



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DEL CONSUMO CRÓNICO DE EDULCORANTES SOBRE
LOS NIVELES DE ACTIVIDAD DE LA ENZIMA
GLUCOQUINASA(GK) EN TEJIDO HEPÁTICO DE MODELOS
ANIMALES**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

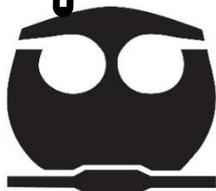
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

JOSÉ CARLOS SOTO MEDINA

ASESOR: M. en C. Rolando Salvador García Gómez

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

| | |
|--------------------------|--|
| Presidente: | Q.F.B. Agustín Reyo Herrera |
| Vocal: | M. en A.I. Landy Irene Ramírez Burgos |
| Secretario: | M. en C. Rolando Salvador García Gómez |
| Primer suplente: | Dra. Marisela Bernal González |
| Segundo suplente: | Dra. María del Carmen Durán Domínguez |

Sitio en donde se desarrolló el tema

Laboratorios E-301, E-302, E-303 del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM

Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Conjunto E, Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Durán Domínguez

SUSTENTANTE:

José Carlos Soto Medina

Declaratoria

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

José Carlos Soto Medina

RECONOCIMIENTOS

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

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por la orientación y ayuda recibida para el desarrollo de esta tesis

A la M. en C. María Isabel Gracia Mora. Responsable de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química de la UNAM por estar al pendiente durante la investigación en las instalaciones a su digno cargo

A la M. en C. Lucía Macías Rosales y al M. en C. Héctor Rico Morales por su apoyo durante la manipulación y manejo de los animales dentro de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química de la UNAM

Al M. en C. Rolando Salvador García Gómez por la asesoría brindada a lo largo del proyecto, por estar siempre al pendiente de los requerimientos faltantes en el proyecto y por su gran amistad

Al Dr. Samuel Mendoza Pérez por su valiosa ayuda para concluir la parte estadística de las pruebas realizadas durante la experimentación y por su amistad

Se agradece el apoyo de préstamo de material en el día a día al laboratorista de los Laboratorios 301, 302 y 303 de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental, (LIQAYQA), el Sr. Benjamín Ramírez Castillo. Por siempre mostrar buena disposición para su entrega y por su apoyo y ayuda en el manejo de material de laboratorio

DEDICATORIAS

A mi papá, quien estuvo conmigo en cada etapa importante de mi vida y no solo académica: en mi entrada y salida de primaria, secundaria y preparatoria, en mi primera carrera atlética como entrenador, en mi salida del servicio militar y en la que estoy seguro de que también estaría aquí en la de la universidad.

A mi mamá, quien siempre vio un gran futuro en mí y tuvo esperanzas en que sería alguien importante. Si bien tal vez no fue la mejor mamá del mundo, siempre se esforzó por ser un ejemplo para todos sus hijos, sacrificándose (más de lo que debía) por darnos una buena vida y por preparándonos para ser autosuficiente el día que faltara.

A mi hermana Elizabeth, quien fue una fuente de inspiración para que yo decidiera estudiar una carrera de ciencias y quien me invitó a ser parte de su pequeña familia durante mis primeros años de universidad.

A mi hermana Natalia, quien siempre se preocupa como una mamá porque estemos bien sus hermanos menores.

A mis hermanos David, Rafael, Miguel y Sergio quienes han estado conmigo apoyándome en los mejores y peores momentos.

Y a todos mis amigos de los cuales me reservo a dar nombres, ya que, sin ellos, no sería quien soy el día de hoy.

Gracias a todos ustedes que siempre me dieron ese pequeño empujón en la vida para tomar decisiones, que me prestaron de su tiempo para escucharme, que me ayudaron con esos momentos des estrés o que simplemente hicieron de mi vida académica y extra académica, una etapa más amena.

ÍNDICE

| | | Página |
|---|---|--------|
| Glosario | | XI |
| Resumen | | XV |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN | | 1 |
| 1.1. | Hipótesis | 2 |
| 1.2. | Objetivo general | 2 |
| 1.3. | Objetivos específicos | 2 |
| CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO | | 3 |
| 2.1. | Edulcorantes | 3 |
| 2.1.1. | Glucosa | 3 |
| 2.1.2. | Fructosa | 4 |
| 2.1.3. | Sacarosa | 5 |
| 2.2. | Edulcorantes no nutritivos | 5 |
| 2.2.1. | Acesulfame de potasio | 6 |
| 2.2.2. | Mezcla aspartame:acesulfame de potasio | 7 |
| 2.2.3. | Sucralosa | 8 |
| 2.2.4. | Sacarina | 8 |
| 2.3. | Glucólisis | 10 |
| 2.3.1. | Glucoquinasa | 12 |
| 2.3.2. | 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (<i>PFK2/FBP2</i>) | 15 |
| 2.3.3. | Proteína reguladora de la glucoquinasa (<i>GKRP</i>) | 15 |
| 2.3.4. | Factores de transcripción | 16 |
| 2.3.4.1. | Proteína de unión al elemento regulador del estero1 1c (<i>SREBP-1c</i>) | 16 |
| 2.3.4.2. | Proteína de unión al elemento de respuesta a los carbohidratos (<i>ChREBP</i>) | 17 |
| CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA | | 18 |
| 3.1. | Desarrollo experimental | 18 |
| 3.2. | Diseño experimental | 18 |
| 3.3. | Modelo animal | 19 |
| 3.4. | Construcción de la curva patrón de proteínas | 19 |
| 3.5. | Extracción de proteínas | 20 |
| 3.6. | Cuantificación de proteínas en tejido hepático | 21 |
| 3.7. | Determinación de la actividad enzimática de la glucoquinasa (<i>GK</i>) | 21 |
| 3.8. | Análisis estadísticos | 23 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 25 |
| 4.1. | Realización de curva patrón de globulina | 25 |
| 4.2. | Cuantificación de proteínas en tejido hepático | 27 |
| 4.3. | Determinación de la actividad enzimática de la glucoquinasa | 27 |
| 4.4. | Análisis estadístico de la actividad enzimática | 29 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 35 |

| | | |
|---------------------|--|---------------|
| 5.1. | Conclusiones | 35 |
| 5.2. | Recomendaciones | 36 |
| APÉNDICES | | Página |
| Apéndice A | Concentración de proteínas del tejido hepático | 37 |
| Apéndice B | Actividad específica de glucoquinasa del tejido hepático | 47 |
| Apéndice C | Pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad | 57 |
| Apéndice D | Disposición de residuos de la investigación | 60 |
| BIBLIOGRAFÍA | | 62 |

| ÍNDICE DE TABLAS | | Página |
|-------------------------|---|---------------|
| Tabla 3.1. | Información nutrimental de la dieta Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Envigo, 2015) | 19 |
| Tabla 3.2. | Orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas del estándar de globulina | 20 |
| Tabla 4.1. | Datos de la curva patrón de globulina | 26 |
| Tabla 4.2. | Media por grupo de actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa de ratas macho | 29 |
| Tabla 4.3. | Media por grupo de actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa de ratas hembra | 29 |
| Tabla 4.4. | Análisis de varianza de dos vías para determinar la actividad específica | 32 |
| Tabla A.1. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de glucosa | 37 |
| Tabla A.2. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de glucosa | 37 |
| Tabla A.3. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de fructosa | 38 |
| Tabla A.4. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de fructosa | 38 |
| Tabla A.5. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sacarosa | 39 |
| Tabla A.6. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarosa | 39 |
| Tabla A.7. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de ace K | 40 |
| Tabla A.8. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de ace K | 40 |
| Tabla A.9. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes | 41 |
| Tabla A.10. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes | 41 |
| Tabla A.11. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sacarina | 42 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabla A.12. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarina | 42 |
| Tabla A.13. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sucralosa | 43 |
| Tabla A.14. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sucralosa | 43 |
| Tabla A.15. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de agua potable como control | 44 |
| Tabla A.16. | Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de agua potable como control | 44 |
| Tabla A.17. | Concentración de proteínas para las 10 muestras de ratas macho del grupo basal | 45 |
| Tabla A.18. | Concentración de proteínas para las 10 muestras de ratas hembra del grupo basal | 46 |
| Tabla B.1. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de glucosa | 47 |
| Tabla B.2. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de glucosa | 47 |
| Tabla B.3. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de fructosa | 48 |
| Tabla B.4. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de fructosa | 48 |
| Tabla B.5. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sacarosa | 49 |
| Tabla B.6. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarosa | 49 |
| Tabla B.7. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de ace K | 50 |
| Tabla B.8. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de ace K | 50 |
| Tabla B.9. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes | 51 |
| Tabla B.10. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes | 51 |

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabla B.11. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sacarina | 52 |
| Tabla B.12. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarina | 52 |
| Tabla B.13. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sucralosa | 53 |
| Tabla B.14. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sucralosa | 53 |
| Tabla B.15. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió agua potable como control | 54 |
| Tabla B.16. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió agua potable como control | 54 |
| Tabla B.17. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo basal | 55 |
| Tabla B.18. | Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo basal | 56 |
| Tabla C.1. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió agua potable como control | 57 |
| Tabla C.2. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de glucosa | 57 |
| Tabla C.3. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sacarosa | 57 |
| Tabla C.4. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de fructosa | 57 |
| Tabla C.5. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de ace K | 57 |
| Tabla C.6. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de mezcla | 57 |
| Tabla C.7. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sacarina | 57 |
| Tabla C.8. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sucralosa | 58 |
| Tabla C.9. | Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo basal | 58 |
| Tabla C.10. | Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió agua potable como control | 58 |
| Tabla C.11. | Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió solución de glucosa | 58 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabla C.12. | Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió solución de sacarosa | 58 |
| Tabla C.13. | Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de fructosa | 58 |
| Tabla C.14. | Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de ace K | 58 |
| Tabla C.15. | Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de mezcla | 58 |
| Tabla C.16. | Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de sacarina | 59 |
| Tabla C.17. | Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de sucralosa | 59 |
| Tabla C.18. | Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo basal | 59 |
| Tabla C.19. | Prueba de Homocedasticidad para ratas macho | 59 |
| Tabla C.20. | Prueba de Homocedasticidad para ratas hembra | 59 |

| ÍNDICE DE FIGURAS | | Página |
|--------------------------|--|---------------|
| Figura 2.1. | Metabolismo de fructosa (Kohlmeier, 2003b) | 5 |
| Figura 2.2. | Primera fase de la glucólisis. Fase preparatoria (Clark et al., 2013) | 11 |
| Figura 2.3. | Segunda fase de la glucólisis. Fase de beneficios (Clark et al., 2013) | 12 |
| Figura 2.4. | Cambio conformacional de la <i>GK</i> en función a la concentración de glucosa (Van Schaftingen, 2020). | 13 |
| Figura 2.5. | Mecanismo de secreción de insulina (Santamaría-Duque, S.F.) | 14 |
| Figura 2.6. | Interacción funcional entre los factores de transcripción <i>SREBP-1c</i> y <i>ChREBP</i> en la lipogénesis (López-Oliva y Muñoz-Martínez, 2013) | 17 |
| Figura 3.1. | Diagrama de bloques del desarrollo experimental | 18 |
| Figura 3.2. | Árbol de decisiones para el manejo de datos estadísticos y pruebas realizadas | 24 |
| Figura D.1. | Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación | 60 |

| ÍNDICE DE GRÁFICAS | | |
|---------------------------|--|----|
| Gráfica 4.1. | Curva patrón de globulina para la cuantificación de proteínas en tejido hepático | 26 |
| Gráfica 4.2. | Curva de avance de reacción de un blanco de reactivos | 28 |
| Gráfica 4.3. | Curva de avance de reacción de muestra H70 Fructosa | 28 |
| Gráfica 4.4. | Interacciones e intervalos de la media al 95% de confianza | 33 |

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

GLOSARIO

Ace K. Acesulfame de potasio

Acinos pancreáticos. Conjuntos de células localizadas en el páncreas, encargadas de producir el jugo pancreático responsable de la digestión de los alimentos

Almidón. Polisacárido de glucosa. Consta de cadenas de glucosa con estructura lineal (amilosa) o ramificada (amilopectina)

ANDEVA. Análisis de varianza. Técnica que permite calcular la probabilidad de encontrar medias dispares entre sí

ARNm. ARN mensajero (Ácido ribonucleico)

ATP. Adenosina 5-trifosfato

Azul de Coomassie G250. Colorante derivado del trifenilmetano que cuenta con la capacidad de unirse a las proteínas

Células β . Células pancreáticas encargadas de la producción de insulina

ChREBP. Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos. Por sus siglas en inglés, *Carbohydrate responsive element binding protein*

Ciclo de Krebs. Ruta metabólica donde se libera energía a través de la oxidación de la Acetil Coenzima A en forma de *ATP*, *NADH* y *FADH*

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

CV. Coeficiente de variación

DAM. Desviación absoluta de la mediana

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

Diabetes mellitus. Trastorno en el cual el cuerpo no produce suficiente insulina o no responde normalmente a ella, lo que hace que los niveles de glucosa en la sangre sean anormalmente altos

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

DNA. Ácido desoxirribonucleico. Por sus siglas en inglés, *Deoxyribonucleic acid*.

Edulcorantes. Sustancias que se emplean para impartir un sabor dulce a los alimentos

EMA. Agencia Europea de Medicamentos. Por sus siglas en inglés, *European Medicines Agency*

Enzimas. Proteínas que tienen la capacidad de facilitar y acelerar las reacciones químicas que tienen lugar en los tejidos vivos

Eritrocitos. Glóbulos rojos en sangre

FDA. Food and Drug Administration de los Estados Unidos

Glucagón. Hormona producida por las células α del páncreas que regula los niveles de glucosa en la sangre. Aumenta el nivel de glucosa en la sangre y evita que baje demasiado

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

GIP. Peptido insulínico dependiente de glucosa. Por sus siglas en inglés, *glucose-dependent insulintropic peptide*

GK. Glucoquinasa. Por sus siglas en inglés, *Glucokinase*

GKRP. Proteína reguladora de la glucoquinasa. Por sus siglas en inglés *glucokinase regulatory protein*

GLP-1. Péptido similar al glucagón tipo 1. Por sus siglas en inglés *glucagon like peptide*. Hormona encargada de la regulación del apetito y de los niveles de glucosa en la sangre

Glucurónidos. También conocido como glucuronósidos son moléculas en las que un ácido glucurónico está enlazado a otra molécula (no glúcidos) a través de un enlace glucosídico

GLUT-2. Transportador de glucosa tipo 2. Por sus siglas en inglés, *glucose transporter 2*. Principal transportador de glucosa en las células β pancreáticas y los

hepatocitos. Desempeña un papel importante en la secreción de insulina de las células β y en el metabolismo de la glucosa en los hepatocitos

GLUT-5. Transportador de glucosa tipo 5. Por sus siglas en inglés, *glucose transporter 5*. Proteína transmembranal encargada de facilitar la absorción de la fructosa

Grelina. Hormona orexígena peptídica secretada principalmente por el estómago. Estimula el apetito a través de un incremento de su concentración y disminuye durante la ingesta de alimento

Hepatocitos. Células propias del tejido hepático del hígado

HFCS. Jarabe de maíz de alta fructosa. Por sus siglas en inglés, *High fructose corn syrup*

Homocedasticidad. Considera que la varianza es constante en los diferentes niveles de un factor, es decir, entre diferentes grupos

IDA. Ingesta diaria admisible. Cantidad de una sustancia que puede ser ingerida diariamente por un individuo durante toda su vida, sin que produzca un daño a la salud

Insulina. Hormona producida por las células β del páncreas encargada de regular los niveles de glucosa en sangre a través de su paso a las células. Se libera cuando la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo es elevada

Islotes pancreáticos. Conjuntos de células situadas en el páncreas encargadas de producir hormonas como la insulina y el glucagón

JECFA. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios. Por sus siglas en inglés *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

Microbiota intestinal. Microorganismos vivos residentes en el tubo digestivo

Monoglúcidos. Hidratos de carbono sencillos. Constituidos por una sola cadena de polialcoholes con un grupo aldehído o cetona

NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido-reducida

NADPH. Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida. Por sus siglas en inglés, *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

Orexígeno. Fármaco, hormona o compuesto que incrementa el apetito

PFK2/FBP2. 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa. Acrónimo del inglés, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase

Poder edulcorante. Valor que se obtiene al comparar los edulcorantes por su capacidad de causar dulzor con respecto de la sacarosa tomada como referencia

PYY. Péptido YY. Hormona que se produce en las células-L del intestino delgado. Ayuda a reducir el apetito y limitar la ingesta de alimentos

RIPA. Solución amortiguadora para ensayos de radioinmunoprecipitación. Por sus siglas en inglés, *radioimmunoprecipitation assay buffer*

RNA. Ácido ribonucleico. Por sus siglas en inglés, *Ribonucleic acid*.

SGLT-1. Transportador de glucosa acoplados a sodio 1. Por sus siglas en inglés, *sodium-glucose transporter 1*

SREBP-1c. Proteína de unión al elemento regulador de esteroides. Por sus siglas en inglés, *Sterol regulatory element-binding protein 1*

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

TRIS base. Tris(hidroximetil)aminometano. Compuesto orgánico usado como componente de soluciones amortiguadoras para ácidos nucleicos. Hay *TRIS* base y *TRIS* HCl, los cuales se usan para amortiguar el pH de las proteínas y estabilizarlas

T1R3. Receptor 3 de sabor 1. Por sus siglas en inglés, *Taste 1 Receptor 3*. Receptor de sabor dulce y umami

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

Ubiquinona. También conocida como coenzima Q10. Participa en los procesos de control de energía en la célula y tiene un efecto antioxidante

Varianza. Medida de dispersión que representa la variabilidad de una serie de datos con respecto de su media

RESUMEN

Dentro de la industria de los alimentos, los edulcorantes calóricos o nutritivos como son la sacarosa, la glucosa y la fructosa, han sido ampliamente utilizados para conservarlos impartiendo un sabor dulce a una gran variedad de productos alimenticios. Sin embargo, su consumo desmedido se ha asociado con daños en la salud de los consumidores. En los últimos años se han observado incrementos de masa corporal y obesidad, alteraciones metabólicas como el índice metabólico y la diabetes *mellitus*, entre otros padecimientos. Derivado de ello, la regulación de alimentos ha sufrido diversos cambios en su normativa, destacando la industria de bebidas no alcohólicas en la que ha implementado entre sus formulaciones el uso de edulcorantes hipocalóricos o no nutritivos como son la sacarina, la sucralosa, y las mezclas entre ellos como el aspartame con acesulfame de potasio, como sustitutos del azúcar teniendo que adicionar conservadores. No obstante, a pesar de que estos edulcorantes y conservadores han sido aprobados por diversas regulaciones, siguen generando controversia por su consumo, ya sea por reportar efectos cancerígenos a altas dosis, cambios en la microbiota intestinal, incrementos en los niveles de glucosa en sangre o diversas alteraciones metabólicas. Bajo este último punto, en esta tesis se planteó la medición de los niveles de la actividad enzimática de la glucoquinasa, *GK* (primera enzima en actuar en la glucólisis) en el tejido hepático para evaluar el efecto del consumo de edulcorantes. Los grupos de ratas que se manejaron fueron: 40 ratas hembra + 40 ratas macho + 2 grupos basales (10 machos y 10 hembras) para dar un total de 100 ratas de la estirpe Wistar. Los resultados obtenidos de la actividad enzimática fueron comparados contra un grupo control (ratas que bebieron solamente agua potable) y de esta manera evaluar el incremento o decremento de esta actividad por el consumo de edulcorantes nutritivos y no nutritivos. El estudio abarcó una duración de 170 días y al término de este se realizó una eutanasia humanitaria en donde se extrajeron los hígados para la realización de este estudio. Los especímenes fueron alimentados con una dieta Teklad Global 18S de manera *ad libitum* y los edulcorantes suministrados fueron los siguientes (glucosa 14%, fructosa 7%, sacarosa 10%, acesulfame de K 0.05%, mezcla de aspartame: acesulfame de K 1.55%, sacarina 0.033% y sucralosa 0.017%). Los resultados obtenidos demostraron, para las ratas macho que bebieron sacarina y sucralosa, que sí hubo diferencias significativas con respecto del grupo control reportando incrementos en los niveles de actividad de la *GK*. Para el caso de las ratas hembra, a pesar de no contar con una diferencia significativa en cuanto a la actividad de la *GK* entre edulcorantes nutritivos y no nutritivos con respecto del grupo control, sí la hubo entre los edulcorantes no nutritivos (acesulfame de K y sacarina con respecto de la sucralosa). En el caso de los dos grupos de ratas macho y hembra, ninguno reportó diferencias significativas entre el grupo control y el grupo basal a lo largo de la duración del experimento. Al aplicarse un análisis multifactorial en donde se relacionó el edulcorante consumido contra el sexo hembra o macho, no hubo diferencias significativas entre el tipo de edulcorante consumido, pero sí en el factor sexo. Lo anterior, da a comprender que el género sí es una variable para la actividad de la *GK* la cual puede estar determinada por distintas vías de regulación a nivel de sustrato como son los factores hormonales o factores de transcripción.

Palabras clave: Edulcorantes nutritivos y no nutritivos, enzima glucoquinasa, *GK* en inglés, tejido hepático, modelos animales

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una preocupación en la sociedad por el consumo excesivo de glúcidos (glucosa, sacarosa, fructosa) ya que su consumo en exceso ha sido asociado dolosamente con enfermedades como son la diabetes *mellitus*, el exceso de masa corporal (“sobrepeso”) y la formación de caries dentales entre otros. Debido a estas razones, se ha buscado reducir su consumo a través del uso de edulcorantes no nutritivos, como la sacarina, la sucralosa, el acesulfame de potasio y algunas mezclas de edulcorantes para potenciar su sabor, por ejemplo, las mezclas de acesulfame con aspartame. Los edulcorantes no nutritivos además de contar con un bajo aporte energético cuentan con un poder edulcorante que se encuentra muy por arriba de los glúcidos naturales mencionados. Por lo tanto, se requieren en bajas cantidades para su adición en alimentos (Bassoli y Merlini, 2003).

La *Food and Drug Administration (FDA)* de los Estados Unidos ha aprobado la utilización de este tipo de edulcorantes en alimentos y bebidas desde 1983, siendo el aspartame el primero de ellos (*FDA*, 1983). Además, la *FDA* ha fijado sus límites de ingesta diaria admisible o aceptable (*IDA* o *ADI*, por sus siglas en inglés).

A pesar del amplio uso de los edulcorantes no nutritivos como endulzantes en alimentos y bebidas, estos edulcorantes todavía son objeto de controversias sobre cuál es la influencia que presentan al interactuar con la microbiota intestinal, el balance de energía, el apetito, la saciedad y la ganancia de masa corporal (Bian et al., 2017; Carraro-Foletto et al., 2016; de-Matos-Feijó et al., 2013; Martínez et al., 2010; Mendoza-Pérez, 2017; Niu et al., 2012; Palmnäs et al., 2014; Suez et al., 2014; Swithers y Davidson, 2008; Swithers et al., 2009; 2010; 2013). También existen interrogantes sobre el impacto que ejercen sobre algunas enzimas del cuerpo, en especial en aquellas que participan en la ruta de la glucólisis (Mendoza-Pérez et al., 2022).

Por ello, en la presente investigación se evaluó el efecto del consumo crónico de edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre los niveles de la actividad específica de la enzima glucoquinasa (primera enzima encargada del proceso de la glucólisis) en

extractos hepáticos de ratas Wistar que consumieron crónicamente edulcorantes durante un largo plazo.

1.1. Hipótesis

Los niveles de actividad de la glucoquinasa en el tejido hepático de ratas hembra y macho de la variedad Wistar son más elevados en aquellos grupos que consumen de manera crónica edulcorantes nutritivos al ser comparados con los grupos que consumen edulcorantes no nutritivos y de un control el cual consume agua potable.

1.2. Objetivo general

Evaluar el efecto del consumo crónico de edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre los niveles de la actividad de la glucoquinasa en extractos de hepatocitos de 40 ratas macho (+10 basales macho) y 40 ratas hembra (+10 basales hembras) de la cepa Wistar que consumieron durante 170 días estas bebidas.

1.3. Objetivos específicos

- 1) Evaluar los efectos del sexo y tipo de edulcorante ingerido sobre los niveles de actividad específica de la glucoquinasa
- 2) Obtener los extractos crudos hepáticos provenientes de las 80 ratas Wistar + 20 ratas basales (se denominan ratas basales a aquellas ratas recién destetadas cuya eutanasia fue al momento de recepción de los especímenes) que consumieron edulcorantes nutritivos y no nutritivos
- 3) Cuantificar el contenido de proteína en cada uno de los extractos hepáticos obtenidos
- 4) Relacionar el efecto del tiempo sobre los niveles de la actividad de la glucoquinasa utilizando un grupo control (grupo que consumió agua potable durante 170 días de experimentación) y un grupo basal (grupo de ratas recién destetadas cuya eutanasia fue al momento de recepción de los especímenes)

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Edulcorantes

Los edulcorantes comprenden una amplia variedad de sustancias que producen una sensación de dulzor cuando son consumidos. El Reglamento (CE) No 1333/2008 del diario oficial de la Unión Europea definen a los edulcorantes como “Sustancia que se emplea para dar un sabor dulce a los alimentos” (UE, 2008).

Los edulcorantes se clasifican en dos grandes grupos, los nutritivos, donde se encuentran la glucosa, la fructosa, la sacarosa, entre otros y que aportan calorías, y los no nutritivos tales como el acesulfame, la sucralosa y la sacarina, entre otros (Fitch y Keim, 2012).

2.1.1. Glucosa

La glucosa es el monoglúcido más abundante en la naturaleza. Se encuentra en diferentes frutas como son las manzanas y las fresas, en hortalizas como la cebolla y en productos como la miel. Asimismo, se puede obtener a través de la hidrólisis del almidón. Cuenta con una intensidad de dulzor relativo menor que la sacarosa que va de 0.74 a 0.8 (Valdés-Martínez, 2006).

La glucosa es de gran importancia en el metabolismo de las células; su oxidación completa a CO_2 y H_2O se da por medio de la glucólisis y el ciclo de Krebs los cuales generan *ATP*, unidad básica de transferencia de energía en los sistemas biológicos. (Valdés-Martínez, 2006). Esta molécula es transportada dentro de los enterocitos del yeyuno por el transportador de glucosa dependiente de sodio (*SGLT-1*, por sus siglas en inglés), y en altas concentraciones se apoya del transportador de baja afinidad y alta capacidad llamado *GLUT-2* (Mattes et al., 2021).

Las principales vías de utilización de la glucosa son la glucólisis y las pentosas fosfato. A través de la glucólisis se producen diez moléculas de *NADH*, dos ubiquinonas reducidas y cuatro *ATP*. La degradación de la glucosa a través de esta vía y del ciclo de Krebs es esencial para los músculos y la mayoría de las demás células (Kohlmeier, 2003a).

La vía de las pentosas fosfato es otra forma de utilización de la glucosa la cual es particularmente importante para el crecimiento de las células a través de la generación de dos *NADPH* y de la producción de ribosa para la síntesis de *DNA* y *RNA* (Kohlmeier, 2003a).

2.1.2. Fructosa

Al igual que la glucosa, este glúcido se encuentra en diversas frutas y mieles. Se obtiene de manera natural durante la maduración de las frutas climatéricas a través de la hidrólisis del almidón con ayuda de la sacarosa sintetasa y de la invertasa que catalizan la síntesis de fructosa y glucosa, respectivamente (Valdés-Martínez, 2006). Dentro del cuerpo, su obtención puede ser por la reducción de la glucosa por el aldehído reductasa y a partir de polialcoholes por acción de la L-itol-2-deshidrogenasa (Kohlmeier, 2003b). A nivel industrial se obtiene a través de la molienda del maíz y la hidrólisis e isomerización del almidón para obtener el jarabe de maíz de alta fructosa (*HFCS*) el cual tiene una intensidad de dulzor relativa de 1.17-1.75 con respecto de la sacarosa (Hernández-Uribe et al., 2008).

La fructosa entra al enterocito del intestino delgado por el *GLUT-5* y posteriormente sale de él por el *GLUT-2* para ser dirigida al torrente sanguíneo (Mattes et al., 2021). Aproximadamente el 42% de esta fructosa se convierte en glucosa, glicerato y ácidos orgánicos y solamente el 14% de la fructosa ingerida entra de manera intacta a la sangre (Jang et al., 2018). Grandes cantidades de fructosa (25 g) son pobremente absorbidas y pueden causar síntomas de malabsorción (Kohlmeier, 2003b).

La vía metabólica dominante de la fructosa es a través de la fructosa 1-fosfato, la cual se une a la vía de la glucólisis al nivel del gliceraldehído 3-fosfato y de la dihidroxiacetona fosfato. Una proporción menor, se une inmediatamente a la glucólisis a través de la formación de la fructosa 6-fosfato por la hexoquinasa dependiente de magnesio (Kawaguchi et al., 1996). En la vía de la fructosa 1-fosfato, la enzima cetohexoquinasa (fructoquinasa hepática) fosforila la fructosa en fructosa 1-fosfato. Posteriormente, a través de la fructosa bisfosfato aldolasa es transformada en gliceraldehído y en dihidroxiacetona fosfato y, finalmente, en gliceraldehído 3-fosfato a través de la

fosforilación del gliceraldehído por la trioquinasa y por la conversión de la dihidroxiacetona fosfato por la triosa isomerasa (Kohlmeier, 2003b). En la **Figura 2.1** se ilustra la ruta metabólica de la fructosa.

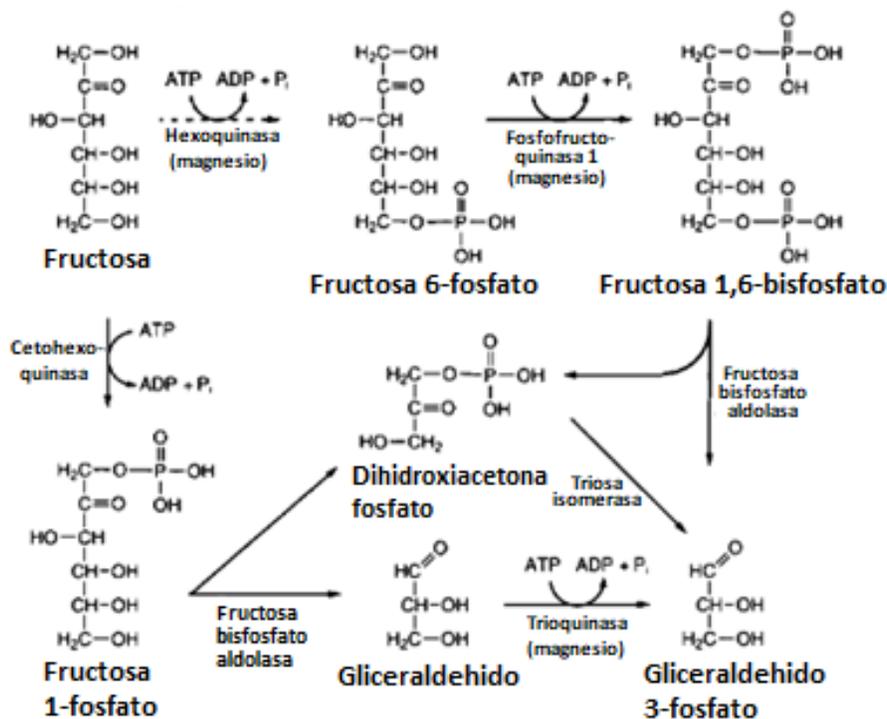


Figura 2.1. Metabolismo de la fructosa (Kohlmeier, 2003b)

2.1.3. Sacarosa

La sacarosa es un diglúcido formado por los monoglúcidos glucosa y fructosa a través de un enlace de tipo 1, 2 glucosídico. Su metabolismo forma sus monoglúcidos constituyentes por la degradación enzimática de la sacarosa. Estos monoglúcidos (glucosa y fructosa) son absorbidos y metabolizados a través de las vías previamente descritas. Su intensidad de dulzor relativa es de 1.0, siendo éste la referencia contra los demás edulcorantes (Mattes et al., 2021).

2.2. Edulcorantes no nutritivos

Introducidos en la industria de alimentos y bebidas como una alternativa a los edulcorantes nutritivos por su aporte despreciable de energía y a una supuesta nula metabolización por el organismo, cuentan con la capacidad de proporcionar un sabor dulce más intenso que la sacarosa, por lo que sus cantidades de adición son mucho

menores. Los edulcorantes no nutritivos más usados a nivel industrial son el acesulfame de potasio, aspartame, sucralosa, sacarina y los glucósidos de esteviol.

2.2.1. Acesulfame de potasio

Es uno de los edulcorantes no nutritivos más usados en la industria de alimentos. Cuenta con una intensidad de dulzor relativa 200 veces mayor que la sacarosa y normalmente se usa mezclado con otros edulcorantes debido al resabio de sabor amargo que presenta. Fue descubierto en 1967 y aprobado por la *FDA* hasta 1988 para ciertos alimentos y bebidas; en 2003 fue aprobado para su uso libre, exceptuando la carne de res y de aves (*FDA*, 1988; Mattes et al., 2021; Yalamanchi et al., 2016)

Estudios en animales demostraron que el acesulfame de potasio (ace K) se absorbe por completo en el intestino delgado sin ser metabolizado, siendo eliminado principalmente por los riñones y excretado por la orina. Adicionalmente, estudios en humanos demostraron que, con la administración de una dosis de 30 mg, se alcanzan las concentraciones máximas sanguíneas en un tiempo de 1-1.5 h sin mostrar una acumulación en tejidos ni en sangre a dosis repetidas y que su eliminación se realiza en un tiempo de 2- 2.5 h (Mace et al., 2007).

No obstante, Yalamanchi et al. (2016) demostraron que el acesulfame de K aumenta la captación de glucosa en un 20-30% con concentraciones de glucosa mayores de 25 mM en el transportador *GLUT-2*. Estos cambios se observaron a los 5 minutos de su consumo y a los 10 minutos no hubo ningún cambio adicional, sugiriendo que las células habían maximizado la translocación del *GLUT-2* en este momento. Este estudio se complementa con el estudio de Bryant et al. (2014) donde detectaron un ligero incremento de glucosa en sangre tras el consumo de acesulfame de K y la posterior administración vía oral de glucosa, sin mostrar cambios en la percepción de hambre o saciedad.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (*JECFA*, por sus siglas en inglés) y la *Food and Drug Administration (FDA)* ha establecido una ingesta diaria admisible (IDA) de 15 mg kg⁻¹ de masa corporal por día.

2.2.2 Mezcla aspartame:acesulfame de potasio

El aspartame, descubierto en 1965, es otro edulcorante no nutritivo. Está conformado por la unión de dos aminoácidos esenciales, ácido aspártico y fenilalanina. El aspartame a diferencia del acesulfame de potasio sí se digiere y metaboliza. Se hidroliza en la parte superior del intestino delgado en forma de ácido aspártico, fenilalanina y en una pequeña cantidad de metanol. Los aminoácidos están disponibles para la síntesis de proteínas y el metanol se oxida en el hígado. Por lo tanto, este edulcorante no ingresa a la circulación, por lo que no puede unirse a los receptores periféricos del dulzor ni pasar al intestino grueso y servir como sustrato para la microbiota. Cualquier efecto de este edulcorante sobre el metabolismo y la salud tendría que ocurrir por un mecanismo alternativo (Mattes et al., 2021).

Ni el acesulfame de K ni el aspartame generan algún efecto sobre la secreción de *GLP-1*, insulina, *PYY* o grelina, ni ningún impacto sobre las respuestas del apetito (Bryant y McLaughlin, 2016).

El aspartame cuenta con una intensidad de dulzor relativa de 180 a 250 veces mayor que la sacarosa. Debido a la capacidad sinérgica de realzar e intensificar los sabores, en particular los cítricos y los frutales, es que se usa en combinación con otros edulcorantes, siendo el más conocido la mezcla de aspartame y acesulfame, la cual es muy usada en la industria refresquera. Esta combinación también favorece esconder las notas amargas del acesulfame de K.

Cuando la mezcla de aspartame: acesulfame de K se comercializa como edulcorante de mesa, se suele usar como excipiente a la dextrosa, otra forma de llamar a la glucosa. En México, esta mezcla comercial es comercializada con el nombre Canderel®, la cual, está constituida por 93.67% de dextrosa, 2.90% de maltodextrina, 1.86% de aspartame y 1.24% de acesulfame de potasio.

2.2.3. Sucralosa

Aprobada por la *FDA* en el año 1998 y con una intensidad de dulzor relativa de 600 veces mayor que la sacarosa. La sucralosa ha demostrado alta estabilidad a temperaturas elevadas que la hacen adecuada para ser usada en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos y horneados. Además, puede emplearse a valores de pH bajos por lo que la degradación del dulzor no es un factor determinante en la vida útil de los productos que contienen sucralosa (*FDA*, 1998). El *JECFA* ha establecido un IDA de 15 mg kg⁻¹ de masa corporal (*World Health Organization*, 2021a).

Diversos estudios reportan una baja absorción de sucralosa en humanos y ratas mediante vía oral, donde en promedio son excretadas un 85% vía heces sin cambios y el 15% restante es absorbida y excretada rápidamente a través de la orina en un tiempo de 5 días. Cerca del 2% de aquella que es metabolizada, es desechada en forma de conjugados glucurónico de sucralosa sin acumularse en el tejido celular (AlDeeb et al., 2013; Fosado-Castro, 2003; Molinary y Quinlan, 2012). Además, existen diversas investigaciones que sustentan la seguridad del consumo de este edulcorante hipocalórico (Berry et al., 2016; Chappell et al. 2020; Grotz y Munro, 2009).

Por otro lado, Li et al. (2016) han reportado que la presencia de sucralosa en las células β , activa los receptores de sensor de glucosa, elevando los niveles de concentración de *ATP* intracelular aún más que la misma glucosa e incluso en ausencia de ésta, lo cual significa que la sucralosa facilita el metabolismo de la glucosa en las células β y aumenta la producción de *ATP*. Adicionalmente, la investigación de Gupta et al. (2014), demostró que cuando se suministra sucralosa en altas dosis a ratas macho albinas, existe toxicidad pancreática en forma de cálculos de islotes, infiltrado linfocítico y degeneración de islotes y acinos pancreáticos.

2.2.4. Sacarina

La sacarina fue el primer edulcorante hipocalórico descubierto en el año 1879, empezando su producción a inicios de 1884. Cuenta con una intensidad de dulzor relativa que va de 300 a 500 veces mayor que la sacarosa dependiendo de la concentración y el

medio en el que es usado. Sin embargo, al contar con un resabio metálico, su uso es en bajas cantidades y frecuentemente es empleada en combinación con otros edulcorantes, tal como el ciclamato o el aspartame (Lawrence, 2003).

En 1977 debido a estudios relacionados con la aparición de tumores cancerígenos en ratas tras su consumo en altas dosis fue prohibido. En 1991 dicha prohibición fue retirada bajo la condición de añadir la leyenda de advertencia “El uso de este producto puede ser nocivo para su salud. Este producto contiene sacarina, que se ha determinado que provoca cáncer a animales de laboratorio” (Bassoli y Merlini, 2003).

La administración de altas dosis de sacarina de sodio en ratas produce un precipitado de fosfato de calcio, el cual es un producto citotóxico para las células uroteliales de la vejiga. Este precipitado produce necrosis en la capa superficial del urotelio con una consecuente hiperplasia (Cohen, 2018; Ellwein y Cohen, 1990). No obstante, Thorgeirsson et al. (1994) extendieron dicho estudio a primates suministrando 25 mg de sacarina/kg de masa corporal durante 22 años a monos Rhesus (*Macaca mulatta*), y posteriormente tras su eutanasia y estudio, no se encontraron daños en la pared urotelial ni tumores en la vejiga. Tal parece ser que la generación de fosfato de calcio por el consumo de sacarina es un fenómeno propio de la rata derivado de las altas concentraciones de proteínas en su orina (Cohen, 2018).

Desde la implementación de la leyenda precautoria, más de 30 estudios en humanos han demostrado que los resultados obtenidos de los estudios en ratas no son relevantes en humanos y que, por lo tanto, es segura para su consumo. En el año 2000, dicha leyenda fue retirada de los productos. Actualmente la sacarina es aceptada por más de 90 países por su alta estabilidad y larga vida útil. Es utilizada para bebidas y productos cocidos y horneados. La JECFA ha determinado una IDA de 5 mg/ kg de masa corporal (FDA, 2018; World Health Organization, 2021b).

Según algunos autores, la sacarina no es metabolizada y, tras su consumo es excretada sin cambio aparente a través de la orina y las heces en un 95% (Bakal y O'Brien, 2011; Guy, 2014). No obstante, la investigación de Zhao et al. (2018) demostraron a través del uso de ratas de la estirpe Sprague-Dawley, que el consumo de sacarina aumenta la

ingesta de alimentos y de energía. Asimismo, estos autores reportaron incrementos de la expresión del *ARNm* del receptor dulce *T1R3* (por sus siglas en inglés) en las papilas gustativas y de la expresión del *ARNm* del receptor de grelina tanto en las papilas gustativas como en el hipotálamo; estos resultados solamente fueron observados en las ratas macho pero no en las hembras. Por otro lado, Suez et al. (2014, 2016) demostraron que el consumo de sacarina resulta en alteraciones de la microbiota intestinal con una subsecuente disbiosis y anomalías metabólicas en ratones y humanos que ocasionan intolerancia a la glucosa. Bajo la misma línea de investigación de las alteraciones de la microbiota intestinal Bian et al. (2017) concluyeron que la sacarina producía inflamación en el hígado de ratones C57BL/6 y alteraba su microbiota intestinal y funciones metabólicas. Finalmente, de-Mattos-Feijo et al., (2013) y Carraro-Foletto et al., (2016) concluyeron que el consumo de sacarina incrementaba la masa corporal de ratas macho Wistar sin ocasionar intolerancia a la glucosa. Por lo tanto, los efectos del consumo crónico de sacarina continúan en estudio. Si bien los efectos carcinogénicos han sido descartados existen muchos otros efectos metabólicos que deben ser indagados.

2.3. Glucólisis

La glucólisis es una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente dentro del citosol que extraen energía de la glucosa al romperla en dos moléculas de tres carbonos llamadas piruvato. La glucosa entra en las células heterótrofas de dos maneras. Un método es a través del transporte activo secundario en el que el transporte tiene lugar contra el gradiente de concentración de glucosa. El otro mecanismo utiliza un grupo de proteínas integrales llamadas proteínas *GLUT*, también conocidas como proteínas transportadoras de glucosa. Estos transportadores ayudan en la difusión facilitada de glucosa (Clark et al., 2013).

La glucólisis consiste en diez pasos divididos en dos fases. La fase preparatoria donde la glucosa es atrapada dentro de la célula y usa energía para transformarse en gliceraldehido 3-fosfato y la fase de beneficios donde se extrae energía a través de la conversión oxidativa del gliceraldehido 3-fosfato en piruvato con formación de *ATP* y *NADH* (Nelson y Cox, 2019)

En la primera fase (Figura 2.2) la enzima hexoquinasa (*HK*) o glucoquinasa (*GK*) se encarga de fosforilar la glucosa en el carbono 6 (C6) usando *ATP* como fuente de fosfato, produciendo glucosa-6-fosfato. Esta reacción impide la interacción de la glucosa con las proteínas *GLUT* e imposibilita su salida de las células debido a la carga negativa del fosfato (paso 1). La glucosa-6-fosfato es convertida en fructosa-6-fosfato por la enzima isomerasa (paso 2). Al ser fosforilada en el C1 con ayuda de otro *ATP* por la fosfofructoquinasa se produce fructosa-1,6-bisfosfato F-1,6-BP (paso 3). Esta molécula por acción de la aldolasa es escindida en dos moléculas de tres carbonos isómeros: la dihidroxiacetona-fosfato y la gliceraldehído-3-fosfato (paso 4). Posteriormente, a través de una isomerización de la dihidroxiacetona-fosfato se genera una segunda molécula de gliceraldehído-3-fosfato (paso 5) (Nelson y Cox, 2019).

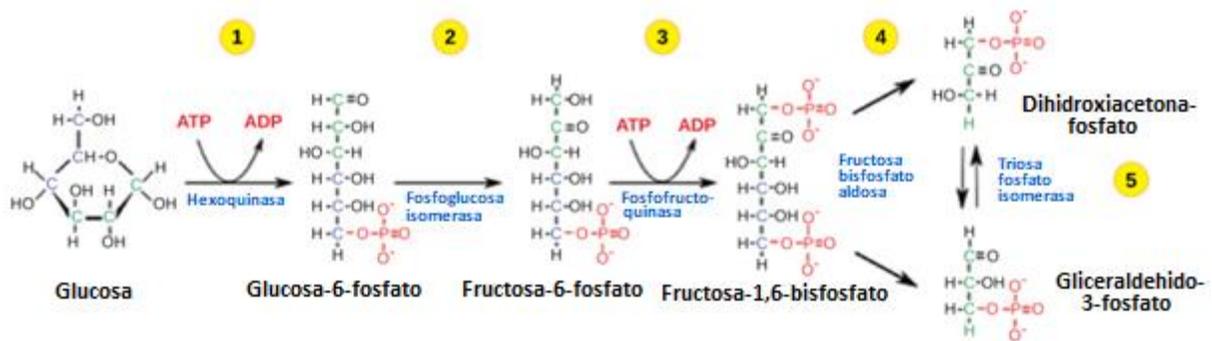


Figura 2.2. Primera fase de la glucólisis. Fase preparatoria (Clark et al., 2013)

En la segunda fase (Figura 2.3), el gliceraldehído-3-fosfato es oxidado por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y fosforilado por un fosfato inorgánico para formar la 1,3-bisfosfoglicerato (paso 6). Con ayuda de la fosfoglicerato quinasa, el 1,3-bisfosfoglicerato dona un fosfato para generar un *ATP* y para transformarse en 3-fosfoglicerato (paso 7). Esta molécula por medio de otra isomerasa pasa a ser 2-fosfoglicerato (paso 8). La enolasa cataliza la reacción de deshidratación de la 2-fosfoglicerato formando el fosfoenolpiruvato (paso 9). Por último, la enzima piruvato quinasa hace que la fosfoenolpiruvato pierda su fosfato, generando una segunda molécula de *ATP* y piruvato (paso 10) (Nelson y Cox, 2019).

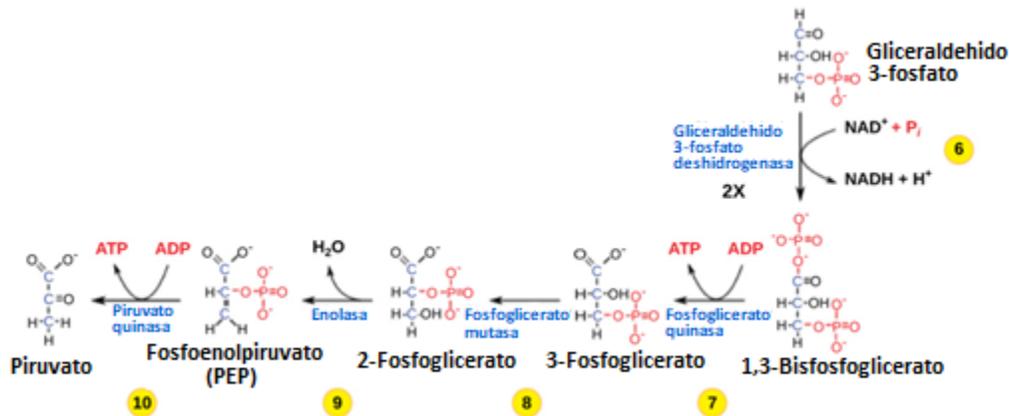


Figura 2.3. Segunda fase de la glucólisis. Fase de beneficios (Clark et al., 2013)

2.3.1. Glucoquinasa

La glucoquinasa (*GK*, también conocida como hexoquinasa IV) cataliza la transferencia del grupo fosforilo del complejo *ATP*-Mg al sexto carbono de la glucosa para formar la glucosa-6-fosfato (*G6P*) durante la glucólisis. Se expresa principalmente en el hígado y páncreas. En los hepatocitos, la *GK* regula el nivel en el que se llevará a cabo la glucólisis. En contraste, en las células α y β del páncreas, se encarga de regular la concentración de glucosa en sangre a través de la liberación de glucagón e insulina (Li et al., 2018).

La *GK* se caracteriza por tener una baja afinidad por la glucosa y no inhibirse a concentraciones fisiológicas de glucosa 6-fosfato, lo que se traduce a una interacción glucosa-*GK* solamente cuando las concentraciones de esta primera son elevadas en la sangre. En comparación de las hexoquinasas I, II y III cuya masa molecular es de 100 kDa, ésta tiene una masa molecular de 50 kDa debido a que solamente cuenta con un dominio de quinasa (Irwin y Tan, 2013).

La *GK* presenta una conformación que cambia en función de la concentración de la glucosa. A altas concentraciones, la glucosa y el *ATP* se unen al sitio catalítico de la *GK* y pasa de su conformación estándar denominada “cerrada” a otra denominada “abierta”. Cuando la concentración de glucosa es baja, la *GK* presenta una conformación denominada “super abierta”, en la cual sufre una reorganización considerable, donde el sitio de unión de la glucosa muestra una disrupción y hay un desplazamiento de la hélice alfa terminal y de los residuos que se unen a la proteína reguladora de la glucoquinasa

(GCKR) (Van Schaftingen, 2020). En la Figura 2.4 se muestran los cambios conformacionales que presenta la GK en función de la concentración de glucosa.

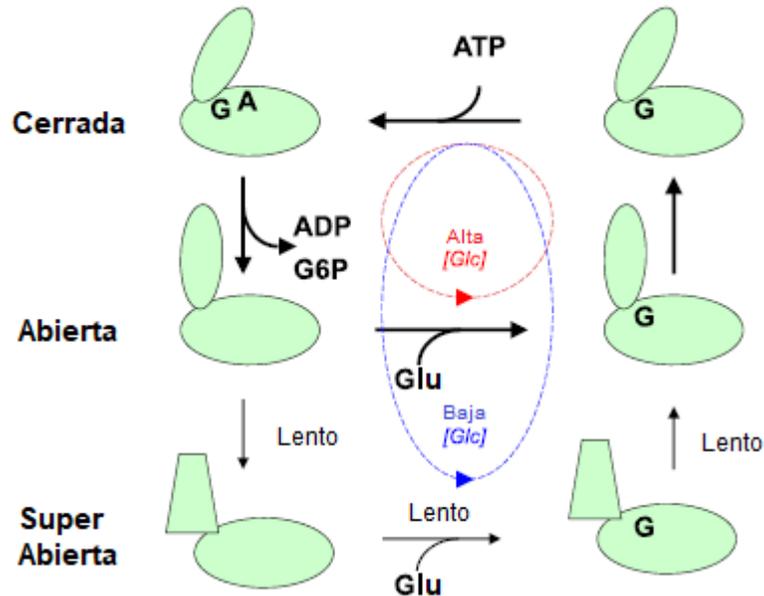


Figura 2.4. Cambio conformacional de la GK en función de la concentración de glucosa (Van Schaftingen, 2020)

Por otro lado, su actividad se regula por las ya mencionadas hormonas insulina y glucagón, donde su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl (Olivares-Reyes y Arellano-Plancarte, 2008).

La insulina es liberada por la estimulación del páncreas por las hormonas péptido insulínótropico dependiente de la glucosa (*GIP*), sintetizada por las células K presentes en el duodeno y yeyuno y por el péptido similar al glucagón-1 (*GLP-1*), producido por las células L endocrinas epiteliales intestinales como respuesta a un incremento en los niveles de glucosa en sangre con el fin de disminuir su concentración a sus niveles normales (Escalada, 2014; Kim y Egan, 2008).

El principal mecanismo de secreción de insulina es a través de su liberación por los niveles elevados de glucosa plasmática. En las células beta pancreáticas una vez que ingresa la glucosa a la célula con ayuda del transportador *GLUT2* es captada por la *GK* y fosforilada en glucosa-6-fosfato (*G6P*). Posteriormente, la *G6P* pasa por la vía de la glucólisis para ser transformado en piruvato e ingresa a la mitocondria para pasar por el

ciclo de Krebs, esto ocasiona un incremento de los niveles de ATP/ADP . El incremento de la relación ATP/ADP provoca el cierre del canal de potasio (K^+) sensible a ATP , despolarizando la membrana y abriendo el canal de calcio (Ca^{2+}) dependiente del voltaje. El ingreso de calcio provoca, después de una serie de reacciones en cadena, la exocitosis de la insulina (Santamaría-Duque, S.F.). En la Figura 2.5 se ejemplifica todo este proceso.

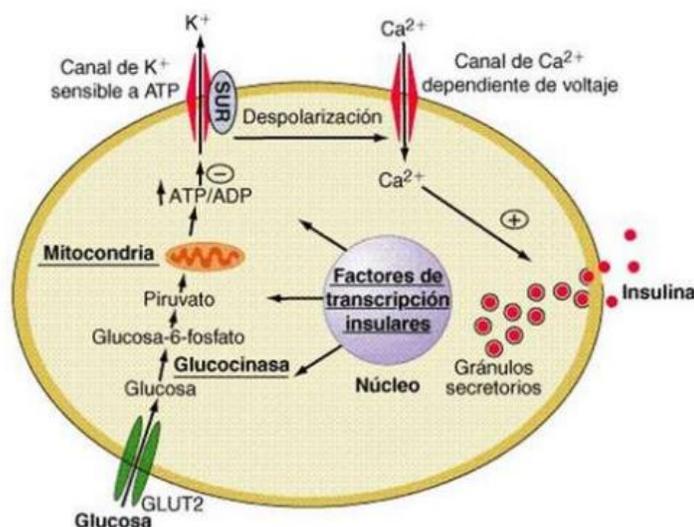


Figura 2.5. Mecanismo de secreción de insulina (Santamaría-Duque, S.F.)

Mientras que el glucagón se encarga de incrementar los niveles de glucosa en sangre y es liberado de manera muy similar a la insulina por las células alfa a través de una estimulación en el canal de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}), el cual sitúa el potencial de membrana celular en un rango que permite la apertura de canales de sodio (Na^+) y de calcio (Ca^{+2}). El aumento en la concentración intracelular de estos 2 iones despolariza la membrana e incrementan la conductancia al Ca^{+2} (Lima-Martínez et al., 2011). Ambas hormonas regulan la homeostasis de la glucosa a través del incremento y la reducción de su concentración en el plasma sanguíneo. Por ello, a mayor concentración de insulina, la GK se encontrará más activa, mientras que, a mayor concentración de glucagón, menor será la actividad de la GK (Nirmalan y Nirmalan, 2020; Zazueta, 2007).

Otras formas de regulación de la actividad de la GK vienen dada por la proteína 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa ($PFK2/FBP2$) y la proteína reguladora de glucoquinasa ($GKRP$) a través de la formación de complejos entre ellas con la GK en

función de la concentración de glucosa en el plasma (Agius, 2016; Sternisha y Miller, 2019; Van Schaftingen, 2020).

2.3.2. 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (*PFK2/FBP2*)

La 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa 2,6-bisfosfatasa (*PFK2/FBP2*) es una enzima bifuncional ubicada en el citoplasma de la célula donde cataliza la formación y degradación de la fructosa 2,6-bisfosfato y, a su vez, favorece la actividad de la glucoquinasa por la glucosa a través de la formación de un complejo enzima-hormona cuando la concentración de glucosa en la sangre es alta. Bajo estas condiciones de concentración alta, la *GK* es translocada del núcleo al citoplasma para actuar junto a *PFK2/FBP2* (Agius, 2016). En ensayos celulares en islotes de células β y hepatocitos, la interacción entre glucoquinasa y *PFK2/FBP2* fue favorecida por las altas concentraciones de glucosa (Massa et al., 2004).

2.3.3. Proteína reguladora de la glucoquinasa (*GKRP*)

La actividad de la glucoquinasa (*GK*) se encuentra determinada por la unión reversible a su proteína reguladora: La *GKRP*, la cual actúa como inhibidor competitivo respecto con la glucosa a través del secuestro y formación de un complejo *GK-GKRP* en condiciones de una concentración basal o baja de glucosa en el plasma. Esta asociación de ambas proteínas es estimulada por la fructosa 6-fosfato, ligante de la *GKRP* y antagonista de la fructosa 1-fosfato, producida por la fosforilación de la fructosa (Van Schaftingen, 2020).

La *GKRP* es una proteína de 68 kDa codificada por el gen *GKRP* que se expresa en los hepatocitos y que pertenece a la familia de glúcidos isomerasas (*SIS*) de las proteínas similares a la glucosamina 6-fosfato sintasa. Hasta el día de hoy, no se ha identificado alguna otra función de la *GKRP* que no sea la de una proteína de unión a la glucoquinasa.

Las investigaciones de Beck y Miller (2013) y Ling et al. (2015) demostraron que la presencia de la fructosa fosfato influye en los movimientos de la proteína *GKRP*, en su espacio conformacional y en la formación o disociación del complejo *GK-GKRP*. La unión de la fructosa-6-fosfato (*F6P*) con la *GKRP* incrementa la afinidad y formación del

complejo *GK-GKRP* y, contrario a esto, la unión de la fructosa-1-fosfato (*F1P*) con la *GKRP* desestabiliza el complejo (Cullen et al., 2014)

2.3.4. Factores de transcripción

Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias específicas de *ADN* controlando así la transcripción de la información genética de *ADN* a *ARN* mensajero. Por lo tanto, juegan un rol de importancia en diversas rutas metabólicas como la glucólisis y la lipogénesis. En el caso de la glucólisis regulan la transcripción de las enzimas glucoquinasa (*GK*) y de la piruvato quinasa (*L-PK*).

2.3.4.1. Proteína de unión al elemento regulador del estero1 1c (*SREBP-1c*)

Las proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (*SREBP*) son factores de transcripción unidos a la membrana que activan genes implicados en la síntesis de colesterol, la lipogénesis y la glucólisis (Bayly, 2014). La isoforma *SREBP-1c* se sintetiza en la membrana del retículo endoplasmático y es activada por la insulina a través de su fosforilación por parte de la serina/treonina proteína cinasa, induciendo la expresión de los genes que codifican para las enzimas lipogénicas y glucolíticas (López-Oliva y Muñoz-Martinez, 2013).

La transcripción, el procesamiento proteolítico, la cantidad y la estabilidad de *SREBP-1c* se encuentran controlados por la insulina y suprimidos por los ácidos grasos poliinsaturados y por el glucagón (Mendoza-Pérez, 2017).

El estado nutritivo es también un importante regulador de *SREBP-1c* en el hígado, en el tejido adiposo y en el músculo esquelético. Su expresión disminuye con el ayuno e incrementa con una dieta alta en carbohidratos, a consecuencia del aumento de la glucemia y de la insulinemia. Adicionalmente, se ha demostrado que en respuesta a carbohidratos se requiere la acción sinérgica de ambos factores de transcripción, *SREBP-1c* y *ChREBP*, sensible a glucosa, para regular los genes glucolíticos y lipogénicos (López-Oliva y Muñoz-Martinez, 2013).

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

El factor de transcripción *ChREBP*, fue identificado por Yamashita et al. (2001) en extractos nucleares de tejido hepático de ratas que fueron alimentadas a base de una dieta alta en carbohidratos. Este factor se identificó como un factor de transcripción que inducían la expresión de los genes que codifican las enzimas piruvato-quinasa (*L-PK*), acetil-CoA carboxilasa (*ACC*) y sintasa de ácidos grasos (*FAS*), entre otros y generalmente surgen en respuesta a las altas concentraciones de glucosa.

En el tejido adiposo y en el hígado, la glucosa, a través de los metabolitos glucosa 6-fosfato, xilulosa 5-fosfato y fructosa 2,6 bisfosfato, estimula la activación del factor *ChREBP* el cual, en sinergia con *SREBP-1c*, regulan la expresión de genes implicados en el metabolismo de glúcidos y lípidos (López-Oliva y Muñoz-Martinez, 2013). En la Figura 2.5 se muestra la interacción de ambos factores de transcripción *SREBP-1c* y *ChREBP* sobre el control de la lipogénesis y de la glucólisis.

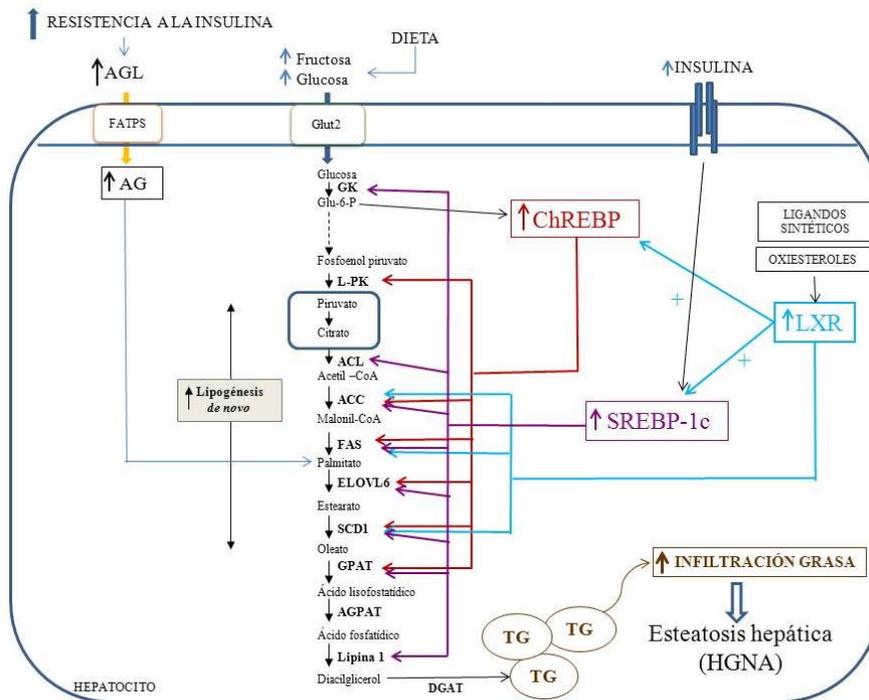


Figura 2.6. Interacción funcional entre los factores de transcripción *SREBP-1c* y *ChREBP* en la lipogénesis (López-Oliva y Muñoz-Martinez, 2013)

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

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Desarrollo experimental

A continuación, en la **Figura 3.1** se aprecia el diagrama de bloques general de la investigación.

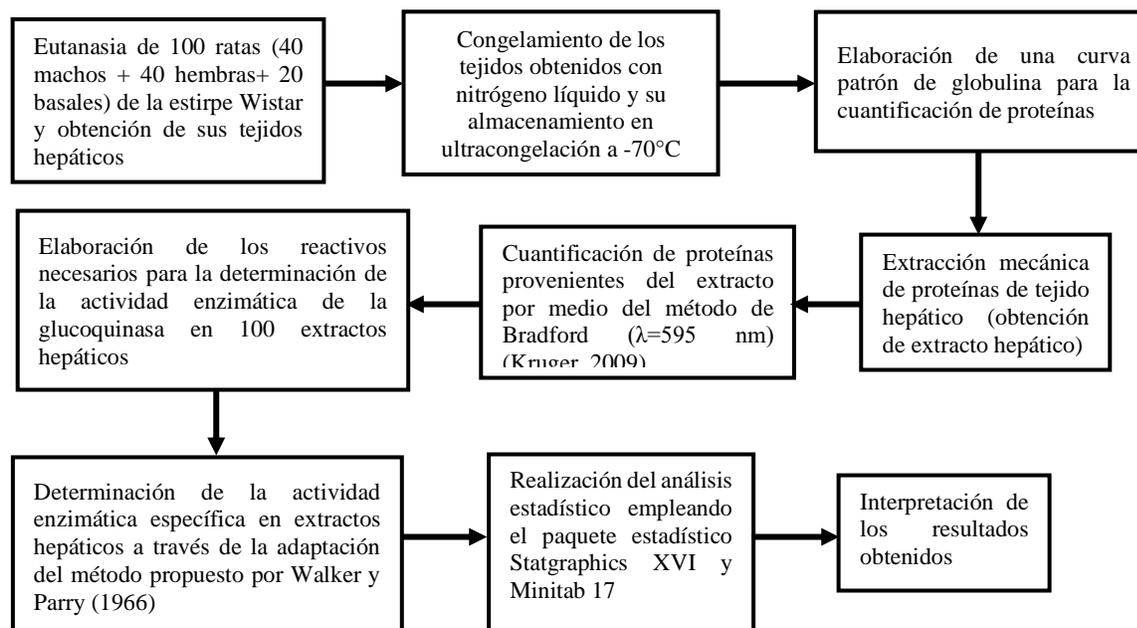


Figura 3.1. Diagrama de bloques del desarrollo experimental

3.2. Diseño experimental

El diseño experimental realizado fue de tipo multifactorial involucrando dos factores de tipo categórico:

- Edulcorante
- Sexo de la rata

El factor “edulcorante” contó con 9 niveles que corresponden a los siete grupos que ingirieron algún edulcorante en su bebida: sacarosa, glucosa, fructosa, acesulfame de potasio (Ace K), mezcla comercial de aspartame con acesulfame (Mezcla), sacarina y sucralosa, contándose con un grupo control al cual le fue suministrada agua potable y otro grupo de ratas recién destetadas que se denominó grupo basal. El factor “sexo de la rata” contó con 2 niveles: macho y hembra.

Todos los grupos tuvieron una n=5 por grupo/sexo excepto el grupo basal que contó con una n=10 por grupo/sexo dando un total de 100 ratas (N=100): 50 ratas hembra y 50 ratas macho.

Como variable de respuesta se tuvo la actividad específica de la glucoquinasa GK expresado en mU/mg. Donde: U= Actividad enzimática de glucoquinasa.

3.3. Modelo animal

Este proyecto partió de 80 muestras de tejido hepático provenientes de la primer eutanasia humanitaria realizada durante 170 días de experimentación en donde 40 machos y 40 hembras de la estirpe Wistar fueron seleccionadas de manera aleatoria de entre una población de 160 ratas. Adicionalmente se contó con 20 muestras de tejido hepático correspondientes a 10 ratas macho y 10 ratas hembra que se encontraban recién destetadas (denominadas “basales”). Todas las ratas ingirieron la dieta Teklad Global 2018S, cuya información nutrimental se muestra en la Tabla 3.1. Las soluciones de suministro fueron edulcorantes naturales y artificiales con una n=5 (por sexo). Los grupos de edulcorantes que se bebieron durante la experimentación fueron: sacarosa (10%), glucosa (14%), fructosa (7%), sucralosa (0.017%), acesulfame K (0.05%), sacarina (0.033%), mezcla comercial de aspartame con acesulfame (Mezcla) (1.55%) y un grupo control de agua potable sin edulcorante. La concentración de las soluciones fue establecida con base en el porcentaje que presentan las bebidas endulzadas no alcohólicas comerciales y a su ingesta diaria admisible (IDA) (Mendoza-Pérez, 2021).

Tabla 3.1. Información nutrimental de la dieta Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Envigo, 2015)

| Macronutrientes | % |
|-----------------|------|
| Proteína cruda | 18.6 |
| Grasa | 6.2 |
| Carbohidratos | 44.2 |
| Fibra cruda | 3.5 |
| Cenizas | 5.3 |

3.4 Construcción de la curva patrón de proteínas

Esta metodología emplea el método de Bradford, el cual se basa en la unión del colorante azul de Coomassie G250 a las proteína y su absorbancia a 595 nm debido a la formación

del complejo formado entre la proteína y el colorante (Kruger, 2009). La absorbancia a 595 nm es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente.

Para realizar la curva patrón de proteínas se etiquetan y añaden los reactivos en varios microtubos de 1.5 mL como se indica en la **Tabla 3.2**. Posteriormente, se homogeneizan los microtubos en un equipo *Vortex* modelo *Genie 2* y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se colocan los 500 μ L de reactivos incubados en los microtubos en celdas de UV. Se da la lectura de las celdas de UV en un espectrofotómetro de UV/VIS modelo RAYLEYGH 1800 a 595 nm registrándose la absorbancia de la muestra.

Tabla 3.2. Orden de adición de reactivos para la determinación de proteínas del estándar de globulina

| Tubo | Blanco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|--------|-----|-----|-----|-----|-----|
| TBS ¹ 1x (μ L) | 400 | 390 | 380 | 360 | 340 | 330 |
| Globulina ² (μ L) | 0 | 10 | 20 | 40 | 60 | 70 |
| Reactivo de Bradford ³ (μ L) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

1. Solución salina amortiguadora de Tris 1x (*TBS*, por sus siglas en inglés) a un pH=7.6. Para su preparación se requirió de 1.2 g de Tris base y de 4.4 g de NaCl disueltos en un volumen total de 500 mL de agua destilada ajustado su pH final con HCl; 2. Solución madre de Globulina. Para su preparación se requirió de 0.0011 g de globulina y de 50 mL de *TBS* 1x; 3. Reactivo de Bradford. Para su preparación se requirió de 100 mg azul de Comassie-G250 disuelto en 50 mL de etanol al 96% y de 100 mL de ácido fosfórico al 85%, la solución es ajustada a 1 L con agua destilada

3.5. Extracción de proteínas

Para esta finalidad se colocan 200 μ L de la solución amortiguadora (*buffer*) de lisis *RIPA* en tubos de microcentrífuga, un tubo para cada muestra procesada. Para la preparación de la solución (*RIPA*) se requieren 495 mL de la solución amortiguadora de Tris 1x (*TBS*), 5 mL del éter nonil-fenol-polietilenglicol (IGEPAL® NP-40), 2.5 g de deoxicolato de sodio, 0.5 g de dodecilsulfonato de sodio (*SDS*), 0.03 g de azida de sodio, 1 pastilla inhibidora de proteasas, 100 μ L de NaF 100 mM y 200 μ L de Na₃VO₄ 100 mM. En cada microtubo de 1.5 mL se pesan de 200–300 mg de tejido hepático congelado y se homogeneizan con un “politrón” modelo Cordless Kimbles Kontes®. Para evitar la degradación de las proteínas (el microtubo siempre es mantenido en hielo el tiempo suficiente hasta lograr la disgregación del tejido). Una vez disgregado el tejido se agregan 800 μ L de la solución amortiguadora de lisis *RIPA* y se incuban en hielo durante 30–45 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugan a 14,000 rpm en una centrífuga Eppendorf® modelo 5414 durante 15 minutos y, finalmente, se transfieren los sobrenadantes a microtubos nuevos, perfectamente etiquetados, en alícuotas de 100 – 250 μ L. Las alícuotas se almacenan

adecuadamente en congelación a -20°C hasta el momento de usarse en las determinaciones enzimático-espectrofotométricas.

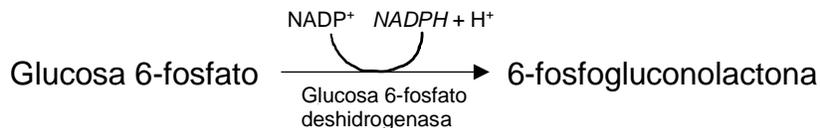
3.6. Cuantificación de proteínas en tejido hepático

Para realizar la determinación de proteínas en los extractos crudos hepáticos se toma cada muestras de extracto hepático y se realizan las diluciones pertinentes con solución amortiguadora de Tris 1x (*TBS*) en un microtubo de 1.5 mL. Las diluciones realizadas fueron aquellas que permitieran que las concentraciones de proteínas en los extractos hepáticos cayeran dentro del rango lineal de la curva patrón. Las concentraciones de proteínas que fueran demasiado elevadas no se tomaban en cuenta, ya que se alejaban del comportamiento lineal de la ley de Lambert-Beer (Kruger, 2009). Las diluciones se homogenizaron en un equipo Vortex modelo Genie 2. Se transfirieron 400 μL de la dilución de la muestra a un nuevo tubo y se añadieron 100 μL del reactivo de Bradford. A partir de dicho tubo, se toman 400 μL de la mezcla y se adicionan en una celda de UV-Vis la cual es leída en un espectrofotómetro UV/VIS modelo RAYLEYGH 1800 a 595 nm registrando su absorbancia. Por último, mediante una interpolación apoyados en la curva patrón, se determina la concentración de proteínas en cada uno de los extractos hepáticos.

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

Esta determinación se realiza siguiendo una adaptación de los métodos espectrofotométricos de Goward et al. (1986) y Walker y Parry (1966). Estos se basan en un ensayo enzimático acoplado a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la cual transforma la glucosa-6-fosfato (resultado de la fosforilación de la glucosa por la glucoquinasa) a 6-fosfogluconolactona con la subsecuente reducción de NADP^+ a *NADPH*. Los cambios en la absorbancia a 340 nm son proporcionales al cambio en la concentración de NADP^+ ; por lo que por cada mol de NADP^+ reducida se transformará un 1 mol de glucosa a glucosa-6-fosfato por parte de la glucoquinasa como se puede observar en la siguiente reacción:





La mezcla de reacción contiene 4.8 mL de solución amortiguadora de Tris 75 mM a pH=9.0, 0.2 mL de β-D (+) – Glucosa 360 mM, 0.2 mL de ATP 120 mM, 0.2 mL de MgCl₂ 600 mM y 0.2 mL de NADP⁺ 27 mM. Se colocan 560 μL de mezcla de reacción y 20 μL de una solución enzimática de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*G-6-F-DH*) (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.) cuya actividad enzimática se debía encontrar a 100 U/mL en una celda de metacrilato para UV-Vis. La mezcla anterior se da lectura a 340 nm durante 5 minutos para obtener una línea base. Posteriormente, se añaden en la misma celda 20 μL de solución Tris base 50 mM a pH=8.5 y se mezcla nuevamente por inversión, leyéndose en el espectrofotómetro a 340 nm durante 5 minutos para generar el blanco de reacción. En una nueva celda se colocan 560 μL de la mezcla de reacción, 20 μL de G-6-F-DH y 20 μL de extracto de tejido hepático y se registra la absorbancia a 340 nm en el espectrofotómetro durante 5 minutos. A partir de estas lecturas se obtiene la velocidad inicial en Δ_{abs340nm}/min tanto para la muestra del extracto hepático como para el blanco con la parte lineal de la curva de avance de reacción. Los valores de Δ_{abs} se utilizan para calcular la actividad enzimática (U) por mililitro de extracto empleando la Ecuación 3.1:

$$\mathbf{U/mL = ((\Delta_{abs340nm} \text{muestra} - \Delta_{abs340nm} \text{blanco}) * (0.6 \text{ mL}) * (fd)) / ((6.22) * (0.02 \text{ mL}))} \quad \mathbf{Ecuación 3.1}$$

donde: **0.6:** Volumen final en celda UV; **fd:** Factor de dilución; **6.22:** Coeficiente de extinción milimolar de NADP⁺; **0.02:** Volumen de extracto hepático agregado. **U:** cantidad de enzima que cataliza la fosforilación de 1 μmol de glucosa por minuto a 28°C y pH= 9.0

Una vez obtenidas la actividad enzimática y la concentración de proteínas de los extractos hepáticos, se establece la actividad específica de la *GK* aplicando la **Ecuación 3.2:**

$$\mathbf{U/mg = (U/mL) / (Conc. \text{ proteínas [mg/mL]})} \quad \mathbf{Ecuación 3.2}$$

Debido a que los niveles de actividad enzimática en los extractos crudos de proteínas sin purificar son generalmente muy bajos, el nivel de actividad enzimática se suele expresar en miliunidades (mU) en lugar de unidades (U). Para ello se realiza la multiplicación por el factor adecuado, por lo que en la presente investigación todos los resultados de actividad específica se encuentran expresados como mU/mg.

3.8. Análisis estadísticos

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANDEVA), para el cual se verificó que cada grupo cumpliera con los requisitos de:

- a) Independencia de muestras
- b) Los datos siguieran distribuciones normales dentro de cada uno de los grupos (normalidad)
- c) Debe existir una igualdad de varianza (homocedasticidad) entre los datos, evaluada con la prueba de Levene (Walpole et al., 2012)

Los tratamientos estadísticos que se llevaron a cabo fueron los siguientes:

- Identificación de datos atípicos o aberrantes por estimación de sigma basada en la desviación absoluta de la media (*Z-DAM*), empleando el software *Statgraphics Centurion XVI*.
- Comprobación de normalidad a través de la prueba Shapiro-Wilk, empleando el software *Statgraphics Centurion XVI*.
- Para aquellos datos que no siguen una distribución normal, fue necesario la realización de la prueba de las medianas de Mood y de múltiples rangos las cuales permiten evaluar la hipótesis de que las medianas de todas las muestras son iguales realizando comparaciones sobre cuáles son diferentes entre sí, respectivamente.
- Comprobación de homocedasticidad a través de la prueba de Levene empleando el software *Statgraphics Centurion XVI*.
- Para aquellos datos que no presentaban homocedasticidad, fue necesario sustituir el ANDEVA por la prueba de Welch y como prueba de rangos múltiples la prueba de Games-Howell, empleando el software *Minitab 17*.
- Para los grupos que no cumplían con los requisitos establecidos para el análisis de varianza, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual evalúa la hipótesis de la igualdad de medianas para todos los grupos. Para esta prueba se empleó el software *Statgraphics Centurion XVI*.
- Análisis de varianza (ANDEVA) multifactorial relacionando grupo y sexo. Para esta prueba se empleó el software *Statgraphics Centurion XVI*.

- Comparación de dos muestras entre el grupo control y basal, y posteriormente sobre una misma muestra para ver el efecto del tiempo. Para esta prueba se empleó el software *Statgraphics Centurion XVI*.

En la **Figura 3.2** se muestra el árbol de decisiones que se diseñó para simplificar la forma de trabajo, las condiciones que se requerían en los datos y las pruebas utilizadas.

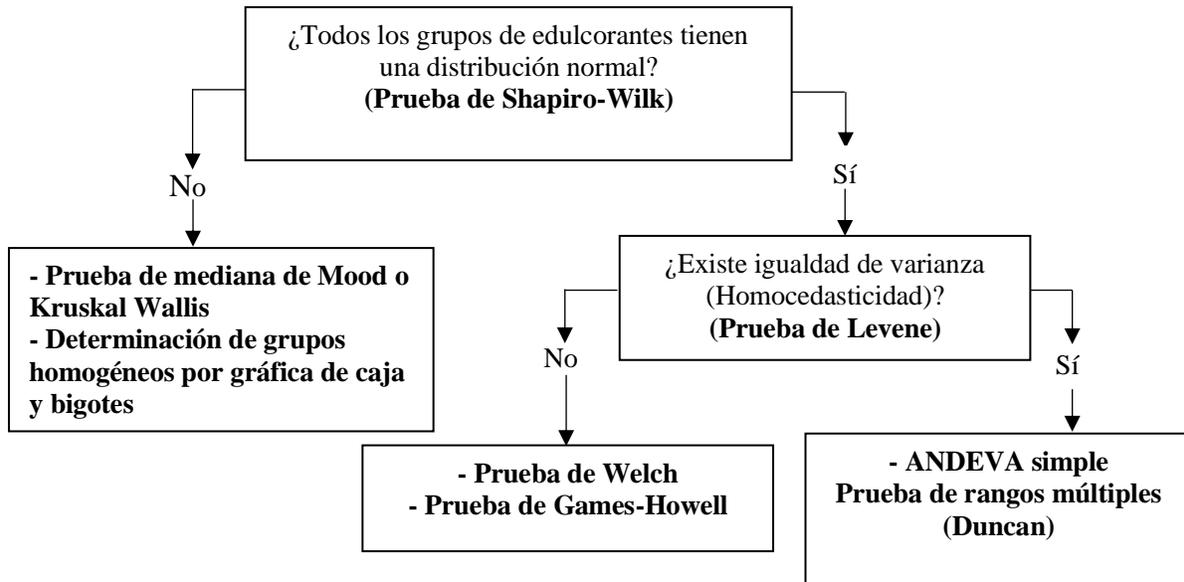


Figura 3.2. Árbol de decisiones para el manejo de datos estadísticos y pruebas realizadas

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como fue mencionado previamente en la metodología, este trabajo partió de la eutanasia humanitaria de 100 ratas de la estirpe Wistar (50 machos y 50 hembras). Se incluyó un grupo basal (ratas recién destetadas). La codificación de las ratas se realizó con base en su sexo (M: Macho, H: Hembra), a su número de rata (1– 80) y al edulcorante suministrado (Sn: Sacarina, Sucr: Sucralosa, Ctrl: Control, etc.). Para las ratas basales (20 ratas), su codificación se realizó de la misma manera. Por ejemplo, la codificación M45Ace indica que la muestra proviene de la rata macho número 45 y que bebió la solución de acesulfame de K. Otro ejemplo es H2B que indica que la muestra fue de la rata hembra #2 del grupo basal. Los números fueron asignados de manera aleatoria mediante el paquete estadístico Statgraphics XVI para evitar cualquier posible sesgo en los datos.

La eutanasia humanitaria se realizó de acuerdo con las disposiciones de la NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (DOF, 1999). Para realizar lo anterior, se empleó una cámara rica en CO₂ para conducir a las ratas a una pérdida de la conciencia y una vez adormecidas se empleó una guillotina para decapitarlas de forma rápida e indolora.

Con ayuda de personal especializado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia se realizó la disección de los hígados de las 100 ratas. Este protocolo experimental fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la UNAM. Los hígados fueron congelados con nitrógeno líquido y posteriormente fueron almacenados a una temperatura de -70°C para evitar su descomposición. Posteriormente, al momento de realizar las pruebas se pasaron a un congelador de la marca TOREY® y fueron mantenidas a una temperatura de -20°C.

4.1 Realización de curva patrón de globulina

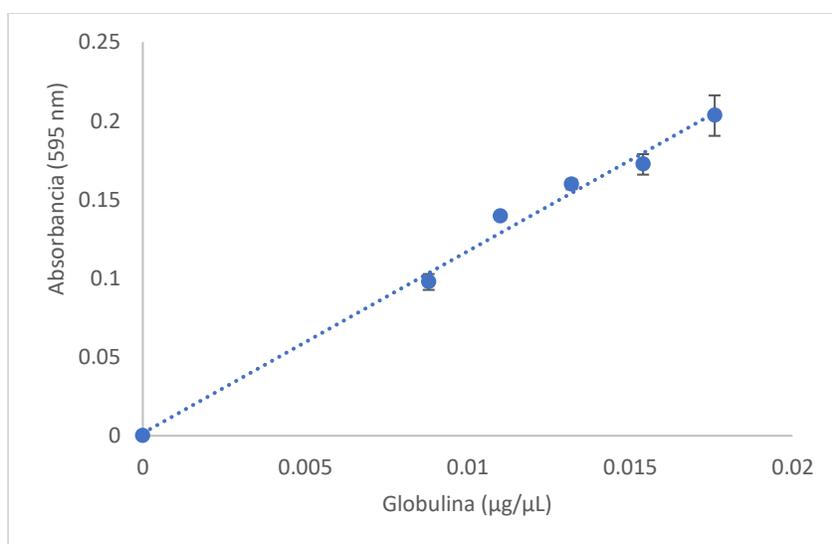
Una vez obtenidos los hígados de las ratas, se construyó una curva patrón de globulina mediante el método espectrofotométrico de Bradford (Kruger, 2009), con la finalidad de

poder cuantificar las proteínas en el tejido hepático de las ratas. Los resultados se presentan en la **Tabla 4.1** y en la **Gráfica 4.1**.

Tabla 4.1. Datos de la curva patrón de globulina

| Tubo | Globulina (µL) | Concentración (µg/µL) | Abs 1 (595 nm) | Abs 2 (595 nm) | Abs 2 (595 nm) | Abs prom (595 nm) | Coef var |
|--------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------|
| Blanco | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 200 | 0.0088 | 0.103 | 0.097 | 0.093 | 0.097 | 5.153 |
| 2 | 250 | 0.011 | 0.138 | 0.140 | 0.140 | 0.139 | 0.828 |
| 3 | 300 | 0.0132 | 0.159 | 0.163 | 0.157 | 0.160 | 1.913 |
| 4 | 350 | 0.0154 | 0.172 | 0.179 | 0.166 | 0.172 | 3.775 |
| 5 | 400 | 0.0176 | 0.218 | 0.194 | 0.198 | 0.203 | 6.323 |

Abs: Absorbancia obtenida a 595 nm; **Coef var:** Coeficiente de variación



Gráfica 4.1. Curva patrón de globulina para la cuantificación de proteínas en tejido hepático (Linealidad de la curva: $R^2 = 0.9911$)

Con los datos obtenidos de la curva patrón se obtuvo la **Ecuación 4.1**.

$$\text{Abs} = 11.553 * (\text{Conc.}) + 0.0016 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Cabe destacar que los datos fueron aceptados con base en los coeficientes de variación (CV) que presentaron los triplicados de cada punto de la curva. Según la Directriz sobre validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) (EMA, 2011); el CV no debe pasar del 15% para aquellas muestras cuyas concentraciones de analito son conocidas.

4.2 Cuantificación de proteínas en tejido hepático

Una vez obtenidos los extractos hepáticos, se procedió a la cuantificación del contenido de proteínas en cada uno de ellos. La medición de las muestras se realizó siguiendo el método de Bradford y de manera aleatoria con apoyo del programa *Statgraphics Centurion XVI* entre el sexo y el edulcorante ingerido. A continuación, se muestra un ejemplo de cálculo de la muestra H70 del grupo de fructosa.

Despejando de la **Ecuación 4.1** se tiene:

$$\text{Conc. Prom. muestra} = (\text{Abs. Prom. muestra} - 0.0016) / 11.553 \quad \text{Ecuación 4.2}$$

$$\text{Conc. Prom. H70 Fructosa} = (0.149 - 0.0016) / 11.553 = 0.0127 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

Considerando la dilución que se realizó de 1:10,000 se tiene:

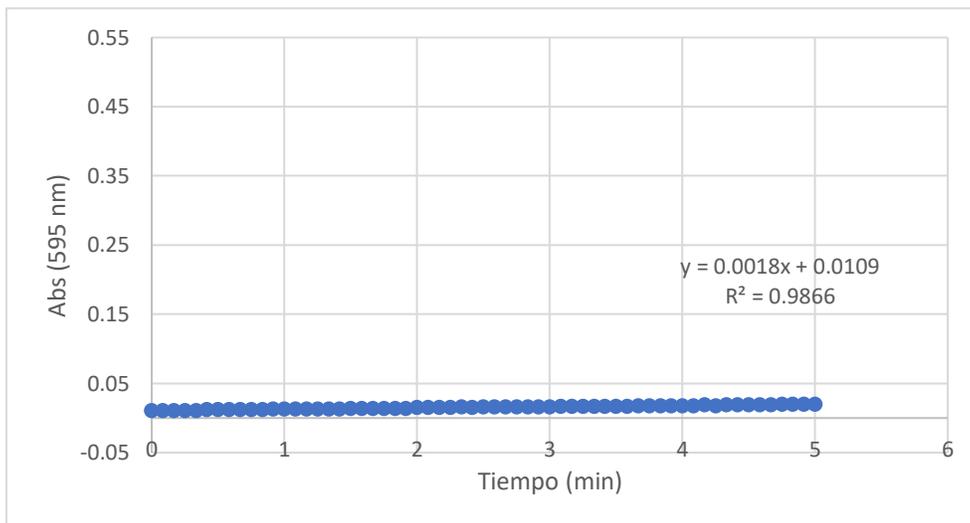
$$\text{Conc. Prom. H70 Fructosa} = (0.0127 \mu\text{g}/1\mu\text{L}) * (10,000\mu\text{L}/1\mu\text{L}) = 127.29 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

En las **Tablas A.1** a la **A.18** del Apéndice A, se muestran los resultados de la concentración de proteínas calculadas mediante interpolación para las muestras de extractos hepático de las 100 ratas con sus respectivos triplicados y coeficientes de variación.

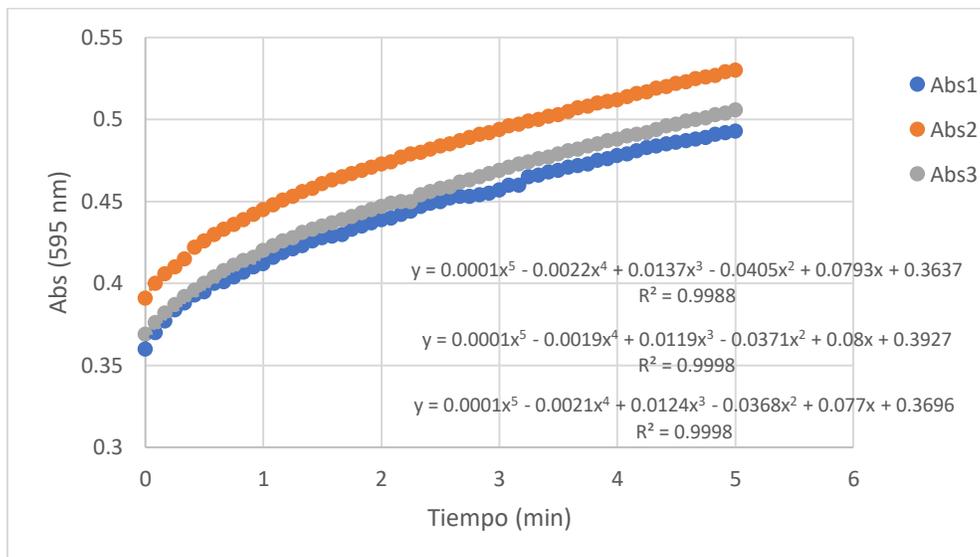
La cuantificación de proteínas es una etapa importante para determinar la actividad específica de la glucoquinasa, ya que si bien la actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima requerida para transformar 1 μmol de sustrato por minuto (Bisswanger, 2014), la actividad específica es el número de unidades de enzima que se tienen en un miligramo de proteína (U/mg).

4.3. Determinación de la actividad enzimática de la glucoquinasa

Las Gráficas 4.2 y 4.3, que se presentan a continuación, muestran un ejemplo de las curvas de avance de reacción para las muestras blanco de tejido hepático y sus triplicados para la muestra H70 del grupo de fructosa. La muestra blanco tiene como finalidad restar el error que presenta el método por los mismos reactivos.



Gráfica 4.2. Curva de avance de reacción de un blanco de reactivos



Gráfica 4.3. Curva de avance de reacción de muestra H70 Fructosa

Usando la ecuación de la curva de reacción de la muestra blanco y de extracto hepático, junto con el método de regresión polinómica, se aplicó la primera derivada (dx) para obtener la pendiente de la recta tangente evaluándose al tiempo 0. Lo anterior permitió calcular la velocidad inicial ($\Delta\text{abs}/\text{min}$) (Fasold y Gundlach, 1974).

La sustitución de estos valores de absorbancia sobre la **Ecuación 3.1** dieron los valores de actividad enzimática (U) para cada muestra y, con la **Ecuación 3.2** y los valores de concentración de proteína se obtuvo la actividad específica (U/mg). Debido a que el valor de actividad enzimática en extractos crudos sin purificar fue bajo, se prefirió expresar el resultado en mU/mg en lugar de U/mg, ya que en los análisis estadísticos fue empleada la concentración de mU/mg.

$$\text{U/mL H70 Fructosa} = ((0.0793 - 0.0018) \cdot (0.6 \text{ mL}) \cdot (4)) / ((6.22) \cdot (0.02 \text{ mL})) = 1.495 \text{ U/mL}$$

$$\text{U/mg H70 Fructosa} = (1.495 \text{ U/mL}) / (127.29 \text{ mg/mL}) = 0.0117 \text{ U/mg} = 11.7 \text{ mU/mg}$$

En el Apéndice B de la Tablas B.1 a la B.18 se muestran los valores de actividad específica calculadas para cada muestra del extracto hepático de las 100 ratas con sus respectivos triplicados y coeficientes de variación.

4.4. Análisis estadístico de la actividad enzimática

En las Tablas 4.2 y 4.3 se muestran las medias de la actividad enzimática específica (mU/mg) y la desviación estándar de cada uno de los grupos de edulcorantes para las ratas macho y hembra, respectivamente.

Tabla 4.2. Mediana por grupo de actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa de ratas macho

| Grupo | Actividad específica (mU/mg ± DAM) | Grupos homogéneos* |
|-----------|------------------------------------|--------------------|
| Control | 5.52 ± 1.35 | A |
| Mezcla | 6.84 ± 0.63 | A |
| Ace K | 7.33 ± 3.37 | AB |
| Glucosa | 8.22 ± 1.53 | AB |
| Basal | 7.29 ± 2.25 | AB |
| Sacarosa | 6.68 ± 2.76 | AB |
| Fructosa | 9.24 ± 3.54 | ABC |
| Sacarina | 9.77 ± 2.02 | B |
| Sucralosa | 13.36 ± 1.07 | C |

*Los grupos que no comparte letra difieren estadísticamente. Prueba Games-Howell al 95% de confianza

Tabla 4.3. Media por grupo de actividad específica (mU/mg) de la glucoquinasa de ratas hembra

| Grupo | Actividad específica (mU/mg ± DE) | Grupos Homogéneos* |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|
| Sucralosa | 7.44 ± 1.22 | A |
| Basal | 8.38 ± 3.03 | A |
| Mezcla | 8.43 ± 3.47 | AB |
| Fructosa | 8.96 ± 2.39 | AB |
| Sacarosa | 9.11 ± 3.43 | AB |
| Control | 9.12 ± 3.97 | AB |
| Glucosa | 10.03 ± 4.46 | AB |
| Ace K | 10.80 ± 1.58 | B |
| Sacarina | 10.85 ± 0.60 | B |

*Los grupos que no comparte letra difieren estadísticamente. Prueba Games-Howell al 95% de confianza

Debido a que los valores de la actividad específica en ratas macho no presentaron un comportamiento normal (ver Tabla C.4 del Apéndice C), se recurrió a hacer su análisis a través del uso de las medianas \pm la DAM (Desviación Absoluta de la Mediana) para evaluar la hipótesis de que todas las medianas eran iguales. El resultado de esta prueba reportó diferencia significativa entre los grupos.

El grupo que presentó una mediana de actividad específica más alta fue el de sucralosa con 13.36 ± 1.07 mU/mg, mientras que el más bajo fue el grupo control con 5.52 ± 1.35 mU/mg. Aquellos que difirieron respecto con el grupo control fueron el de sacarina con 9.77 ± 2.02 mU/mg y el de sucralosa 13.36 ± 1.07 mU/mg.

Bajo este escenario puede suponerse que la sucralosa obtuvo valores elevados debido al efecto que tiene sobre el metabolismo. Tal como lo reportan Li et al. (2016), la presencia de sucralosa activa los receptores de glucosa y facilita su metabolismo. Por lo tanto, era de esperar un incremento del metabolismo de la glucosa y, como consecuencia, mayores niveles de actividad de la glucoquinasa (*GK*).

Por otro lado, diversas investigaciones sobre la sacarina han demostrado que su consumo tiene un impacto sobre el incremento de masa corporal, la ingesta de alimento y la ingesta de energía. Estos comportamientos se han detectado en ratas de las estirpes Wistar y Sprague-Dawley, lo cual permite suponer que este ligero incremento de los valores de la *GK* que se presentaron con respecto del grupo control, podría provenir de un mayor consumo de alimento y, por ende, de un mayor consumo de glucosa. En el grupo de sacarina la única fuente de glucosa era el alimento ingerido.

En el caso de las ratas hembra cuyos valores de actividad específica no contaron con un comportamiento homocedástico (ver Tabla C.20 del Apéndice C), fue necesario hacer la prueba de Welch para evaluar la hipótesis de que todas las medias fueron iguales. El resultado arrojó un valor de P menor al de 0.05, lo cual indicó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en las medias de la actividad específica, con un nivel del 95.0% de confianza.

En las ratas hembra, el grupo que presentó los niveles más altos de la actividad específica fue el que bebió sacarina con 10.85 ± 0.60 mU/mg, mientras que el que presentó los niveles más bajos fue el de sucralosa con 7.44 ± 1.22 mU/mg. No obstante, estadísticamente, ningún grupo presentó diferencia significativa con respecto al grupo control, sin embargo, sí existieron diferencias significativas entre los grupos sacarina (10.85 ± 0.60 mU/mg) y ace k (10.80 ± 1.58 mU/mg) con respecto con de los grupos de sucralosa (7.44 ± 1.22 mU/mg) y el grupo basal (8.38 ± 3.03 mU/mg).

En el grupo de sacarina, el efecto que se podría estar suscitando sería similar al caso de las rata macho, donde la alta actividad de la *GK* vendría de un mayor consumo de alimento y una mayor demanda de energía debido a la actividad física. Esta hipótesis se respalda con la investigación realizada por Mendoza-Pérez (2021) donde ratas hembra de la estirpe Wistar que ingirieron sacarina reportaron un mayor consumo de alimento.

Para el caso del grupo sucralosa en donde se han presentado resultados completamente diferente a los de las ratas macho, existen investigaciones que reportan que dicho edulcorante no se metaboliza y es excretado en un 85% vía heces y 15% vía orina sin modificación en su conformación. No obstante, se deberá seguir indagando el efecto tanto en hembras como en machos, ya que se aprecia que el efecto depende del sexo del espécimen.

Los grupos control de las ratas macho y hembra presentaron una media de actividad específica de 6.22 ± 2.32 mU/mg y de 9.12 ± 3.97 mU/mg, respectivamente. Esto concuerda con lo reportado en el ensayo de Walker y Parry (1966) quienes obtuvieron un valor de media de 8.7 mU/mg partiendo de un conjunto de 10 muestras de tejido hepático de ratas Wistar.

Por otro lado, tal como se aprecia en las Tablas 4.2 y 4.3, la comparación entre el grupo basal y el grupo control no reporta diferencia estadísticamente significativa ni para las ratas macho ni para las ratas hembra, lo cual permite suponer que, a los 170 días previos a la eutanasia, el tiempo no fue una variable que pudiera afectar los niveles de actividad de la *GK*.

Los resultados obtenidos entre ratas macho y hembra permiten suponer el hecho de que el sexo puede ser una determinante en el efecto de los edulcorantes, por lo que para poder evaluar esta hipótesis sobre si existen diferencias significativas entre edulcorante y el sexo, se realizó un ANDEVA de dos vías. Este tipo de ANDEVA resulta ser más tolerante a las condiciones descritas en el capítulo 3 de metodología, por lo que no fue necesario realizar su evaluación de comportamiento normal y de homocedasticidad.

En la Tabla 4.4 y Gráfica 4.4 se muestra el análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías y la gráfica de Interacción edulcorante-sexo, respectivamente. En ellas se aprecia que el sexo resultó ser un factor estadísticamente significativo ($P=0.0393$), pero no así el factor edulcorante. Adicionalmente, el ANDEVA muestra que la interacción entre el edulcorante-sexo resultó ser significativa con un valor $P=0.0001$ y por ello no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el edulcorante ingerido, sin hacer alguna distinción entre ambos sexos, pero sí hubo entre la interacción del grupo de ratas macho y hembra.

Tabla 4.4. Análisis de varianza de dos vías para determinar la actividad específica

| Fuente | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | Razón-F ¹ | Valor-P |
|---------------------|-------------------|-----|----------------|----------------------|---------|
| EFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A: Grupo | 0.000125027 | 8 | 0.0000156284 | 1.65 | 0.1110 |
| B: Sexo | 0.000040641 | 1 | 0.000040641 | 4.30 | 0.0393 |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 0.000313356 | 8 | 0.0000391695 | 4.14 | 0.0001 |
| RESIDUOS | 0.00219378 | 232 | 0.00000945596 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 0.0026887 | 249 | | | |

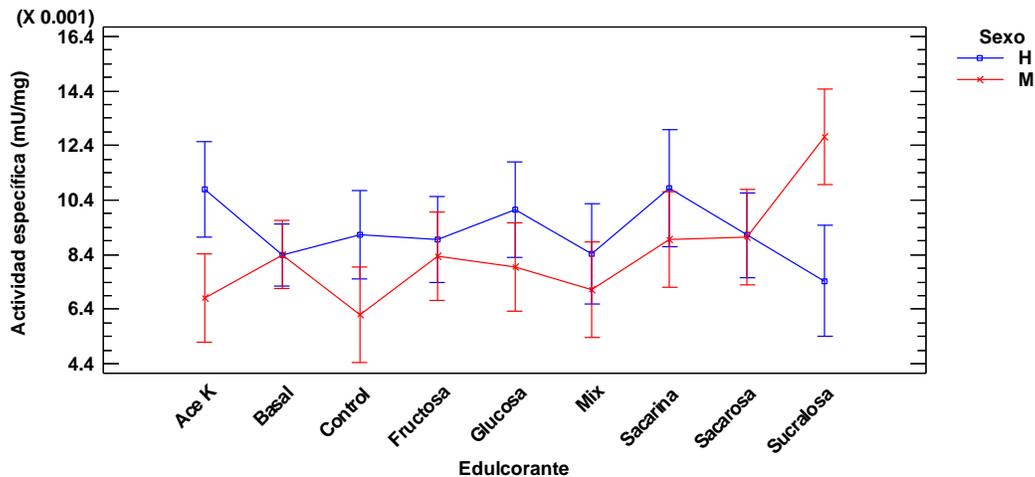
¹Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Gl: Grados de libertad

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P fueron menores que 0.05, estos factores presentaron un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad específica con un 95.0% de nivel de confianza.

La razón a la cual es posible atribuir esta diferencia entre los sexos son las distintas vías de regulación de la GK de las cuales es posible mencionar tres: La primera vía de regulación es el sustrato, es decir, la cantidad de alimento consumido y a la bebida ingerida (o edulcorante consumido). Se sabe que el motor principal para llevar a cabo la glucólisis es la glucosa. La glucosa proviene del alimento y/o de la bebida que se suministró, por lo que un mayor o menor consumo de estos dos componentes junto con

la actividad física de los modelos bajo estudio podría estar impactando en los nivel de *GK*. Tal como se ha mencionado en el marco teórico de esta tesis, todos los edulcorantes nutritivos y no nutritivos tienen distintas formas de actuar dentro del metabolismo, estimulando por consecuencia en mayor o en menor grado a la *GK*.



Gráfica 4.4. Interacciones e intervalos de la media al 95% de confianza

La segunda vía de regulación es la hormonal, donde se encuentran la insulina, el glucagón y las incretinas *GIP* y *GLP-1c*. Esta regulación de la *GK* resulta de manera indirecta, ya que la acción de estas hormonas se lleva a cabo sobre las células hepáticas, las cuales se encuentran en función de la concentración de glucosa en sangre. A altas concentraciones, tanto la hormona *GIP* como la hormona *GLP-1* liberan desde las células β a la hormona insulina, reduciendo de esta forma dicha concentración, dando paso a la glucólisis y a la activación de la *GK*. El glucagón funciona de manera inversa a la insulina y es liberado desde las células α cuando son detectadas bajas concentraciones de glucosa en la sangre para transformar vía glucogenólisis y gluconeogénesis al glucógeno, piruvato, lactato y glicerol en glucosa, lo cual implica un paro en la actividad de la *GK*.

La *GKRP* y *PFK2/FBP2* son otras hormonas cuya función también es regular a la *GK*, pero de una manera más directa, ya que lo hace a través de la formación de un complejo con la misma y va en función de la concentración de glucosa en sangre. A bajas concentraciones, la *GKRP* es quien forma este complejo para limitar la actividad de la *GK*, donde la presencia de la fructosa 6-fosfato (*F6P*) o de la fructosa 1-fosfato (*F1P*) favorecen o reducen su afinidad; la *PFK2/FBP2* por otro lado, a altas concentraciones de

glucosa en la sangre, es quien forma este complejo y favorece la actividad de la *GK* (Payne et al., 2007).

La tercera vía de regulación es a través de los factores de transcripción, siendo más específico el de la proteína de unión al elemento regulador del esteroles (*SREBP-1c*, por sus siglas en inglés) y de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*, por sus siglas en inglés). Ya que si bien, *SREBP-1c* se encarga de regular la lipogénesis a través de la transcripción de genes codificantes para las enzimas involucradas en el proceso, también lo hacen para la glucólisis, ya que se encarga de la codificación para la *GK* además de ser activado por la insulina y suprimido por el glucagón. Para el caso de *ChREBP*, si bien no tiene ningún impacto directo en la *GK*, sí tiene un efecto sinérgico con *SREBP* para la generación de lípidos (López-Oliva y Muñoz-Martinez, 2013).

Con todas estas variables en juego es posible suponer que, con la alteración de alguna de ellas, la actividad enzimática de la *GK* podría verse favorecida o reducida.

Durante la ingesta de alimento, los niveles de glucosa se elevan y tanto la glucólisis como la lipogénesis se activan. Sin embargo, cuando el consumo de glucosa es superior a lo que requiere el cuerpo, la lipogénesis tiene una mayor actividad. Además de estas vías, el cuerpo humano se apoya de otras más para reducir la glucosa, tales como la glucogénesis y la vía de las pentosas fosfato, ambas usando a la glucosa 6-fosfato como precursor (Bollen et al., 1998; Horecker, 2002).

Por otro lado, la investigación de Yip y Wolfe (1999) sobre la hormona *GIP* reporta que mientras más edad tenga el sujeto de estudio, mayores serán los niveles de la hormona, así como también la existencia de una correlación entre géneros donde los machos presentan niveles mayores que las hembras.

Sin embargo, debido al alcance y limitaciones de esta investigación, no se profundizará en esta parte debido a que queda fuera de los objetivos de esta tesis y quedará por indagar en futuras investigaciones ya que la regulación metabólica es en extremo compleja e involucra muchas vías de regulación.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

De acuerdo con la hipótesis planteada “Los niveles de actividad de la glucoquinasa en el tejido hepático de ratas hembra y macho de la variedad Wistar serán más elevados en aquellos grupos que consumen de manera crónica edulcorantes nutritivos al ser comparados con los grupos que consumen edulcorantes no nutritivos y de un control el cual consume agua potable “ y con el objetivo de esta investigación el cual fue el “Evaluar el efecto del consumo crónico de edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre los niveles de la actividad de la glucoquinasa en extractos de hepatocitos de 40 ratas macho (+10 basales macho) y 40 ratas hembras (+10 basales hembras) de la cepa Wistar que consumieron durante 170 días estas bebidas” es posible concluir lo siguiente:

1. El consumo crónico de edulcorantes no nutritivos desde el destete hasta la etapa de jóvenes adultos (170 días) influyó en que existieran diferencias estadísticamente significativas en las ratas macho entre el grupo basal y el grupo que bebió sucralosa. En ratas hembra las diferencias se presentaron entre el grupo basal y el grupo sucralosa con respecto a los grupos que bebieron acesulfame de K y sacarina.
2. Las ratas tanto macho como hembra que consumieron la bebida con el edulcorante sacarina fueron las que tuvieron los valores promedio más altos de actividad específica, mientras que el grupo control fue el que tuvo en promedio el valor más bajo de actividad de la glucoquinasa.
3. Se demostró que el tipo de edulcorante ingerido es un factor significativo para los niveles de actividad enzimática de la glucoquinasa en muestras hepáticas.
4. El factor sexo fue significativo. Por lo tanto, los niveles de actividad enzimática son dependientes del sexo de los especímenes. Los resultados observados en un sexo no son completamente extrapolables al otro. Por ello, siempre se deberán realizar investigaciones con ambos sexos.
5. En las ratas macho, los grupos sucralosa y sacarina reportaron diferencias significativas con respecto al grupo control con un valor más alto al obtenido para este último lo cual permite suponer que las rutas metabólicas de la glucosa tienen una mayor actividad tras el consumo de estos edulcorantes no nutritivos.

6. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos basal y control de ratas macho y hembra con respecto de la actividad específica de la *GK*, lo cual significa que a los 170 días, que fue el primer sacrificio, no se consideró al tiempo como una variable determinante.

5.2. Recomendaciones

Con base en los resultados y su análisis queda por indagar sobre las siguientes incógnitas:

1. Realizar una medición de los niveles de actividad de la *GK* en la fase climatérica de la rata para analizar si la edad es un factor determinante en la actividad de la enzima.
2. Realizar una segunda extracción sobre los tejidos hepáticos ya analizados para entender si existe una variación por el tiempo de almacenamiento y el tiempo de estudio.
3. Evaluar los niveles de concentración de las hormonas, insulina, glucagón, *GIP* y *GLP-1* las cuales se encargan de dar la señal de inicio para la glucólisis.
4. Complementar este estudio con un análisis sobre los niveles de expresión de factores de transcripción como *SREBP* y *ChREBP*.

APÉNDICE A. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL TEJIDO HEPÁTICO

Tabla A.1. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de glucosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M67 | Glucosa | 1:10,000 | 0.195 0.191 0.199 | 0.195 | 0.017 | 167.402 | 2.051 |
| M48 | Glucosa | 1:10,000 | 0.159 0.168 0.169 | 0.165 | 0.014 | 141.724 | 3.331 |
| M27 | Glucosa | 1:10,000 | 0.087 0.089 0.094 | 0.090 | 0.008 | 76.517 | 4.006 |
| M71 | Glucosa | 1:10,000 | 0.086 0.088 0.085 | 0.086 | 0.007 | 73.343 | 1.769 |
| M64 | Glucosa | 1:10,000 | 0.084 0.077 0.075 | 0.079 | 0.007 | 66.707 | 6.007 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.2. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de glucosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H5 | Glucosa | 1:10,000 | 0.131 0.137 0.127 | 0.132 | 0.011 | 112.583 | 3.822 |
| H58 | Glucosa | 1:10,000 | 0.134 0.134 0.137 | 0.135 | 0.012 | 115.468 | 1.283 |
| H36 | Glucosa | 1:10,000 | 0.080 0.087 0.096 | 0.088 | 0.007 | 74.497 | 9.149 |
| H24 | Glucosa | 1:10,000 | 0.086 0.077 0.074 | 0.079 | 0.009 | 66.996 | 7.905 |
| H78 | Glucosa | 1:10,000 | 0.080 0.078 0.079 | 0.079 | 0.007 | 66.996 | 1.265 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.3. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de fructosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M17 | Fructosa | 1:20,000 | 0.102 0.108 0.113 | 0.108 | 0.009 | 183.618 | 5.115 |
| M28 | Fructosa | 1:10,000 | 0.130 0.121 0.120 | 0.124 | 0.011 | 105.658 | 4.453 |
| M13 | Fructosa | 1:10,000 | 0.137 0.134 0.132 | 0.134 | 0.011 | 114.891 | 1.873 |
| M38 | Fructosa | 1:10,000 | 0.088 0.091 0.087 | 0.089 | 0.009 | 75.363 | 2.347 |
| M42 | Fructosa | 1:10,000 | 0.051 0.055 0.054 | 0.053 | 0.005 | 44.779 | 3.903 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.4. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de fructosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H73 | Fructosa | 1:10,000 | 0.189 0.186 0.174 | 0.183 | 0.016 | 157.015 | 4.337 |
| H28 | Fructosa | 1:10,000 | 0.166 0.169 0.153 | 0.163 | 0.014 | 139.415 | 5.228 |
| H18 | Fructosa | 1:10,000 | 0.161 0.154 0.154 | 0.156 | 0.013 | 133.933 | 2.585 |
| H70 | Fructosa | 1:10,000 | 0.143 0.157 0.146 | 0.149 | 0.013 | 127.297 | 4.958 |
| H31 | Fructosa | 1:10,000 | 0.147 0.145 0.157 | 0.150 | 0.013 | 128.163 | 4.295 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.5. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sacarosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M41 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.196 0.198 0.201 | 0.198 | 0.017 | 170.288 | 1.268 |
| M16 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.166 0.161 0.176 | 0.168 | 0.014 | 143.743 | 4.555 |
| M66 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.099 0.092 0.087 | 0.093 | 0.008 | 78.825 | 6.504 |
| M32 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.148 0.150 0.151 | 0.150 | 0.013 | 128.163 | 1.020 |
| M61 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.067 0.068 0.066 | 0.067 | 0.006 | 56.609 | 1.492 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.6. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H32 | Sacarosa | 1:20,000 | 0.119 0.120 0.128 | 0.122 | 0.010 | 209.008 | 4.032 |
| H68 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.136 0.136 0.143 | 0.138 | 0.012 | 118.353 | 2.921 |
| H52 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.134 0.143 0.143 | 0.140 | 0.012 | 119.796 | 3.711 |
| H55 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.140 0.146 0.136 | 0.141 | 0.012 | 120.373 | 3.578 |
| H34 | Sacarosa | 1:10,000 | 0.181 0.189 0.178 | 0.183 | 0.016 | 156.727 | 3.113 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.7. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de ace K

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M45 | Ace K | 1:20,000 | 0.141 0.148 0.138 | 0.142 | 0.012 | 243.631 | 3.605 |
| M76 | Ace K | 1:10,000 | 0.141 0.138 0.137 | 0.139 | 0.012 | 118.642 | 1.501 |
| M1 | Ace K | 1:10,000 | 0.135 0.131 0.120 | 0.129 | 0.011 | 109.986 | 6.037 |
| M58 | Ace K | 1:10,000 | 0.155 0.161 0.166 | 0.161 | 0.014 | 137.684 | 3.428 |
| M25 | Ace K | 1:10,000 | 0.068 0.072 0.061 | 0.067 | 0.006 | 82.576 | 8.310 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.8. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de ace K

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H17 | Ace K | 1:10,000 | 0.137 0.137 0.140 | 0.138 | 0.012 | 118.065 | 1.255 |
| H80 | Ace K | 1:10,000 | 0.132 0.136 0.141 | 0.136 | 0.012 | 116.622 | 3.307 |
| H48 | Ace K | 1:10,000 | 0.108 0.102 0.111 | 0.107 | 0.009 | 91.232 | 4.282 |
| H9 | Ace K | 1:10,000 | 0.184 0.185 0.189 | 0.186 | 0.016 | 159.612 | 1.422 |
| H19 | Ace K | 1:10,000 | 0.134 0.127 0.124 | 0.128 | 0.011 | 109.697 | 3.998 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.9. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] | Conc. proteínas "D" [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|---|---|-----------------|
| M11 | Mezcla | 1:10,000 | 0.186 0.186 0.185 | 0.186 | 0.016 | 159.324 | 0.311 |
| M63 | Mezcla | 1:10,000 | 0.200 0.201 0.201 | 0.201 | 0.017 | 172.307 | 0.287 |
| M14 | Mezcla | 1:10,000 | 0.140 0.139 0.137 | 0.139 | 0.012 | 118.642 | 1.101 |
| M7 | Mezcla | 1:10,000 | 0.144 0.141 0.141 | 0.142 | 0.012 | 121.527 | 1.219 |
| M49 | Mezcla | 1:10,000 | 0.186 0.176 0.181 | 0.181 | 0.016 | 155.284 | 2.762 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %. **Mezcla:** aspartame: acesulfame de k

Tabla A.10. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] | Conc. proteínas "D" [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|---|---|-----------------|
| H1 | Mezcla | 1:10,000 | 0.154 0.147 0.141 | 0.147 | 0.013 | 126.143 | 4.416 |
| H50 | Mezcla | 1:10,000 | 0.115 0.116 0.127 | 0.119 | 0.010 | 101.907 | 5.579 |
| H25 | Mezcla | 1:10,000 | 0.089 0.091 0.092 | 0.091 | 0.008 | 77.094 | 1.684 |
| H10 | Mezcla | 1:10,000 | 0.176 0.176 0.181 | 0.178 | 0.015 | 152.399 | 1.625 |
| H64 | Mezcla | 1:10,000 | 0.089 0.089 0.089 | 0.089 | 0.008 | 75.651 | 0.000 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %. **Mezcla:** aspartame: acesulfame de k

Tabla A.11. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sacarina

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M18 | Sacarina | 1:10,000 | 0.162 0.163 0.159 | 0.161 | 0.014 | 138.261 | 1.290 |
| M80 | Sacarina | 1:10,000 | 0.146 0.141 0.144 | 0.144 | 0.012 | 122.970 | 1.751 |
| M51 | Sacarina | 1:10,000 | 0.073 0.078 0.078 | 0.076 | 0.006 | 64.687 | 3.781 |
| M30 | Sacarina | 1:10,000 | 0.093 0.083 0.078 | 0.085 | 0.007 | 71.901 | 9.021 |
| M60 | Sacarina | 1:10,000 | 0.060 0.055 0.056 | 0.057 | 0.005 | 47.953 | 4.641 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.12. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarina

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H11 | Sacarina | 1:10,000 | 0.168 0.158 0.160 | 0.162 | 0.014 | 138.838 | 3.266 |
| H72 | Sacarina | 1:10,000 | 0.131 0.137 0.141 | 0.136 | 0.012 | 116.622 | 3.691 |
| H33 | Sacarina | 1:10,000 | 0.138 0.136 0.135 | 0.136 | 0.012 | 116.622 | 1.120 |
| H29 | Sacarina | 1:10,000 | 0.150 0.149 0.151 | 0.150 | 0.013 | 128.451 | 0.666 |
| H45 | Sacarina | 1:10,000 | 0.146 0.147 0.142 | 0.145 | 0.012 | 124.124 | 1.824 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.13. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de sucralosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M39 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.167 0.157 0.157 | 0.160 | 0.014 | 137.396 | 3.601 |
| M35 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.116 0.122 0.123 | 0.120 | 0.010 | 102.773 | 3.146 |
| M68 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.108 0.095 0.096 | 0.100 | 0.008 | 84.884 | 7.258 |
| M44 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.139 0.133 0.134 | 0.135 | 0.012 | 115.756 | 2.375 |
| M23 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.026 0.030 0.027 | 0.028 | 0.002 | 22.563 | 7.524 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.14. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de sucralosa

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H56 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.175 0.177 0.180 | 0.177 | 0.015 | 152.111 | 1.419 |
| H30 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.145 0.144 0.133 | 0.141 | 0.012 | 120.373 | 4.733 |
| H79 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.174 0.167 0.164 | 0.168 | 0.014 | 144.320 | 3.048 |
| H16 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.058 0.057 0.053 | 0.056 | 0.005 | 47.087 | 4.724 |
| H44 | Sucralosa | 1:10,000 | 0.030 0.030 0.035 | 0.032 | 0.003 | 26.025 | 9.116 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.15. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas macho del grupo que bebió solución de agua potable como control

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M2 | Control | 1:10,000 | 0.167 0.173 0.170 | 0.170 | 0.015 | 145.763 | 1.764 |
| M55 | Control | 1:20,000 | 0.101 0.101 0.112 | 0.105 | 0.009 | 178.424 | 6.067 |
| M57 | Control | 1:10,000 | 0.140 0.145 0.132 | 0.139 | 0.012 | 118.930 | 4.717 |
| M8 | Control | 1:10,000 | 0.082 0.080 0.078 | 0.080 | 0.007 | 67.861 | 2.500 |
| M56 | Control | 1:10,000 | 0.068 0.071 0.068 | 0.069 | 0.006 | 58.340 | 2.510 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.16. Concentración de proteínas para las 5 muestras de ratas hembra del grupo que bebió solución de agua potable como control

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H41 | Control | 1:10,000 | 0.175 0.177 0.168 | 0.173 | 0.015 | 148.648 | 2.726 |
| H6 | Control | 1:10,000 | 0.149 0.147 0.140 | 0.145 | 0.012 | 124.412 | 3.251 |
| H22 | Control | 1:10,000 | 0.114 0.123 0.135 | 0.124 | 0.011 | 105.947 | 8.496 |
| H71 | Control | 1:20,000 | 0.105 0.106 0.099 | 0.103 | 0.009 | 176.116 | 3.663 |
| H57 | Control | 1:10,000 | 0.086 0.085 0.096 | 0.089 | 0.008 | 75.651 | 6.834 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.17. Concentración de proteínas para las 10 muestras de ratas macho del grupo basal

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| M1 | Basal | 1:10,000 | 0.141 0.148 0.144 | 0.144 | 0.012 | 123.547 | 2.433 |
| M2 | Basal | 1:10,000 | 0.143 0.149 0.150 | 0.147 | 0.013 | 126.143 | 2.569 |
| M3 | Basal | 1:10,000 | 0.085 0.095 0.086 | 0.089 | 0.008 | 75.363 | 6.211 |
| M4 | Basal | 1:10,000 | 0.070 0.071 0.061 | 0.067 | 0.006 | 56.897 | 8.179 |
| M5 | Basal | 1:10,000 | 0.107 0.112 0.113 | 0.111 | 0.009 | 94.405 | 2.904 |
| M6 | Basal | 1:10,000 | 0.170 0.174 0.168 | 0.171 | 0.015 | 146.340 | 1.790 |
| M7 | Basal | 1:10,000 | 0.185 0.190 0.196 | 0.190 | 0.016 | 163.363 | 2.893 |
| M8 | Basal | 1:10,000 | 0.156 0.156 0.148 | 0.153 | 0.013 | 131.337 | 3.012 |
| M9 | Basal | 1:10,000 | 0.157 0.150 0.151 | 0.153 | 0.013 | 130.760 | 2.480 |
| M10 | Basal | 1:5,000 | 0.094 0.100 0.097 | 0.097 | 0.008 | 41.288 | 3.092 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla A.18. Concentración de proteínas para las 10 muestras de ratas hembra del grupo basal

| Rata | Edulcorante | Factor de dilución | Abs. (595 nm) | Abs. Prom. (595 nm) | Conc. proteínas "C" [µg/µL] | Conc. proteínas "D" [µg/µL] | Coef. Variación |
|------|-------------|--------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| H1 | Basal | 1:10,000 | 0.163 0.163 0.164 | 0.163 | 0.014 | 139.992 | 0.353 |
| H2 | Basal | 1:10,000 | 0.147 0.149 0.160 | 0.152 | 0.013 | 130.183 | 4.605 |
| H3 | Basal | 1:10,000 | 0.170 0.171 0.177 | 0.173 | 0.015 | 148.071 | 2.192 |
| H4 | Basal | 1:5,000 | 0.149 0.141 0.149 | 0.146 | 0.013 | 125.278 | 3.156 |
| H5 | Basal | 1:10,000 | 0.153 0.155 0.156 | 0.155 | 0.013 | 132.491 | 0.987 |
| H6 | Basal | 1:10,000 | 0.181 0.174 0.174 | 0.176 | 0.015 | 151.245 | 2.292 |
| H7 | Basal | 1:10,000 | 0.072 0.074 0.072 | 0.073 | 0.006 | 61.514 | 1.589 |
| H8 | Basal | 1:10,000 | 0.068 0.065 0.066 | 0.066 | 0.006 | 56.032 | 2.302 |
| H9 | Basal | 1:10,000 | 0.069 0.076 0.068 | 0.071 | 0.006 | 60.071 | 6.139 |
| H10 | Basal | 1:10,000 | 0.142 0.145 0.141 | 0.143 | 0.012 | 122.104 | 1.459 |

Donde: **Abs:** Absorbancia a 595 nanómetros. **Abs. Prom.:** Absorbancia promedio. **Conc. "C":** Concentración de proteínas obtenida a partir de la curva patrón. **Conc. "D":** Concentración de proteínas multiplicada por el factor de dilución. **Coef.:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias expresado en %

Tabla B.1. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de glucosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M67 | Glucosa | 4 | 167.402 | 0.0511 0.0524 0.0605 | 0.0013 | 0.9608 0.9859 1.1421 | 0.0057 0.0059 0.0068 | 6.150 | 9.5443 |
| M48 | Glucosa | 4 | 141.724 | 0.0687 0.0739 0.0646 | 0.0020 | 1.2868 1.3871 1.2077 | 0.0091 0.0098 0.0085 | 9.130 | 6.9495 |
| M27 | Glucosa | 4 | 76.517 | 0.0418 0.0372 0.0477 | 0.0018 | 0.7717 0.6830 0.8855 | 0.0101 0.0089 0.0116 | 10.195 | 13.0175 |
| M71 | Glucosa | 4 | 73.343 | 0.0271 0.0221 0.0226 | 0.0015 | 0.4939 0.4264 0.4360 | 0.0067 0.0058 0.0059 | 6.164 | 8.0781 |
| M64 | Glucosa | 4 | 66.707 | 0.0290 0.0169 0.0313 | 0.0016 | 0.5286 0.2952 0.5730 | 0.0079 0.0044 0.0086 | 8.257 | 5.6965 |

Donde: **F.d.:** Factor de dilución de la muestra; **C proteínas:** Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs muestra:** Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs blanco:** Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL:** Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg:** actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.2. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de glucosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H5 | Glucosa | 4 | 112.583 | 0.0651 0.0690 0.0672 | 0.0023 | 1.2116 1.2868 1.2521 | 0.0108 0.0114 0.0111 | 11.104 | 3.0122 |
| H58 | Glucosa | 4 | 115.468 | 0.0518 0.0676 0.0699 | 0.0035 | 0.9318 1.2367 1.2810 | 0.0081 0.0107 0.0111 | 10.902 | 2.4925 |
| H36 | Glucosa | 4 | 74.497 | 0.0739 0.0666 0.0704 | 0.0018 | 1.3910 1.2502 1.3235 | 0.0187 0.0168 0.0178 | 17.740 | 5.3300 |
| H24 | Glucosa | 4 | 66.996 | 0.0456 0.0331 0.0337 | 0.0015 | 0.8508 0.6096 0.6212 | 0.0127 0.0091 0.0093 | 9.186 | 1.3300 |
| H78 | Glucosa | 4 | 66.996 | 0.0168 0.0169 0.0137 | 0.0016 | 0.2932 0.2952 0.2334 | 0.0044 0.0044 0.0035 | 4.089 | 12.8123 |

Donde: **F.d.:** Factor de dilución de la muestra; **C proteínas:** Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs muestra:** Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs blanco:** Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL:** Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg:** actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación:** Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.3. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de fructosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M17 | Fructosa | 4 | 183.618 | 0.0539 0.0443 0.0478 | 0.0027 | 0.9878 0.8026 0.8701 | 0.0054 0.0044 0.0047 | 4.830 | 10.5692 |
| M28 | Fructosa | 4 | 105.658 | 0.0543 0.0515 0.0391 | 0.0023 | 1.0032 0.9492 0.7100 | 0.0095 0.0090 0.0067 | 9.239 | 3.9128 |
| M13 | Fructosa | 4 | 114.891 | 0.0682 0.0718 0.0761 | 0.0035 | 1.2482 1.3177 1.4006 | 0.0109 0.0115 0.0122 | 11.508 | 5.7712 |
| M38 | Fructosa | 4 | 75.363 | 0.0201 0.0200 0.0190 | 0.0015 | 0.3588 0.3569 0.3376 | 0.0048 0.0047 0.0045 | 4.659 | 3.3422 |
| M42 | Fructosa | 4 | 44.779 | 0.0319 0.0251 0.0322 | 0.0024 | 0.5691 0.4379 0.5749 | 0.0127 0.0098 0.0128 | 11.776 | 14.6904 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.4. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de fructosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H73 | Fructosa | 4 | 157.015 | 0.0715 0.0775 0.0704 | 0.0020 | 1.3408 1.4566 1.3196 | 0.0085 0.0093 0.0084 | 8.740 | 5.3722 |
| H28 | Fructosa | 4 | 139.415 | 0.0376 0.0447 0.0388 | 0.0027 | 0.6733 0.8103 0.6965 | 0.0048 0.0058 0.0050 | 5.212 | 10.0897 |
| H18 | Fructosa | 4 | 133.933 | 0.0586 0.0650 0.0607 | 0.0035 | 1.0630 1.1865 1.1035 | 0.0079 0.0089 0.0082 | 8.345 | 5.6313 |
| H70 | Fructosa | 4 | 127.297 | 0.0793 0.0800 0.0770 | 0.0018 | 1.4952 1.5087 1.4508 | 0.0117 0.0119 0.0114 | 11.665 | 2.0392 |
| H31 | Fructosa | 4 | 128.163 | 0.0716 0.0816 0.0690 | 0.0018 | 1.3466 1.5395 1.2965 | 0.0105 0.0120 0.0101 | 10.878 | 9.2052 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.5. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sacarosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| M41 | Sacarosa | 4 | 170.288 | 0.0576 | 0.0013 | 1.0862 | 0.0064 | 6.418 | 0.8737 |
| | | | | 0.0583 | | 1.0997 | 0.0065 | | |
| | | | | 0.0408 | | 0.7621 | 0.0045 | | |
| M16 | Sacarosa | 4 | 143.743 | 0.0452 | 0.0020 | 0.8334 | 0.0058 | 6.348 | 12.2585 |
| | | | | 0.0534 | | 0.9916 | 0.0069 | | |
| | | | | 0.0301 | | 0.5421 | 0.0038 | | |
| M66 | Sacarosa | 4 | 78.825 | 0.0730 | 0.0014 | 1.3814 | 0.0175 | 16.594 | 7.7542 |
| | | | | 0.0714 | | 1.3505 | 0.0171 | | |
| | | | | 0.0632 | | 1.1923 | 0.0151 | | |
| M32 | Sacarosa | 4 | 128.163 | 0.0772 | 0.0031 | 1.4296 | 0.0112 | 10.417 | 10.0139 |
| | | | | 0.0488 | | 0.8817 | 0.0069 | | |
| | | | | 0.0674 | | 1.2405 | 0.0097 | | |
| M61 | Sacarosa | 4 | 103.350 | 0.0271 | 0.0032 | 0.4611 | 0.0045 | 4.101 | 9.3776 |
| | | | | 0.0230 | | 0.3820 | 0.0037 | | |
| | | | | 0.0254 | | 0.4283 | 0.0041 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.6. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| H32 | Sacarosa | 4 | 209.008 | 0.0477 | 0.0013 | 0.8952 | 0.0043 | 4.058 | 5.4603 |
| | | | | 0.0452 | | 0.8469 | 0.0041 | | |
| | | | | 0.0429 | | 0.8026 | 0.0038 | | |
| H68 | Sacarosa | 4 | 118.353 | 0.0810 | 0.0023 | 1.5183 | 0.0128 | 13.242 | 10.9259 |
| | | | | 0.0934 | | 1.7576 | 0.0149 | | |
| | | | | 0.0762 | | 1.4257 | 0.0120 | | |
| H52 | Sacarosa | 4 | 119.796 | 0.0724 | 0.0023 | 1.3524 | 0.0113 | 11.783 | 6.3363 |
| | | | | 0.0732 | | 1.3678 | 0.0114 | | |
| | | | | 0.0808 | | 1.5145 | 0.0126 | | |
| H55 | Sacarosa | 4 | 120.373 | 0.0473 | 0.0035 | 0.8450 | 0.0070 | 7.560 | 6.4389 |
| | | | | 0.0515 | | 0.9260 | 0.0077 | | |
| | | | | 0.0532 | | 0.9588 | 0.0080 | | |
| H34 | Sacarosa | 4 | 156.727 | 0.0825 | 0.0018 | 1.5569 | 0.0099 | 8.937 | 13.3139 |
| | | | | 0.0770 | | 1.4508 | 0.0093 | | |
| | | | | 0.0637 | | 1.1942 | 0.0076 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.7. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de ace K

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ _{abs} muestra (340 nm) | Δ _{abs} blanco (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|--------------------|------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M45 | Acesulfame de K | 4 | 243.631 | 0.0400 0.0421 0.0424 | 0.0013 | 0.7466 0.7871 0.7929 | 0.0031 0.0032 0.0033 | 3.183 | 3.2529 |
| M76 | Acesulfame de K | 4 | 118.642 | 0.0441 0.0516 0.0455 | 0.0022 | 0.8084 0.9531 0.8354 | 0.0068 0.0080 0.0070 | 7.296 | 8.8883 |
| M1 | Acesulfame de K | 4 | 109.986 | 0.0717 0.0600 0.0665 | 0.0023 | 1.3389 1.1132 1.2386 | 0.0122 0.0101 0.0113 | 11.185 | 9.1929 |
| M58 | Acesulfame de K | 4 | 137.684 | 0.0570 0.0561 0.0690 | 0.0018 | 1.0650 1.0476 1.2965 | 0.0077 0.0076 0.0094 | 8.253 | 12.2276 |
| M25 | Acesulfame de K | 4 | 56.609 | 0.0146 0.0103 0.0097 | 0.0016 | 0.2508 0.1678 0.1563 | 0.0044 0.0030 0.0028 | 2.863 | 5.0508 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ_{abs}muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ_{abs}blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.8. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de ace K

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ _{abs} muestra (340 nm) | Δ _{abs} blanco (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|--------------------|------|-----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H17 | Acesulfame de K | 4 | 99.887 | 0.0160 0.0218 0.0188 | 0.0017 | 0.2069 0.2908 0.2474 | 0.0021 0.0029 0.0025 | 2.274 | 12.6108 |
| H80 | Acesulfame de K | 4 | 116.62 | 0.0694 0.0705 0.0598 | 0.0022 | 1.2965 1.3177 1.1113 | 0.0111 0.0113 0.0095 | 10.648 | 9.1443 |
| H48 | Acesulfame de K | 4 | 91.232 | 0.0615 0.0531 0.0606 | 0.0012 | 1.1633 1.0013 1.1460 | 0.0128 0.0110 0.0126 | 12.096 | 8.0628 |
| H9 | Acesulfame de K | 4 | 159.612 | 0.0746 0.0683 0.0820 | 0.0018 | 1.4045 1.2830 1.5473 | 0.0088 0.0080 0.0097 | 8.844 | 9.3722 |
| H19 | Acesulfame de K | 4 | 109.697 | 0.0619 0.0694 0.0764 | 0.0032 | 1.1325 1.2772 1.4122 | 0.0103 0.0116 0.0129 | 11.613 | 10.9815 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ_{abs}muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ_{abs}blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.9. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| M63 | Mezcla | 4 | 172.307 | 0.0586 | 0.0020 | 1.0920 | 0.0063 | 6.457 | 13.7928 |
| | | | | 0.0681 | | 1.2752 | 0.0074 | | |
| | | | | 0.0523 | | 0.9704 | 0.0056 | | |
| M11 | Mezcla | 4 | 159.324 | 0.0769 | 0.0020 | 1.4450 | 0.0091 | 9.191 | 1.8633 |
| | | | | 0.0789 | | 1.4836 | 0.0093 | | |
| | | | | 0.1084 | | 2.0527 | 0.0129 | | |
| M14 | Mezcla | 4 | 118.642 | 0.0428 | 0.0018 | 0.7910 | 0.0067 | 7.171 | 8.3961 |
| | | | | 0.0449 | | 0.8315 | 0.0070 | | |
| | | | | 0.0500 | | 0.9299 | 0.0078 | | |
| M7 | Mezcla | 4 | 121.527 | 0.0553 | 0.0018 | 1.0322 | 0.0085 | 6.104 | 10.1147 |
| | | | | 0.0430 | | 0.7949 | 0.0065 | | |
| | | | | 0.0375 | | 0.6887 | 0.0057 | | |
| M49 | Mezcla | 4 | 155.284 | 0.0639 | 0.0032 | 1.1711 | 0.0075 | 7.044 | 9.9768 |
| | | | | 0.0559 | | 1.0167 | 0.0065 | | |
| | | | | 0.0842 | | 1.5627 | 0.0101 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; **C_{proteínas}**: Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs_{muestra}**: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs_{blanco}**: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL**: Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg**: actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación**: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra; **Mezcla**: aspartame: acesulfame de k

Tabla B.10. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de mezcla de edulcorantes

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| H1 | Mezcla | 4 | 126.143 | 0.0685 | 0.0020 | 1.2830 | 0.0102 | 9.941 | 9.5198 |
| | | | | 0.0602 | | 1.1228 | 0.0089 | | |
| | | | | 0.0723 | | 1.3563 | 0.0108 | | |
| H50 | Mezcla | 4 | 101.907 | 0.0589 | 0.0022 | 1.0939 | 0.0107 | 11.876 | 8.4143 |
| | | | | 0.0687 | | 1.2830 | 0.0126 | | |
| | | | | 0.0672 | | 1.2540 | 0.0123 | | |
| H10 | Mezcla | 4 | 152.399 | 0.0694 | 0.0018 | 1.3042 | 0.0086 | 8.444 | 1.9082 |
| | | | | 0.0432 | | 0.7987 | 0.0052 | | |
| | | | | 0.0676 | | 1.2695 | 0.0083 | | |
| H64 | Mezcla | 4 | 75.651 | 0.1042 | 0.0026 | 1.9601 | 0.0259 | 23.398 | 15.1826 |
| | | | | 0.0676 | | 1.2540 | 0.0166 | | |
| | | | | 0.0845 | | 1.5801 | 0.0209 | | |
| H25 | Mezcla | 4 | 77.094 | 0.0147 | 0.0015 | 0.2547 | 0.0033 | 3.462 | 10.5337 |
| | | | | 0.0143 | | 0.2469 | 0.0032 | | |
| | | | | 0.0170 | | 0.2990 | 0.0039 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; **C_{proteínas}**: Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs muestra**: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs blanco**: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL**: Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg**: actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación**: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra; **Mezcla**: aspartame: acesulfame de k

Tabla B.11. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sacarina

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M18 | Sacarina | 4 | 138.261 | 0.0607 0.0820 0.0737 | 0.0027 | 1.1190 1.5299 1.3698 | 0.0081 0.0111 0.0099 | 10.486 | 7.8097 |
| M80 | Sacarina | 4 | 122.970 | 0.0753 0.0773 0.0806 | 0.0023 | 1.4084 1.4469 1.5106 | 0.0115 0.0118 0.0123 | 11.835 | 3.5481 |
| M51 | Sacarina | 4 | 64.687 | 0.0222 0.0337 0.0390 | 0.0014 | 0.4013 0.6232 0.7254 | 0.0062 0.0096 0.0112 | 10.424 | 10.7229 |
| M30 | Sacarina | 4 | 71.901 | 0.0190 0.0173 0.0142 | 0.0016 | 0.3357 0.3029 0.2431 | 0.0047 0.0042 0.0034 | 4.441 | 7.2633 |
| M60 | Sacarina | 4 | 47.953 | 0.0203 0.0182 0.0216 | 0.0024 | 0.3453 0.3048 0.3704 | 0.0072 0.0064 0.0077 | 7.094 | 13.6342 |

Donde: **F.d.**: Factor de dilución de la muestra; **C_{proteínas}**: Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs_{muestra}**: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs_{blanco}**: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL**: Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg**: actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación**: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.12. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sacarina

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H11 | Sacarina | 4 | 138.838 | 0.0479 0.0319 0.0497 | 0.0013 | 0.8990 0.5904 0.9338 | 0.0065 0.0043 0.067 | 6.600 | 2.6796 |
| H72 | Sacarina | 4 | 116.622 | 0.0675 0.0494 0.0723 | 0.0022 | 1.2598 0.9106 1.3524 | 0.0108 0.0078 0.0116 | 11.200 | 5.0135 |
| H33 | Sacarina | 4 | 116.622 | 0.0654 0.0666 0.0664 | 0.0023 | 1.2174 1.2405 1.2367 | 0.0104 0.0106 0.0106 | 10.560 | 1.0072 |
| H29 | Sacarina | 4 | 128.451 | 0.0784 0.0676 0.0778 | 0.0018 | 1.4778 1.2695 1.4662 | 0.0115 0.0099 0.0114 | 10.934 | 8.3374 |
| H45 | Sacarina | 4 | 124.124 | 0.1201 0.0974 0.1082 | 0.0026 | 2.2669 1.8289 2.0373 | 0.0183 0.0147 0.0164 | 16.470 | 10.7151 |

Donde: **F.d.**: Factor de dilución de la muestra; **C_{proteínas}**: Concentración de proteínas en muestra; **Δ abs_{muestra}**: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; **Δ abs_{blanco}**: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; **U/mL**: Actividad enzimática por mL de muestra; **U/mg**: actividad enzimática por mg de muestra; **Coef. Variación**: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.13. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió solución de sucralosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| M39 | Sucralosa | 4 | 137.396 | 0.0401 | 0.0013 | 0.7486 | 0.0054 | 5.624 | 4.4139 |
| | | | | 0.0426 | | 0.7968 | 0.0058 | | |
| | | | | 0.0537 | | 1.0109 | 0.0074 | | |
| M35 | Sucralosa | 4 | 102.773 | 0.0860 | 0.0035 | 1.5916 | 0.0155 | 14.317 | 7.3641 |
| | | | | 0.0751 | | 1.3814 | 0.0134 | | |
| | | | | 0.0782 | | 1.4412 | 0.0140 | | |
| M68 | Sucralosa | 4 | 84.884 | 0.0543 | 0.0018 | 1.0129 | 0.0119 | 13.182 | 8.4483 |
| | | | | 0.0614 | | 1.1498 | 0.0135 | | |
| | | | | 0.0637 | | 1.1942 | 0.0141 | | |
| M44 | Sucralosa | 4 | 115.756 | 0.0868 | 0.0026 | 1.6244 | 0.0140 | 12.956 | 9.8313 |
| | | | | 0.0719 | | 1.3370 | 0.0115 | | |
| | | | | 0.0823 | | 1.5376 | 0.0133 | | |
| M23 | Sucralosa | 4 | 22.563 | 0.0156 | 0.0024 | 0.2547 | 0.0113 | 10.432 | 11.4754 |
| | | | | 0.0152 | | 0.2469 | 0.0109 | | |
| | | | | 0.0130 | | 0.2045 | 0.0091 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C proteínas: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.14. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió solución de sucralosa

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|--------|--------|-------------------|------------------------|
| H56 | Sucralosa | 4 | 152.111 | 0.0581 | 0.0013 | 1.0958 | 0.0072 | 7.077 | 1.7921 |
| | | | | 0.0571 | | 1.0765 | 0.0071 | | |
| | | | | 0.0561 | | 1.0572 | 0.0070 | | |
| H30 | Sucralosa | 4 | 120.373 | 0.0713 | 0.0022 | 1.3331 | 0.0111 | 8.535 | 6.2411 |
| | | | | 0.0531 | | 0.9820 | 0.0082 | | |
| | | | | 0.0578 | | 1.0727 | 0.0089 | | |
| H79 | Sucralosa | 4 | 144.320 | 0.0669 | 0.0018 | 1.2559 | 0.0087 | 8.589 | 1.8709 |
| | | | | 0.0652 | | 1.2232 | 0.0085 | | |
| | | | | 0.0938 | | 1.7749 | 0.0123 | | |
| H44 | Sucralosa | 4 | 26.025 | 0.1136 | 0.00260 | 2.1415 | 0.0823 | 72.500 | 11.7106 |
| | | | | 0.0945 | | 1.7730 | 0.0681 | | |
| | | | | 0.0931 | | 1.7460 | 0.0671 | | |
| H16 | Sucralosa | 4 | 47.087 | 0.0157 | 0.0024 | 0.2566 | 0.0054 | 5.716 | 6.5895 |
| | | | | 0.0170 | | 0.2817 | 0.0060 | | |
| | | | | 0.0214 | | 0.3666 | 0.0078 | | |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C proteínas: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.15. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo que bebió agua potable como control

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M55 | Control | 4 | 178.424 | 0.0956 0.0689 0.0571 | 0.0020 | 1.8058 1.2907 1.0630 | 0.0101 0.0072 0.0060 | 6.596 | 13.6785 |
| M2 | Control | 4 | 145.763 | 0.0755 0.0684 0.0817 | 0.0020 | 1.4180 1.2810 1.5376 | 0.0097 0.0088 0.0105 | 9.688 | 9.0916 |
| M57 | Control | 4 | 118.930 | 0.0248 0.0443 0.0276 | 0.0017 | 0.4457 0.8219 0.4997 | 0.0037 0.0069 0.0042 | 3.974 | 8.0812 |
| M56 | Control | 4 | 58.340 | 0.0185 0.0181 0.0156 | 0.0016 | 0.3260 0.3183 0.2701 | 0.0056 0.0055 0.0046 | 5.225 | 9.9470 |
| M8 | Control | 4 | 67.861 | 0.0249 0.0162 0.0179 | 0.0016 | 0.4495 0.2817 0.3145 | 0.0066 0.0042 0.0046 | 4.392 | 7.7805 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C proteínas: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.16. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo que bebió agua potable como control

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H41 | Control | 4 | 148.650 | 0.0470 0.0366 0.0468 | 0.0013 | 0.8817 0.6810 0.8778 | 0.0059 0.0046 0.0059 | 5.473 | 14.1049 |
| H6 | Control | 4 | 124.412 | 0.0868 0.0849 0.0750 | 0.0023 | 1.6302 1.5936 1.4026 | 0.0131 0.0128 0.0113 | 12.395 | 7.9265 |
| H22 | Control | 4 | 105.947 | 0.0861 0.0789 0.0747 | 0.0035 | 1.5936 1.4547 1.3736 | 0.0150 0.0137 0.0130 | 13.912 | 7.5464 |
| H71 | Control | 4 | 176.116 | 0.0718 0.0781 0.0815 | 0.0018 | 1.3505 1.4720 1.5376 | 0.0077 0.0084 0.0087 | 8.252 | 6.5333 |
| H57 | Control | 4 | 75.651 | 0.0155 0.0108 0.0172 | 0.0015 | 0.2701 0.1794 0.3029 | 0.0036 0.0024 0.0040 | 3.787 | 8.0948 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C proteínas: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.17. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas macho del grupo basal

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| M1 | Basal | 3 | 123.547 | 0.0588 0.0600 0.0523 | 0.0000 | 0.8508 0.8682 0.7568 | 0.0069 0.0070 0.0061 | 6.680 | 7.2639 |
| M2 | Basal | 3 | 126.143 | 0.0265 0.0272 0.0368 | 0.0000 | 0.3834 0.3936 0.5325 | 0.0030 0.0031 0.0042 | 3.080 | 1.8435 |
| M5 | Basal | 3 | 94.405 | 0.0479 0.0472 0.0459 | 0.0000 | 0.6931 0.6830 0.6641 | 0.0073 0.0072 0.0070 | 7.204 | 2.1593 |
| M7 | Basal | 3 | 163.363 | 0.1085 0.1304 0.1095 | 0.0022 | 1.5381 1.8550 1.5526 | 0.0094 0.0114 0.0095 | 10.091 | 10.8532 |
| M6 | Basal | 3 | 146.340 | 0.1078 0.1105 0.1123 | 0.0022 | 1.5280 1.5670 1.5931 | 0.0104 0.0107 0.0109 | 10.679 | 2.0972 |
| M10 | Basal | 3 | 41.288 | 0.0296 0.0205 0.0262 | 0.0017 | 0.4037 0.2720 0.3545 | 0.0098 0.0066 0.0086 | 9.182 | 9.1762 |
| M8 | Basal | 3 | 131.337 | 0.1885 0.1860 0.1811 | 0.0034 | 2.6783 2.6421 2.5712 | 0.0204 0.0201 0.0196 | 20.029 | 2.0706 |
| M9 | Basal | 3 | 130.760 | 0.1363 0.1557 0.1375 | 0.0034 | 1.9230 2.2037 1.9404 | 0.0147 0.0169 0.0148 | 15.466 | 7.7778 |
| M3 | Basal | 3 | 75.363 | 0.0322 0.0283 0.0365 | 0.0037 | 0.4124 0.3559 0.4746 | 0.0055 0.0047 0.0063 | 5.498 | 14.3247 |
| M4 | Basal | 3 | 56.897 | 0.0321 0.0256 0.0234 | 0.0037 | 0.4109 0.3169 0.2850 | 0.0072 0.0056 0.0050 | 5.290 | 7.4790 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

Tabla B.18. Valores de actividad enzimática por mL y por mg de proteína para ratas hembra del grupo basal

| Rata | Edulcorante | F.d. | C _{proteínas} [mg/mL] | Δ abs _{muestra} (340 nm) | Δ abs _{blanco} (340 nm) | U/mL | U/mg | Promedio mU/mg | Coef. Variación (%) |
|------|-------------|------|-----------------------------------|---|--|----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| H10 | Basal | 3 | 122.104 | 0.0983 0.1008 0.1286 | 0.0000 | 1.4223 1.4585 1.8608 | 0.0116 0.0119 0.0152 | 11.797 | 1.7758 |
| H5 | Basal | 3 | 132.491 | 0.0589 0.0609 0.0585 | 0.0022 | 0.8204 0.8494 0.8146 | 0.0062 0.0064 0.0061 | 6.251 | 2.2466 |
| H3 | Basal | 3 | 148.071 | 0.1702 0.1201 0.1428 | 0.0022 | 2.4309 1.7059 2.0344 | 0.0164 0.0115 0.0137 | 12.630 | 12.4188 |
| H1 | Basal | 3 | 139.992 | 0.1139 0.0873 0.1054 | 0.0022 | 1.6162 1.2314 1.4932 | 0.0115 0.0088 0.0107 | 10.336 | 13.5857 |
| H4 | Basal | 3 | 42.875 | 0.0212 0.0203 0.0204 | 0.0017 | 0.2822 0.2691 0.2706 | 0.0066 0.0063 0.0063 | 6.390 | 2.6054 |
| H2 | Basal | 3 | 130.183 | 0.1138 0.1094 0.1081 | 0.0034 | 1.5974 1.5338 1.5150 | 0.0123 0.0118 0.0116 | 11.896 | 2.7909 |
| H8 | Basal | 3 | 56.032 | 0.0344 0.0307 0.0386 | 0.0024 | 0.4630 0.4095 0.5238 | 0.0083 0.0073 0.0093 | 8.307 | 12.2880 |
| H7 | Basal | 3 | 61.514 | 0.0264 0.0207 0.0240 | 0.0024 | 0.3473 0.2648 0.3125 | 0.0056 0.0043 0.0051 | 5.010 | 13.4358 |
| H6 | Basal | 3 | 151.245 | 0.0908 0.0736 0.0813 | 0.0037 | 1.6804 1.3486 1.4971 | 0.0111 0.0089 0.0099 | 9.975 | 11.0175 |
| H9 | Basal | 3 | 60.071 | 0.0189 0.0218 0.0184 | 0.0037 | 0.2199 0.2619 0.2127 | 0.0037 0.0044 0.0035 | 3.854 | 7.4790 |

Donde: F.d.: Factor de dilución de la muestra; C_{proteínas}: Concentración de proteínas en muestra; Δ abs muestra: Absorbancia de la muestra obtenida a partir de la ecuación de la curva al tiempo cero; Δ abs blanco: Absorbancia de muestra blanco obtenida a partir de la ecuación de la curva; U/mL: Actividad enzimática por mL de muestra; U/mg: actividad enzimática por mg de muestra; Coef. Variación: Coeficiente de variación obtenido a partir del triplicado de las absorbancias de la muestra

APÉNDICE C. PRUEBAS ESTADÍSTICAS DE NORMALIDAD Y HOMOCEDASTICIDAD

Tabla C.1. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió agua potable como control

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.879392 | 0.0821299 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que control proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.2. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de glucosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.929159 | 0.288278 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que glucosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.3. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sacarosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.865183 | 0.053694 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que sacarosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.4. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de fructosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.84227 | 0.01686 |

Debido a que el valor-P para esta es menor que 0.05, **SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que fructosa proviene de una distribución normal con 95% de confianza

Tabla C.5. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de ace K

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.902231 | 0.120745 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que ace K proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.6. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de mezcla

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.924187 | 0.304142 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que mezcla proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.7. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sacarina

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.908068 | 0.19202 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que sacarina proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.8. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo que bebió solución de sucralosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.946749 | 0.547488 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que sucralosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.9. Prueba de Normalidad de ratas macho para el grupo basal

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.945255 | 0.219406 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Basal proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.10. Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió agua potable como control

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.91777 | 0.200673 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Control proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.11. Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió solución de glucosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.906905 | 0.185624 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Glucosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.12. Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo que bebió solución de sacarosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.95262 | 0.543238 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Sacarosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.13. Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de fructosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.925556 | 0.231929 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Fructosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.14. Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de ace K

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.957081 | 0.688057 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Ace K proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.15. Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de mezcla

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.876718 | 0.09241 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Mix proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.16. Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de sacarina

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.927221 | 0.495961 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Sacarina proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.17. Prueba de Normalidad para el grupo de ratas hembra que bebió solución de sucralosa

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.929123 | 0.466747 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Sucralosa proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.18. Prueba de Normalidad de ratas hembra para el grupo basal

| Prueba | Estadístico | Valor-P |
|-------------------------------|--------------------|----------------|
| Estadístico W de Shapiro-Wilk | 0.930161 | 0.0695784 |

Debido a que el valor-P para esta es mayor o igual que 0.05, **NO SE PUEDE RECHAZAR** la idea de que Basal proviene de una distribución normal con 95%, ó más, de confianza

Tabla C.19. Prueba de Homocedasticidad para ratas macho

| | Prueba | Valor-P |
|----------|---------------|----------------|
| Levene's | 2.68426 | 0.00956834 |

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes

Tabla C.20. Prueba de Homocedasticidad para ratas hembra

| | Prueba | Valor-P |
|----------|---------------|----------------|
| Levene's | 3.92777 | 0.000390356 |

Puesto que el valor-P es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel del 95.0% de confianza. Esto viola uno de los supuestos importantes subyacentes en el análisis de varianza e invalidará la mayoría de las pruebas estadísticas comunes

APÉNDICE D. DISPOSICIÓN DE RESIDUOS DE LA INVESTIGACIÓN

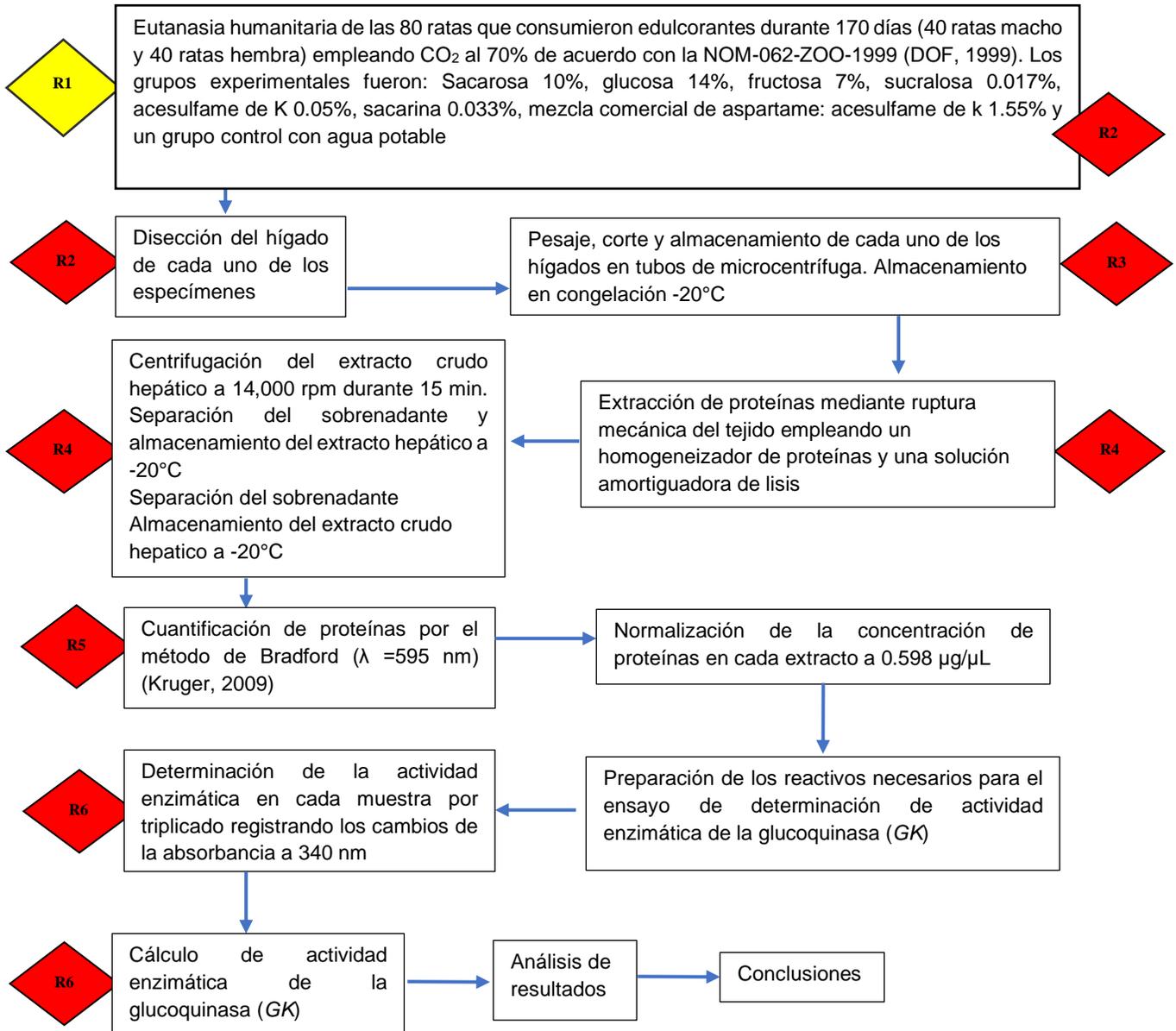


Figura D.1 Diagrama esquemático de la disposición controlada de residuos producidos en esta investigación

R1: Partes de tejido y restos anatómicos. Se almacenan en bolsas amarillas para residuos biológico-infecciosos y se almacenan temporalmente a -20°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*[®]: NaCl 137 mM, KCl 2 mM, K_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.5 mM, octilfenoxi poli (etilenoxi)etanol 0.1%, deoxicolato de sodio 0.5%, dodecilsulfato de sodio 0.1%, NaF 1 mM, Na_3VO_4 2 mM, azida de sodio 0.006%. 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 glucoquinasa: 75 mM de Tris, 360 mM de β -D(+)-Glucosa, 120 mM de *ATP*, 600 mM de MgCl_2 , 27 mM de NADP^+ , 100 U de G-6-P-DH, 5 mM de citrato de sodio, 50 mM de Tris. Los reactivos son desechados en tarja ya que no representan ningún peligro químico.

BIBLIOGRAFÍA

- Agius, L. 2016. Hormonal and metabolite regulation of hepatic glucokinase. *Annual Review of Nutrition*. 36: 389-415. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-051145>
- AlDeeb, O.A.A., Mahgoub, H. Foda, N.H. 2013. Sucralose. En Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, Brittain, H.G., ed. Academic Press Volume 38, pp. 423-462. San Diego, EE. UU. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407691-4.00010-1>
- Bakal, A.I., O'Brien-Nabors, L. 2011. Saccharin. En Alternative Sweeteners, O'Brien-Nabors, L., ed., Marcel Dekker, 3ª ed., pp. 151-170. Nueva York, EE. UU.
- Bassoli, A., Merlini, L. 2003. Sweeteners. Intensive. En Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Caballero, B., ed., Academic press, 2ª ed., pp. 5688-5695. Londres, Reino Unido.
- Bayly, G.R. 2014. Chapter 37. Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. En Clinical biochemistry: Metabolic and clinical aspects, Marshall, W.J., Lapsley, M., Day, A.P., Ayling, R.M., eds., Churchill Livingstone 3ª ed., pp. 702-736. Londres, Reino Unido. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-5140-1.00037-7>
- Beck, T., Miller, B.G. 2013. Structural basis for regulation of human glucokinase by glucokinase regulatory protein. *Biochemistry*. 52: 6232- 6239. <https://doi.org/10.1021/bi400838t>
- Berry, C., Brusick, D., Cohen, S.M., Hardisty, J.F., Grotz, V.L., Williams, G.M. 2016. Sucralose non-carcinogenicity: A review of the scientific and regulatory rationale. *Nutrition and cancer*. 68(8): 1247-1261. <http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2016.1224366>
- Bian, X., Tu, P., Chi, L., Gao, B., Ru, H., Lu, K. 2017. Saccharin induced liver inflammation in mice by altering the gut microbiota and its metabolic functions. *Food and chemical toxicology*. 107: 530-539. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.045>
- Bisswanger, H. 2014. Enzyme assays. *Perspectives in Science*.1(1): 41-55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W. 1998. Specific features of glycogen metabolism in the liver. *Biochemical Journal*. 366(1): 19 – 31. <https://doi.org/10.1042/bj3360019>
- Bryant, C., Wasse, L.K., Astbury, N., Nandra, G., McLaughlin, J.T. 2014. Non-nutritive sweeteners: No class effect on the glycaemic or appetite responses to ingested glucose. *European Journal of Clinical Nutrition*. 68(5): 629-631. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.19>
- Bryant, C., McLaughlin, J. 2016. Low calorie sweeteners: Evidence remains lacking for effects on human gut function. *Physiology & Behavior*. 164(part B): 482-485. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.04.026>
- 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.

<https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.11.003>

- Chappell, G.A., Borghoff, S.J., Pham, L.L., Doepker, C.L., Wikoff, D.S. 2020. Lack of potential carcinogenicity for sucralose – Systematic evaluation and integration of mechanistic data into the totality of the evidence. *Food and Chemical Toxicology*. 135: 110898. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110898>
- Clark, M.A., Douglas, M., Choi, J. 2013. Biology. OpenStax College, 2^a ed. Pp. 198-204. Houston, EE. UU.
- Cohen, S.M. 2018. The role of cell proliferation in the etiology of neoplasia. En *Comprehensive Toxicology*, McQueen, C.A., ed., Elsevier Science, 3a ed., Vol. 7., pp. 226-247. Amsterdam, Países Bajos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64272-1>
- Cullen, K.S., Al-Oanzi, Z.H., O'Harte, F.P.M., Agius, L., Arden, C. 2014. Glucagon induces translocation of glucokinase from the cytoplasm to the nucleus of hepatocytes by transfer between 6-phosphofructo 2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-2 and the glucokinase regulatory protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Cell Research*. 1843: 1123-1134. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.006>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.10.009>
- DOF. 1999. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. Recuperado el 24 de agosto de 2021. [En línea]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf
- Ellwein, L.B., Cohen, S.M. 1990. The health risks of saccharin revisited. *Critical Reviews in Toxicology*. 20: 311-326. <https://doi.org/10.3109/10408449009089867>
- Escalada, F. 2014. Fisiología del GLP-1 y su papel en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. *Medicina Clínica*, 143 (S2): 2-7. [https://doi.org/10.1016/S0025-7753\(14\)70101-0](https://doi.org/10.1016/S0025-7753(14)70101-0)
- EMA. European Medicines Agency. 2011. Guideline on bioanalytical method validation. Recuperado el 02 de febrero de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>.
- Envigo. 2015. Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable). [En línea]. Disponible en: <https://insights.envigo.com/hubfs/resources/data-sheets/2018s-datasheet-0915.pdf>
- Fasold, H., Gundlach, G. 1974. Characterization of peptides and proteins with enzymes. En *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U., ed. Academic Press.

Vol. 4, pp. 1625-1639. Nueva York, EE. UU. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091304-6.50007-0>

- FDA. 1983. Aspartame. Federal Register. Vol. 48, No. 132. Rules and Regulations. Pp. 31376-31382.
- FDA. 1988. Acesulfame Potassium. Federal Register. Vol. 53, No. 145. Rules and Regulations. Pp. 28379-28383.
- FDA. 1998. Sucralose. Federal Register. Vol. 63, No. 64. Rules and Regulations., pp. 16417-16433.
- FDA. 2018. Additional Information about high-intensity sweeteners permitted for use in food in the United States. Recuperado el 02 de febrero de 2022. [En línea]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states>
- Fitch, C., Keim, K.S. 2012. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*. 112(5): 739-758. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.03.009>
- Fosado-Castro, K.F. 2003. Revisión y discusión de la información disponible sobre el metabolismo en el humano y eliminación de los edulcorantes artificiales. Tesis de Químico de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. Ciudad de México. México.
- Goward, C.R., Hartwell, R., Atkinson, T., Scawen, M.D. 1986. The purification and characterization of glucokinase from the thermophile *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemical Journal*. 237(2): 415-420. <https://doi.org/10.1042/bj2370415>
- Grotz, V.L., Munro, I.C. 2009. An overview of the safety of sucralose. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 55(1): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.05.011>.
- Gupta, S., Kalra, S., Bharihoke, V., Dhurandhar, D. 2014. Sucralose induced pancreatic toxicity in albino rats: Histomorphological evidence. *Journal of Morphological Sciences*. 31(2): 123-127. <http://dx.doi.org/10.4322/jms.073614>
- Guy, R.C. 2014. Saccharin. En *Encyclopedia of Toxicology*, Wexler, P., ed., Academic Press, pp. 193-194. Amsterdam, Países Bajos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00923-4>
- Hernández-Uribe, J.P., Rodríguez-Ambríz, S.L., Bello-Pérez, L.A. 2008. Obtención de jarabe fructosado a partir de almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.). Caracterización parcial. *Interciencia*. 33(5): 372-376. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008000500011
- Horecker, B.L. 2002. The pentose phosphate pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 277(50): 47965 – 47971. <https://doi.org/10.1074/jbc.X200007200>
- Irwin, D.M., Tan, H. 2013. Evolution of glucose utilization: Glucokinase and glucokinase regulator protein. *Molecular phylogenetics and evolution*. 70: 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.09.016>
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A.J., Morscher, R.J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G.J., Bimbaum, M.J., Rabinowitz, J.D. 2018. The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metabolism*. 27: 351-361.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.12.016>

• Kawaguchi, M., Fujii, T., Kamiya, Y., Ito, J., Okada, M., Sakuma, N., Fujinami, T. 1996. Effects of fructose ingestion on sorbitol and fructose 3-phosphate contents of erythrocytes from healthy men. *Acta Diabetologica*. 33: 100-103.

<https://doi.org/10.1007/BF00569417>

• Kim, J., Egan, J.M. 2008. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*. 60 (4): 470-502.

<https://doi.org/10.1124/pr.108.000604>

• Kohlmeier, M. 2003a. Fructose. En *Nutrient Metabolism*, Kohlmeier, M., ed., Academic Press, pp. 210-216. Nueva York, EE. UU.

<https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50037-5>

• Kohlmeier M. 2003b. Glucose. En *Nutrient Metabolism*, Kohlmeier, M. ed., Academic Press, pp. 193-210. Nueva York, EE. UU.

<https://doi.org/10.1016/B978-012417762-8.50036-3>

• Kruger, N.J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. En *The Protein Protocols Handbook*, Walker, J.M., ed., Human Press, 3a ed., pp. 17-24. Totowa, EE. UU. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4

• Lawrence, J.F. 2003. Saccharin. En *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Caballero, B., ed., Academic Press, 2a ed. pp. 5033-5035. Nueva York, EE. UU.

<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/01033-6>

• Li, L., Ohtsu Y., Nakagawa Y., Masuda K., Kojima I. 2016. Sucralose, an activator of the glucosa-sensing receptor, increases ATP by calcium-dependent and - independent mechanisms. *Endocrine Journal*. 63(8): 715-725.

<https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ16-0217>

• Li, Q., Gakhar, L., Spies, M.A. 2018. Determinants of human glucokinase activation and implications for small molecule allosteric control. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 1862(9): 1902-1912.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.06.001>

• Lima-Martínez, M.M., Betancourt, L., Bermúdez A., 2011. Glucagón: ¿Un simple espectador o un jugador clave en la fisiopatología de la diabetes? *Avances en diabetología*. 27 (5): 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.avdiab.2011.09.002>

• Ling, B., Yan, X., Sun, M., Bi, S. 2015. Theoretical investigations on the interactions of glucokinase regulatory protein with fructose phosphates. *Computational Biology and Chemistry*. 60: 21-31.

<https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2015.07.009>

• López-Oliva, M.E., Muñoz-Martínez, E. 2013. *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.

• Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., Kellett, G.L. 2007. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical *GLUT2*. *Journal of Physiology*. 582(1): 379-392. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130906>

- Massa, L., Baltrusch, S., Okar, D.A., Lange, A.J., Lenzen, S., Tiedge, M. 2004. Interaction of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFK-2/FBPase-2) with glucokinase activates glucosa phosphorylation and glucosa metabolism in insulin-producing cells. *Diabetes*. 53(4): 1020-1029. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.4.1020>
- Martínez, C., González, E., García, R.S., Salas, G., Constantino-Casas, F., Macías, L., Gracia, I., Tovar, C., Durán-de-Bazúa, C. 2010. Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *The Open Obesity Journal*. 2: 116-124. <https://doi.org/10.2174/1876823701002010116>
- Mattes, R.D., Tan, S.Y., Tucker, R.M. 2021. Sweeteners: sensory properties, digestion, consumption trends, and health effects. En Reference Module in Food Science, Elsevier, pp. 1-12. Amsterdam, Países Bajos. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821848-8.00014-7>
- Mendoza-Pérez, S. 2017. Efecto de la ingesta de diferentes edulcorantes sobre la liberación de las hormonas de la saciedad *GIP* y *GLP-1* y su efecto sobre la lipogénesis a largo plazo. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Mendoza-Pérez, S. 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. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.
- Mendoza-Pérez, S., García-Gómez, R.S., Durán-Domínguez-de-Bazúa, M.d.C. 2022. Chronic intake of nutritive sweeteners and saccharin increases levels of glycolytic and lipogenic enzymes in rat liver. *International Journal of Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/09637486.2022.2088705>
- Molinary, S.V., Quinlan, M.E. 2011. Sucralose. En *Alternative Sweeteners*, O'Brien-Nabors, L., ed. Marcel Dekker, 3ª ed., pp. 130-145. Nueva York, EE. UU.
- Nirmalan, N, Nirmalan, M. 2020. Hormonal control of metabolism: Regulation of plasma glucose. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*. 21(11): 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.mpaic.2020.08.002>
- Nelson, D., Cox, M. 2009. Leningher. Principios de Bioquímica. Omega, 5ª ed., pp. 527-569. Barcelona, España.
- Niu, W., Kong, H., Wang, H., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, X. 2012. A chemiluminescence sensor array for discriminating natural sugars and artificial sweeteners. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402: 389-395. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5305-8>
- Olivares-Reyes, J.A., Arellano-Plancarte, A. 2008. Bases moleculares de las acciones de la insulina. Recuperado el 02 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/f_Articulo2.pdf

- Palmnäs, M.S.A., Cowan, T.E., Bomhof, M.R., Su, J., Reimer, R.A., Vogel, H.J., Hittel, D., Shearer, J. 2014. Low-dose aspartame consumption differentially affects gut microbiota-host metabolic interactions in the diet-induced obese rat. *PLoS ONE*. 9(10): e109841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109841>
- Payne, V.A., Arden, C., Lange, A.J., Agius, L. 2007. Contributions of glucokinase and phosphofructokinase-2/fructose biphosphatase-2 to the elevated glycolysis in hepatocytes from Zucker fa/fa rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 293(2): R618-R625.
- Santamaría-Duque, C. S.F. Insulina. Función fisiológica y acciones farmacológicas. Recuperado el 02 de septiembre de 2022. [En línea]. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Poster/CRISTIAN%20SANTAMARIA%20DUQUE.pdf>
- Sternisha, S.M., Miller, B.G. 2019. Molecular and cellular regulation of human glucokinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 663:199-213. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.01.011>
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., Kuperman, Y., Harmelin, A., Kolodkin-Gal, I., Shapiro, H., Halpern, Z., Segal, E., Elinav, E. 2014. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 514: 181-186.
- Suez, J., Shapiro, H., Elinav, E. 2016. Role of the microbiome in the normal and aberrant glycemic response. *Clinical Nutrition Experimental*. 6: 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.clnex.2016.01.001>
- Swithers, S.E., Baker, C.R., Davidson, T.L. 2009. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behavioral Neuroscience*. 123: 772-780. <https://doi.org/10.1037/a0016139>
- Swithers, S.E., Davidson, T.L. 2008. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behavioral Neuroscience*. 122(1): 161-173. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.1.161>
- Swithers, S.E., Martin, A.A., Davidson, T.L. 2010. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & Behavior*. 100(1): 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.12.021>
- 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. <https://doi.org/10.1037/a0031717>
- Thorgeirsson, U.P., Dalgard, D.W., Reeves, J., Adamson, R.H. 1994. Tumor Incidence in a chemical carcinogenesis study of nonhuman primates. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 19(2): 130-151. <https://doi.org/10.1006/rtph.1994.1013>

- UE. 2008. Reglamento (CE) No 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo sobre aditivos alimentarios. 2008. Diario Oficial de la Unión Europea. pp. L 354/21 <https://www.boe.es/doue/2008/354/L00016-00033.pdf>
- Valdés-Martínez, S.E. 2006. Hidratos de carbono. En Química de los Alimentos Baduí, S., ed., Pearson Education, 4ª ed. pp. 30-50. Ciudad de México, México.
- Van Schaftingen, E. 2020. Hexokinase/Glucokinase. En Encyclopedia of Biological Chemistry, Jez, J., ed., Elsevier 3a ed., Vol. 1, pp. 149-161. Ámsterdam, Países Bajos <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819460-7.00034-7>
- Walker, D.G., Parry, M.J. 1966. Glucokinase. En Methods in enzymology, Wood, W.A., ed. Academic Press. Vol. 9, pp. 381-388. Nueva York, EE. UU.
- Walpole, R.E., Myers, R.H., Myers, S.L., Ye, K. 2007. Probabilidad y estadística para ingeniería y ciencias. 8ª edición, Pearson Education, pp. 507-550. Ciudad de México, México.
- World Health Organization. 2021a. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). SUCRALOSE. Recuperado el 15 de noviembre de 2021. [En línea]. Disponible en: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/2340>
- World Health Organization. 2021b. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). SACCHARIN. Recuperado el 21 de noviembre de 2021. [En línea]. Disponible en: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/3164>
- Yalamanchi, S., Srinath, R., Dobs, A. 2016. Acesulfame-K. En Encyclopedia of Food and Health, Caballero, B., Finglas, P.M., Toldrá, F., eds., Academic Press, pp. 1-5. Londres, Reino Unido. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00001-5>
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R.K., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Arnot, D., Uyeda, K. 2001. A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Science*. 98(16): 9116-9121. <https://doi.org/10.1073/pnas.16128429>
- Yip, R.G., Wolfe, M.M. 1999. Minireview. GIP biology and fat metabolism. *Life Sciences*. 66(2): 91-103. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00314-8](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00314-8)
- Zazueta, A.R. 2007. Polipéptido insulínico dependiente de glucosa y péptido semejante al glucagón tipo 1: Acciones fisiológicas e implicaciones en la diabetes tipo 2 y la obesidad. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 15(3):156-164.
- Zhao, X., Yan, J., Chen, K., Song, L., Sun, B., Wei, X. 2018. Effects of saccharin supplementation on body weight¹, sweet receptor mRNA expression and appetite signals regulation in post-weanling rats. *Peptides*. 107: 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.07.006>

¹Weight, peso en español, es incorrecta ya que es una fuerza que se mide en Newtons. Debería usarse la palabra masa, mass en inglés