J., Lee, D., Burkart, M.D. 2014. Fatty acid biosynthesis revisited: Structure elucidation and metabolic engineering. *Molecular Biosystems*, 11 (1): 38-59.
- Bellisile, F., Drewnowski, A. 2007. Intense sweeteners, energy intake and the control of body “weight”. *European Journal of Clinical Nutrition*. 61(6): 691-700.
- 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): 1-16.
- Bloch, K., Vance, D. 1977. Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annual Review of Biochemistry*. 46(1): 263–298.
- Blundell, J.E., Hill, A.J. 1986. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *The Lancet*. 327(8489): 1092-1093.
- 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79 (4): 537-543. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.537>.
- Campbell, J.W., Cronan, J.E. 2001. Bacterial fatty acid biosynthesis: Targets for antibacterial drug discovery. *Annual Review of Microbiology*. 55(1): 305-332.
- Carraro-Foletto, K., Melo-Batista, B.A., Magagnin-Neves, A., de-Matos-Feijó, F., Reis-Ballard, C., Marques-Ribeiro, M.F., Casaccia-Bertoluci, M. 2016. Sweet taste of saccharin induces “weight” gain without increasing caloric intake, not related to insulin-resistance in Wistar rats. *Appetite*. 96: 604-610. [10.1016/j.appet.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.11.003)
- de-Matos-Feijó, F., Reis Ballard, C., Carraro-Foletto, K., Melo-Batista, B.A., Magagnin-Neves, A., Marques-Ribeiro, M.F., Casaccia-Bertoluci, M. 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.

- DOF, 1999. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones, técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación.
- 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.
- Durán-A., S., Cordon-A., K., Rodríguez-N., M. del P. 2013. Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de “peso”. *Revista Chilena de Nutrición*. 40(3): 309-314. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000300014>.
- Envigo. 2008. Historical control data of body weights, food consumption and water consumption in HsdRcc HanTM: WIST, Wistar Hannover Rats. Recuperado el 22 de mayo 2022. [En línea]. Disponible: <https://www.envigo.com/products-services/research-models-services/models/research-models/rats/outbred/wistar-han-outbred-rat/hsdhanwist/>
- Envigo. 2015. 2018S Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable). Recuperado el 22 de mayo 2022. [En línea]. Disponible: <https://insights.envigo.com/hubfs/resources/datasheets/2018s-datasheet-0915.pdf>
- 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>.
- FDA. 2018. Additional information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the United States. Recuperado el 6 de febrero 2019. [En línea]. Disponible en <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm397725.htm>.
- Figlewicz, D.P., Ioannou, G., Bennett Jay, J., Kittleson, S., Savard, C., Roth, C.L. 2009. Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiology & Behavior*. 98 (5): 618-24.
- Fox, S.I. 2011. Fisiología Humana. McGraw-Hill, 12ª ed. Pp. 106-108. Ciudad de México, México.
- Fullerton, M.D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.P., Hardie, D.G. 2013. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature Medicine*. 19(12): 1649-1654. doi:10.1038/nm.3372.
- García-Almeida, J.M., Casado-Fernández, G.M., García-Alemán, J. 2013. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Revista Nutrición Hospitalaria*. 28(4): 17-31.
- Gil-Hernández, Á. 2010. Tratado de Nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Panamericana. 2ª ed., pp. 225-226, 318. Madrid, España.
- Goldsmith, L.A., Merkel C.M. 2011. Sucralose. En *Alternative Sweeteners*. O'Brien Nabors, L., ed. Marcel Dekker, 3ª edición, pp.185-209. Nueva York, EE. UU.
- González-Hita, M.E., Ambrosio-Macías, K.G., Sánchez-Enríquez, S. 2006. Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 8(3): 191-200.
- Graffigna, M., Catoira, N., Soutelo, J., Azpelicueta, A., Berg, G., Perel, C., Migliano, M.E.,

- Aranguren, M., Musso, C., Farias, J. 2017. Diagnóstico de esteatosis hepática por métodos clínicos, bioquímicos y por imágenes. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 54(1): 37-46.
- 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>.
- Haber, B., Lipinski, G., Rathjen, S. 2012. Acesulfame K. En *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*, Mitchell, H., ed. Blackwell Publishing, 4<sup>a</sup> ed., pp. 65-83. Nueva York, EE.UU.
- 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).
- 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.
- 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>.
- 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>.
- Keim, N.L., Havel, P.J. 2013. Fructose: Absorption and metabolism. En *Encyclopedia of Human Nutrition*, Caballero, B., ed. Academic Press, 3<sup>a</sup> ed. Vol. 2, pp. 361-365. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375083-9.00128-8>.
- Klug, C., von Rymon-Lipinski, G.W. 2011. Acesulfame potassium. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L. ed. CRC Press, 4<sup>a</sup> ed. Pp. 13-30. Boca Raton, EE. UU.
- Kruger, N. 2009. The Bradford method for protein quantitation. En *The Protein Protocols Handbook*, Walker, J.M., ed. Human Press, 3<sup>a</sup> ed. Pp. 17-25. Hatfield, Reino Unido.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. 2007. *Lehninger: Principios de bioquímica*. 5<sup>a</sup> Ed. Ediciones Omega. Pp. 527-569, 805-851. Barcelona, España.
- Lipinski, G., Hanger, L. 2011. Acesulfame K. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed. Marcel Dekker, 3<sup>a</sup> ed. Pp. 13-31. Nueva York, EE. UU.
- López-Oliva-Muñoz, 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.
- Ma, J., Bellon, M., Wishart, J.M., Young, R., Blackshaw, L.A., Jones, K.L., Horowitz, M., Rayner, C.K. 2009. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal Liver Physiology*. 296(4): 735-739.
- Maier, T., Jenni, S., Ban, N. 2006. Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*. 311(5765): 1258-1262. <https://doi.org/10.1126/science.1123248>.
- Manzur-Jattin, F., Morales-Núñez, M., Ordosgoitia-Morales, J., Quiroz-Mendoza, R., Ramos-Villegas, Y., Corrales-Santander, H. 2020. Impacto del uso de edulcorantes no calóricos en la salud cardiometabólica. *Revista Colombiana de Cardiología*. 27(7): 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2019.11.003>.
- 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(1): 116-124.
- Méndez-Sánchez, N., Gutiérrez-Grobe, Y., Chávez-Tapia, N.C., Kobashi-Margain, R.A., Uribe, M. 2010. Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: Conceptos actuales. *Revista de Gastroenterología de México*. 75(S2): 143-148.
- Mendoza-Pérez, S. 2017. Efecto de la ingesta de diferentes edulcorantes sobre la liberación de las hormonas incretinas GLP-1 y GIP y su efecto sobre la lipogénesis a largo plazo. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México. México.
- Mendoza-Pérez, S. 2021. Efecto de los edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre la actividad de las enzimas reguladoras de la glucólisis y la lipogénesis. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Química, UNAM. Ciudad de México. México.
- 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.
- 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.
- OMS. 2020a. Obesidad y “sobrepeso”. [En línea] (Actualizado el 1 de abril del 2020). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [Último acceso 19 de noviembre de 2020].
- OMS. 2020b. Evaluaciones del Comité Mixto *FAO / OMS* de Expertos en Aditivos Alimentarios (*JECFA*). Sucralose. Recuperado el 11 de febrero 2022. [En línea]. Disponible en [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/jecfa\\_additives/docs/Monograph1/Additive-444.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-444.pdf)
- 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 aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS ONE*. 9(10): e109481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
- Pavlov, I. 1975. Reflejos condicionados e inhibiciones. Editorial Península. Barcelona, España.
- Postic, C., Girard, J. 2008. Contribution of *de novo* fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(3): 829-838. <https://doi.org/10.1172/JCI34275>.
- Real Academia Española. 2020. Definición de edulcorante - Diccionario panhispánico del español jurídico - RAE. <https://dpej.rae.es/lema/edulcorante>.
- Reuber, M.D. 1975. Carcinogenicity of saccharin. *Environmental Health Perspectives*. 25: 173-200. doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.7825173>
- Riveros, M.J., Parada, A., Pettinelli, P. 2014. Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud; malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutricion Hospitalaria*. 29(3): 491-499.
- Roesch-Dietlen, F., Dorantes-Cuéllar, A., Carrillo-Toledo, M.G., Martínez-Sibaja, C., Rojas-Carrera, S., Bonilla-Rojas S, Uchino-Higueras V., Lagunas, L., Carrasco-Arróniz, M.A., Soler-Leal, B., León-Valdivieso, J., Cid-Juárez, S., Martínez, J.A. 2006. Frecuencia del hígado graso no alcohólico en un grupo de pacientes con síndrome metabólico estudiado en la Ciudad de Veracruz. *Revista de Gastroenterología de México*. 71(4): 446-452.
- 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>.

- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 514(7521): 181–186.
- Swithers, S.E., Baker, C.R., Davidson, T.L. 2009. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body “weight” gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*. 123(4): 772–780.
- Swithers, S.E., 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.
- Swithers S.E. 2015. Artificial sweeteners are not the answer to child- hood obesity. *Appetite*. 93:85-90.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0195666315001294?via%3Dihub>
- Tsiloulis, T., Watt, M.J. 2015. Exercise and the regulation of adipose tissue metabolism. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 135: 175-201.  
<https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.016>.
- Valdés-Martínez, S.E. 2006. Hidratos de carbono. En Química de los Alimentos, Baduí-Dergal, S., ed. Pearson Education, 4<sup>a</sup> ed. Pp. 48-50. Ciudad de México, México.
- Velásquez-Uribe, G. 2006. Fundamentos de alimentación saludable. Editorial Universidad de Antioquia. Pp.79. Antioquia, Colombia.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W. 2009. Fundamentos de bioquímica: La vida a nivel molecular. Panamericana, 2<sup>a</sup> ed. Pp.459-460. Barcelona, España.
- Zakim, D. 1972. The effect of fructose on hepatic synthesis of fatty acids. *Acta Medica Scandinavica*. 192(S542): 205–214. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1972.tb05336.x>