



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina
Departamento de Estudios de Posgrado
Maestría en Ciencias de la Salud

“Efecto de la suplementación de edulcorantes naturales y artificiales sobre el perfil histomorfológico y la distribución corporal del tejido adiposo en el ratón BALB/c”

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias de la Salud**

Presenta:

L.N. Betsy Corina Sosa García

Comité de Tutores:

Dr. Francisco Bernardo Pliego Rivero

Tutor Académico

Dr. Rigoberto Oros Pantoja

Tutor Interno

Dra. Ma. De Lourdes Basurto Acevedo

Tutor externo

ÍNDICE

| | No. Página |
|--|---------------|
| Resumen | 1 |
| Abstract | 2 |
| I. Antecedentes | 3 |
| 1.1 Definición de edulcorantes naturales y artificiales | 3 |
| 1.2 Edulcorantes y su importancia | 3 |
| 1.3 Fisiología gustativa. El sabor dulce | 6 |
| 1.4 Lipogénesis | 9 |
| 1.5 Lipólisis | 10 |
| 1.6 Tejido adiposo | 12 |
| 1.6.1 Tipos de tejido adiposo | 13 |
| 1.6.2 Tejido adiposo blanco (WAT) | 15 |
| 1.6.3 Tejido adiposo marrón o pardo (BAT) | 16 |
| 1.6.4 Tejido adiposo beige | 17 |
| 1.6.5 Tejido adiposo rosa | 17 |
| 1.6.6 Tejido adiposo azul ¿Un quinto tipo de adipocitos? | 18 |
| 1.7 Tejido adiposo como órgano endocrino | 18 |
| 1.8 Tejido adiposo relación con la hormona irisina | 20 |
| 1.9 Estudios del efecto de edulcorantes | 20 |
| II. Planteamiento del problema | 24 |
| III. Hipótesis | 26 |
| IV. Objetivos | 27 |
| V. Justificación | 28 |
| VI. Material y Métodos | 30 |
| 6.1 Diseño del estudio | 30 |
| 6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación | 30 |
| 6.3 Procedimientos | 31 |
| 6.4 Variables de estudio | 35 |
| 6.5 Implicaciones Bioéticas | 37 |
| 6.6 Recolección de datos y análisis estadístico | 38 |
| VII. Resultados | 40 |
| 7.1 Título corto del artículo | 39 |
| 7.1.2 Página frontal del manuscrito | 40 |
| 7.1.3 Carta de envío de artículo | 42 |
| 7.1.4 Resumen | 44 |
| 7.1.5 Abstract | 45 |
| 7.1.6 Introduction | 46 |
| 7.1.7 Materials and methods | 50 |
| 7.1.8 Results | 53 |
| 7.1.9 Discussion | 57 |
| 7.2 Conclusions | 62 |
| 7.2.1 Declaration of interests | 63 |
| 7.2.2 References | 64 |
| 7.2.3 Figures | 70 |
| 7.4 Resultados adicionales | 76 |
| 7.4.1 Gráfico. Cinética de peso corporal | 76 |
| 7.4.2 Gráficos composición corporal | 77 |

| | | |
|-------|---|-----|
| | 7.4.3 Tabla Composición corporal determinada por bioimpedancia (Impedivet) posterior a las seis semanas de tratamiento. | 78 |
| | 7.4.4 Gráficos de variables metabólicas | 79 |
| | 7.4.5 Tabla 2. Variables metabólicas posterior a las seis semanas de tratamiento | 80 |
| | 7.4.6 Gráficos de número de células por rango de volumen relativo por cavidad | 81 |
| VIII. | Conclusiones | 82 |
| | 8.1 Conclusiones generales | 82 |
| | 8.2 Limitaciones | 83 |
| | 8.3 Recomendaciones | 83 |
| IX. | Referencias bibliográficas | 85 |
| X. | Anexos | 92 |
| | I.Pruebas bioquímicas: Determinacion de perfil de lipidos | 92 |
| | II Determinacion de glucosa sanguínea | 98 |
| | III Determinación de la concentración de irisina | 100 |
| | IV. Método histomofologico | 105 |

Resumen:

Introducción: Con el consumo indiscriminado de edulcorantes no calóricos (ENC) se ha observado un incremento de tejido adiposo, a pesar de que estos productos no participan directamente en la generación de energía metabólica. Hasta ahora se desconoce el mecanismo fisiológico por el cual ocurre este fenómeno.

Objetivo: Comparar el efecto de la suplementación de edulcorantes naturales y artificiales sobre el perfil histomorfológico y distribución corporal del tejido de adiposo corporal en ratones BALB/c.

Material y métodos: Estudio experimental, prospectivo y comparativo. De 40 ratones BALB/c machos se formaron cinco grupos de estudio 1) control agua, 2) sacarosa, 3) sucralosa, 4) estevia, 5) aspartame) que recibieron tratamiento con edulcorantes. Posterior a 6 semanas se determinaron glucosa en plasma, perfil de lípidos, concentración de irisina y composición corporal por bioimpedancia. Del tejido adiposo se determinaron masa grasa inguinal, gonadal y mesentérica, número de células/área de corte histológico y volumen celular relativo.

Resultados: Al final del estudio se encontró que los grupos experimentales: sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa consumieron más alimento; y una ganancia de peso al término del tratamiento ($p < 0.03$). El grupo sacarosa consumió considerablemente más alimento sin cambios metabólicos excepto en el aumento de peso sin ningún otro cambio importante. Sin embargo hubo aumento de grasa gonadal en grupo estevia ($p < 0.0001$); inguinal en el grupo de sucralosa y mesentérica en los grupos de estevia y sucralosa, así como una disminución en las concentraciones plasmáticas de irisina en el grupo con sucralosa.

Discusión y conclusiones: En comparación con el grupo control, los grupos bajo tratamiento con ECN y sacarosa mostrarán cifras mayores de glucemia. Los datos sugieren que los edulcorantes no calóricos no son inertes al metabolismo y al aumento del tejido adiposo.

Palabras clave: *Edulcorantes no calóricos, obesidad, tejido adiposo.*

Summary:

Introduction: with the indiscriminate consumption of non-nutritive sweeteners (NNS) an increase of adipose tissue has been observed, even though these products do not directly participate in the generation of metabolic energy. Until now the physiological mechanism by which this phenomenon occurs is unknown.

Objective: to compare the effect of the supplementation of natural and artificial sweeteners on the histomorphological profile and body distribution of body adipose tissue in BALB/c mice.

Material and methods: experimental, prospective and comparative study. Of 40 male BALB/c mice, five study groups were formed: 1) water control, 2) sucrose, 3) sucralose, 4) stevia, 5) aspartame, which were treated with sweeteners. After 6 weeks, plasma glucose, lipid profile, irisin concentration and body composition were determined by bioimpedance. Adipose tissue was determined inguinal, gonadal and mesenteric fat mass, number of cells/histological section area and relative cell volume.

Results: at the end of the study it was found that the experimental groups: sucrose, aspartame, stevia and sucralose consumed more food; and a weight gain at the end of the treatment ($p < 0.03$). The sucrose group consumed considerably more food without metabolic changes except in the weight gain without any other major change. However, there was an increase in gonadal fat in the stevia group ($p < 0.0001$); inguinal in the sucralose and mesenteric group in the stevia and sucralose groups, as well as a decrease in plasma irisin concentrations in the sucralose group.

Discussion and conclusions: compared to the control group, the groups under treatment with NNS and sucrose showed higher glycemic figures. The data suggest that non-caloric sweeteners are not inert to metabolism and to the increase of adipose tissue.

Key words: *Non-caloric sweeteners, obesity, adipose tissue*

I. ANTECEDENTES

1.1 Definición de edulcorantes naturales o nutritivos

Sustancias que se emplean como aditivos que confieren sabor dulce a los alimentos aportando 4 cal por gramo (1,2).

1.1.2 Definición de edulcorantes no calóricos (ENC)

Conocidos también como edulcorantes no nutritivos (NNS, por sus siglas en inglés *non-nutritional sweeteners*) son sustancias orgánico-sintéticas que pueden sustituir total o parcialmente el dulzor de los edulcorantes naturales. Su beneficio radica en que son mucho más dulces que el azúcar común con menor aporte energético (1-3).

1.2 Edulcorantes y su importancia

El azúcar de caña y el de remolacha fueron los edulcorantes más consumidos en el mundo hasta mediados del siglo XX. En México, el azúcar de mesa o sacarosa es usado extensamente en la elaboración de alimentos. Sin embargo, con los problemas mundiales de sobrepeso, obesidad y diabetes, se han propuesto alternativas, entre ellas el uso de los edulcorantes no calóricos por su bajo aporte energético. (3).

En Estados Unidos de América (EUA) el uso de los ENC se ha regulado por la FDA (por sus siglas en inglés *Food and Drug Administration*) para consumo seguro. Los ENC aprobados por la FDA son tres: aspartame, sucralosa y estevia. Por parte de la Secretaría de Salud (SS) en México actualmente se permite también el uso de sorbitol, xilitol, manitol aspartame, sucralosa, estevia y ciclamato (4). La información sobre el consumo de ENC no es precisa, no obstante, está en aumento en proporción con la incidencia de enfermedades crónico- degenerativas (5-8).

La clasificación de edulcorantes de acuerdo a su aporte energético y a su origen se muestra a continuación:

Cuadro 1. Clasificación de edulcorantes

| Clasificación | Naturales | Artificiales |
|---------------------|----------------------------------|---|
| Calóricos | Miel, azúcar de mesa, piloncillo | Jarabe de maíz de alta fructosa, caramelo, alcoholes de azúcar |
| No calóricos | Stevia, glucósidos de esteviol | Aspartame, sucralosa, sacarina, acesulfame potásico, advantame, neotame, ciclamato y alitam |

Modificado de Cabello (3)

Los ENC más utilizados en México son:

Sucralosa

Edulcorante artificial descubierto en 1976, compuesto de 1,6 dicloro- 1,6 dideoxy-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4deoxy- αD-galactopi-ranósido (Fig. 1). La sucralosa se obtiene por la halogenación selectiva de la molécula de sacarosa. Es 600 veces más dulce que el azúcar, la dosis diaria recomendada (ADI) es de 15 mg/kg peso/día y la dosis máxima recomendada es 1,050 mg/día. En su forma comercial la podemos encontrar como *Splenda* (3,8).

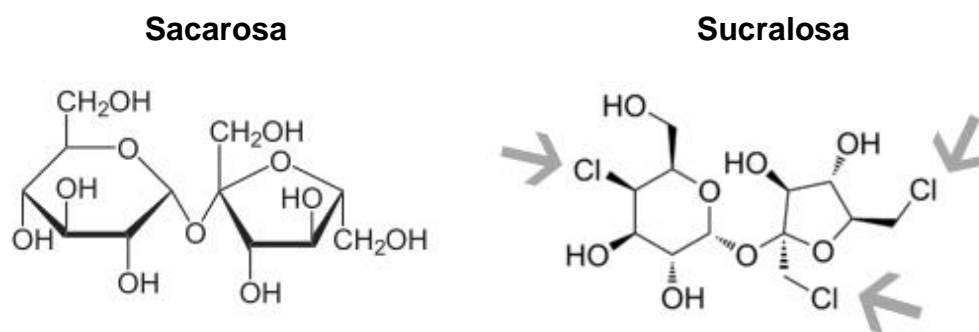


Figura 1. Esquemas comparativos de la estructura molecular de sucralosa y sacarosa (9)

Aspartame

Descubierto en 1965, formado por un dipéptido de L-fenilalanina y L-ácido aspártico, unido por un enlace éster metílico (Fig. 2), tiene un poder dulzor de 180 a 200 veces en comparación con la sacarosa. Este edulcorante es un péptido, proporciona 4 calorías por gramo. Continúa siendo uno de los edulcorantes más intensos y utilizados. La ADI es de 50 mg/kg peso/día y la dosis máxima recomendada de 2,800 mg/día. En su forma comercial la podemos encontrar como *NutraSweet* y *Equal* (3,10).

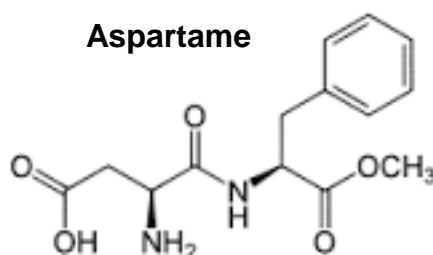


Figura 2. Estructura molecular de aspartame (9).

Estevia

Este edulcorante recibe el mismo nombre de la planta que lo origina, la cual se encuentra en el sureste de Paraguay y pertenece a la familia de las asteráceas, conocidas también como "hoja dulce". De estas hojas se extrae este edulcorante natural, con poder endulzante 300 veces mayor que el de la sacarosa, pero sin ser calórico. Conformada por una molécula de esteviol en la cual el átomo de hidrógeno inferior se sustituye por una molécula de beta-D-glucosa, y el hidrógeno superior se sustituye por dos moléculas de beta-D-glucosa (Fig. 3) (1,8).

La ADI es de 12 mg/kg peso/día y dosis máxima recomendada es de 280 mg/día. En su forma comercial se encuentra como *Svetia* y *Super life* (1,3,8).

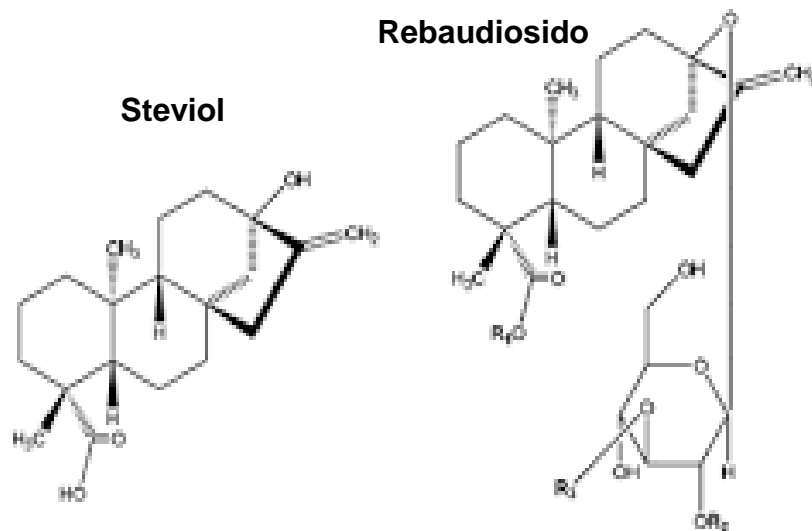


Figura 3. Estructura molecular de estevia (11).

1.3 Fisiología gustativa. El sabor dulce.

La lengua es el órgano del gusto, en ella se encuentra la mayor cantidad de receptores gustativos. Su superficie es rugosa por la presencia de papilas linguales o gustativas. Estas se clasifican en caliciformes o circunvaladas, fungiformes, foliadas y filiformes (Fig. 4) (14,15).

El papel fisiológico del gusto es detectar los principales sabores: dulce, umami, amargo, salado y amargo, características determinantes en la elección de la dieta y en el rechazo de posibles toxinas (14,15).

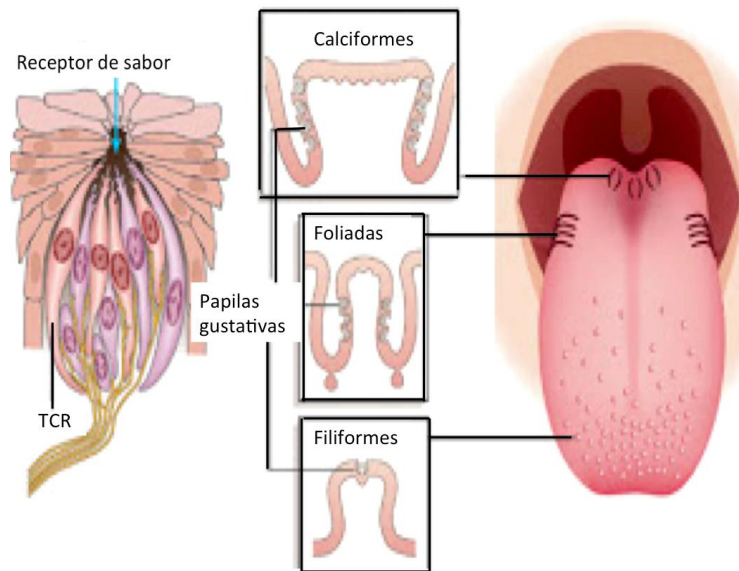


Figura 4. Anatomía del gusto. Se distinguen cuatro tipos de estructuras prominentes denominadas papilas gustativas (14).

El proceso de percepción del sabor dulce se debe a las señales organolépticas recibidas para ser transmitidas a las fibras nerviosas, por medio de los receptores T1R2/T1R3 (por sus siglas en inglés *sweet receptor*), que se encuentran en el intestino delgado, acoplados a proteína GPCR (por sus siglas en inglés *G protein couple receptors*), T1R3 y α -gustducin en estómago y células entero endocrinas; sin embargo, no todos los edulcorantes se unen a los mismos sitios sobre el receptor (Fig. 5) (1,11-17).

Las fibras nerviosas que transmiten la información del sabor de las papilas gustativas convergen en la división del núcleo del tracto solitario (NTS) a través de señales de captación del gusto enviadas al núcleo parabraccial bilateral (PNB), hacia el tálamo, un tercio de las fibras ascendentes van al tálamo de tal manera que el sabor está representado bilateralmente en el ínsula (18-22).

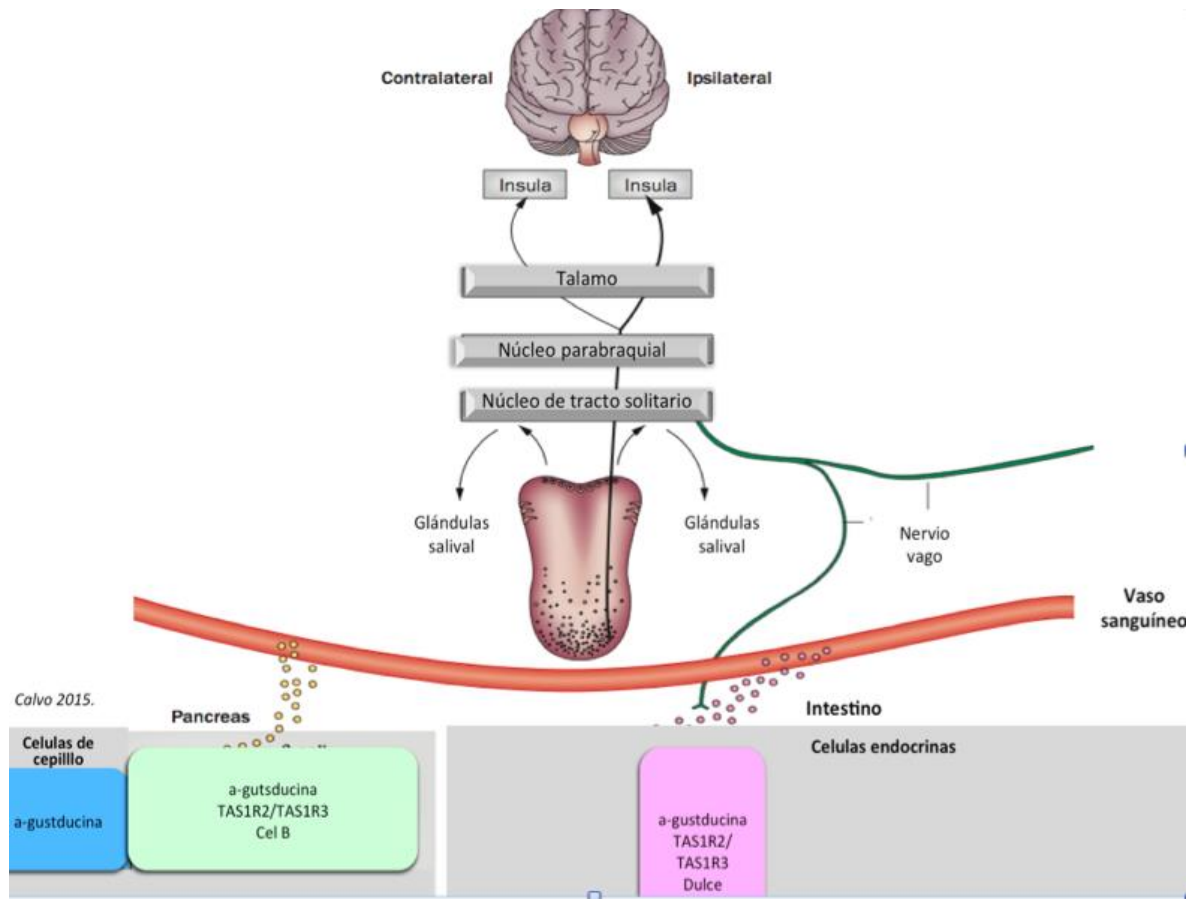


Figura 5. Relación de los órganos con los mecanismos de percepción del sabor dulce (17).

En intestino delgado, T1R2 y T1R3 que se expresan en células enteroendocrinas, secretan dos hormonas de la saciedad: péptido similar a glucagón-1 y el péptido GIP (péptido inhibidor gástrico), dependiente de glucosa e insulina (23).

En el duodeno, el nivel de expresión del receptor de sabor dulce ha demostrado ser regulado por factores tipo luminal y concentración de glucosa. Los receptores del sabor dulce y α -gustducin desempeñan un papel clave en el proceso de detección de hidratos de carbono intestinales (24).

En el páncreas, las células β ubicadas en los islotes de Langerhans están involucradas en la regulación de la concentración de glucosa en la sangre a través de la secreción de insulina (25, 26).

Los componentes para la detección de compuestos de sabor dulce, incluyendo α -gustducin, T1R2 y T1R3, están presentes en la superficie de células humana β pancreáticas. Un aumento en la liberación de insulina en presencia de glucosa es inducido por la estimulación con fructosa o ENC, tales como sacarina, ciclamato, acesulfame-K (17).

El papel de la expresión del receptor al sabor dulce en la regulación de la insulina en el páncreas plantea la cuestión de si éste conduce a una mayor liberación de hormonas y a la regulación del metabolismo energético (26).

Se ha observado estimulación de adipogénesis y supresión de la lipólisis después de estimulación de los adipocitos con sacarina y acesulfame-K (26).

1.4 Lipogénesis

La *lipogénesis de novo* es una vía metabólica compleja regulada que convierte los hidratos de carbono de la dieta en ácidos grasos, que una vez esterificados se almacenan en el tejido adiposo como triacilglicéridos (TAG). Este proceso implica la degradación de los ácidos tricarbónicos, hidratos de carbono mediante la glucólisis anaerobia en el citoplasma y el ciclo tricarbónico en el interior de la mitocondria con producción de energía (27).

Los productos intermediarios del metabolismo de la glucosa, se convierten en ácidos grasos. La *lipogénesis de novo* utiliza el exceso de energía procedente del ATP, para sintetizar los ácidos grasos, que una vez esterificados con glicerol y en forma de TAG, pueden ser eficientemente acumulados en el tejido adiposo en forma de grasa neutra o de reserva. Los productos de estas reacciones son secretadas por el hígado en forma de partículas VLD (por sus siglas en inglés *very low-density lipoprotein*) (28).

La síntesis endógena de los ácidos grasos convierte a los hidratos de carbono en lípidos para su almacenamiento, debido a que los lípidos son más densos en energía y se considera como una forma eficiente de reserva (29).

Un incremento en *la lipogénesis de novo* contribuye el incremento de la masa grasa, mientras que una reducción de la lipogénesis, puede ser protectora frente al desarrollo de la obesidad (24, 35).

Los receptores del sabor dulce acoplados a proteínas G, T1R2 y T1R3, caracterizados en cerebro, lengua, vejiga, páncreas e intestino se expresan también en la adipogénesis de los adipocitos. En adipocitos maduros, la exposición a ENC suprime tanto la lipólisis basal estimulada a través de un mecanismo que también es independiente al de los receptores de sabor dulce. Por lo que demuestra que los ENC participan en la diferenciación de los adipocitos y el metabolismo promueve la presencia de receptores del sabor dulce "adicionales" aún no identificados (28).

Por tanto, existe un creciente interés por estudiar el papel fisiológico de la *lipogénesis de novo* en estados patológicos asociados a la obesidad tales como la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (30).

1.5 Lipólisis

La lipólisis es el proceso en el cual los triacilglicéridos se transforman en diacilgliceroles, monoacilgliceridos, una molécula de glicerol y ácidos grasos libres. En el tejido adiposo blanco (WAT por sus siglas en inglés *white adipose tissue*) son liberados en el sistema vascular para uso de otros órganos en forma de sustratos energéticos (26).

El WAT, durante la disminución de calor, se somete a cambios mayores durante el proceso de lipólisis, que se define como la hidrólisis de los triacilglicéridos para generar ácidos grasos libres (27).

En respuesta a cambios en el estado nutricional, la lipólisis es regulada por señales hormonales y bioquímicas. Estas señales modulan la actividad de las enzimas lipolíticas y proteínas que permiten la capacidad de respuesta máxima del tejido adiposo a cambios en las necesidades de energía (23).

Las alteraciones en la lipólisis, son asociadas a la obesidad y resistencia a la insulina. Por lo tanto la obesidad se caracteriza principalmente por un exceso de

WAT y una ampliación de tamaño de los adipocitos que representan una condición mayor de almacenamiento de los triacilglicéridos. Por lo que la obesidad se ha convertido en un problema endocrino (29).

Los triacilglicéridos se hidrolizan hasta formar ácidos grasos libres y monoacilglicerol por acción de la lipoproteínlipasa (LPL) que se encuentra en la pared de los capilares del tejido adiposo (30).

El paso limitante en la lipólisis está dado por la lipasa sensible a hormonas (HSL). Esta enzima cataliza la hidrólisis de triacilglicéridos hasta formar monoglicéridos, los que finalmente son degradados por la acilglicerol lipasa (31). HSL está sujeta a una estrecha regulación, se activa por fosforilación controlada por proteína cinasa A, la cual a su vez es activada por AMPc (por sus siglas en inglés *cyclic adenosine monophosphate*) (28).

La lipólisis se verá así estimulada por hormonas que provoquen la activación de proteínas G estimuladoras y, por tanto, a través de adenilato ciclasa, inducirán la formación de AMPc evento similar al observado por la unión de catecolaminas a receptores tipo β -adrenérgicos (28).

Por el contrario, la lipólisis es inhibida por hormonas cuyo receptor se asocia a adenilato ciclasa a través de proteínas G inhibitorias. Entonces, la mayor o menor acumulación de grasa en unas u otras zonas del organismo está determinada por variaciones regionales en el equilibrio entre la movilización o el almacenamiento de lípidos (33). En este sentido, el desarrollo de complicaciones metabólicas y cardiovasculares podría resultar de diferencias regionales en la lipólisis de grasa visceral y subcutánea. La localización regional de este tipo de grasa es más marcada en personas con obesidad abdominal, responsable de alteraciones metabólicas hepáticas y que finalmente conducen a hipertriacilgliceridemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (29).

1.6 Tejido adiposo

El tejido adiposo (TA) es la reserva energética principal del cuerpo. El TA tiene su origen y desarrollo mesodérmico y se encuentra distribuido en distintos sitios del organismo: a nivel subcutáneo (cervical, craneal, facial, supraclavicular, glúteo y abdominal), retro-orbital, paravertebral, pericárdico, omental, retroperitoneal, visceral y perigonadal (31).

El adipocito representa la unidad básica del TA, constituyendo entre uno y dos tercios del mismo (32). El resto del tejido está formado por células sanguíneas, endoteliales, fibroblastos y células mesenquimales (31).

El crecimiento del tejido adiposo puede ser por incremento del tamaño o de la formación de nuevos adipocitos, esto es la base para la clasificación de la obesidad como hipertrófica e hiperplásica. La obesidad hipertrófica propia del adulto, se caracteriza por la acumulación de una gran cantidad de lípidos en los adipocitos, sin un concomitante aumento en el número de células (26).

Por el contrario, la obesidad hiperplásica corresponde a una forma clínica de larga duración en la que es mayor tanto el número de adipocitos como la cantidad de grasa que contienen. En esta situación, los individuos tienden a ser obesos desde niños y a tener una ganancia importante de peso durante la adolescencia (32).

La prevalencia de la obesidad se ha multiplicado por más de dos entre 1980 y 2014. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2014 más de 1,900 millones de adultos de 18 años de edad o más presentan sobrepeso y obesidad. En general, alrededor del 13% de la población adulta a nivel mundial (11% de los hombres y 15% de las mujeres) son obesos (33).

En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012), reveló que existe un 38.8% de sobrepeso y un 32.4% de personas tienen obesidad; 37.5% son mujeres y un 26.8% hombres (34).

Existen factores de riesgo íntimamente ligados a un exceso de tejido adiposo, en particular a una distribución corporal específica del mismo. Su patrón fenotípico habitual es la hipertriacilgliceridemia preprandial, la hiperlipidemia postprandial, el aumento real en la producción de partículas densas y pequeñas de LDL-colesterol, así como la baja producción de colesterol HDL-colesterol (33).

Cuando se presenta un descontrol en la ingesta de alimentos tales como los carbohidratos y las grasas saturadas, las vías metabólicas se afectan y el organismo inicialmente trata de compensar el desbalance, no obstante, si el incremento de los glúcidos y los ácidos grasos persiste, estos se acumulan en los adipocitos (33).

1.6.1 Tipos de tejido adiposo

En mamíferos el TA está compuesto por tres tipos de tejido adiposo: blanco (WAT), marrón o pardo (BAT) y beige, que presentan diferencias en cuanto a su morfología celular, distribución corporal, genes y función (Cuadro 1) (31).

Recientes estudios han indicado la presencia de los adipocitos rosa y el azul. En el caso del adipocito rosa, se encuentra en las células secretoras de leche, denominado de esta forma en referencia a su existencia exclusiva en glándulas mamarias durante la etapa de lactación en los mamíferos hembras, y a la coloración rosada de estos órganos con tinciones comunes. Por su parte el adipocito azul, se expresa en las células estrelladas hepáticas (34).

Cuadro 2. Diferencias entre adipocitos marrón, blanco y beige.

| | Marrón | Blanco | Beige |
|--|--|---|---|
| Localización | Interescapular, perirrenal, axilar y paravertebral | Subcutánea: craneal, facial, intra abdominal; mesentérica, retroperitoneal, otros sitios; inguinal, gluteal | Dentro WAT inguinal |
| Morfología | Pequeñas gotas de lípidos | Grandes gotas de lípidos | Múltiples pequeñas gotas uniloculares de lípidos |
| Función | Termogénesis | Almacén de energía en forma de triacilglicéridos | Termogénesis |
| Presencia de mitocondrias | Positivo | Positivo | Post-estimulación (++) |
| Marcadores | UCP1, PDK4 | Resistina, LPL | TBX1 |
| Vascularización/Capilares | Abundante | Bajo | Estimulación al frío da aumento de la angiogénesis |
| UCP1 | (+++) | Casi indetectables | Tras la estimulación (abundante) |
| Alfa-, receptores β adrenérgicos | $\beta 3$ (+++) | $\beta 3$, $\alpha 2$ | $\beta 3$, $\alpha 2$ |
| Relación con obesidad | Negativo | Positivo | Negativo |
| Correlación con la resistencia a la insulina | Negativo | Positivo | Negativo |
| Activadores | Hormonas tiroideas, tiazolidinedionas, FGF21 | Dieta alta en grasa | Calor, péptido natriurético, FGF21, irisina, catecolaminas, (agonistas de los receptores beta-adrenérgicos) tiazolidinedionas |

Modificado de Park A et al. Distinguishing white, beige and brown adipocytes. **UCP-1**(proteína desacopladora 1), **PDK4** (piruvato deshidrogenasa cinasa 4), **LPL** (lipoteinlipasa), **TBX1** (factor de transcripción T1) (**$\alpha 2$** , **$\beta 3$** (receptor beta3 adrenérgico y alfa 2), **FGF21** (factorfibroblasto de crecimiento 21) (31)

1.6.2 Tejido adiposo blanco (WAT)

Se caracteriza por tener forma esférica y ser unilocular, es decir, contiene una sola y voluminosa vacuola de grasa, que abarca la mayor parte de su citoplasma y el núcleo. El WAT es encargado del almacenamiento de ácidos grasos esterificados a glicerol en forma de TAG (32). Es el principal efector de los procesos de lipogénesis y lipólisis, regulado por diversos agentes hormonales como la leptina (36).

El WAT es la reserva tisular de energía y el TA más abundante, se localiza en todo el cuerpo y se subdivide, en visceral y subcutáneo. El tejido visceral está relacionado positivamente con el riesgo de desarrollar resistencia a la insulina; a su vez es considerado como el principal sitio de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos aunque actualmente este tejido es conocido también como un órgano endocrino que participa en la regulación del metabolismo energético y la expresión de citocinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-8, MCP-1 (37).

La función principal del WAT es mantener la homeostasis de la energía, almacenar los ácidos grasos en forma de depósitos de triacilglicéridos y de esta forma atenuar el efecto deletéreo de los ácidos grasos circulantes y evitar la formación de depósitos ectópicos lipídicos y complicaciones metabólicas (37).

La absorción de triacilglicéridos en el WAT está mediada por la lipoproteína lipasa, que se une al endotelio vascular a través de proteoglicanos en sus sitios activos ubicados en la superficie luminal de los vasos sanguíneos, lo que les permite hidrolizar triglicéridos para ser movilizados y utilizados en el almacenamiento celular (38).

El acúmulo excesivo de adipocitos del tejido WAT se asocia con riesgos cardiovasculares y metabólicos, produciendo inflamación por la liberación de citocinas pro-inflamatorias con actividad secretora de TNF- α , IL-8 y proteína C-reactiva principalmente caracterizadas por la actividad de las citocinas proinflamatoria como TNF- α , IL- 8, proteína C-reactiva principalmente (39).

1.6.3 Tejido adiposo marrón o pardo (BAT)

El BAT, en contraste con el WAT, está formado por adipocitos marrones que son células progenitoras, con múltiples y pequeñas gotas lipídicas (multilocular). Se encuentra localizado en la región cervical, supraclavicular, paravertebral, mesentérica, para-aórtica y suprarrenal (40).

La mayoría de las células de grasa marrón se originan a partir de células precursoras en el mesodermo embrionario que también dan lugar a células del músculo esquelético y a una subpoblación de los adipocitos blancos (38).

El BAT se caracteriza por expresar la proteínas UCP-1 por sus siglas en inglés *uncoupling protein 1* (40). La cantidad de BAT depende directamente de la exposición al frío y el ejercicio, por ello se considera termogénico; el sistema nervioso central produce catecolaminas y orexina, ambos potentes activadores del desarrollo de grasa marrón, de ahí su relación con la función termogénica (41).

Su importancia en la termogénesis; como respuesta protectora contra la obesidad, tiende a disminuir a medida que aumenta la edad y el índice de masa corporal (IMC) (40). Los adipocitos marrones pueden aparecer después de un estímulo termogénico en sitios anatómicos correspondientes al tejido adiposo blanco, a este proceso se le conoce como el "oscurecimiento o pardeamiento" de WAT (41).

El tejido marrón posee una función metabólica, la cual se encarga de la oxidación de lípidos para la producción de calor; esta función se debe a la gran cantidad de mitocondrias y proteínas UCP-1 que poseen los adipocitos marrones, dando como resultado un aumento en la actividad de la cadena respiratoria y por ende en la producción de energía (43).

Además de su función en la termogénesis, recientes estudios han demostrado que el BAT pudiera estar implicado en el metabolismo de los lípidos, glúcidos y en la liberación adipocinas, por lo que posee una distinta función inflamatoria comparada con el WAT (44).

El equilibrio entre las áreas blancas y pardas puede verse modificado en respuesta a distintos factores tales como el frío, el calor, la obesidad y la edad, entre otros. Así, los individuos con menores depósitos de BAT son más susceptibles a acumular tejido adiposo blanco, aumentar su peso corporal y presentar mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas y cardiovasculares asociadas a dicha obesidad (44).

1.6.4 Tejido adiposo beige

Los adipocitos marrones que aparecen en WAT son a menudo llamados "inducible, beige o brite." estas células beige se asemejan a las células de grasa blanca en el estado basal, pero responden a estímulos termogénicos y aumento de las tasas de respiración (43).

El desarrollo de las células beige provenientes de la termogénesis del WAT, como respuesta a estímulos como las bajas temperaturas y ejercicio; se correlaciona con un adecuado metabolismo en general, mayor gasto energético, mejoramiento en la sensibilidad a la insulina y pérdida de peso (45, 46).

El tejido beige confiere beneficios metabólicos, como es el aumento de los factores que intervienen en el pardeamiento del tejido adiposo, incluyendo UCP-1, PPAR y co-activador 1- α (PGC-1 α). El perfil termogénico de los adipocitos de color beige es reversible. Los adipocitos beige adquiridos en el WAT durante la exposición al frío pierden la expresión de UCP1 y se conservan después del movimiento. El cambio de adipocitos beige interviene en la termorregulación al igual que el BAT, en la homeostasis de energía y pérdida de peso (44).

1.6.5 Tejido adiposo rosa

De reciente hallazgo, denominado rosa por la coloración del tejido adiposo con tinciones comunes de hematoxilina y eosina (45). En la descripción original, el tejido adiposo rosa se localizó en los depósitos de grasa subcutánea mamaria del ratón durante el embarazo y la lactancia. Los adipocitos rosas se consideran como reservorio graso cuya función es actuar como sustrato a la producción de leche. Se

propuso que estos adipocitos derivan de la transdiferenciación de los adipocitos blancos subcutáneos (47).

El tejido adiposo rosa es productor de leptina, y esta hormona favorece la proliferación del epitelio mamario previniendo la obesidad (47).

1.6.6 Tejido adiposo azul, célula estrellada hepática (CEH) ¿Un quinto tipo de adipocitos?

Al igual que el tejido adiposo rosa, es de recién hallazgo en el ratón y tiene un origen embriológico. Tiene la capacidad de expresar un fenotipo dual. El primer fenotipo es el quiescente, estado fisiológico de estas células, en el que poseen múltiples vesículas (multilocular) que contiene vitamina A y El segundo fenotipo es el llamado de activación, y se constituye en una célula altamente fibrogénica a nivel hepático (46).

Las hormonas que se expresan en CEH son adiponectina, resistina así como IL-1 y 5 en esteatosis hepática no alcohólica y fibrosis (47, 48).

1.7 Tejido adiposo como órgano endocrino

El tejido adiposo no sólo es un órgano almacenador de energía, sino que también sintetiza un gran número de proteínas con función para, endo y autocrina. Controla diversas funciones relacionadas con el metabolismo. A estas proteínas se les conoce como adipocinas e incluyen leptina, adiponectina, resistina, proteína estimuladora de acilación (ASP) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), asociadas a saciedad, regulación de la insulina y disminución del glucagón (Cuadro 2) (49).

Cuadro 3. Factores expresados por el tejido adiposo.

| Factor secretado | Función | Órgano excretor |
|--|--|--|
| Leptina | Hormona de sensación de saciedad. Mecanismo de acción a través de receptores transmembrana acoplados a proteína sinasa dependiente de 5'-AMP (AMPK). | Adipocito, placenta, músculo esquelético, estómago e intestino |
| Adiponectina | Hormona que actúa a través de dos receptores: AdipoR1, específico de músculo estriado, y; AdipoR2, expresado en hígado. Activa al receptor nuclear hepático PPAR- γ . Disminuye glucogenólisis hepática y oxidación de ácidos grasos, conlleva a mayor sensibilidad a insulina. | Adipocito |
| Resistina | Hormona involucrada en la resistencia a la insulina debido a aumento en la producción de glucosa a nivel hepático, antagoniza la captura de glucosa en adipocitos, e inhibe la diferenciación de mioblastos. | Adipocito |
| Proteína estimuladora de acilación (ASP) | Potente esterificador de ácidos grasos. Aumenta su captación e inhibe a la lipasa sensible a hormona. Produce aumento en la liberación de insulina en células beta. | Adipocito |
| Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) | Disminuye captación de ácidos grasos no esterificados por el adipocito generando aumento de ácidos grasos en circulación. Efectos negativos sobre el receptor de insulina (genera resistencia). De manera paracrina y autocrina modifica la expresión de otras adiponectinas como leptina. | Adipocito |
| Interleucina 6 (IL-6) | Expresión mayor en pacientes obesos, hasta 30% del total de circulante. En estos pacientes, ésta proviene del tejido adiposo. Aumenta la lipólisis y oxidación de grasas; también se relaciona con resistencia a la insulina. | Macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, e incluso el músculo esquelético |

Factores expresado por tejido adiposo, (49).

1.8 Tejido adiposo y su relación con la hormona Irisina

La irisina es una adipocina, se origina a partir del producto del gen FNDC5 antes de ser liberado en la circulación, se encuentra regulada por el proliferador de receptor-coactivador-1 (PGC1) relacionado con la regulación del metabolismo de energía mediante de inducción de pardeamiento del WAT, aumentando los niveles de la proteína desacoplante 1 (UCP1) (50-53).

La formación de irisina parece estar influenciada por la relación de tejido adiposo, musculo y niveles de glucosa plasmática en ayuno. Un artículo reciente de Parque *et al.*, mostró que las concentraciones bajas de irisina también se asocian con signos del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina. Por lo tanto la disminución de la concentración circulante de la hormona se relaciona significativamente con la resistencia a la insulina, obesidad y alteración del metabolismo de los lípidos (53-54).

Se han conducido diversos experimentos con la irisina en ratones, donde se ha observado que períodos cortos de ejercicio aumentan las concentraciones de irisina en sangre. Sin embargo, en ratones obesos se observó una sobreexpresión del gen FNDC5, lo que puede significar que se produzca resistencia a la hormona como sucede con la insulina o la leptina, fenómeno que también se observa en humanos. Con base en otros experimentos en humanos se ha visto que las concentraciones de irisina disminuyen en condiciones de diabetes, pero aumentan en condiciones de obesidad (53, 55).

1.9 Estudios sobre el efecto de edulcorantes artificiales

Neurosci et al., donde evaluaron el aumento de la ingesta de calorías y el incremento de peso corporal en un modelo murino, al primer grupo se les dio de comer yogurt bajo en grasa mezclado con sacarina, al segundo grupo se les dio yogurt mezclado con acesulfame K y al tercer grupo yogurt con sacarosa. Como resultado se obtuvo que los efectos en la ingesta de energía y la ganancia de peso corporal fue similar en los grupo de acesulfame K y sacarina. Los resultados de

estos experimentos mostraron un aumento notable en la ganancia de peso expuestas por primera vez a una dieta endulzada con glucosa ganan peso adicional cuando posteriormente se exponen a una dieta endulzada con edulcorantes no calóricos (56).

Stephen *et al.*, estudiaron el efecto del consumo de bebidas endulzadas con estevia (290 kcal), aspartame (290 kcal) y sacarosa (493 kcal) en la ingesta de alimento, saciedad y niveles de glucosa e insulina postprandial en 31 personas, 19 de ellas con IMC normal y 12 con IMC superior a 30, completaron tres días de prueba de alimentos durante los cuales recibieron precargas que contienen estevia (290 kcal), aspartamo (290 kcal)) o sacarosa (493 kcal) antes de la comida del almuerzo y la cena. El orden de precarga fue equilibrado, y la ingesta de alimentos (kcal) se calculó directamente. Los niveles de hambre y saciedad se informaron antes y después de las comidas, y cada hora a lo largo de la tarde. Los consumidores de estevia no ingirieron más calorías en comidas y cenas; en el caso de los de aspartame frente al grupo que consumió sacarosa mostró un menor nivel de saciedad. En ningún grupo se presentaron alteraciones en los niveles de glucosa e insulina postprandial (57).

Polyák *et al.* (2010), administraron sacarina, ciclamato, acesulfame-K y aspartame vs. un grupo control que solamente recibió agua. Se determinaron aumentos de peso en hembras suplementadas con sacarina ($p=0.0495$) y en machos que hubieron consumido ciclamato y sacarina mientras que la ingesta de alimento fue similar entre grupos. En cuanto al consumo a corto plazo de sucralosa comparado con el consumo de agua y sacarosa (58).

Brow Aw *et al.*, (2011) evaluaron el efecto en la homeostasis de la glucosa y el peso en 8 mujeres (media IMC 22.16 ± 1.71 kg/m²; edad de 21.75 ± 2.25 años). En muestras de sangre en ayunas y 30, 60, 90 y 120 min después de romper el ayuno mostraron diferencias significativas en las concentraciones de insulina, glucosa y acilación de grelina a lo largo del tiempo entre tratamientos que contenían

sacarosa y sucralosa, sin detectarse diferencias en triglicéridos ni glucagón entre los tratamientos (59).

Entre 477 niños de 18 meses a 4 años de edad Ruyter et al. (2012) compararon el efecto en el consumo de bebidas endulzadas con sacarosa, sucralosa y acesulfame K. Posterior a 6 meses el grupo ENC mostró un incremento promedio de peso (6.35 kg) menor en comparación con el grupo sacarosa (7.37 kg) e igualmente en cuanto al grosor de los pliegues cutáneos. El grupo ENC ganó en promedio 1,47 kg de grasa corporal mientras que en el grupo sacarosa fue de 1.82 kg (60).

De Matos F. et al. (2013), determinaron el efecto de la sacarina y aspartame vs. sacarosa en cuanto a ganancia de peso corporal e ingesta calórica en ratas Wistar macho. Éstas recibieron yogurt natural endulzado alternativamente con sacarosa 20%, sacarina 0.3% y aspartame 0.4% durante 12 semanas. Los grupos suplementados con sacarina y aspartame incrementaron considerablemente más el peso (175.31 ± 6.47 gr y 164.28 ± 10.65 gr, respectivamente), en comparación con sacarosa (137.37 ± 5.51 gr) aunque la ingesta calórica total fue similar entre todos los grupos (61).

Mitsutomi K *et al.*, examinaron el impacto de la exposición a una combinación de ENC (99% eritritol y aspartame al 1%) en ratones C57BL / 6 con obesidad inducida por la dieta. Informaron que hubo mayor acumulo de tejido adiposo blanco en epidídimo en el grupo expuesto a eritritol y aspartame (62).

En humanos, Olivier *et al.*, realizaron un meta-análisis de la literatura en cuanto a posibles beneficios nutricionales y riesgos relacionados al consumo de productos elaborados a base de edulcorantes no calóricos. Como resultados se encontró escasos datos que indicaran beneficios nutricionales por el consumo de aspartame, sacarina, acesulfame k como son: el control de peso y regulación de glucosa en sangre en pacientes con diabetes tipo 2. La relación entre el consumo

de edulcorantes y cambio en el peso corporal o masa grasa, se indicó un ligero aumento en la media del IMC (+0.03 kg/m²). No obstante hoy en día los riesgos nutricionales por consumo de edulcorantes como la incidencia de diabetes tipo 2, se relacionan con el desarrollo de cáncer, lo que ponen en relieve la necesidad urgente de mejorar el conocimiento entre los posibles vínculos en el consumo de edulcorantes no calóricos y el riesgo de desarrollar alguna otra patología de tipo cardiovascular (63).

Peters *et al.*, evaluaron los efectos del consumo de agua en comparación con las bebidas endulzadas con aspartame—Nutra Sweet, sucralose—Splenda y estevia—Truvia V sobre el peso corporal en los sujetos inscritos en un programa de tratamiento de pérdida de peso durante un año. El estudio utilizó un diseño aleatorizado en 303 personas de peso estable, sobrepeso y obesidad. Se les asignaron 710 ml de agua y bebidas con edulcorantes para consumo diario durante 1 año. Como resultado se obtuvo que en el grupo que bebió ENC mostró mayor pérdida de peso al final de 1 año. Sin embargo en el perfil de lípidos se mantuvo sin cambios LDL mg/dL 122.45 ± 125.59, triacilglicéridos mg/dL 182.45 ± 195.67. Este ensayo clínico aleatorizado proporciona evidencia de que las bebidas con ENC pueden ser una herramienta eficaz para ayudar en la pérdida de peso, sin embargo para el control metabólico son una herramienta ineficaz (64).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la información existente se menciona que los problemas que conllevan a la obesidad, han sido objeto de estudio privilegiado para la teoría. Mientras tanto, aspectos como el consumo crónico y deliberado de productos con ENC han sido abordados en menor medida.

El uso de los ENC se han utilizado como medidas nutricionales de restricción energética, para los pacientes con diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, sobrepeso y obesidad, en las últimas ddécadas, el aumento en el consumo de estos aditivos ya no es sólo por pacientes con alguna enfermedad crónica degenerativa, sino también por la población en general.

No obstante, se debe mencionar que los ENC han sido estudiados en términos de sus posibles beneficios para el control de la cifras de glucosa y peso corporal. Varios estudios han sugerido que ENC tienen efectos específicos sobre el metabolismo como la reducción de la hiperglucemia postprandial y resistencia a la insulina. Sin embargo, los efectos detallados de ENC sobre la adiposidad corporal y el metabolismo de la energía no han sido completamente aclarados.

En este sentido, es necesario seguir explorando nuevas estrategias para el tratamiento de obesidad y enfermedades crónico degenerativas. Así mismo es oportuno conocer el efecto de los ENC en la distribución del tejido adiposo. Debido que la obesidad y el sobrepeso han alcanzado proporciones epidémicas tanto en países industrializados como en desarrollo, situación que conducen a importantes riesgos para la salud como diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) menciona que en 2014 más de 1,900 millones de adultos mayores de 18 años tenían sobrepeso. De estos más de 600 millones eran obesos. A nivel mundial, en 2014 alrededor del 13% de la población adulta (11% de hombres y 15% de mujeres) eran obesos. En 2014, el 39% de los adultos hombres y mujeres presentaron sobrepeso. La prevalencia mundial de la obesidad se ha multiplicado entre 1980 y 2014 (33).

Su papel fisiológico esencial en numerosos tejidos queda por establecer, debido a que se conoce poco acerca de los efectos en la modificación de la histomorfología del tejido adiposo, que se origina por un consumo crónico de estos, por lo que se necesita que se realicen investigaciones para establecer una regulación en su consumo.

Es por ello que se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la suplementación de edulcorantes naturales y artificiales Sobre el perfil histomorfológico y la distribución corporal del tejido adiposo en ratones BALB/c?

III. HIPOTESIS

H. nula:

El perfil histomorfológico y distribución corporal del tejido adiposo en ratones BALB/c, mostrará considerables y complejas modificaciones como resultado del consumo crónico de edulcorantes artificiales vs edulcorantes naturales y agua.

H. alterna: El perfil histomorfológico y distribución corporal del tejido adiposo en ratones BALB/c, no mostrará considerables y complejas modificaciones como resultado del consumo crónico de edulcorantes artificiales vs edulcorantes naturales y agua.

IV. OBJETIVOS

General

Determinar la histomorfología y la distribución corporal del tejido adiposo en diversas cavidades corporales en respuesta al consumo crónico de los edulcorantes naturales y artificiales en el ratón BALB/c.

Específicos:

- Cuantificar el consumo de alimento y edulcorante en ratones BALB/c según en los grupos de tratamiento con consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Determinar el cambio de peso corporal de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Comparar la composición corporal de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Medir nivel de glucosa en ayuno de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Cuantificar la grasa de las cavidades: mesentérica, inguinal y gonadal de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Observar la histomorfología del tejido adiposo de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.
- Determinar niveles de irisina y perfil de lípidos en sangre de ratones BALB/c según consumo crónico de sacarosa, aspartame, estevia y sucralosa comparado con el grupo control.

V. JUSTIFICACIÓN

En la sociedad moderna, el consumo de los sustitutos de azúcar o edulcorantes no calóricos ha ido en aumento, en un afán de reducir la ingesta de energía a través de los alimentos ricos en azúcares de tipo simple.

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SS2-2010, recomienda el consumo de los ENC, entre los más utilizados esta aspartame, sucralosa, estevia, sacarina, acesulfame de potasio, debido al bajo o nulo aporte energético que estos brindan.

La dosis que habitualmente se debe consumir debe ser en dosis pequeñas, tomando en cuenta que la dosis recomendada va de acuerdo a lo sugerido por instituciones nacionales e internacionales.

A pesar de que los ECN son conocidos como metabólicamente inertes al organismo, estudios recientes sugieren que estos producen efectos fisiológicos en el apetito, metabolismo de la glucosa, esto a través del descubrimiento que al igual que el azúcar, activan los receptores de dulzor T1R2, T1R3, localizados en diferentes órganos como son las papilas gustativas, cerebro, páncreas, células entero-endocrinas, tracto gastrointestinal, entre otros.

En estudios previos los ENC, son asociados a efectos metabólicos adversos, como la ganancia de peso, síndrome metabólico y diabetes por ejemplo; sin embargo no se han podido demostrar la causalidad de estos efectos.

Se ha estudiado en menor medida el efecto que estos ENC en la cantidad de tejido adiposo sobretodo en la parte visceral, esto resalta la importancia del sitio de distribución y la alteración funcional del tejido adiposo en el incremento el riesgo cardiovascular asociado a la obesidad. Los individuos con distribución central o visceral de tejido adiposo presentan mayor riesgo de mortalidad general, comparados con aquellos con distribución periférica o subcutánea.

A pesar de la amplia utilización de estos ECN, es importante enfatizar en la información acerca del metabolismo del tejido adiposo y su distribución asociados a su consumo crónico.

En este proyecto se estudió en un modelo experimental en un modelo murino, si el consumo crónico de edulcorantes tipo ENC modificó la cantidad, distribución y tipo de tejido adiposo. Realizando una valoración cualitativa y semi-cuantitativamente de la distribución del tejido adiposo resultante del consumo crónico de ENC.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS:

6.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo y comparativo

6.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación.

Criterios de inclusión: Ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad, con un peso de entre 20 y 23g.

Criterios de exclusión: Ratones que al inicio del estudio se encuentren enfermos o por debajo del peso indicado.

Criterios de eliminación: Ratones que desarrollen alguna enfermedad o mueran durante el estudio.

Universo de trabajo: Ratones machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad.

Método de muestreo: No probabilístico, por conveniencia.

Tamaño de muestra: 40 ratones machos de la cepa BALB/c machos de 8 semanas de edad.

El tratamiento se realizó durante 6 semanas consecutivas a partir de las 8 semanas de edad.

Los grupos experimentales se conformaron de la siguiente manera:

- Control Control (agua): 8 ratones
- Grupo Sacarosa: 8 ratones
- Grupo Aspartame (Edulcorante Artificial): 8 ratones
- Grupo Estevia (Edulcorante Natural): 8 ratones
- Grupo Sucralosa (Edulcorante Artificial): 8 ratones

Para el grupo sacarosa se utilizó una concentración del 10% en 100 mL de agua y para los grupos de sucralosa, estevia y aspartame, una concentración del 1% por 100 mL de agua.

La concentración de cada una de las soluciones edulcoradas tuvo la finalidad de equiparar el sabor dulce entre los grupos de estudio y proporcionar una cantidad similar de edulcorante a la que utilizan habitualmente los seres humanos.

Características de la dieta

La dieta que se administró de manera *ad libitum* durante el tratamiento experimental corresponde LabDiet 5001, con una distribución de macronutrientes:

| | |
|---------------------------------|--------------|
| Hidratos de carbono..... | 56.4% |
| Proteína..... | 29.8% |
| Grasa..... | 13.4% |
| Fibra..... | 5% |

6.3 Procedimiento experimental:

El estudio se efectuó en el Laboratorio de Neuroquímica de las instalaciones de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Animales y dieta

Se utilizó un modelo animal de 40 ratones machos BALB/c de seis semanas de edad, en la semana tres de edad, los animales recibieron un periodo de aclimatación con una duración de tres semanas, posteriormente se colocaron en cajas, fueron criados bajo condiciones de temperatura regulada de 22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas, con agua y acceso al alimento de manera *ad libitum* (LabDiet 5001®).

Después del periodo de aclimatación en la semana seis, los animales se separaron de forma aleatoria en grupos experimentales, se formaron cinco grupos experimentales, a) grupo control (agua), b) sacarosa c) aspartame, d) sucralosa y

e) estevia; se administró el tratamiento durante seis semanas consecutivas a partir de las ocho semanas de edad.

Para el grupo con sacarosa se administró una concentración del 10 % por 100 mL de agua. Para los grupos de aspartame, sucralosa y estevia en sus presentaciones comerciales, se utilizó una concentración del 1 % por 100 mL de agua. La concentración a utilizarse de cada una de las soluciones con edulcorantes tuvo la finalidad de equiparar el sabor dulce entre los grupos de estudio y proporcionar una cantidad similar de edulcorante a la que utilizan habitualmente los seres humanos.

Consumo de alimento y edulcorante

Se pesó el alimento y se calculó el consumo total restando la cantidad obtenida a la cantidad ofrecida diariamente, luego se reponía el alimento y se depositaba en el contenedor. Finalmente, se registró el consumo de bebida restando la cantidad marcada en el bebedero al líquido disponible, después se volvía a reponer la cantidad señalada y los bebederos eran sellados y colocados en su espacio dentro de la caja.

Para calcular las calorías consumidas por día en la bebida con sacarosa (10%, 40 kcal/100 ml), se realizó la conversión y se obtuvo que por cada 1 ml proporciona 0.4 kcal por día. Los ENC se diluyeron cada uno al 1% de sus presentaciones comerciales para consumo humano (58-62). El agua y las soluciones compuestas por edulcorantes no calóricos no proporcionaron energía.

Peso corporal.

Todos los grupos experimentales se distribuyeron aleatoriamente de forma que los pesos entre ellos no presentaron una diferencia mayor a una desviación estándar. Para controlar el peso se realizaron pesajes semanales a la misma hora con una báscula eléctrica báscula eléctrica Rhino® (ADIVIR1661).

Composición corporal.

Se determinó la composición corporal (agua corporal total, líquido extra e intra celular, masa muscular, masa grasa e IMC) de los ratones de cada grupo con un equipo *Impedivet BIS1*®. Se colocaron cuatro electrodos distribuidos en puntos específicos en el ratón: a) en la punta de la nariz, b) trazando una intersección imaginaria de 2 cm de la punta de la nariz hacia la parte media de la cabeza, entre las orejas, c) en el punto donde comienza la cola del ratón, en medio de los muslos, d) dibujando una intersección imaginaria de 2 cm del punto c hacia la cola del ratón; bajo anestesia intraperitoneal. Se consideró un estado de ayuno de cuatro horas.

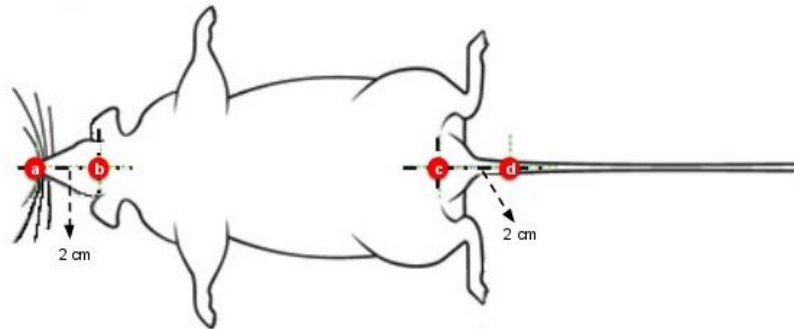


Figura 6. Colocación de electrodos *Impedivet vetB15*

Pruebas bioquímicas

Perfil de lípidos

Posterior a la extracción sanguínea del ventrículo derecho, se tomó una gota de sangre y se midió el perfil de lípidos (c-HDL, c-LDL, triacilglicéridos y colesterol total), utilizando los reactivos Spinreact® por el método químico espectrofotometría (anexo 10.1).

Glucosa sanguínea.

Se obtuvieron muestras de sangre por extracción de sangre del ventrículo izquierdo. Las muestras de sangre se tomaron antes del período de oscuridad en la semana seis de tratamiento. Las concentraciones de glucosa se determinaron utilizando los reactivos Glucose- TR, Trinder. GOD-POD de Spinreact® por el

método químico espectrofotometría. Los animales se sometieron a un ayuno de 4 horas previo a la toma de la muestra de sangre (anexos 10.1).

Cuantificación de Irisina

Posterior a la extracción sanguínea del ventrículo derecho, Las concentraciones de irisina se determinaron utilizando el KIT SK00170-01, de AVISCERA BIOSCIENCE® por el método químico ELISA (ver anexos).

Disección de grasa corporal por compartimiento.

Para la determinación de grasa corporal, los ratones se sacrificaron bajo anestesia intraperitoneal, se utilizó instrumentos de disecciones finos para la extracción del tejido adiposo adherida a la piel en lugares específicos como la cavidad inguinal, mesentérica y gonadal, se pesó en una báscula analítica.

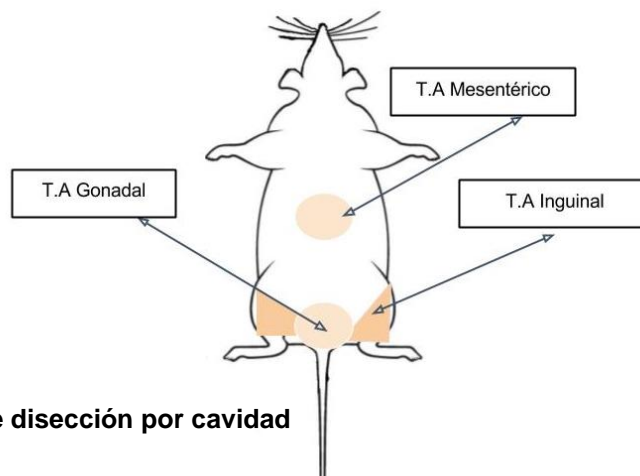


Figura 7. Regionalización de disección por cavidad

Volumen celular del tejido adiposo.

Se diseccionó tejido adiposo gonadal, inguinal y mesentérico, fijado en formaldehído al 10% y embebido en parafina; se obtuvieron secciones de 4 μm y se colocaron en portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina. Los porta-objetos se evaluaron en el microscopio Axiostar Carl-Zeiss®, se digitalizaron las fotos y se guardaron en formato (Tiff) fueron tomadas con el mismo balance de blancos con el software IScapture®.

Las imágenes fueron capturadas (cámara Tucson) a una ampliación total de 400X (marca microscopio). Cada zona de conteo o región de interés (200217.5 μm^2), abarcó aproximadamente la mitad de la superficie del corte sobre cada laminilla. Tomando en cuenta que las células adiposas son aproximadamente esféricas, se tomó el criterio de que la superficie celular de un adipocito en un corte de 5 μm es representativo del volumen total (volumen relativo) de la célula evaluada. Esto para todas las células y todas las cavidades. El número total de células es la sumatoria del número de células por rango de volúmenes relativos: 300-499 μm^2 , 600-7999 μm^2 y 8000-25000 μm^2 .

6.4 Operacionalización de variables

Independientes: Consumo de edulcorantes: aspartame, sucralosa y estevia

Dependientes: Consumo de alimento, peso corporal, composición corporal, glucosa sanguínea, perfil de lípidos, concentración de irisina, acumulación de tejido adiposo de las cavidades: inguinal, mesentérica y gonadal.

| VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERATIVA | TIPO DE VARIABLE | ESCALA DE MEDICIÓN |
|-------------------------|--|---|-----------------------|--------------------|
| INDEPENDIENTE | | | | |
| Consumo de edulcorantes | Fluido bebestible por los ratones de estudio | Promedio del consumo de edulcorante diluidos en agua por los ratones de estudio por semana: 1. Control Agua 2. Sacarosa 3. Aspartame 4. Sucralosa 5. Estevia | Cuantitativa continua | ml |
| DEPENDIENTE | | | | |
| Consumo de alimento | Alimento ingerido por los ratones de estudio | Promedio del consumo de alimento por los ratones de estudio por semana | Cuantitativa continua | g |
| Peso corporal | Suma de todos los componentes del organismo y representa la masa corporal total. | Monitoreo del peso corporal en los ratones de estudio por semana | Cuantitativa continua | g |
| Composición corporal | Método de fraccionamiento del peso o masa corporal en compartimentos (Agua corporal total, fluidos intra y extracelular, masa muscular, masa grasa y agua) | Determinación de la composición por un método de impedancia | Cuantitativa continua | % |
| Glucosa sanguínea | Monosacárido simple, principal sustrato metabólico intermediario metabólico importante en la respiración celular | Cuantificación de glucosa en sangre | Cuantitativa continua | mg / dL |
| Colesterol total | Molécula derivada de los esteroides, componente esencial de las membranas de las células animales y es esencial para el funcionamiento del organismo | Cuantificación de colesterol total en sangre | Cuantitativa continua | mg / dL |

| | | | | |
|----------------------------|---|--|--------------------------|-----------------|
| c-LDL | Lipoproteína de baja densidad, es el colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad | Cuantificación de c-LDL en sangre | Cuantitativa continua | mg / dL |
| c-HDL | Lipoproteína de alta densidad, transportador del colesterol de los tejidos periféricos al hígado | Cálculo de c-HDL por medio de la formula friedewald | Cuantitativa continua | mg / dL |
| Triacilglicéridos | Componente conformado por una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos | Cuantificación de triglicéridos en sangre | Cuantitativa continua | mg / dL |
| Irisina | Hormona secretada como producto de FNDC5 en el musculo esquelético | Cuantificación de la concentración de irisina en sangre | Cuantitativa continua | ng / dL |
| Tejido adiposo inguinal | Tejido conjuntivo conformado por la asociación de células que acumulan lípidos en su citoplasma localizado a nivel de la ingle | Cuantificación de tejido adiposo a nivel de la ingle | Cualitativa cuantitativa | mg |
| Tejido adiposo mesentérico | Tejido conjuntivo conformado por la asociación de células que acumulan lípidos en su citoplasma, localizado a nivel del mesenterio | Cuantificación de tejido adiposo a nivel del mesenterio | Cuantitativa continua | mg |
| Tejido adiposo gonadal | Tejido conjuntivo conformado por la asociación de células que acumulan lípidos en su citoplasma, localizado a nivel de las gónadas masculinas | Cuantificación de tejido adiposo a nivel de las gónadas masculinas | Cuantitativa continua | mg |
| Volumen celular | Cantidad de tejido adiposo que se encuentra en μm^2 | Cuantificación del volumen celular presente en el tejido adiposo | Cuantitativa continua | μm^2 |

6.5 Implicaciones Bioéticas

El mantenimiento y cuidado de cada animal se realizó bajo la supervisión directa del responsable de este proyecto. Se permitió el crecimiento, maduración, reproducción y comportamiento normal de los animales. El responsable de esta investigación vigiló el cumplimiento de las medidas de seguridad para el cuidado y manejo de los animales como lo señala las Guías del consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas para la Investigación Biomédica que involucre animales, Guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos de Norteamérica, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud en sus artículos 121- 125.- y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Bioseguridad

El manejo de los equipos en el laboratorio así como la disposición final de productos biológicos será determinado de acuerdo a las Normas: NORMA Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos; NOM-052-semarnat-2005, que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos; Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

6.6 Recolección de datos y análisis Estadístico

La base de datos se creó en Excel y el análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa SPSS versión 21, para Windows. Las variables estudiadas se describieron

por grupos utilizando la media y la desviación estándar. Se utilizó la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) para evaluar la distribución de las variables.

Para comprobar diferencias entre grupos en las variables se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias estadísticamente significativas, se realizaron comparaciones *post-hoc* mediante la prueba de Tukey's, se trabajó con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$).

VII. RESULTADOS

7.1 Título corto del artículo

**Non-nutritional sweeteners elicit varied, and complex but specific body responses
in Balb/c mice: weight, irisin, adipose tissue**

7.1.2 Página frontal del manuscrito

Non-nutritional sweeteners elicit varied, and complex but specific body responses in Balb/c mice: weight, irisin, adipose tissue

Authors

Betsy C. Sosa-García¹ Rigoberto Oros-Pantoja¹

Lourdes Basurto-Acevedo²

Gloria A. Otero¹ Keila Isaac-Olivé¹

F. Bernardo Pliego-Rivero^{1*}

*F. Bernardo Pliego-Rivero: correspondence author fpbr5555@gmail.com

¹ Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina P. Tollocan esq. J. Carranza (s/n), Toluca, Méx 50180, México

² Instituto Mexicano del Seguro Social, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Endocrinas, Centro Médico Nacional.

Conflict of interests: none

7.1.3 Carta de envío de artículo

Track your co-authored submission to Appetite

1 mensaje

Appetite <EvisSupport@elsevier.com>
Responder a: EvisSupport@elsevier.com
Para: sosabetsy@gmail.com

6 de diciembre de 2017, 7:35

Dear Miss Sosa-García,

Submission no: APPETITE_2017_1460

Submission title: Non-nutritional sweeteners elicit varied, and complex but specific body responses in Balb/c mice: weight, irisin, adipose tissue

Corresponding author: Dr F. Bernardo Pliego-Rivero

Listed co-author(s): Miss Betsy C. Sosa-García, Dr Gloria A Otero, Dr Lourdes Basurto, Dr Rigoberto Oros-Pantoja, Dr Keila Isaac-Olivé

Dr Pliego-Rivero has submitted a manuscript to Appetite and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evis.com/profile/api/navigate/APPETITE?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach01956663%23%2FAPPETITE%2Fsubmission%2FAPPETITE_2017_1460&email=sosabetsy@gmail.com&firstName=Betsy+C.&surname=Sosa-Garc%C3%ADa&country=Mexico&institution=Universidad+Aut%C3%B3noma+del+Estado+de+M%C3%A9xico-Facultad+de+Medicina&title=Miss

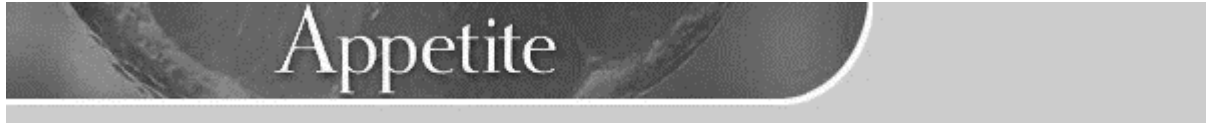
If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at:
<https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Appetite

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

<http://www.evis.com/co-author/#/APPETITE/unsubscribe/sosabetsy@gmail.com/pndo91BpBh13TFMqyStmYgBz2EEvPj7AmdKK9HhbaN2J4wFQHlkPmnf41W9NIOhF>



[Home](#) [Reports](#)

My Author Tasks

[Start New Submission](#)

[Click here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

Non-nutritional sweeteners elicit varied, and complex but specific body responses in Balb/c mice: weight, irisin, adipose tissue

Current status: With Editor  (05/Dec/2017)

APPETITE_2017_1460

Editor-in-Chief: Suzanne Higgs

Article Type: Full Length Article

Initial submission : 05/Dec/2017

7.1.4 Resumen

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por incremento de depósitos grasos conducente a alteraciones metabólicas y predisposición a trastornos cardiovasculares. Diversos tipos de edulcorantes no calóricos (ENC) se han comercializado con el objetivo disminuir el problema de obesidad. Estos, idealmente proporcionan sabor dulce sin calorías. Sin embargo persisten dudas sobre los riesgos y beneficios de su consumo crónico sobre la salud.

Por 6 semanas y diluidos en agua bebestible se proporcionó en su forma comercial para consumo humano aspartame, estevia, sucralosa y sacarosa (promedio 1-2 kcal/día/sujeto). Se compararon perfil histomorfológico y distribución corporal de tejido de adiposo, irisina, glucosa, parámetros corporales por bioimpedancia y ganancia de peso. Se formaron 5 grupos (n=8/grupo, ratones BALB/c machos): control (agua), sacarosa aspartame, estevia y sucralosa. Además de los parámetros arriba mencionados, por compartimiento corporal y tratamiento se determinó el perfil histomorfológico del tejido adiposo por masa, rangos de tamaños celulares (volumen celular relativo—Vr) y número de células por rango de Vr. Significativamente, todos los grupos experimentales 1) consumieron más alimento; 2) observaron ganancia de peso ($p < 0.03$). Hubo aumentos de grasa 3) gonadal en grupo estevia ($p < 0.0001$); 4) inguinal en grupo sucralosa; 5) y mesentérica en grupos estevia y sucralosa; 6) reducción de irisina en grupo sucralosa. Significativamente los grupos tratados con ENC o sacarosa presentaron incremento de peso corporal. El grupo sacarosa consumió considerablemente más alimento sin cambios metabólicos excepto ligero aumento de peso sin ningún otro cambio importante. Excepto aspartame, los ENC estevia y sucralosa sí indujeron cambios metabólicos importantes.

Palabras clave: *Edulcorantes no calóricos, obesidad, tejido adiposo.*

7.1.5 Abstract

Obesity is a chronic disease characterized by an increase of fatty deposits leading to heightened susceptibility towards cardiovascular and metabolic disorders. Different types of non-nutritional sweeteners (NNS) have been marketed in order to reduce the widespread issue of obesity. These ideally provide sweetness without calories, however, the doubts about the risks and benefits of NNS chronic consumption on human health have not been cleared. For 6 weeks and diluted in drinking water were provided aspartame, stevia, and sucralose in their commercial presentations for human consumption. An additional sucrose group (40 kcal/100 ml) was formed. The histomorphological profile and body distribution of adipose tissue, circulating irisin, plasma glucose, body weight gain and bioimpedance parameters were compared among 5 groups (control—water) by means of an experimental model of male BALB/c mice (n=8/group). The adipose tissue histomorphological profile was assessed by its mass, range of cell sizes (relative cell volume -Vr) and number of cells per size range. Significantly all experimental groups 1) consumed more food; 2) observed a similar increase of weight gain ($p < 0.03$). Fat mass increases per body compartment were determined 3) around the gonads in group Stevia ($p < 0.0001$); (4) in the inguinal compartment of group sucralose; (5) and mesenteric deposits in groups Stevia and sucralose, with; (6) reduction of circulating irisin in group sucralose. Varied, complex though specific metabolic changes were induced by individual sweetener and body compartment.

Key words: Non-nutritional sweeteners, adipocyte, adipose tissue, irisin

7.1.6 Introduction

WHO (World Health Organization) defines obesity as an increase of body weight due to the increase in body fat deposits. This is a multifactorial etiology, involving genetic, environmental and lifestyle influences, all resulting in an imbalance between the number of food calories ingested with respect to energy expenditure (WHO, 2014; Dobner et al., 2017; Tschop et al., 2012). Worldwide, the prevalence of overweight among adults over 18 years old is more than 1,900 million. In Mexico, the adult population over 20 years shows a combined prevalence of overweight and obesity of 72.5% while among women this is 75.6%, and 69.4% among men (ENSANUT, 2012)

The high consumption of sugary drinks, and foods, the latter also with a high content of fat and carbohydrates is associated to increasingly negative health consequences. Overweight and obesity frequently present themselves together with diabetes type 2, and metabolic syndrome. Among the nutritional strategies employed to fight obesity and its risks to health is the use of non-nutritional or non-caloric sweeteners (NNS / NCS). Their apparent and immediate outcome would be a restriction of energy intake present in the diet. Among the most commonly consumed NNS are aspartame, saccharin, acesulfame-K, sucralose, cyclamate, alitame and rebaudiosides and steviosides from *Stevia* sp. (Gardner et al., 2012).

The use of NNS has been regulated and assessed by a number of international committees such as SCF (Scientific Committee on Food), by FAO (Food and Agriculture Organization), this last one belonging to the United Nations (UN), among others. In Mexico the Secretary of Health regulates their use through the Federal Commission for the Protection Against Sanitary Risks (COFEPRIS - NOM-051-SCFISSA1-2010,) (Padmini et al., 2012; Secretaría de Economía, 2012; Fernstrom et al., 2015; Mayu et al., 2015; Calvo et al., 2015).

Recent studies have cast doubts on the benefits of NNS in the control of body weight, energy metabolism, and formation of body fat deposits. Fowler et al. (2008) documented the relationship between the intake of beverages sweetened with NNS (aspartame,

sucralose and saccharin) and a long term body weight change among men and women of normal BMI ($< 25 \text{ kg/m}^2$) or presenting obesity ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) for a period of 7-8 years. Among participants, among users of aspartame who had normal body weight or slight overweight at the beginning of the study, the risk of weight gain and accumulation of abdominal fat was significantly higher ($p < 0.0001$) compared to those who were not consuming it. Tey et al. (2017a,b), investigated the effects of aspartame and stevia consumption in comparison with sucrose in 10 healthy males of 26.2 years average age, 21.2 kg/m^2 BMI and 14.2% body fat. In terms of sweetness, they were given comparable drinks containing either aspartame, Stevia or sucrose (65 g) to be consumed at midmorning. Blood glucose was monitored every 5 min/24 hours to calculate average 24 h glucose, area under the curve (AUC) and incremental (iAUC) for glucose and glycemic variability. The concentration of blood glucose after sucrose ingestion reached its peak at 35 minutes. Beverages containing NNS led to an increase in glycemic index variability between drinks. This was higher with Stevia, followed by aspartame compared to sucrose intake. As for the average of 24 h glucose, iAUC and total along 23 h, and 24 h glucose AUC were not significantly different between treatments with sucrose and non-nutritive sweeteners. Anton et al. (2010) assessed the effect of Stevia, aspartame, and sucrose preloads in relation to food intake, satiety, and postprandial levels of glucose and insulin among 19 individuals with BMI: 20.0 - 24.9 and 12 individuals with BMI 30.0 - 39.9 of ages 18-50 years for 3 days. Hunger and satiety levels did not differ after ingestion of glucose preloads, while postprandial insulin levels were significantly lower upon ingesting Stevia in comparison with sucrose and aspartame ($p < 0.01$). Mitsutomi et al. (2014) examined the impact of exposure to a combination of non-nutritive sweeteners (99% erythritol— aspartame 1%) in C57BL / 6 mice with diet-induced obesity. They reported a greater accumulation of white adipose tissue in epididymis of the group exposed to erythritol and aspartame. In 4 groups of adult Sprague Dawley male rats the relationship between Splenda intake and the change of relative weight were investigated (Abou-Donia et al., 2008), The NNS doses (0.1 to 1 g/kg/day) were supplied through an oral probe oral probe for 12 weeks. Interestingly, the rats exposed to the lowest dose (0.1 g) gained significantly more weight compared to a control group supplied with water only. At higher doses

however there were no significant differences compared to group C. After 24 weeks discontinuation of Splenda supplementation, all groups previously exposed to the NNS continued gaining more weight compared to the experimental animals which had not been exposed. In another assay, with respect to sucralose, aspartame, acesulfame-K and saccharin intake by 301 adults (average age 41.8 ± 13.4 years; BMI 33.0 ± 9.1 kg/m²) Hedrick et al. (2017) examined the response to intake of NNS.

An average increase of BMI of 2.6 ± 1.2 kg / m² ($p = 0.02$) was found among consumers of sucralose compared to the other NNS without cardiometabolic changes between groups.

Polyak et al. (2010) analyzed the effects of saccharin, cyclamate, acesulfame-K and aspartame ingestion vs. a C group (water) in relation to weight changes among 30 female and 30 male CBA/CA mice. While feed intake was similar between groups, weight increases were determined among saccharin-supplemented females ($p = 0.0495$) and males having consumed cyclamate and saccharin. Brown et al. (2011) assessed the effect on glucose homeostasis and weight among 8 women (mean BMI 22.16 ± 1.71 kg/m² and; age 21.75 ± 2.25 years) in relation to short-term consumption of sucralose compared to drinking water with sucrose. Blood samples were taken at fasting and 30, 60, 90, and 120 min after breaking the fast. The presence of sucralose with or without sucrose appeared not to alter the bodily response to sucrose consumption. Only significant differences were found in insulin, glucose and acylated ghrelin concentrations in beverages containing or not sucrose independently of sucralose intake or not.

Among 477 children of ages 18 months to 4 years, Ruyter et al. (2012) compared the effect of drinking beverages sweetened with sucrose, sucralose or acesulfame-K. After 6 months the groups taking NNS showed in average a reduced weight increase (6.35 kg) in comparison with children taking sucrose (7.37 kg) and also in skinfold thickness. Children in group NNS reached on average 1.47 kg body fat while those drinking sucrose beverages accounted for 1.82 kg body fat. De Matos et al. (2013) determined the effect of saccharin and aspartame vs. sucrose in terms of body weight gain and caloric intake in

male Wistar rats. These received yogurt alternately sweetened with sucrose 20%, saccharin 0.3% and aspartame 0.4% for 12 weeks. The groups supplemented with saccharin and aspartame increased considerably more weight (175.31 ± 6.47 gr and 164.28 ± 10.65 gr, respectively), compared to sucrose (137.37 ± 5.51 g), although the total caloric intake was similar among all groups.

The above data are revealing against preconceived notions regarding NNS as inert substances contributing to reductions in body fat accumulation. The neuroendocrine response is not that simple. The metabolic control of energy intake and expenditure is very complex leading to a variety of bodily responses remaining to be explained. In this sense, our study was directed to directly analyze changes in adipose tissue deposits in inguinal, gonadal and mesenteric compartments as well as the histomorphology of adipocytes in a murine model (Balb/c) of NNS (aspartame, Stevia and sucralose) chronic consumption in their commercial presentations for human consumption.

7.17 Materials and methods

Animals, diet and experimental drinks

An experimental animal model of 40 male BALB/c mice of age 8 weeks old was used. From the age 3 weeks old, these were adapted to our laboratory conditions: regulated temperature (23 °C), and a 12-hour light-dark cycle. All had ad libitum access to food (LabDiet 5001) and experimental drinks. According to the sweeteners diluted in the supplied drinking water 5 groups were formed: a) control (water), b) sucrose (10%, 40 kcal/100 ml), c) aspartame, d) Stevia and e) sucralose. The NNS were each diluted at 1% from their commercial presentations for human consumption. From start, the weights of all animals did not differ by more than 1 standard deviation and the assay lasted 6 consecutive weeks until the age of 14 weeks.

At the beginning of each week of treatment all animals were weighed. Also were weighed the supplied and non-consumed food. Similarly the daily intake of sweetened water was determined after which the weekly consumption was calculated.

Determining body parameters

Body weight was recorded weekly at the same time (ADIVIR1661 electric scale). Prior to sacrifice at week 6, and end of the assay, all animals had a 4 hours fast. After sacrifice (250 mg sodium pentobarbital/kg body weight) blood samples were obtained by cardiac puncture from the left ventricle. Plasma glucose concentration was determined by the chemical method GOD-POD (glucose oxidase-peroxidase) (Spinreact, Spain), and body composition determined by bioimpedance (Impedivet BIS1) including: total body water, muscle mass; both extra and intracellular fluids, body mass index (BMI), and fat mass. In order to do this 4 electrodes were placed dorsally, subdermally and transverse to the long axis of the body in the next regions: nasal, upper part of the head (parietal bone), last lumbar vertebra rostral to the pelvic girdle and in the tail distally at 1 cm from start (sacrum).

Histomorphology of adipose tissue by body compartment

Fine dissecting instruments were used in order to extract the greatest amount of adipose tissue from the inguinal, gonadal and mesenteric body compartments. This was weighed in an analytical scale (Sartorius) and immediately fixed in 0.1% Zinc10% formaldehyde prepared freshly in PBS: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.24 g of KH₂PO₄ per litre of H₂O ultrapurified (Thermo Scientific), pH 7.4. Fixation was left run for 72 hr at 4 oC under gentle stirring. Afterwards the tissue was embedded in high purity and low molecular weight paraffin (Sigma-Aldrich, Mexico) without dehydration. For fixation alcohol and other solvents were avoided in order to preserve the lipid droplets. A fast hematoxylin (5 g Harris, 50 ml ethanol absolute, 100 g bottle sulfate ammonium, 100 g aluminum, 1 lt oxide of mercury and 3.5 g glacial acetic acid) and eosin (10 g eosin yellowish, 300 mL water double distilled, 2 lt 95% ethanol, 4 g phosphotungstic acid and 20 drops saturated lithium carbonate) staining diluted 1/10 in PBS was performed. Photographs (Tucson Chamber) of the sections were captured to a total magnification of 400 X (Carl-Zeiss, Axiostar). From each section, a total area of 200,217.5 μm^2 was documented for cell counts and volume analysis. This area comprised approximately half of the section surface on a slide. To evaluate cell volumes, we worked under the premise that each adipose cell is approximately spherical. Thus we applied the criterion that the cell surface ($\pi \cdot r^2$) of an adipocyte in a 5 μm section is very well representative of its total volume. This here we call relative volume (V_r) and is expressed in μm^2 . We analyzed 120 adipose tissue fields corresponding to 40 different animals, 3 body compartments (inguinal, gonadal and mesenteric) per subject and treatment (control, sucrose, aspartame, sucralose and Stevia). For this we used the Image-Pro-Plus 7 software (Media Cybernetics, USA) to perform quantitative and qualitative determinations. The cells were classified into three size ranges of V_r : 300-599; 600-7,999 and; 8,000-25,000 μm^2 . Each of these V_r ranges takes into account the intracellular accumulation of lipid droplets, from least to greatest. These values are within ranges (nL) already reported (Leonhardt et al., 1978).

Statistical analysis

A database was created in Excel and the statistical analysis conducted using the SPSS software, version 21. The studied variables were described by groups using mean and standard error of the mean. When applicable, the Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality in the distribution of variables. To establish statistically significant differences an analysis of variance (ANOVA) was applied and comparisons performed post-hoc applying the test of Tukey from a confidence level of 95% ($p < 0.05$).

Ethical considerations

This study was approved in advance by the Faculty of Medicine Bioethics Committee, State of Mexico Autonomous University. All procedures were conducted in accordance to international guidelines for the production, handling, care and use of laboratory animals and in agreement with the Norma Oficial Mexicana NOM-062ZOO-1999

7.1.8 Results

Consumption of food and sweetened beverages; final body weight attained

Regarding food consumption (Figure 1), noticeably group C (water) consumed less food from week 1, and this with a pattern of less variability: approximately the same amount of food was ingested weekly along the course of the experimental procedure. As for group sucrose, although there was no individual account of it, it is estimated that on average each mouse consumed daily between 0.18-0.28 kcal in the sucrose-containing drinking water. Together with the additional calories in the mixture water-sucrose, the amount of food consumed by group sucrose since week 1 was the largest, ranging from twice to more than triple the amount consumed by group C. Groups aspartame and stevia also consumed more food compared to group C, though showing a more variable pattern, and less than group sucrose. The highest variability in food ingestion was shown by group sucralose. Initially, at weeks 1 and 2 the quantity of food eaten was similar to group C, then the amount increased by weeks 3, 4, and 5, returning to initial magnitudes at the end of the trial.

With respect to the mean weekly volume of drinking fluid ingested (Figure 2), group C also showed a regular and stable pattern of water consumption along the 6 weeks of the experiment. The three NNS groups ingested considerably more fluid, in the range of twice that of groups C and sucrose, with group sucralose having slightly less. Sucrose drinkers showed a variable pattern though the amount tended to be similar to that of group C.

At the end of the assay, week 6, all groups having consumed sweeteners, either sucrose or NNS, showed increased weight ($p < 0.03$) with respect to group C (Figure 3). Group sucrose showed the highest weight gain with minimal though significant differences with groups aspartame ($p < 0.022$) and sucralose ($p < 0.01$) but not with group Stevia.

Blood glucose and body parameters

After sacrifice, the average concentrations of blood plasma glucose values did not differ significantly between groups, and neither there were significant differences in relation to

body parameter values determined by bioimpedance. These were, total body water, extracellular and intracellular fluids, fat-free mass, fat mass (MG), and body mass index. Nor we found differences in blood plasma cholesterol, triglycerides, LDL and HDL (low and high density lipoproteins) (results not shown).

Adipose tissue in the inguinal, gonadal and mesenteric compartments.

At the end of the trial, i.e., week 6 of treatment, the adipose tissue (g) was dissected from three body compartments: gonadal, inguinal and mesenteric (figures 4, 5, and 6, respectively). Group Stevia was found to have the greatest accumulation of fat mass in the gonadal cavity showing highly significant differences ($p \leq 0.0001$) with all other groups, control and experimental ones. In the inguinal compartment the sucralose group showed increased significant fat accumulation ($p < 0.03$) compared to control, sucrose and Stevia. Finally, in the mesenteric compartment both Stevia and sucralose showed a highly significant ($p < 0.0001$) increase in adipose tissue compared to group C.

Analysis of number of adipocytes in relation to relative volume (Vr)

As explained in section materials and methods, after determining the surface area of a cell ($\pi \cdot r^2$) in a 5 μm section this was considered a close representative of the adipocytes' total volume considering these cells have an approximately spherical shape. Hereby then, this semiquantitative determination is called relative volume (Vr), and its units are given in μm^2 .

In the gonadal compartment (table 1) all sweeteners, sucrose and NNS, led to an increase in the number of cells belonging to the small (300-599 μm^2) and mid-size (600-7,999 μm^2) Vr ranges. In the small range Stevia and sucralose had the strongest impact while in Vr mid-range all sweeteners led to considerable increases in the number of cells. Of these aspartame and sucrose had the strongest impact. In the opposite direction, aspartame, Stevia and sucralose led to a reduction in cell number among the largest cells (Vr 8,000-25,000 μm^2).

In the inguinal compartment (table 2) Stevia and sucralose led to opposite results. The former induced an increase while the latter a reduction in the number of cells in the smallest Vr range. Among mid-size cells, sucrose, aspartame and sucralose led to a reduction in their number while the same sweeteners led to increases in numbers among the largest cells.

In the mesenteric compartment (table 3) all sweeteners led to an increase in the number of small-size cells with aspartame nearly doubling those present among C tissue. In the mid-size range opposite effects were determined. Aspartame had a reductive effect while Stevia and sucralose increased the number of cells. Among the largest cells in mesentery, all sweeteners led to reduction of cell number with aspartame and sucralose having a dramatic impact.

Analysis of adipocytes average cell size per Vr range

In tables 4-6 are presented the Vr means within each of the three size ranges of cells ascribed (300-599, 600-7,999, and 8,000-25,000 μ^2). Cell size is directly proportional to the amount of lipid storage.

In the gonadal cavity (table 4) Stevia and sucralose led to a slightly bigger cells within the smallest range while all sweeteners produced reductions of average cell size in the mid and large-size ranges. Of these, the most dramatic effect was attained by aspartame with a decrease of nearly five times the size of mid-range size cells present among control animals.

In the inguinal cavity (table 5), only aspartame had a small enlarging impact among the small-size cells. Within the mid-range size, all sweeteners led to moderate growth of cell size compared to control tissue, and in relation to the largest cells, with the exception of aspartame the other sweeteners induced a reduction of average cell size.

Finally, in the mesenteric compartment (table 6) are observed perhaps the most impressive results. Within the small cells range, slight though opposite changes are induced by sucrose, augmentation, and aspartame, reduction. In the mid and largesize

ranges, all sweeteners caloric and non-caloric led to increases. In the mid-range aspartame induced an increase of cell size more than five times that of control. The size increase induced by the other sweeteners did not double that of cells dissected from control mice. Within the range of large cells the increase is also noteworthy. Those which observe the least change attain a size 32% larger (aspartame) than those of control mice, while others reach more than 40% Vr (sucrose and sucralose).

Irisin

A significant decrease of irisin expression (ng/dL) in blood plasma was determined among animals treated with sucralose. Neither aspartame, nor Stevia or saccharose led to significant changes of irisin expression when compared to group C (figure 7).

7.1.9 Discussion

It is worth noting that in our study the group sucrose consumed considerably more food than the rest of experimental animals and in spite of this attained similar weight gain compared to groups aspartame, Stevia and sucralose. Also, group sucrose as expected, observed changes in fat content as well as histological and morphological changes. Contrary to what it was expected from the administration of non-caloric sweeteners, these were not inert and led to dramatic and in some cases even more drastic alterations than those observed with sucrose ingestion. Irrespective of caloric content, in this assay all sweeteners induced mice to eat more, compared to group C, leading consistently to similar weight gain. Taking into account the high caloric content of sucrose, however, those mice managed their physiological weight control better than those under NNS considering both the amount of food and the sucrose consumed by this group. This is matter to be further investigated. Neuroendocrine control, hypothalamic for instance, together with hormonal influences from other tissues including gastrointestinal and adipose most likely are responsible of this. It is likely that NNS possibly start up similar signaling pathways as those initiated by glucose though as these are neither hydrolyzed nor biochemically processed they perhaps continue signaling for longer periods after systemic distribution. Other authors have reported similar observations (Matos et al., 2013).

Hereby we discuss the possibility of signal transduction in tissues other than the oral cavity which may lead to initiation of parallel responses to those of glucose in the absence of this. We hypothesize those signaling pathway may take place through the heterodimeric sweet taste receptor T1R2/T1R3 (T1R2/3), a heterodimer coupled to gustducin, itself the alpha subunit of the G proteins trimeric complex or until now alternative though unidentified molecular mechanisms. It is well known the molecular composite T1R2/3-gustducin is expressed in the oral cavity by tongue taste buds, soft palate, epiglottis and upper end of the esophagus (Nelson et al., 2001). Although conscious recognition of sweetness takes place in this region, these receptors are demonstrated to be widely expressed by other tissues (Kojima et al., 2011; Lee and Owyang, 2017) although up to

now it is not clear if outside the oral cavity monomers or heterodimers of T1R2/3 are fully functional (Kitagawa et al., 2001a,b).

Stevia rebaudiana leaves or extracts are sweet due to their content of steviol glycosides, among which stevioside, rebaudioside A and rebaudioside C are estimated to provide up to 300 times the sweetness of sucrose (Bramachari et al., 2011). In relation to insulin sensitivity, complex and varied responses from 3T3-L1 cells were observed upon in vitro treatment with stevioside (Mohd-Radzman et al., 2013). These responses depended very much on the conditions present, and specifically on the concentration of stevioside applied. This glycoside either enhanced glucose uptake or not, in the presence or absence of insulin, alone or combined with either insulin, rosiglitazone maleate, and TNF- α . Also the responses depended on pre-treatment or no pretreatment with the above mentioned reagents. This complexity and variability of responses observed using a cell line under highly controlled laboratory conditions lead us to ponder the complexity of physiological responses which may be expected and observed in vivo. *Stevia* extracts might have direct insulinotropic and anti-hyperglycaemic effects in type 2 diabetic animal models (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009). It has been postulated that sweet tasting results from a secondary signaling cascade through GPCR elicited in the respective taste buds. This cascade encompasses initially IP₃ formation after PLC activation and the promotion of Ca²⁺ release from internal stores, cation which then activates TRPM5 (Zhang et al., 2003). In turn, TRPM5 activity acts depolarizing the cell, and prompting the release of ATP as a neurotransmitter activating the voltage-gated channel calcium homeostasis modulator 1. It thus appears that at least part of the mechanism of conscious perception of sweetness takes place through ATP neurotransmission (Taruno et al., 2013). Through patch clamp techniques, the application of steviol and glycoside derivatives either to the external or internal leaflets of TRPM5 transfected HEK293T whole cells or membranes induced inward and outward currents (Philippaert et al., 2017). The hydrophobic diterpenoid steviol is the chemical core of steviosides (Upreti et al., 2011), and this group is a byproduct of digestion in the intestine of the lateral glucose moieties. It is thus stevioside the one interacting directly with TRPM5 leading to insulinotropic and

anti-hyperglycaemic actions (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009). Pancreatic cells respond to glucose by forming internal Ca^{2+} oscillation waves and in the presence of steviol or steviosides the glucose present in the medium in a dose-dependent manner induced the internal oscillating Ca^{2+} waves. This response was stable for more than 60 minutes and not observed, however, when the stevioside was present at low concentration (3 mM). Upon analysis of their data through Fourier transformation, the authors observed a higher frequency of Ca^{2+} waves in the presence of steviosides at higher concentrations, shift which did not occur amongst pancreatic cells extracted from genetically *Trpm5* $-/-$ mice (Philippaert et al., 2017).

In taste buds sweeteners binding to T1R2/3 led to a cellular response corresponding to a rise of intracellular Ca^{2+} concentration. The ligands eliciting this type of response were both natural and artificial including sucrose, and aspartame, both used in this study. T1R3 is the protein product of *sac* gene which for sweet taste detection which appears to act in conjunction with T1R2 (Max et al., 2001; Sainz et al., 2001). After genetic KO of the former, although still unidentified, other sweet tasting pathways appear to be present (Nelson et al., 2001). T1R2/3 receptors are activated by a structurally broad variety of natural and artificial sweeteners including also diverse saccharides, amino acids, peptides, proteins and others. By which means each of these agonists activate the heterodimeric T1R2/3 receptor is still under investigation (reviewed by Roper, 2007). It is a fact that the heterodimer T1R2/3, however, is expressed by a considerable number of tissues outside the oral cavity and gastrointestinal tract tissues, including bone, testis, adipocytes, pancreatic beta-cells (Margolskee et al., 2007; Nakagawa et al., 2009; Lee and Owyang, 2017) and also circulating subpopulations of leukocytes (Malki et al., 2015).

Upon differentiation of 3T3-L1 cells under in vitro standard conditions it was demonstrated by RT-PCR an increased expression of T1R3, event confirmed by Western blotting and immunocytochemistry with antigenicity detected mainly on the cell surface. In epididymal adipose tissue of C57BL/6 mice a high expression of T1R3 was shown while in its stroma vascular fraction, a source of preadipocytes, this was minimal. In no case the expression of its molecular partner in the oral cavity, T1R2, and neither of a type of G

alpha stimulatory subunit similar to gustducin, are present in significant amounts to account for sensing and transduction of the “sweetness” signal. An early addition (day 2), and in a dose dependent manner of saccharine and sucralose to either differentiating 3T3-L1 cells or stroma cells either suppressed or considerably reduced the expression of peroxisome proliferator activated receptor c (PPARc), CCAAT/enhancer-binding protein a (C/EBPa), and the formation of triglyceride deposits. The delayed addition of the non-caloric sweeteners (differentiation days 3 to 6) had little anti-adipogenic effect. The question then remained on how 3T3-L1 cells recognize the sweetness molecules if the known pathway mediated by T1R3/2 appears to be either non-functional or absent (Masubuchi et al., 2013). In the same work the authors were not able to detect the expression of CaSR (calcium-sensing receptor), a class C GPCR which as the heterodimer T1R3/2 is also present in taste buds. CaSR apart from sweetness is also functional in the physiology of salty, and umami flavours tasting. The above mentioned anti-adipogenic effects of saccharine and sucralose were reversed by suppressing the gene expression of T1R3 through transfection of a specifically directed short-hairpin mRNA. It is suggested the strong possibility that a pathway mediated through G proteins leads to adipogenic or anti-adipogenic effects though remaining to be demonstrated.

This fact poses the important question on the possibility of NNS molecules promoting both already known metabolic pathways and alternative ones. In our study aspartame, sucralose and steviosides were studied although other NNS should also be investigated in this sense. The specific question is, are non-caloric sweeteners eliciting unknown metabolic responses related to energy regulation? And, if that is the case to what extent and what kind of metabolic responses are having an impact among people either healthy or suffering from diabetes or other metabolic diseases? Sweet “tasting”, i.e., the molecular recognition of those molecules, either consciously or internally, appears to not only involve T1R2/3 transduction but other yet undiscovered mechanisms (discussed by Kojima et al., 2011). For instance, in vitro sucralose and saccharin led to a marked disruption of microtubules in 3T3-L1 preadipocytes (Kojima et al., 2011) by a G α stimulatory

mechanism. As it has been shown, disassembly of the microtubular network is a molecular event preceding adipogenesis (Feng et al., 2010).

Adipose tissue differentiation follows a definite pattern (Rosen & MacDougald, 2006) which appears to be influenced by sweeteners. In terms of the effect of aspartame on 3T3-L1 cells a reduction of lipid buildup was observed upon adipocytes differentiation. Pandurangan et al. (2014) showed by qRT-PCR analysis a significant reduction in the expression of PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), FABP4 (fatty acid-binding protein 4), and C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) and SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) mRNA upon addition of aspartame to adipocytes, all key components of the adipogenic pathway. In this respect we did not find any data in the literature related to steviosides or rebaudiosides. In this study while sucralose had no impact on adipose tissue accumulation, Stevia sweeteners induced growth both in inguinal and gonadal compartments and aspartame did the same in inguinal and mesenteric compartments.

In rats (Figlewicz et al., 2009) the effects of moderate fluid consumption of fructose and non-caloric sweeteners on specific days (three days a week) were compared according to feeding behavior, metabolic and serum lipid profiles, hepatic histology and serum liver enzymes. The sweeteners agave, fructose, high fructose corn syrup (HFCS), a combination of HFCS and Hoodia (a putative appetite suppressant), and the non-caloric sweetener Stevia were supplemented in drinking water. Food and beverage intakes were lower for the Stevia group ($p < 0.0001$ vs. any other group), and the weight of retroperitoneal fat pad did not differ among the six tested groups. The Stevia group showed increased alkaline phosphatase although other markers of lipid metabolism did not differ among groups. Neither there were differences in body weight nor in the inflammatory markers MCP1, TNF α , and IL-1 β (Figlewicz et al., 2009). The authors claim a possible reduction of total calories intake among the Stevia subjects although an alternate high and low food intake, respectively, in days of non-supplementation of sweetener compared to days of supplementation was not calculated.

In rats, sodium saccharine augmented lipolysis through augmented cAMP synthesis while aspartame did not (Dibs et al., 1996). Specifically, in membranes of adipocytes dissected from saccharine treated rats the activity of adenylyl cyclase increased considerably (200%) apparently through a G alpha inhibitory subunit, regardless of diverse agonist-stimulation treatments. This effect was specifically observed in adipocytes as no changes in cAMP synthesis activity were observed in cell membrane fractions obtained from other tissues upon saccharine or aspartame treatment. Through in vivo magnetic resonance spectroscopy (MRS), aspartame was not observed to induce lipid accumulation in liver or steatosis in rats compared, respectively, to glucose and fructose. An event which apparently occurred after de novo synthesis and not from systemic uptake (Janssens et al., 2017).

In a murine model of feeding and supplementation of caloric and non-caloric sweeteners (Soto et al., 2017) it was found that sucralose (Splenda) did not alter metabolic markers or hormones related to feeding behavior except CART (cocaineand-amphetamine-related transcript). This molecule is involved in the regulation of satiety and weight gain and in this respect appears to act conjointly with other hypothalamic hormones like neuropeptide Y (NPY), cholecystokinin (CCK), leptin and ghrelin (Soto et al., 2017).

7.2 Conclusions

From our study it is clear that intake of NNS is far from having no consequences in terms of bodily responses. Food intake, irisin expression, weight gain, and adipose tissue histomorphology were all influenced by NNS. Importantly, all these responses were not only varied and complex but appear to be specific by sweetener ingested and body compartment. It appears that each sweetener, caloric or non-caloric promotes specific signaling pathways per body compartment. This is, not necessarily what happens in a particular body compartment may take place correspondingly in another, a matter to be further investigated. As it is already known, accumulation of fat in the mesentery is a condition of high risk of suffering heart failure. The question is, what are the molecular and physiological events underlying the diverse and complex responses observed here which

are related to a specific sweetener and to specific body compartments. Sucrose, aspartame, Stevia and sucralose each led to diverse responses in terms of food ingestion, gross fat accumulation, number and volume of cells per adipocytes' size range. It is also highly likely there are species and strain variations. In this sense it will be necessary to systematically investigate each of them separately and look for specific neuroendocrine, immunological, and metabolic physiological responses explaining the modifications in both adipose tissue histomorphology and weight gain.

7.2.1 Declaration of interests

The authors hereby declare there is no conflict of interest of any kind in the publication of this work and the data hereby presented. We received partial funding from Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados-Universidad Autónoma del Estado de México Project No. 4342/2017/CI.

7.2.2 References

Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., & Abdel-Rahman, A. A. et al. (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *Journal of Toxicology and Environ Health*, 71, 1415-1429.

Anton S. D., Martin C. K., Han H., Coulon S., Cefalu W. T., Geiselman P., & Williamson D. A. (2010). Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin level. *Appetite*, 55, 37–43.

Brahmachari G., Mandal L. C., Roy R., Mondal S., & Brahmachari A. K (2011). Stevioside and related compounds—molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. *Archives der Pharmazie*, 344, 5–19.

Brown A. W., Bohan M. M., & Onken K. L (2011). Short-term consumption of sucralose, a nonnutritive sweetener, is similar to water with regard to select markers of hunger signaling and short-term glucose homeostasis in women. *Nutrition Research*, 31, 882-888

Calvo S., & Jopsephine M. (2015). The endocrinology of taste receptors. *Nature Reviews Endocrinology*, 3, 344-363.

Chatsudthipong V., & Muanprasat C., (2009). Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacological Therapy*, 121, 41–54.

De Matos F., Reis C., & Carraro K. (2013). Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite*, 60, 203-207.

Dibs K., Oget I., Wrisez F., El-Jamali A., Aguié-Aguie G., Correze C., & Lambert B., (1996). Effects of sodium saccharin diet on fat-cell lipolysis: evidence for increased function of the adenylyl cyclase catalyst. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 20, 15-20.

Dobner J., & Kaser S. (2017). Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity. *Clinical Microbiology*, 4, 534-567.

ENSANUT 2012, Encuesta Nacional de Salud y Nutrición – Instituto Nacional de Salud Pública de México.

Feng T., Szabo E., Dziak E., & Opas M. (2010). Cytoskeletal disassembly and cell rounding promotes adipogenesis from ES cells. *Stem Cell Reviews*, 6, 74-85.

Fernstrom J. (2015). Non-nutritive sweeteners and obesity. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 119-136.

Figlewicz D. P., Ioannou G., Bennett J. J., Kittleson S., Savard C., & Roth C. L. (2009). Effect of moderate intake of sweeteners on metabolic health in the rat. *Physiology and Behavior*, 98, 618-624.

Food and Drug Administration – FDA <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/InteractiveNutritionFactsLabel/factsheets/Sugars.pdf> (access date Nov 12, 2017)

Fowler S. P., Williams K., Resendez R. G., Hunt K. J., Hazuda H. P., & Stern M. P. (2008). Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and longterm weight gain. *Obesity*, 16, 1894–1900.

Gardner C., Chair J., Wylie R., Co-Chair S, Gidding S., Faha Lyn M., Steffen S., & Faha R. K. (2012). Non-nutritive sweeteners: current use and health perspectives a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 8, 1798-1808.

Hedrick V., E., Passaro E. M., Davy B. M., & You W., et al. (2017). Characterization of non-nutritive sweetener intake in rural Southwest Virginian adults living in a health-disparate region. *Nutrients*, 9.

Janssens S., Ciapaite J., Wolters J. C., van Riel N. A., Nicolay K., & Prompers J. J., (2017). An in vivo magnetic resonance spectroscopy study of the effects of caloric and

non-caloric sweeteners on liver lipid metabolism in rats. *Nutrients* 9 pii: E476. doi: 10.3390/nu9050476.

Kitagawa M., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y., & Hino A. (2001a). Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, 283, 236.

Kitagawa Y., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y., & Hino A. (2001b). Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 283, 236-242.

Kojima I., & Nakagawa Y., (2011). The role of the sweet taste receptor in enteroendocrine cells and pancreatic beta-cells. *Diabetes and Metabolism Journal*, 35, 451–457.

Lee A. A., & Owyang C. (2017). Sugars, sweet taste receptors, and brain responses. *Nutrients* 9. pii: E653. doi: 10.3390/nu9070653.

Leonhardt W., Hanefeld M., & Haller H.(1978). The adipocyte volume in human adipose tissue: 1. Lipid space, normal and maximum values, and the relation to body weight index. *International Journal of Obesity*, 2, 33-45.

Malki A., Fiedler J., Fricke K., Ballweg I., Pfaffl M. W., & Krautwurst D., (2015). Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 9, 533-545.

Margolskee R. F., Dyer J., Kokrashvili Z., Salmon K. S., & Ilegems E., et al., (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104, 15075–15080.

Masubuchi Y., Nakagawa Y., Ma J., Sasaki T., & Kitamura T., et al. (2013). A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *PLoS ONE* 8(1): e54500. doi: 10.1371/ journal.pone.0054500

Max M., Shanker Y. G., Huang L., Rong M., Liu Z., Campagne F., Weinstein H., Damak S., & Margolskee R. F. (2001). Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nature Genetics* 28, 5863.

Mayu N., & Masafumi J. (2015). Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. *Results and Problems in Cell Differentiation* 170, R159-R171.

Mitsutomi K., Masaki T., & Shimasaki T. et al. (2014). Effects of a nonnutritive sweetener on body adiposity and energy metabolism in mice with diet-induced obesity. *Metabolism*, 63, 69-78.

Mohd-Radzman N. H., Wan-Ismail W. I., Jaapar S. S., Adam Z., & Adam A., (2013). Stevioside from *Stevia rebaudiana* Bertoni increase insulin sensitivity in 3T3-L1 adipocytes. *Evidence-Based Complement Alternative Medicine*, 938081.

Nakagawa Y., Nagasawa M., Yamada S., Hara A., & Mogami H., et al. (2009). Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*, 4, e5106

Nelson G., Hoon M. A., Chandrashekar J., Zhang Y., & Ryba N. J., et al. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381–390.

World Health Organization (2014). *Obesidad y sobrepeso. Nota descriptiva no. 311* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html>.

Padmini S., Ahuja S., & Sriram K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*, 2, 1293-1299.

Pandurangan M., Park J., & Kim E. (2014). Aspartame downregulates 3T3-L1 differentiation. *In Vitro Cell Development. Biology—Animal*, 50, 851-857.

Philippaert K., Pironet A., Mesuere M., Sones W., Vermeiren L., Kerselaers S., Pinto S., Segal A., Antoine N., Gysemans C., Laureys J., Lemaire K., Gilon P., Cuypers E., Tytgat J., Mathieu C., Schuit F., Rorsman P., Talavera K., Voets T., & Vennekens R., (2017). Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by

potentiation of TRPM5 channel activity. *Nature Communications*, 8, 14733. doi: 10.1038/ncomms14733.

Polyák E. (2010). Effects of artificial sweeteners on body weight, food and beverage consumption., *Acta Physiologica Hungarica*, 97, 401-407.

Roper S. D., (2007). Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Archives*, 454, 759–776.

Rosen E. D., & MacDougald O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews in Molecular and Cellular Biology* 7, 885–896.

Ruyter J., & Margreet R. A. (2012). Trial of sugar-free or sugar-sweetened beverages and body weight in children. *The New England Journal of Medicine*, 364, 1394-1406.

Sainz E., Korley J. N., Battey J. F., & Sullivan S. L., (2001). Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *Journal of Neurochemistry*, 77, 896-903.

Secretaría de Economía – México, (2012). Análisis comercial del sector edulcorantes en México. 34 (1): S7-16.

Taruno A., Vingtdoux V., Ohmoto M., Ma Z., Dvoryanchikov G., Li A., Adrien L., Zhao H., Leung S., Abernethy M., Koppel J., Davies P., Civan M. M., Chaudhari N., Matsumoto I., Hellekant G., Tordoff M. G., Marambaud P., & Foskett J. K., (2013). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*, 495, 223-226.

Tey S. L., Salleh N. B., Henry F., Ford C. G. (2017). Effects of non-nutritive (artificial vs natural) sweeteners on 24-h glucose profiles. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1129-1132.

Tey S. L., Salleh N. B., Henry F., Ford C. G. (2017). Effects of aspartame-, monk fruit-, stevia- and sucrose-sweetened beverages on postprandial glucose, insulin and energy intake. *International Journal of Obesity (London)*, 41, 450-457. doi: 10.1038/ijo.2016.225.

Tschop M., Smiley D., & Heiman M. (2012). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407, 908-913.

Upreti M., Strassburger K., Chen Y. L., Wu S., & Prakash I., (2011). Solubility enhancement of steviol glycosides and characterization of their inclusion complexes with gamma-cyclodextrin. *International Journal of Molecular Science*, 12, 7529– 7553.

Zhang Y., Hoon M. A., Chandrashekar J., Mueller K. L., Cook B., Wu D., Zuker C. S., & Ryba N. J., (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112, 293-301.

7.2.3 Figures

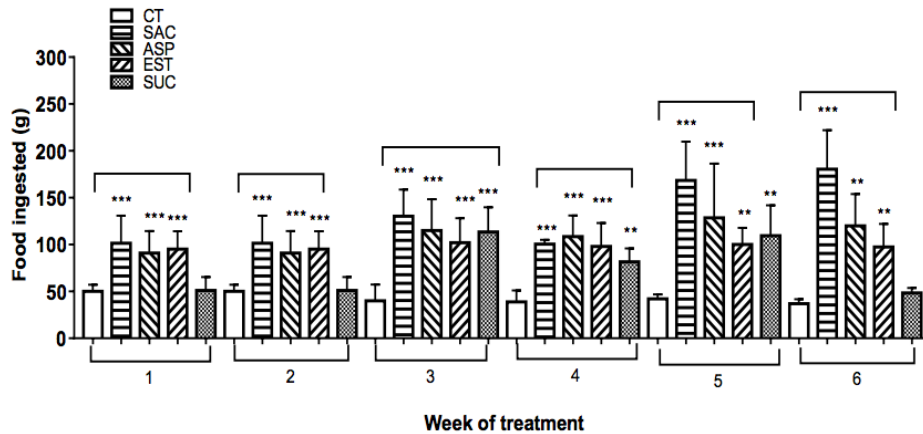


Figure 1. Ingestion of food (g) per experimental group, and per week. Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: *p \leq 0.03; **p \leq 0.001; ***p \leq 0.0001. All comparisons made vs. control group within the same week. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

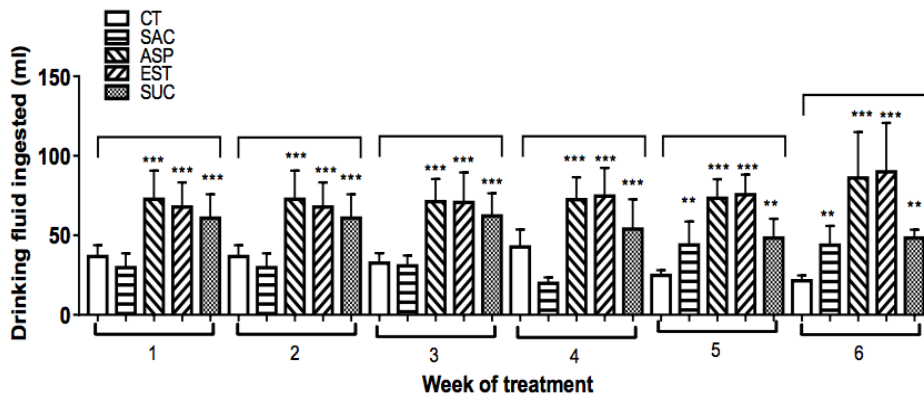


Figure 2. Ingestion of drinking fluid (ml) per experimental group, and per week. Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: *p \leq 0.03; **p \leq 0.001; ***p \leq 0.0001. All comparisons made vs. control group within the same week. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

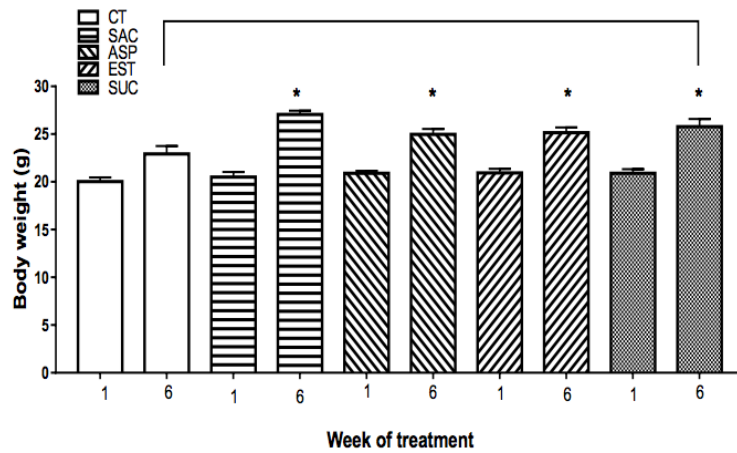


Figure 3. Body weight at weeks 1 and 6, beginning and of experimental trial. Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: * $p \leq 0.03$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$. All comparisons made vs. control group at week 6. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

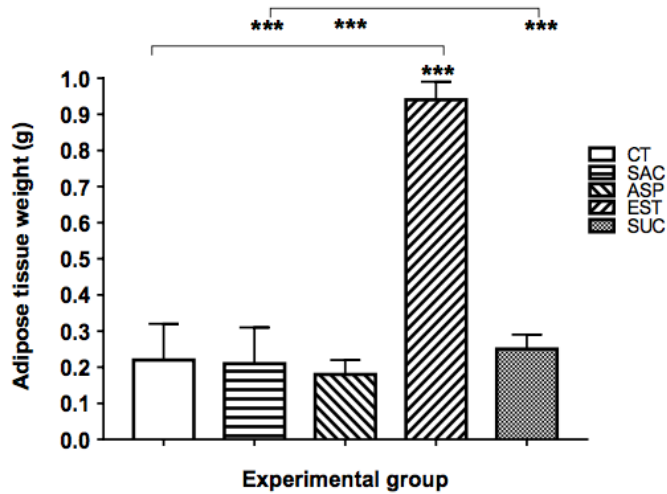


Figure 4. Gonadal cavity. Content of adipose tissue (g). Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: *** $p \leq 0.0001$. Below, comparisons made vs. control group. Above, comparisons made between groups against Stevia. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

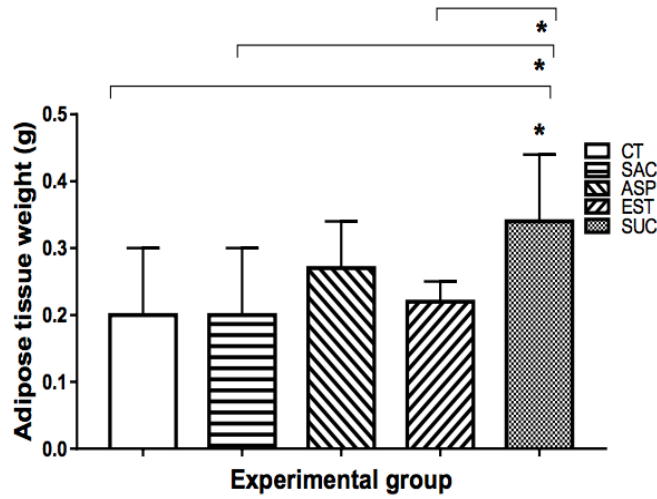


Figure 5. Inguinal cavity. Content of adipose tissue (g). Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: * $p \leq 0.03$. Comparisons: below, sucralose vs. control; middle, sucralose vs. saccharose; above, sucralose vs. stevia. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

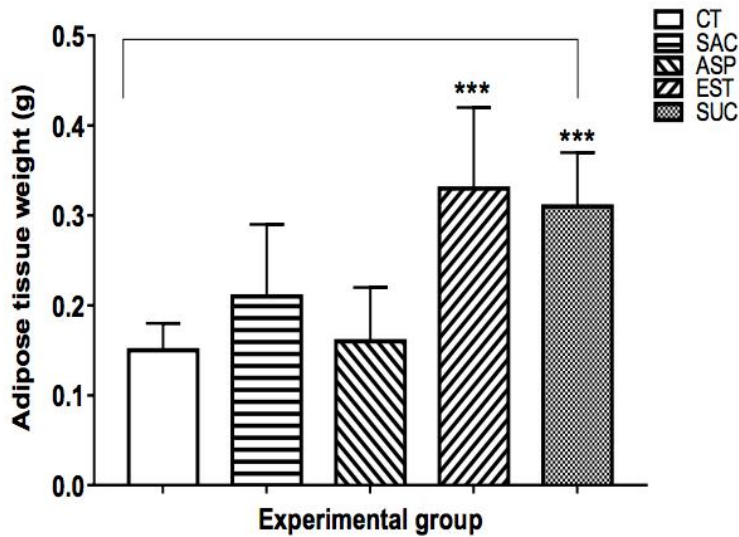


Figure 6. Mesenteric cavity. Content of adipose tissue (g). Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence: *** $p \leq 0.0001$. All comparisons made vs. control group. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

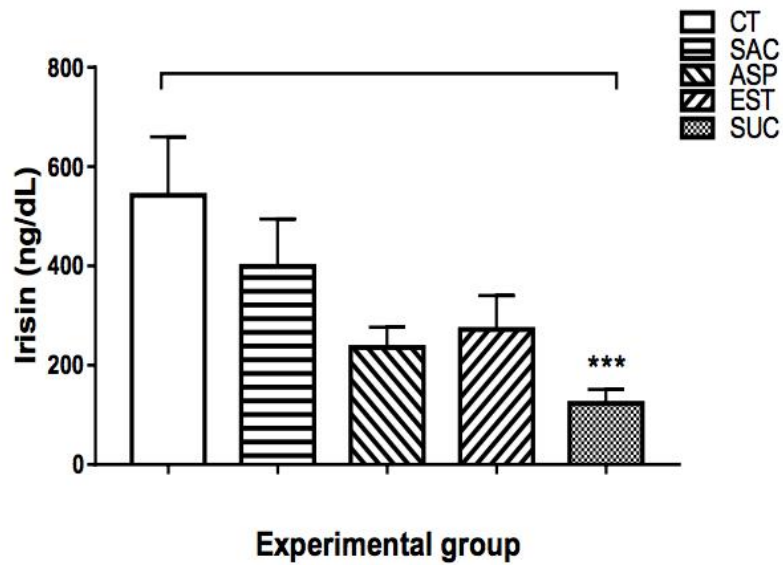


Figure 7. Irisin (ng/dL) in blood plasma. Mean \pm SEM; n = 8 mice/group treatment; significance at >95% level of confidence.; ***p \leq 0.0001. All comparisons made vs. control group. Tukey's post hoc test. CT, control (water); SAC, sucrose; ASP, aspartame; EST, stevia; SUC, sucralose.

Table 1. Gonadal cavity. Average number of cells per range of relative volumes (Vr).

| Vr (μ^2) | CT | SAC | ASP | EST | SUC |
|----------------|----------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| 300-599 | 13 \pm 1.6 | 69 \pm 8.3** | 68 \pm 5.7** | 89 \pm 8.6*** | 71 \pm 12.2** |
| 600-7,999 | 214 \pm 13.4 | 430 \pm 298** | 469 \pm 8.9*** | 407 \pm 23.7** | 377 \pm 13.2* |
| 8,000-25,000 | 48 \pm 1.1 | 53 \pm 11 | 12 \pm 0.8** | 23 \pm 3.3* | 22 \pm 2.9* |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

Table 2. Inguinal cavity. Average number of cells per range of relative volumes (Vr).

| Vr (μ^2) | CT | SAC | ASP | EST | SUC |
|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 300-599 | 109 \pm 7.5 | 115 \pm 14.2 | 120 \pm 12.4 | 160 \pm 14.2* | 58 \pm 2.9* |
| 600-7,999 | 547 \pm 15.6 | 462 \pm 14.8* | 458 \pm 10.5* | 528 \pm 5.4 | 483 \pm 13.2* |
| 8,000-25,000 | 4 \pm 0.5 | 11 \pm 2.4** | 10 \pm 1.5** | 3 \pm 0.1 | 8 \pm 0.9* |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

Table 3. Mesenteric cavity. Average number of cells per range of relative volumes (Vr).

| Vr (μ^2) | CT | SAC | ASP | EST | SUC |
|----------------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 300-599 | 155 \pm 5.9 | 196 \pm 10.2* | 275 \pm 15.5** | 185 \pm 17.2* | 171 \pm 10.8* |
| 600-7,999 | 494 \pm 29.8 | 505 \pm 22.7 | 337 \pm 20.8* | 552 \pm 19.6* | 544 \pm 14.6* |
| 8,000-25,000 | 16 \pm 6.0 | 5 \pm 1.0** | 1 \pm 0.1*** | 9 \pm 3.5* | 2 \pm 0.4*** |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

Table 4. Gonadal cavity. Average relative volumes (Vr) per range of Vr.

| Vr (μ^2) | CT Vr (μ^2) | SAC Vr (μ^2) | ASP Vr (μ^2) | EST Vr (μ^2) | SUC Vr (μ^2) |
|----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 300-599 | 406.6 \pm 25.2 | 405.5 \pm 9.7 | 445.7 \pm 10.3 | 480.0 \pm 8.2* | 490.4 \pm 9.7* |
| 600-7,999 | 3621.4 \pm 418.4 | 3388.5 \pm 85.3* | 655.9 \pm 69.1*** | 3055.1 \pm 78.4** | 3521.0 \pm 87.5* |
| 8,000-25,000 | 12206.5 \pm 1226.8 | 9050.4 \pm 573.4*** | 8628.2 \pm 1511.2*** | 10030.3 \pm 789.3** | 11897.7 \pm 334.6* |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

Table 5. Inguinal cavity. Average relative volumes (Vr) per range of Vr.

| Vr (μ^2) | CT Vr (μ^2) | SAC Vr (μ^2) | ASP Vr (μ^2) | EST Vr (μ^2) | SUC Vr (μ^2) |
|----------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 300-599 | 438.3 \pm 13.8 | 440.2 \pm 8.0 | 537.0 \pm 7.5* | 447.0 \pm 6.6 | 427.9 \pm 10.7 |
| 600-7,999 | 2012.6 \pm 124.8 | 2683.5 \pm 63.2** | 2193.74 \pm 59.7* | 2479.3 \pm 60.0** | 2568.6 \pm 66.9** |
| 8,000-25,000 | 12689.8 \pm 1308.9 | 11122.8 \pm 459.2* | 12667.3 \pm 1655.5 | 10232.7 \pm 712.6** | 10710.5 \pm 1250.4** |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

Table 6. Mesenteric cavity. Average relative volumes (Vr) per range of Vr.

| Vr (μ^2) | CT Vr (μ^2) | SAC Vr (μ^2) | ASP Vr (μ^2) | EST Vr (μ^2) | SUC Vr (μ^2) |
|----------------|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| 300-599 | 449.8 \pm 18.5 | 540.2 \pm 5.9* | 381.7 \pm 5.2* | 451.8 \pm 6.4 | 435.7 \pm 6.7 |
| 600-7,999 | 1845.6 \pm 205.6 | 2991.5 \pm 53.5** | 9595.9 \pm 53.1*** | 2278.1 \pm 57.0* | 2073.3 \pm 47.5* |
| 8,000-25,000 | 8362.3 \pm 848.4 | 12050.3 \pm 225.8*** | 11037.4 \pm 529.9** | 11201.8 \pm 1043.0** | 11906.3 \pm 2351.5*** |

Mean \pm SEM, n=8. Significance at >95% confidence level: *p<0.03 **p<0.001 ***p<0.0001

7.4 Resultados adicionales

7.4.1 Gráfico. Cinética de peso corporal

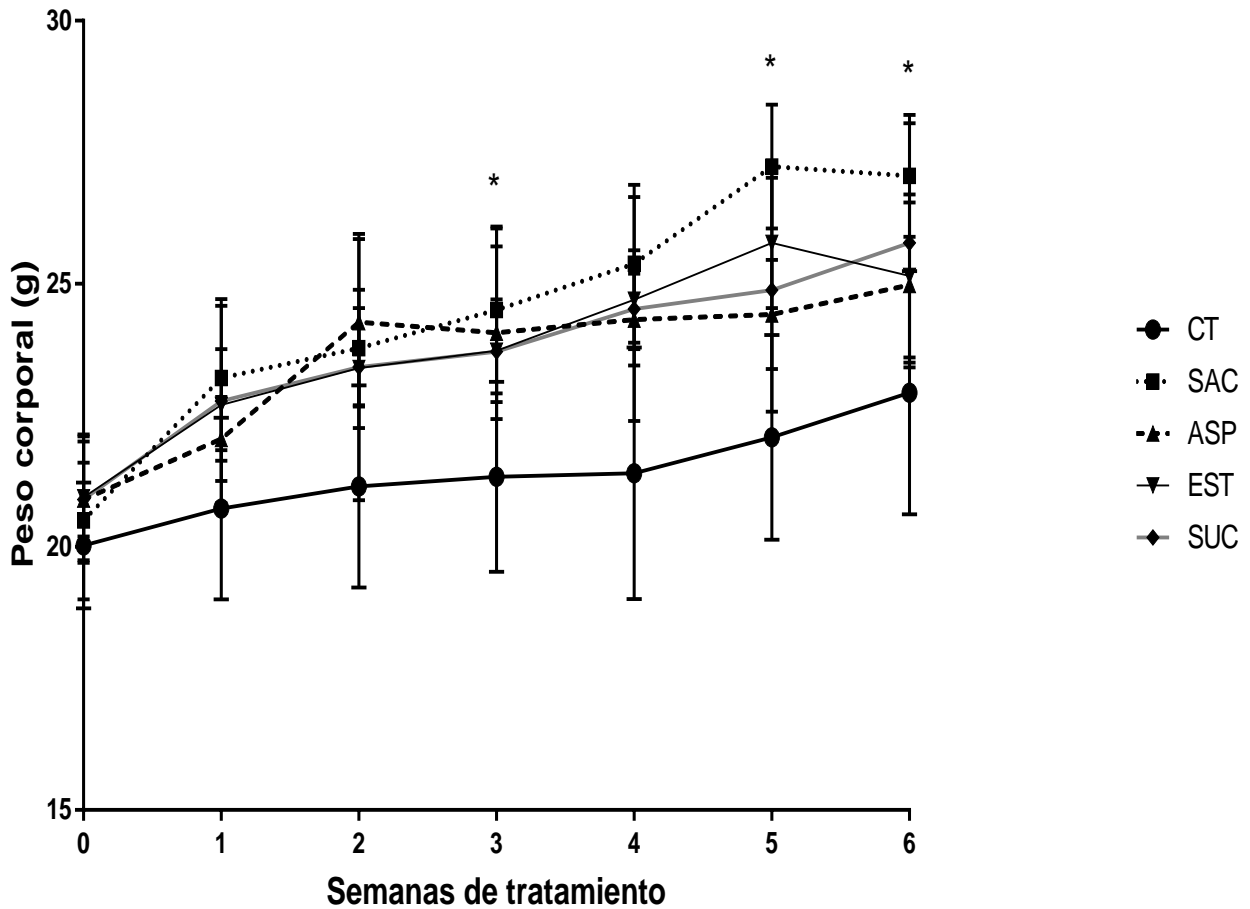


Gráfico 1. Cinética de peso corporal (g).

Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.

Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$

n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

7.4.2 Gráficos composición corporal

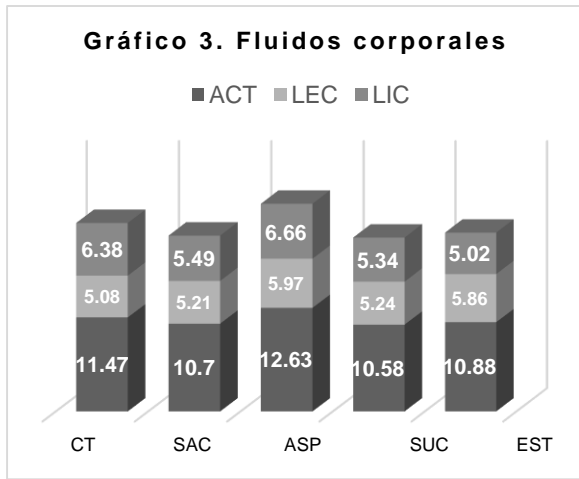


Gráfico 3. Valores de agua corporal (ml) total dados y con respecto a ésta se presentan los valores (ml) de fluidos intra y extracelulares obtenidos por la técnica de bioimpedancia (Impedivet). n=8 por grupo de tratamiento.
Clave: CT: control, SAC: sacarosa, SUC: sucralosa, ASP: aspartame, EST: estevia

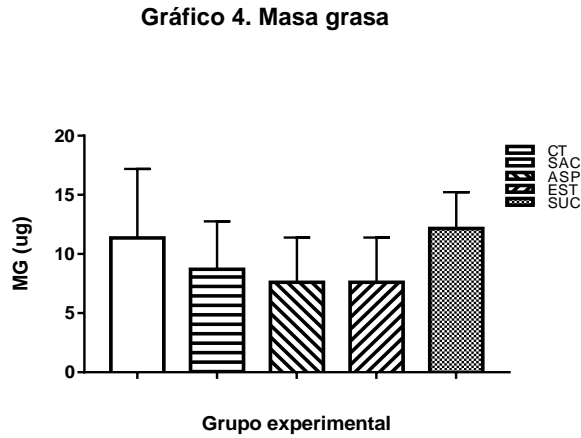


Gráfico 10. Masa grasa (MG) determinada por bioimpedancia (Impedivet) posterior al tratamiento. Valores (g) dados respecto al peso corporal total y composición en fluidos y masa libre de grasa
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

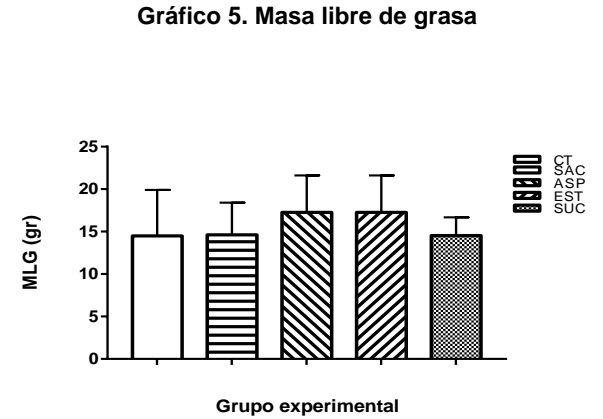


Gráfico 4. Masa libre de grasa (MLG) determinada por bioimpedancia (Impedivet) posterior al tratamiento. Valores (g) dados respecto al peso corporal total y composición en fluidos y masa libre de grasa
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

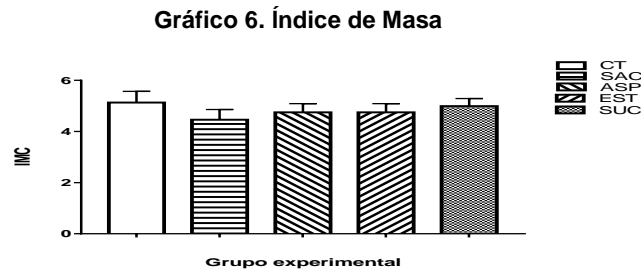


Gráfico 6. Índice de Masa Corporal (IMC) la longitud tomada desde la línea media de la espalda dibujando una intersección imaginaria hasta donde se encuentra la línea media de los muslos del roedor.
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.

7.4.3 Tabla 1. Composición corporal determinada por bioimpedancia (Impedivet) posterior a las seis semanas de tratamiento.

| Grupo experimental | | Agua corporal total (ACT mL) | Fluido extracelular (FE mL) | Fluidos intracelular (FI mL) | Masa libre de grasa (MLG g) | Masa grasa (MG g) | IMC |
|--------------------|----------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|------|
| CT n=8 | PROMEDIO | 11.47 | 5.08 | 6.38 | 5.69 | 6.6 | 5.13 |
| | SE | 1.6 | 0.5 | 1.4 | 0.5 | 1.4 | 0.1 |
| SAC n=8 | PROMEDIO | 10.7 | 5.21 | 5.49 | 5.65 | 6.53 | 4.46 |
| | SE | 1.0 | 0.4 | 0.9 | 0.7 | 0.9 | 0.1 |
| ASP n=8 | PROMEDIO | 12.63 | 5.97 | 6.66 | 6.68 | 6.06 | 4.75 |
| | SE | 1.2 | 0.2 | 1.2 | 0.5 | 0.9 | 0.1 |
| EST n=8 | PROMEDIO | 10.88 | 5.86 | 5.02 | 7.39 | 6.83 | 4.91 |
| | SE | 0.9 | 0.2 | 1.0 | 0.6 | 1.0 | 0.09 |
| SUC n=8 | PROMEDIO | 10.58 | 5.24 | 5.34 | 7.82 | 7.21 | 4.97 |
| | SE | 0.8 | 0.5 | 0.8 | 0.7 | 1.1 | 0.05 |

Los valores de fluidos corporales (ml) dados con respecto al agua corporal total.
Los valores de masa libre de grasa (g) y masa grasa (g) dados con respecto al peso corporal de acuerdo a la impedancia.

n=8 por grupo de tratamiento. Se presenta la media de los valores \pm SE.

Clave: CT: control, SAC: sacarosa, SUC: sucralosa, ASP: aspartame, EST: stevia

7.4.4 Gráficos de variables metabólicas

Gráfico 7. Cifra de glucosa en plasma sanguínea

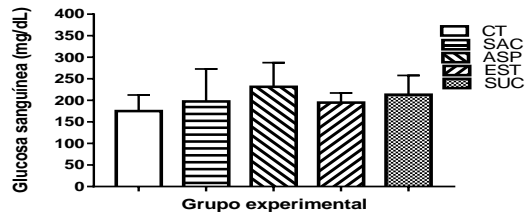


Gráfico 7. Concentración de glucosa en plasma sanguínea, posterior al sacrificio
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$

Gráfico 8. Cifra de Colesterol Total

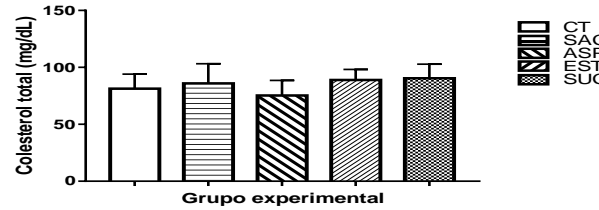


Gráfico 8. Concentración de colesterol total en plasma
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

Gráfico 9. Cifra de triacilglicéridos

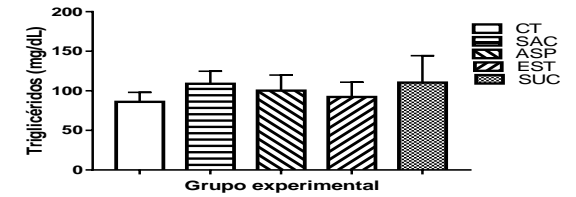


Gráfico 9. Concentración de triacilglicéridos en plasma
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

Gráfico 10. Cifra de c-HDL

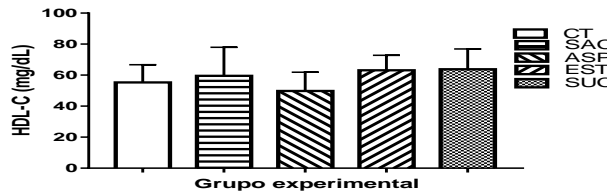


Gráfico 10. Concentración de HDL-C en plasma
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

Gráfico 11. Cifra de c-LDL

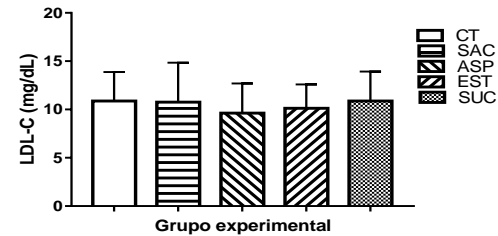


Gráfico 11. Concentración de LDL-C en plasma
Clave: A) CT: agua, B) SAC: sacarosa, C) SUC: sucralosa, D) ASP: aspartame, E) EST: estevia.
Prueba de Tukey's post-hoc, * $p \leq 0.03$ ** $p \leq 0.002$ *** $p \leq 0.0001$
n=8 ratones por grupo de tratamiento. Se presenta promedio \pm SE

7.4.5 Tabla 2. Variables metabólicas posterior a las seis semanas de tratamiento

| Variables metabólicas | CT | SAC | ASP | EST | SUC |
|----------------------------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| Gucosa (mg/dL) | 175.13±18.2 | 197.50±17.5 | 231.63±3.2 | 194.88±13.9 | 213.00±10.7 |
| Colesterol (mg/dL) | 81.25±3.0 | 85.88±3.0 | 75.25±3.3 | 88.88±3.0 | 90.38±2.8 |
| HDL-C (mg/dL) | 55.255±2.2 | 59.505±4.4 | 49.755±1.8 | 63.135±3.6 | 63.755±3.3 |
| LDL-C (mg/dL) | 10.88±3.0 | 10.75±4.1 | 9.63±2.5 | 10.88±3.0 | 10.13±3.1 |
| Triacilglicéridos (mg/dL) | 86.00±3.0 | 108.88±5.8 | 100.25±4.5 | 92.25±11.6 | 110.38±6.0 |

Tabla 2. Variables metabólicas obtenidas posterior a las seis semanas de tratamiento n=8 por grupo de tratamiento. Se presenta la media de los valores ± SE.

Clave: CT: control, SAC: sacarosa, SUC: sucralosa, ASP: aspartame, EST: estevia

7.4.6 Gráficos de número de células por rango de volumen relativo (μm^2) por cavidad

Gráfico 12. Número de células por rango de volumen relativo (μm^2) en la cavidad gonadal

■ TOTAL ■ 300-599 μm^2 ■ 600-7999 μm^2 ■ 8000-25000 μm^2

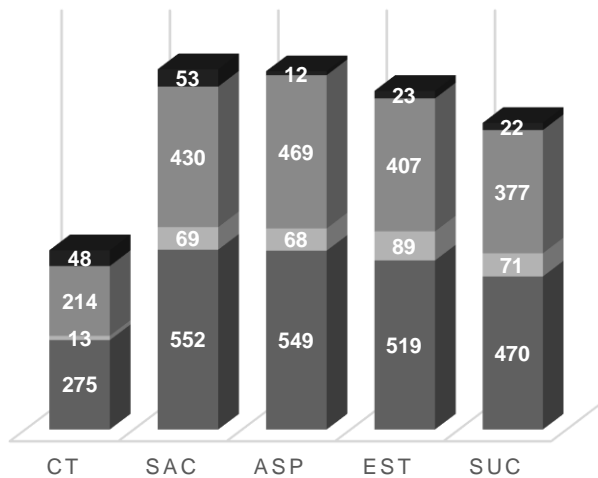


Gráfico 12. Número de células por rango de volumen relativo (300-500 μm^2 ; 600-7999 μm^2 y; 8000-25000 μm^2) y por tratamiento en la cavidad gonadal. El número total de células es la sumatoria del número de células por rango de volúmenes relativos: 300-499 μm^2 , 600-7999 μm^2 y 8000-25000 μm^2 .
Clave: CT: control, SAC: sacarosa, ASP: aspartame, SUC: sucralosa y EST: estevia.

Gráfico 13. Número de células por rango de volumen relativo (μm^2) en la cavidad inguinal

■ TOTAL ■ 300-599 μm^2 ■ 600-7999 μm^2 ■ 8000-25000 μm^2

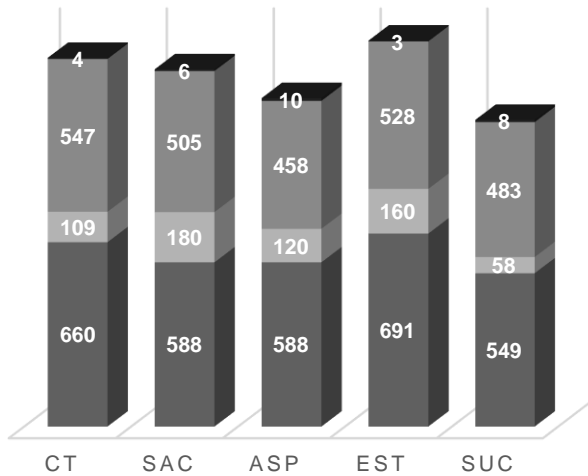


Gráfico 13. Número de células por rango de volumen relativo (300-500 μm^2 ; 600-7999 μm^2 y; 8000-25000 μm^2) y por tratamiento en la cavidad inguinal. El número total de células es la sumatoria del número de células por rango de volúmenes relativos: 300-499 μm^2 , 600-7999 μm^2 y 8000-25000 μm^2 .
Clave: CT: control, SAC: sacarosa, ASP: aspartame, SUC: sucralosa y EST: estevia.

Gráfico 14. Número de células por rango de volumen relativo (μm^2) en la cavidad mesentérica

■ TOTAL ■ 300-599 μm^2 ■ 600-7999 μm^2 ■ 8000-25000 μm^2

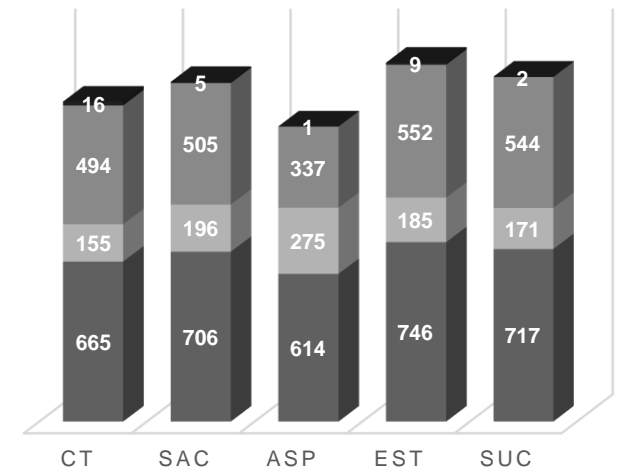


Gráfico 14. Número de células por rango de volumen relativo (300-500 μm^2 ; 600-7999 μm^2 y; 8000-25000 μm^2) y por tratamiento en la cavidad mesentérica. El número total de células es la sumatoria del número de células por rango de volúmenes relativos: 300-499 μm^2 , 600-7999 μm^2 y 8000-25000 μm^2 .
Clave: CT: control, SAC: sacarosa, ASP: aspartame, SUC: sucralosa y EST: estevia.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES DEL TRABAJO

Cada día el consumo de edulcorantes se hace más masivo en nuestra sociedad y están presentes en una gran variedad de alimentos. Los edulcorantes mantienen la palatabilidad de la dieta permitiendo reemplazar el azúcar de muchos alimentos y así reducir el aporte calórico de los mismos.

El sentido del gusto proporciona información valiosa sobre la calidad y el valor nutricional de los alimentos. Se ha identificado receptores del gusto involucrados en la percepción del sabor dulce (T1R2 / 3) se combinan para funcionar para el reconocimiento de moléculas de sabor dulce tan diversas como sacarosa, sacarina, acesulfame-K, aspartame, sucralosa, entre otros.

Sustituir el azúcar por edulcorantes puede ser una estrategia eficaz para el control de peso corporal, aunque los resultados son contradictorios. Recientemente se ha iniciado el debate sobre si el consumo de edulcorantes no calóricos aumenta el apetito, el peso corporal y promueve la adipogénesis.

Se ha observado que la ingesta de aspartame, estevia y sucralosa se relacionada con un aumento del peso corporal y mayor tejido adiposo en las cavidades gonadal, inguinal y mesentérica al compararlo con la ingesta de sacarosa, debido a que los edulcorantes podrían causar la sensación de hambre estimulando a comer en exceso y estimular los receptores del gusto, creando adicción al sabor dulce. Por otro lado se discute que los edulcorantes no calóricos no provocan cambios en los niveles de glucosa plasmática, lo mismo sucede con los datos obtenidos en el análisis de composición corporal.

En conjunto, los datos presentados en esta investigación apoyan la hipótesis de que el consumo de los ENC produce efectos significativamente diferentes en comparación con el consumo de la sacarosa y con el tiempo estos efectos pueden

contribuir a un balance energético positivo y considerarlos como metabólicamente activos.

Se debe prestar más atención a las señales fisiológicas y neuronales relacionadas con el balance energético y la regulación metabólica lo que puede mejorar nuestra capacidad de comprender las circunstancias en las que la reducción del contenido energético de alimentos y bebidas puede empeorar y no mejorar los resultados de salud.

En ratones, el consumo de aspartame, sucralosa y estevia aparecen como un factor que predispone al aumento de peso por medio del acúmulo de tejido adiposo. Nuestros resultados, junto con el aumento de consumo de los edulcorantes y la alta prevalencia de obesidad en la región, muestran una necesidad apremiante de estudios futuros sobre el rol de los edulcorantes en el riesgo de la generación de tejido adiposo.

8.1 Limitaciones:

Una limitación de este estudio es la falta inclusión de un modelo experimental de mayor tamaño para medir cambios en la composición corporal e índice de masa corporal entre los grupos. Sin embargo, los resultados de este diseño permiten concluir que la suplementación de los ENC incrementa, el peso corporal, tejido adiposo en las cavidades gonadal, inguinal y mesentérica, lo que sugiere un efecto no benéfico para el metabolismo energético.

Entre las fortalezas, podemos nombrar que es una muestra que se controlaron factores ambientales, dentro del bioterio para evitar cambios en la respuesta metabólica por estrés o cambios climáticos.

8.2 Recomendaciones

Se sugiere realizar pruebas complementarias de biología molecular que permitan medir hormonas relacionadas con la obesidad como es la Grelina, Leptina, genes del sistema opioide como POMC.

Investigaciones han sugerido que el sistema opioide y sus receptores están involucrados en la regulación del metabolismo energético en los tejidos periféricos así como la activación en el tejido adiposo marrón termogénesis, aumentando y disminuyendo la ingesta de alimento.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gardner C, Chair JW, Co-Chair SS, Gidding F, Faha LM, Faha RK. Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives A Scientific Statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, (35) no. 8 1798-1808, 2012
2. García J, Garcia M, Casaso F. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. *Nutr Hosp*; 28 (Supl. 4):17-31, 2013
3. Cabello I, Lock O. Moléculas que endulzan. *Revista de Química* 5, No(2), 1991
4. Anderson GH, Foreyt J, Sigman-Grant M, Allison DB. The use of low-calorie sweeteners by adults: impact on weight management. *J Nutr*. 142 (6): 1163S-9S. 2012;
5. Padmini S, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*, 29; 1293-1299, 2013.
6. Popkin BM, SJ N. The sweetening of the world's diet. *Obes Res*. 2003;11(13):25-132
7. Secretaría de Economía. Análisis comercial del sector edulcorantes en México. 2012.
8. Popkin BM, Gordon P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(S3):S2-S9.
9. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012;96(3):640-6.
10. Carson JS. Non-nutritive Sweeteners: What Do They Offer to a Heart Healthy Diet?, *Circulation*, 20; 1011-1020, 2015
11. Oehler N. Sweeteners. Nutritive and Non-Nutritive. *Sweeteners: Nutritive and Non-Nutritive*. 2013
12. Ashwell M. Stevia, Nature's zero-calorie sustainable sweetener. *Food and Nutrition*. (50), 3, pp 129-1134, 2015,

13. Durán S, Rodríguez MP. Stevia (stevia rebaudiana), non-caloric natural sweetener. *ev Chil Nutr*, (39), No4, 2012
14. Fernstrom J, Munger S. Mechanisms for Sweetness. *The Journal of Nutrition*. 0.3945/jn.111.149567. 2012
15. Fernstrom J. Non-Nutritive Sweeteners and Obesity. *Annual Review of Food Science and Technology* 6; 119-136, 2015
16. Mayu N, Masafumi J. Reciprocal modulation of sweet taste by leptin and endocannabinoids. DOI 10.1007/978-3-642-14426-4_9, #Springer-Verlag Berlin Heidelberg 20
17. Calvo S, Madison J. The endocrinology of taste receptors. *Nature reviews Endocrinology*. doi:10.1038/nrendo.2015
18. Iwatsuki K, Uneyama H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Sci* 2012; 118:123–128
19. Laffitte A, Neiers F. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. 1363-1950, 2014
20. Mitrovic S, Nogueira C. TRPM5-mediated calcium uptake regulates mucin secretion from human colon goblet cell. Ed. . James Nelson *eLife* 2 (2013):. E00658 PMC. Web. 22 de octubre 2015.
21. Anssen S, Laermans J, Verhulst PJ, et al. Bitter taste receptors and alpha-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:2094– 2099.
22. Hass N, Schwarzenbacher K, Breer H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res* 2010; 339:493– 504.
23. Simon BR, Parlee SD, Learman BS. Artificial sweeteners stimulate & adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. *J Biol Chem* 2013; 288:32475 – 32489.

24. Brown J, Rother K. Non-Nutritive Sweeteners and their Role in the Gastrointestinal Tract. *The Journal of Clinical Endocrinology and metabolism*. doi.org/10.1210/jc.2012-1475. 2012
25. Fith C, Kejm K. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, (112), No 5, 739-758. 2012
26. Kuo Ch, Harris MB, Abdominal fat reducing outcome of exercise training: fat burning or hydrocarbon source redistribution?. *Journal Physiol Phamacol*, 2016, (122), No 6, 452-459
27. Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi E. La regulación de la lipólisis en los adipocitos. *Annual Review of Nutrition*, 2007, 27 , 101.
28. Cohen AW, Schubert W, Brasaemle DL, Scherer PE, Lisanti MP. La expresión de caveolina-1 es esencial para la termogénesis sin temblor adecuada en el tejido adiposo marrón. *Diabetes*. 2005; 54 :. 679-86
29. Mottilo E, Balasubramanian P, Lee Y. Coupling of lipolysis and de novo lipogenesis in brown, beige, and white adipose tissues during chronic β 3-adrenergic receptor activation. *Lipid Res*. 2014 55 : (11) 2276 – 2286
30. Simon B, Parlee S, Learman B. Artificial Sweeteners Stimulate Adipogenesis and Suppress
31. Kajimura S, Saito M. A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. 2013, *Annu. Rev. Physiol*. 2014. 76:13.1–13.25
32. Gómez A, Perdomo L, Escribano O. Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad. *An. Real Acad. Farm*. Vol. 80, No 2 (2014), pag. 322-344
33. OMS, Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014, ISBN 978 92 4 356444 9

34. Gutiérrez JP, Rivera Dommarco J, Shamah LT, Villalpando Hernandez S, Franco A, Cuevas NL, Romer Martínez M, Hernández Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México, Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012.
35. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*. 2014;3(6):344-63.
36. Spiroglou S, Kostopoulos C. Adipokines in Periaortic and Epicardial Adipose Tissue: Differential Expression and Relation to Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* (17), No.2. 2010
37. Sánchez J, López D, Pinzón Ó, Sepúlveda J. Adipocinas y síndrome metabólico: múltiples facetas de un proceso fisiopatológico complejo:[revisión]; Adipokines and metabolic syndrome: multiple aspects of a complex pathophysiological process. *Rev Colomb Cardiol*. 2010;17(4):167-76.
38. Proenca AR, Sertie RA, Oliveira AC, Campana AB, Caminhotto RO, Chimin P, et al. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biológicas/Sociedades Brasileira de Biofísica*. 2014;47(3):192-205.
39. Veyrat C, Poher A, Caillon A. Alterations in lipid metabolism and thermogenesis with emergence of brown adipocytes in white adipose tissue in diet-induced obesity-resistant Lou/C rats. *AJP-Endocrinol Metab*, 2011 (300)
40. Martin L, Matthias B. Two types of brown adipose tissue in humans. *adipocyte* (3):1, 63–66. 2014
41. Coelho M, Oliveira T. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ *Arch Med Sci*; 9, 2: 191-200. DOI (digital object identifier): 10.5114/aoms.2013.33181. 2013
42. Schrauwem P, Lichtenbel W. The future of brown adipose tissues in the treatment

of type 2 diabetes. Diabetología
DOI 10.1007/s00125-015-3611. 2015

43. Cinti S. Between brown and white: novel aspects of adipocyte differentiation. *Ann Med*. 2011; 43(2):104-15.
44. Ràfols EM. Tejido adiposo: heterogeneidad celular y diversidad funcional. *Endocrinología y Nutrición*. 2014; 61(2):100-12.
45. Ouellet V, Routhier LA, Bellemare W, Lakhali CL, Turcotte E, Carpentier AC. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of ¹⁸F-FDG- detected BAT in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2011;96(1):192-9.
46. Cannon B, Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes (Lond)*. 2010; 34(1):S7-16.
47. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*. 2014;3(6):344-63.
48. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J Endocrinol*. 2014;170(5):R159-71
49. Park A, Kon W. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem* 26; 6(1): 33-42 ISSN 1948-0210. 2014
50. Moreno JM, Ortega M. Irsin is expressed and produced by human muscle and adipose tissue in association with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*, April 2013, 98(4):E769–E778

51. Castro M, Mosalves M. Irisina, obesidad: una breve revisión. Rev. Horiz; cienc. Act. Fis, ISSN:0718-817, pp 43-47, 2013
52. Norheim F, Langleite M. The effects of acute and chronic exercise on PCG-1 α , irisin and browning of subcutaneous adipose tissue in humans. FEBS Journal 281 (2014) 739–749 ^a 2013 FEBS
53. Patel SA, Hoehn KL, Lawrence RT. Overexpression of the adiponectin receptor AdipoR1 in rat skeletal muscle amplifies local insulin sensitivity. *Endocrinology*. 2012; 153(11):5231–5246.
54. Parque J, Margreet R. A Trial of Sugar-free or Sugar-Sweetened Beverages and Body Weight in Children. The new england journal of Medicine. 364, 1394-1406, 2012.
55. Zhang H, Menon S. Stimulates Hepatic SREBP1c and Lipogenesis through Parallel mTORC1-Dependent and Independent Pathways. Cell Metabolism 14 (1), 21-32, 2011
56. Neorosci B. General and persistent effects of high intensity sweeteners on weight gain and compensation of calories in rats. 123 (4); 722-80 doi: 10.1037 / a0016139. 2009
57. Stephen D. Anton P, Corby K, Donald A, Hongmei H. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite* 55 (2010) 37–43
58. Polyák E. Efectos de edulcorantes artificiales en el peso corporal, consumo de alimentos y bebidas. 2012, Acta Physiol Hung, (4), 401.7
59. Brow AW, Bohan MM, Onken KL. Short-term consumption of sucralose, a nonnutritive sweetener, is similar to water with regard to select markers of hunger signaling and short-term glucose homeostasis in women. *Nutr Res*. 2011 Dec; 31(12):882-8

60. Ruyter J, Margreet R. A Trial of Sugar-free or Sugar-Sweetened Beverages and Body Weight in Children. *The new england journal of Medicine*. 364, 1394-1406, 2012.
61. De matos F, Reis C, Carraro K. Saccharin and aspartame, compared with sucrose, induce greater weight gain in adult Wistar rats, at similar total caloric intake levels. *Appetite* (60), 203-207, 2013
62. Mitsutomi K, Masaki T. Efectos de un edulcorante no nutritivo en la adiposidad corporal y el metabolismo energético en ratones con obesidad inducida por dieta. *Metabolismo*. 63 (1): 69-78. doi: 10.1016 / j.metabol.2014
63. Olivier B, Anderson A, Jacques BM. Review of the nutritional benefits and risks associated with intense sweeteners. *Archives of Public Health* (2015) 73:41
64. Peters JC Beck J. The Effects of Water and Non-Nutritive Sweetened Beverages on Weight Loss and Weight Maintenance: A Randomized Clinical Trial. *Obesity* 2016 Feb;24(2):297-304



X. ANEXOS

Anexo I. Pruebas bioquímicas: Determinación del perfil de lípidos

Se utilizó el kit CHOD-POD. Líquido de Spinreact® por el método químico espectrofotométrico.

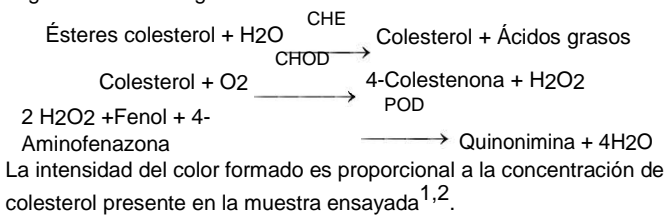
Colesterol CHOD-POD. Líquido

Determinación cuantitativa de colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación del colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias. El aumento del nivel de colesterol es uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{5,6}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

| | | |
|-----------------|--------------------------------------|------------|
| R | PIPES pH 6.9 | 90 mmol/L |
| | Fenol | 26 mmol/L |
| | Colesterol esterasa (CHE) | 1000 U/L |
| | Colesterol oxidasa (CHOD) | 300 U/L |
| | Peroxidasa (POD) | 650 U/L |
| | 4 - Aminofenazona (4-AF) | 0,4 mmol/L |
| CHOLESTEROL CAL | Patrón primario acuoso de Colesterol | |

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,26$.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma^{1,2}. Estabilidad de la muestra 7 días a 2-8°C y 3 meses si se mantiene la muestra congelada (-20°C).

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 505 nm (500-550).
 - Cubeta: 1 cm paso de luz

CÁLCULOS

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times \text{Conc. Patrón} = \text{mg/dL de colesterol en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0258= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

Temperatura 37°C /15-25°C

- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|-----------------------------|--------|--------|---------|
| R (mL) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Patrón (Nota1-2) (μ L) | -- | 10 | -- |
| Muestra (μ L) | -- | -- | 10 |

- Mezclar e incubar 5 min a 37°C ó 10 min a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A) del patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

VALORES DE REFERENCIA

Evaluación del riesgo^{5,6}:

| | |
|--------------------|----------|
| Menos de 200 mg/dL | Normal |
| 200-239 mg/dL | Moderado |
| 240 o más | Alto |

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARÁCTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 0,113 mg/dL hasta el límite de linealidad 750 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir

1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

| | Intraserie (n=20) | | Interserie (n=20) | |
|---------------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| Media (mg/dL) | 99.789 | 185.309 | 96.346 | 184.962 |
| SD (mg/dL) | 1.213 | 1.405 | 4.196 | 12.773 |
| CV (%) | 1.216 | 0.758 | 4.355 | 6.906 |

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 (A).

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,9968.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0.9797x + 2.2803$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias de hemoglobina hasta 5 g/L y bilirrubina hasta 10 mg/dL^{1,2}. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol^{3,4}.

NOTAS

1. CHOLESTEROL CAL: Debido a la naturaleza del producto, es aconsejable tratarlo con sumo cuidado ya que se puede contaminar con facilidad.
2. LCF (*Lipid Clearing Factor*) está integrado en el reactivo.
3. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
4. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
5. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Naito H.K. *Cholesterol*. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1194-11206 and 437.
2. Meitattini F. et al. *The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System*. *Clin Chem* 1978; 24 (12): 2161-2165.
3. Young DS. *Effects of drugs on Clinical Lab. Tests*, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. *Effects of disease on Clinical Lab. Tests*, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

| | | |
|------------|-------|-------------|
| Ref: 41020 | Cont. | 2 x 50 mL |
| Ref: 41022 | | 2 x 100 mL |
| Ref. 41021 | | 2 x 250 mL |
| Ref. 41019 | | 1 x 1000 mL |

HDL Colesterol P

Reactivo precipitante

Reactivo precipitante de HDL colesterol IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnesio. Tras la centrifugación, el sobrenadante contiene lipoproteínas de alta densidad (HDL). La fracción de HDL colesterol se determina utilizando el reactivo enzimático de colesterol total^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a menudo se denomina "colesterol bueno", ya que niveles elevados están relacionados con un menor riesgo cardiovascular. Un nivel bajo de colesterol HDL es considerado uno de los principales factores de riesgo cardiovascular^{1,6,7}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

| | | |
|------------------------------|----------------------|-----------|
| R | Acido fosfotúngstico | 14 mmol/L |
| Reactivo precipitante | Cloruro magnésico | 2 mmol/L |
| STD opcional (Nota 2) | Pat. Prim. Ac. HDL | 50 mg/dL |
| Reactivo opcional | Colesterol CHOD-POD | |

PRECAUCIONES

- H314-Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.
Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

PREPARACION

El reactivo está listo para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹.
No utilizar muestras hemolizadas. Separar el suero de los hematies lo antes posible.
Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Precipitación (Nota 1)

- Dosificar en tubos de centrifuga:

| | |
|--------------|-----|
| R (µL) | 100 |
| Muestra (mL) | 1,0 |
- Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 20 min a 4000 r.p.m. ó 2 min a 12000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total.

CÁLCULOS

Seguir las instrucciones detalladas en el insert de colesterol total.

LDL-colesterol calculado (Friedewald)

LDLc = Colesterol total – HDLc - (TG/5)

CONTROL DE CALIDAD

Proceder según lo indicado en las instrucciones de trabajo del reactivo de Colesterol.

VALORES DE REFERENCIA³

HDL-colesterol:

| | Hombres | Mujeres |
|----------------|-------------|-------------|
| Riesgo menor | > 55 mg/dL | > 65 mg/dL |
| Riesgo normal | 35-55 mg/dL | 45-65 mg/dL |
| Riesgo elevado | < 35 mg/dL | < 45 mg/dL |

LDL-colesterol:

Valores sospechosos a partir de: 150 mg/dL

Valores elevados a partir de: 190 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el *límite de detección* de 1,57 mg/dL hasta el *límite de linealidad* de 275 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

| | Intraserie (n=20) | | Interserie (n=20) | |
|---------------|-------------------|------|-------------------|------|
| Media (mg/dL) | 33,9 | 75,8 | 34,8 | 75,4 |
| SD | 0,85 | 0,89 | 1,25 | 1,95 |
| CV (%) | 2,51 | 1,18 | 3,60 | 2,59 |

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)²: 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: $y=0,9944x - 1,2346$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con triglicéridos hasta 4 g/L¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol HDL^{4,5}.

NOTAS

- El procedimiento de precipitación también se puede realizar usando la mitad del volumen del reactivo y muestra.
- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

BIBLIOGRAFIA

- Naito H K. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1207-1213 and 437.
- Grove T H. Effect of reagent pH on Determination of HDL Cholesterol by precipitation with Sodium Phosphotungstate-magnesium Clin Chem 1979; 25:560,.
- US National Cholesterol Education Program of the National Institutes of Health.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PRESENTACION

LDL Colesterol D

Enzimático colorimétrico. Líquido

Determinación cuantitativa de colesterol LDL IVD

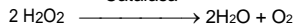
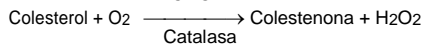
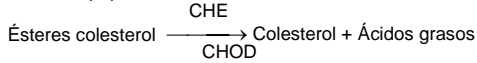
Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

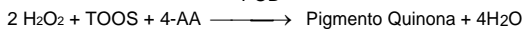
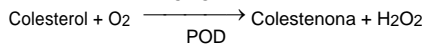
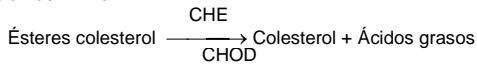
 Determinación directa del LDLc (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra^{3,4}.

La determinación se realiza en dos pasos:

- 1º Eliminación de lipoproteínas no-LDL



- 2º Medición de LDLc



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de LDLc presente en la muestra ensayada.

SIGNIFICADO CLÍNICO

 Las partículas de LDLc son lipoproteínas que transportan el colesterol a las células. Niveles elevados de colesterol LDL son un factor de riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares, a menudo se le denomina "colesterol malo". Niveles altos de colesterol LDL están relacionados con obesidad, diabetes y nefrosis^{1,2,9}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

| | | |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|
| R 1 | Tampón PIPES pH 7,0 | 50 mmol/L |
| | Colesterol esterasa (CHE) | ≥600 U/L |
| | Colesterol oxidasa (CHOD) | ≥500 U/L |
| | Catalasa | ≥600 KU/L |
| | TOOS | 2 mmol/L |
| R 2 | Tampón PIPES pH 7,0 | 50 mmol/L |
| | 4 - Aminoantipirina (4-AA) | 4 mmol/L |
| | Peroxidasa (POD) | ≥4 KU/L |
| | HDLc/LDLc CAL | Calibrador. Suero humano liofilizado |

PRECAUCIONES

HDLc/LDLc CAL: Todos los componentes de origen humano han resultado ser negativos para el antígeno HBs, HCV y para el anti-HIV (1/2). Sin embargo, deben tratarse con precaución como potencialmente infecciosos.

PREPARACION

R 1 y R 2: Listos para su uso.

HDLc/LDLc CAL: Reconstituir el contenido de un vial con 1 mL de agua destilada. Tapar el vial y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación.

R 1 y R 2: Una vez abiertos son estables 4 semanas a 2-8°C.

HDLc/LDLc CAL: Una vez reconstituido es estable 30 horas a 20-25°C, 2 semanas a 2-8°C o 3 meses a -20°C. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 600 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero, plasma heparinizado o plasma EDTA.

 Si alguna muestra presenta precipitados, centrifugarla antes de usarla⁵.

El suero es estable 6 días a 2-8°C. No congelar las muestras.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
 Longitud de onda: 600 (590-700) nm
 Cubeta: 1 cm paso de luz
 Temperatura: 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

8. Pipetear en tubos de ensayo:

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|--------------|--------|--------|---------|
| R 1 (µL) | 300 | 300 | 300 |
| Patrón (µL) | -- | 4 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 4 |

4. Mezclar e incubar 5 min a 37°C

5. Añadir:

| | | | |
|----------|-----|-----|-----|
| R 2 (µL) | 100 | 100 | 100 |
|----------|-----|-----|-----|

5. Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C y leer la absorbancia (A), frente al Blanco de reactivo.

CÁLCULOS

(A) Muestra - (A) Blanco

$$\frac{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de LDL colesterol en la}$$

muestra

Factor de conversión: mg/dL x 0,0259 = mmol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210)

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar los instrumentos, los reactivos y la calibración.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{6,7,8}

| | |
|--------------------|---------------|
| Optimo | < 100 mg/dL |
| Bueno | 100-129 mg/dL |
| Moderadamente alto | 130-160 mg/dL |
| Alto | > 160 mg/dL |

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 17 mg/dL hasta el límite de linealidad 976 mg/dL. Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

| Media (mg/dL) | Intraserie (n= 20) | | Interserie (n= 20) | |
|---------------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | 132,5 | 204,0 | 129,8 | 198,2 |
| SD | 3,28 | 2,20 | 4,29 | 7,19 |
| CV (%) | 2,48 | 1,09 | 3,31 | 3,62 |

Sensibilidad analítica: 1mg/dL = 0,001694 (A).

Exactitud^{10,11}: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 54 muestras fueron los siguientes:

 Coeficiente de regresión (r)²: 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y= 0,9634x + 5,35

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

El ensayo no se ve afectado por muestras ictericas. No interfieren concentraciones de ácido ascórbico hasta 50 mg/dL, hemoglobina hasta 0,5 g/dL, no se detectaron interferencias hasta 30mg/dL de bilirrubina, factores reumatoides hasta 1000 UI/mL y muestras lipémicas hasta 1200 mg/dL de triglicéridos..

Muestras lipémicas con concentración de triglicéridos mayor a 1200 mg/dL, se deben diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Naito H. K., et al, Clin Chem, 41: 132-133, 1995.
- Seidel d., et al, Internist, 28: 606-314, 1987.
- Weiland H. and Seidel D., J Lip Res, 24: 904-909, 1983.
- Friedewald w.F., et al, Clin Chem, 18:499-502, 1972.
- Clinical Laboratory Diagnostics: use and Assesment of Clinical Laboratory Results: First Edition T-H Books Germany; p 172.
- Rifai N., et al, Clin Chem, 38 : 150-160, 1992.
- National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA, Vol.285, No. 19; p.2846-2897 Publication 2001.
- Armstrong V., et al, Arztl Lab, 31: 325-330, 1985.
- Bachorik P.S. and Ross J.W., Clin Chem, 41: 1414-1420, 1995.
- Passing H. and Bablok W., J Clin Chem Clin Biochem, 21: 709-720, 1983.
- Bablok W., et al, J Clin Chem Clin Biochem, 26: 783-790, 1988.

PRESENTACIÓN

| | | |
|------------|-------|----------------|
| Ref: 41023 | Cont. | R 1: 1 x 30 mL |
| | | R 2: 1 x 10 mL |
| | | CAL: 1 x 1 mL |

Quantitative determination of triglycerides
IVD

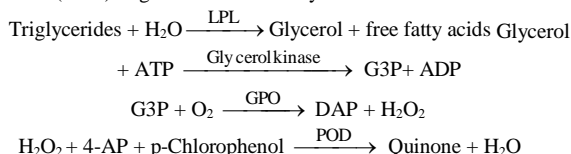
Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Sample triglycerides incubated with lipoproteinlipase (LPL), liberate

glycerol and free fatty acids. Glycerol is converted to glycerol-3-phosphate (G3P) and adenosine-5-diphosphate (ADP) by glycerol kinase and ATP. Glycerol-3-phosphate (G3P) is then converted by glycerol phosphate dehydrogenase (GPO) to dihydroxyacetone phosphate (DAP) and hydrogen peroxide (H₂O₂).

In the last reaction, hydrogen peroxide (H₂O₂) reacts with 4- aminophenazone (4-AP) and p-chlorophenol in presence of peroxidase (POD) to give a red colored dye:



The intensity of the color formed is proportional to the triglycerides concentration in the sample^{1,2,3}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

Triglycerides are fats that provide energy for the cell.

Like cholesterol, they are delivered to the body's cells by lipoproteins in the blood. A diet with a lot of saturated fats or carbohydrates will raise the triglyceride levels. The increases in serum triglycerides are relatively non-specific. For example liver dysfunction resulting from hepatitis, extra hepatic biliary obstruction or cirrhosis, diabetes mellitus is associated with the increase^{3,6,7}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

| | | |
|--------------------------|---------------------------|------------|
| R (Note 2) | GOOD pH 6.3 | 50 mmol/L |
| | p-Chlorophenol | 2 mmol/L |
| | Lipoprotein lipase (LPL) | 150000 U/L |
| | Glycerol kinase (GK) | 500 U/L |
| | Glycerol-3-oxidasa (GPO) | 3500 U/L |
| | Peroxidase (POD) | 440 U/L |
| | 4 - Aminophenazone (4-AP) | 0,1 mmol/L |
| | ATP | 0,1 mmol/L |
| TRIGLYCERIDES CAL | Aqueous primary standard | 200 mg/dL |

PREPARATION

Reagent and standard provided are ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 505 nm \geq 0,26.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 505 nm.
- Matched cuvettes 1,0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Serum or plasma¹.

Stability of the sample: 5 days at 2-8°C .

PROCEDURE

1. Assay conditions:

Wavelength: 505 nm (490-550)
 Cuvette: 1 cm light path
 Temperature: 37°C / 15-25°C

2. Adjust the instrument to zero with distilled water.

| | Blank | Standard | Sample |
|---------------------------------------|-------|----------|--------|
| R (mL) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Standard ^(Note 1,3,4) (μL) | -- | 10 | -- |
| Sample (μL) | -- | -- | 10 |

- Mix and incubate for 5 min at 37°C or 10 min at 15-25°C.
- Read the absorbance (A) of the samples and standard, against the Blank. The colour is stable for at least 30 minutes.

CALCULATIONS

(A) Sample – (A)Blank

_____ x Standard conc.= mg/dL triglycerides in the sample

(A) S t andard – (A)Blank

Conversion factor: mg/dL x 0,0113= mmol/L.

QUALITY CONTROL

Control Sera are recommended to monitor the performance of assay procedures: SPINTROL H Normal and Pathologic (Ref. 1002120 and 1002210).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagent and calibration material.

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES

Men **40 – 160 mg/dL**
 Women **35 – 135 mg/dL**

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit 0,000 mg/dL to linearity limit 1600 mg/dL.

If the concentration is greater than linearity limit dilute 1/2 the sample with ClNa 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

| | Intra-assay (n=20) | | Inter-assay (n=20) | |
|--------------|--------------------|------|--------------------|------|
| | Mean (mg/dL) | SD | CV (%) | |
| Mean (mg/dL) | 109 | 224 | 111 | 224 |
| SD | 0,64 | 1,01 | 3,74 | 7,90 |
| CV (%) | 0,58 | 0,45 | 3,38 | 3,52 |

Sensitivity: 1 mg/dL = 0,0013 (A).

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagent (x). The results obtained using 50 samples were the following:

Correlation coefficient (r): 0,99810.

Regression equation: y= 0,9178x - 0,5426

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

No interferences were observed with bilirubin < 170 μmol/L, hemoglobin < 10 g/L².

A list of drugs and other interfering substances with cholesterol determination has been reported^{4,5}.

NOTES

- TRIGLYCERIDES CAL: Proceed carefully with this product because due its nature it can get contaminated easily.
- LCF (Lipid Clearing Factor) is integrated in the reagent.
- Calibration with the aqueous Standard may cause a systematic error in automatic procedures. In these cases, it is recommended to use a serum Calibrator.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers.**

BIBLIOGRAPHY

- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 476-482.
- Fossati P et al. Clin. Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Tryglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PACKAGING

- Pipett _____ e into a cuvette:

Ref: 41030
Ref. 41031
Ref. 41032
Ref. 41033
Ref. 41034

R:1 x 50
mL, CAL:
1 x 2 mL
R:2 x 150
mL, CAL:
1 x 5 mL
R:1 x 100
mL, CAL:
1 x 2 mL
R:1 x 500
mL, CAL:
1 x 5 mL
R:1 x 1000
mL, CAL: 1
x 5 mL

Cont.

Anexo II. Determinación de glucosa sanguínea

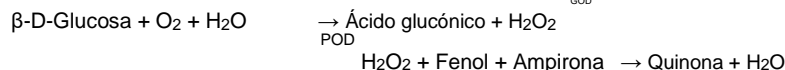
Trinder. GOD-POD

Determinación cuantitativa de glucosa IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂), producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células. La diabetes mellitus es una enfermedad que cursa con una hiperglucemia, causada por un déficit de insulina^{1,5,6}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

| | | |
|--------------------|-----------------------------------|------------|
| R 1 | TRIS pH 7,4 | 92 mmol/L |
| Tampón | Fenol | 0,3 mmol/L |
| R 2 | Glucosa oxidasa (GOD) | 15000 U/L |
| Enzimas | Peroxidasa (POD) | 1000 U/L |
| | 4 - Aminofenazona (4-AF) | 2,6 mmol/L |
| GLUCOSE CAL | Patrón primario acuoso de Glucosa | 100 mg/dL |

- Mezclar e incubar 10 minutos a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CÁLCULOS

$(A)_{\text{Muestra}} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa en la muestra } (A)_{\text{Patrón}}$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0555= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:

60 – 110 mg/dL ≈ 3,33 – 6.10 mmol/L

LCR:

60 – 80 % del valor en sangre

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,04 mg/dL hasta el límite de linealidad de 500 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de

R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido. Estabilidad: 1 mes en nevera (2-8°C) o 7 días a Temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

GLUCOSE CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm $\geq 0,10$.

MATERIAL ADICIONAL

11. Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
12. Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
13. Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis¹ y LCR.

El suero debe separarse lo antes posible del coágulo.

Estabilidad: La glucosa en suero o plasma es estable 3 días a 2-8°C.

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0036 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Precisión:

| | Intraserie (n=20) | | Interserie (n=20) | |
|---------------|-------------------|------|-------------------|------|
| Media (mg/dL) | 96,8 | 241 | 98,4 | 248 |
| SD | 0,81 | 1,43 | 1,55 | 3,73 |
| CV (%) | 0,83 | 0,59 | 1,58 | 1,50 |

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 1,0x + 0,12$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con: hemoglobina hasta 4 g/L, bilirrubina hasta 20 mg/L, creatinina hasta 100 mg/L, galactosa hasta 1 g/L. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucosa^{3,4}.

NOTAS

9. La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
10. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
11. **SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.**

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta:

| | Blanco | Patrón | Muestra |
|------------------------|--------|--------|---------|
| RT (mL) | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| Patrón (Nota 1,2) (µL) | -- | 10 | -- |
| Muestra (µL) | -- | -- | 10 |

1. Kaplan A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
2. Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
3. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
4. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
5. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
6. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref:1001190 4 x 125 mL
Ref:1001191 Cont. 4 x 250 mL

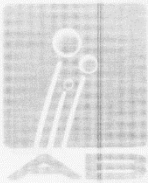
IMPORTADORES EXCLUSIVOS : LAB CENTER DE MEXICO S.A. DE C.V.
Colina de las Termas #35 Fracc. Boulevares Naucalpan Edo. de México C.P. 53140
TEL.: 01 (55) 5360-6772 LADA SIN COSTO 01 800 500 SPIN (7746)
www.spinreact.com.mx info@spinreact.com.mx

Anexo III. Determinación de la concentración de irisina

IRISIN ELISA KIT PAGE | 1

IRISIN (HUMAN, MOUSE, RAT) ELISA KIT

FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF IRISIN CONCENTRATIONS IN SERUM AND EDTA PLASMA



ALWAYS REFER TO LOT SPECIFIC PROTOCOL PROVIDED WITH EACH KIT FOR INSTRUCTIONS. PROTOCOL MUST BE READ BEFORE USING THIS PRODUCT.

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

PRODUCT INFORMATION:

THIS KIT IS FOR ONE TIME USE ONLY.

| | |
|-----------------------|---|
| ELISA NAME | IRISIN ELISA KIT |
| Catalog No. | SK00170-01 |
| Lot No. | 20113125 |
| Formulation | 96 T |
| Standard range | 0.066 - 1024 ng/mL |
| Dynamic range | 1.638 - 1024 ng/mL |
| Sensitivity | ~1 ng/mL |
| Sample Volume | 50 µL |
| Dilution Factor | 2 or 4 for serum or plasma samples (Optimal dilutions should be determined by each laboratory for each application) |
| Sample Type | Serum, EDTA Plasma |
| Specificity | Human, Mouse, Rat Irisin |
| Calibration | Irisin recombinant |
| Intra-assay Precision | 4 - 6% |
| Inter-assay Precision | 8 - 10% |
| Storage | 2 - 8° C |

This kit contains sufficient materials to run approximately 35 samples duplicated provided that assay is run according to protocol.

Order Contact:
AVISCERA BIOSCIENCE, INC.
2348 Walsh Ave., Suite C
Santa Clara, CA 95051
USA
Tel: (408) 982 0300
Fax: (408) 982 0301
Email: Info@AvisceraBioscience.com
www.AvisceraBioscience.com

IRISIN ELISA KIT

INTRODUCTION

Irisin (Human, Mouse, Rat) ELISA employs the quantitatively competitive enzyme immunoassay technique in which Irisin present in samples compete with a fixed amount of biotinylated Irisin for sites on purified rabbit IgG specific against Irisin. During the incubation period, the rabbit IgG specific for Irisin binds to the goat anti-rabbit IgG pre-coated onto the microplate. Following a wash to remove any unbound antibody, standard, samples and biotin conjugate, a Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (HRP) is added to the wells. After washing away any unbound enzyme, a substrate solution is added to the wells. The enzyme reaction yields a blue product that turns yellow when stop solution is added. The intensity of the color measured is in inverse proportion to the amount of Irisin bound in the initial step. The sample values are then read off the standard curve.

Irisin (Human, Mouse, Rat) ELISA has been shown to accurately quantify the recombinant and natural Irisin. Results obtained using natural Irisin showed dose response curves that were parallel to the standard curves obtained using the kit standards.

PROCEDURAL LIMITATIONS

_FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.

_This ELISA kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.

_Do not mix reagents with those from other lots or sources.

_It is important that the Dilution Buffer selected for the standard curve be consistent with the samples being assayed.

_Any modifications in buffers, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, as well as kit age can cause a change in signal.

_Not all interfering factors have been tested in the immunoassay, therefore the possibility of interference cannot be excluded.

COMPONENTS PROVIDED

| DESCRIPTION | CODE | QUANTITY |
|--|-----------|----------|
| R-Microplate - 96 well microplate pre-coated with polyclonal anti rabbit IgG Fc. | RM01 | 1 plate |
| Irisin Standard – 1024 ng/vial of recombinant Irisin in a buffered protein base with preservative; lyophilized. | 170-01-01 | 1 vial |
| Irisin Biotin – 6 mL of biotinylated Irisin with preservative; lyophilized. | 170-01-02 | 1 bottle |
| Irisin Antibody – 6 mL of polyclonal purified IgG against Irisin with preservative; lyophilized. | 170-01-03 | 1 bottle |
| Positive Control – one vial of recombinant Irisin; lyophilized (optional). | 170-01-04 | 1 vial |
| Streptavidin-HRP Conjugate - 120 µL/vial, 100-fold concentrated solution of Streptavidin conjugate to HRP. | SAHRP | 1 vial |
| Dilution Buffer – 60 mL of buffered protein based solution with preservative. Ready to use. | DB18 | 1 bottle |
| HRP Diluent Solution - 12 mL of buffered protein based solution with preservative. | DB06 | 1 bottle |
| Wash Buffer - 50 mL of 10-fold concentrated buffered surfactant, with preservative. | WB01 | 1 bottle |
| TMB Substrate Solution - 11 mL of TMB substrate solution. | TMB01 | 1 bottle |
| Stop Solution - 11 mL of 0.5M HCl. | S-STOP | 1 bottle |
| Plate Sealer | EAPS | 1 |
| Plastic Pouch | P01 | 1 |

STORAGE

Unopened Kit: Store at 2 – 8° C for up to 12 months. For longer storage, unopened Standard, Positive Control, Irisin Antibody and Irisin Biotin should be stored at -20° C or -70° C. Do not use kit past expiration date.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Microplate shaker (250-300rpm).
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 100 mL and 500 mL graduated cylinders.

PRECAUTIONS FOR USE

All reagents should be considered as potentially hazardous. The stop solution contains diluted hydrochloric acid. Appropriate care, therefore, should be taken while handling this solution. We therefore recommend that this product is handled only by those persons who have been trained in laboratory techniques and that it is used in accordance with the principles of good laboratory practice. Wear suitable protective clothing such as laboratory overalls, safety glasses and gloves. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In the case of contact with skin or eyes wash immediately with water.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

For cell cultures supernates, must use **animal serum free media**. Fetal bovine serum samples cross-reacts with this ELISA Kit.

Optional: Use Aprotinin (enzyme inhibitor) for ALL sample collection to prevent sample degradation. 0.5 TIU per ml of sample solution.

SAMPLE PREPARATION

Serum and plasma samples may require a 2-fold or 4-fold dilution. A suggested 2-fold dilution is 75 μL sample + 75 μL Dilution Buffer. A suggested 4-fold dilution is 40 μL sample + 120 μL Dilution Buffer.

Optimal dilutions should be determined by each laboratory for each application with a pretest. Use polypropylene test tubes.

REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 50 mL of Wash Buffer Concentrate into deionized or distilled water (450 mL) to prepare 500 mL of 1x Wash Buffer.

Irisin Standard - Reconstitute the irisin standard with 1.0 mL of Dilution Buffer. This reconstitution produces a stock solution of 1024 ng/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions. Pipette 200 μL of Dilution Buffer into tubes #1 to #6. Use the stock solution to produce a 5-fold dilution series. Mix each tube thoroughly before the next transfer. The 1024 ng/mL standard serves as the high standard.

| TUBE | STANDARD | DILUTION BUFFER | CONCENTRATION |
|-------|---------------------------|-------------------|---------------|
| stock | powder | 1.0mL | 1024 ng/ml |
| # 1 | 50 μl of stock | 200 μl | 204.8 ng/ml |
| # 2 | 50 μl of 1 | 200 μl | 40.96 ng/ml |
| # 3 | 50 μl of 2 | 200 μl | 8.192 ng/ml |
| # 4 | 50 μl of 3 | 200 μl | 1.638 ng/ml |
| # 5 | 50 μl of 4 | 200 μl | 0.328 ng/ml |
| # 6 | 50 μl of 5 | 200 μl | 0.066 ng/ml |



Positive Control - Reconstitute the Positive Control with 1.0 mL of Dilution Buffer.

Irisin Antibody - Reconstitute the Irisin Antibody with 6.0 mL of Dilution Buffer to prepare 1x Antibody Solution.

Irisin Biotin - Reconstitute the Irisin Biotin with 6.0 mL of Dilution Buffer to prepare 1x Biotin Solution.

Streptavidin-HRP Conjugate - Transfer 120 µL of 100-fold concentrated Streptavidin-HRP Conjugate stock solution to 11.88 mL of **HRP Diluent Solution (DB06)** to prepare working solution (protect from light).

ELISA PROTOCOL

Bring all reagents and samples to room temperature before the start of the assay. Blank, standard dilutions, positive control and samples should be assayed in duplicate. ELISA Protocol may need further optimization.

1. Prepare all reagents and working standards as directed in the previous sections.
2. Leave two wells as Blank. **DO NOT ADD ANY ANTIBODY OR BIOTIN SOLUTION INTO BLANK WELLS.**
3. Set two wells as total binding (TB). Add 50 µL per well of Dilution Buffer.
4. Add 50 µL per well of standard dilutions from #6 to #5 (reverse order of serial dilution) to wells. Add 50 µL per well of Positive Control into two wells. Add 50 µL per well of samples into other wells.
5. Add 50 µL per well of 1x Antibody Solution into total binding, standards, positive control and sample wells. Cover with plate sealer and incubate on microplate shaker (250 – 300 rpm) at room temperature for 1 hour. **NOTE: DO NOT ASPIRATE AND WASH PLATE. PROCEED IMMEDIATELY TO THE NEXT STEP.**
6. Add 50 µL per well of 1x Biotin Solution into total binding, standards, positive control and sample wells. Cover with plate sealer and incubate on microplate shaker (250 – 300 rpm) at room temperature for 1 hour. **NOTE: DO NOT ADD Biotin Solution to Blank wells.**
7. Aspirate wells and wash 4 times with 300 µL of 1x Wash Buffer. Blot plate on absorbent paper to remove any residual buffer.
8. Add 100 µL of Streptavidin-HRP Conjugate working solution to each well, including blanks. Incubate on microplate shaker (250 – 300 rpm) for 60 minutes at room temperature. **Protect from light.**
9. Aspirate and wash as step 7.
10. Add 100 µL of Substrate Solution to each well. Incubate on microplate shaker (250 – 300 rpm) for 3-7 minutes at room temperature. **Protect from light.**
11. Add 100 µL of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. It is recommended to add the stop solution when the Total Binding or the lowest standard has developed a dark blue color.
12. Determine the optical density of each well using a microplate reader set to 450 nm.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, positive control and sample, and subtract the average Blank optical density. It is recommended to use software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. The standard curve shows relationship between standard concentrations and corresponding O.D. absorbances. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

Calculation of samples with a concentration exceeding that of standard 1024 ng/mL may result in inaccurate, low Irisin levels. Such samples require further external predilution according to expected Irisin values with Dilution Buffer in order to precisely quantify the actual Irisin level. **Optimal dilutions should be determined by each laboratory for each application.**

Curva MyBiosource

| | | |
|----|-----------|-----|
| A1 | Bco | |
| B1 | 200 ng/ml | |
| C1 | 100 | |
| D1 | 50 | |
| E1 | 12.5 | st3 |
| F1 | 0 | |
| G1 | Control | |
| H1 | | |

Dil. Muestra 1:3
50:100

TYPICAL DATA

This standard curve is provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

| LAYOUT | STANDARD (NG/ML) | AVERAGE OD450 (CORRECTED) |
|---------------|------------------|---------------------------|
| BLANK | | 0 (0.054) |
| STOCK STD | 1024 | 0.069 |
| STD1 | 204.8 | 0.179 |
| STD2 | 40.96 | 0.653 |
| STD3 | 8.192 | 1.501 |
| STD4 | 1.638 | 1.690 |
| STD5 | 0.328 | 1.791 |
| STD6 | 0.066 | 1.890 |
| TOTAL BINDING | 0 | 1.619 |

- Lot No.: 20113125
- Positive Control: 40 ~ 110 ng/mL

SPECIFICITY

This assay recognizes both natural and recombinant Irisin. The factors listed below were prepared at 500 µg/mL in Dilution Buffer, and assayed for cross reactivity.

| PROTEINS | CROSS-REACTIVITY (%) |
|----------------------------|----------------------|
| Irisin (Human, Mouse, Rat) | 100 |
| Human Chemerin | 0 |
| Human FGF-21 | 0 |
| Human Visfatin | 0 |
| Human Vaspin | 0 |
| Human FABP4 | 0 |
| Human SPARC | 0 |
| Human Omentin 1 | 0 |
| Human ANGPTL4 | 0 |

The fetal bovine neat or diluted serum samples were detectable in this ELISA kit, which indicates that fetal bovine serum samples cross-reacts with this ELISA Kit. For cell culture supernates, must use animal serum free media.

SUMMARY OF ASSAY PROCEDURE**PREPARE REAGENTS, SAMPLES AND STANDARDS**

Add 50 µL of standard dilutions, samples or positive control to the well. Add 50 µL of 1x Antibody Solution to each well used, except blanks. Incubate 2 hours on the plate shaker at RT. **DO NOT ASPIRATE AND WASH PLATE. PROCEED TO NEXT STEP.**

Add 50 µL 1x Biotin Solution to each well used, except blanks. Incubate 2 hours on the plate shaker at RT.

Aspirate and wash 4 times.

Add 100 µL Streptavidin-HRP conjugate working solution to all wells, including blanks. Incubate 60 minutes on the plate shaker at RT. **Protect from light.**

Aspirate and wash 4 times.

Add 100 µL Substrate Solution to each well. Incubate 3-7 minutes on plate shaker at RT. **Protect from light.**

Add 100 µL Stop Solution to each well. Read at 450nm.

Anexo IV. Método histológico

Materiales:

1. Microscopio CARL ZEISS®, modelo ZES-PRIMOSTAR
2. Criotomo Leica®, modelo CM3050-S
3. Cassettes de histología
4. Horno de secado RIOSSA®, modelo E-41MMOQ (desparafinar)
5. Frascos Coplin
6. Porta objetos
7. Cubre objetos
8. Propenilglicol (C₃H₈O₂)
9. Isopropanol (C₃H₈O)
10. Sucrosa de laboratorio (C₁₂H₂₂O₁₁)
11. Resina
12. Parafina **Paraplast®**

Características de Parafina:

Parafina de alta pureza, mezcla de polímeros de bajo peso molecular , su presentación es en pequeños gránulos que facilitan la fusión, minimiza la compresión del tejido y la formación de arrugas, las secciones se pueden cortar sin desmoronarse o formación de grietas.

Por inclusión del tejido en parafina

Fundamento

El objetivo de incluir el tejido adiposo en parafina fue prepararlo y mantenerlo en condiciones óptimas para observar, examinar y analizar sus componentes histomorfológicos a través de un microscopio fotónico.

Soluciones:

PBS estéril

NaCl..... 8g
KCl.....0.2 g

Na₂HPO₄.....1.44g
KH₂PO₄..... 0.24g
Ajustar pH a 7.4 con HCl
Ajustar el volumen de PBS estéril con H₂O

Contraste de Zinc-formaldehido 1x

Formaldehido (concentración al 37%)..... 100 mL
Agua destilada..... 900 mL
NaCl..... 9 g
Na₂HPO₄..... 12 g
Zn en polvo..... 1 g

Preparación de muestras

1. Realizar la disección de tejido adiposo de las cavidades: inguinal, mesentérica y perigonadal.
2. Incubar 72 hr la muestra en zinc-formaldehido a 4 °C
3. Lavar las muestras tres veces con PBS
4. Deshidratar las muestras con formol 2 h
5. Embeber en parafina
6. Cortar la sección en criotomo a 5 µm
7. Colocar los cortes en laminillas
8. Teñirlas con hematoxilina y eosina, secar por 5 min

Método de tinción Hematoxilina-Eosina

Soluciones:

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina de Harris..... 5g
Etanol al 100..... 50 mL
Sulfato de amonio y aluminio..... 100 g
Oxido de mercurio..... 1 L
Ac. Acético glacial..... 3.5 g

Eosina

Eosina (amarillenta)..... 10 g
Agua destilada..... 300 mL

Etanol al 95%..... 2 L
Ac. Fosfotúnstico..... 4 g
Carbonato de litio saturado..... 20 gotas

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar 5 min
- 2.-Colocar la laminilla en Xilol por 2 min
- 3.- Realizar 10 baños en alcohol absoluto
- 4.-Realizar 2 baños en alcohol al 96%
- 5.- Enjuagar la laminilla en agua
- 6.- Sumergir en Hematoxilina por 10 min
- 7.- Realizar 1 baño en carbonato de litio
- 8.- Enjuagar la laminilla en agua
- 9.- Realizar un baño en Eosina
- 10.- Realizar 10 baños en alcohol al 96%
- 11.- Realizar 10 baños en alcohol absoluto
12. Realizar2 baños en Xilol
- 13.- Dejar secar a temperatura ambiente por 5 min
- 14.- Colocar una gota de resina y cubrir con el cubreobjetos
- 15.- Secar en el horno de secado por 10 min
- 16.- Observar en microscopio

Una vez teñido el tejido en la laminilla, se observó y analizó bajo el microscopio la histomorfología con el programa *Image-Pro-Plus®*, para realizar determinaciones cuanti y semicuantitativas del tejido adiposo en las cavidades inguinal, mesentérica y gonadal.