



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

**“Efecto del consumo de extracto de stevia sobre la expresión de  $\Delta$ FosB en el núcleo del tracto solitario y área tegmental ventral de ratas Wistar”**

Tesis

que para obtener el título de Biólogo presenta:

**Luis Enrique Gómez Juárez**

Director:

Dr. Arturo Venebra Muñoz

Toluca, Estado de México.

Contenido

**Resumen** ..... 4

**Introducción**..... 6

**Antecedentes**..... 8

**1. Sistema de recompensa cerebral** ..... 8

        1.1 Dopamina..... 8

        1.2 Sistema dopaminérgico..... 9

        1.3 Área tegmental ventral ..... 10

        1.4 Núcleo Accumbens..... 11

        1.3 Core y Shell (Núcleo Accumbens)..... 12

**2. Vía del gusto**..... 13

        2.1 Señalización celular..... 15

        2.2 Receptores al sabor dulce, familia T1r ..... 17

        2.3 Teoría molecular del sabor dulce ..... 18

        2.4 Núcleo del tracto solitario..... 19

        2.5 Anatomía del gusto..... 20

**3. *Stevia rebaudiana*** ..... 21

**4.  $\Delta$ FosB** ..... 22

**Justificación** ..... 24

**Hipótesis** ..... 24

**Objetivos** ..... 24

**Método**..... 25

**1. Animales** ..... 25

        1.2 Alojamiento ..... 25

        1.3 Obtención de las camadas..... 25

        1.4 Aleatorización de las camadas ..... 26

        1.5 Grupos ..... 26

**2. Preparación del tejido nervioso**..... 26

        2.1 Perfusión ..... 27

        2.2 Crioprotección ..... 27

        2.3 Cortes ..... 28

2.4 Inmunohistoquímica.....	29
2.5 Montaje .....	30
3. Análisis histológico .....	30
4. Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	33
1. Prueba de normalidad de datos.....	33
2. Inmunoreactividad de $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario (Sol) .....	33
3. Inmunoreactividad de $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral (VTA) .....	35
Discusión .....	36
1. Inmunoreactividad en núcleo del tracto solitario.....	36
2. Inmunoreactividad en área tegmental ventral .....	37
Conclusiones.....	39
Referencias .....	40

## Resumen

Los edulcorantes de stevia (steviosidos) son edulcorantes naturales no calóricos entre 100 a 300 veces más dulces respecto al azúcar y contienen una mezcla compleja de glúcidos diterpenos. En la actualidad su uso ha ido en aumento debido a una tendencia en el consumo de productos naturales sustitutos del azúcar. Los steviosidos activan al receptor del sabor dulce T1R2-T1R3, que es donde se inicia la transducción de señales. Las vías del gusto se transmiten a través de los pares craneales VII, IX y X hasta llegar a la corteza gustativa primaria con relevos primarios a nivel del tallo cerebral y en núcleos del tracto solitario o del séptimo.

El sistema de recompensa evolucionó para satisfacer conductas biológicamente esenciales como alimentación, hidratación, reproducción, cuidado parental e interacciones sociales. Cuando se consumen alimentos se activa la vía mesolímbica de recompensa, de hecho, se puede consumir alimento aún después de haber alcanzado los requerimientos energéticos debido a las propiedades hedónicas de la comida. Investigaciones previas, han reportado la actividad del sistema dopaminérgico por el consumo de sacarosa. Sin embargo, a la fecha no se ha reportado la actividad de este sistema provocado por el consumo de edulcorantes no calóricos.

En la actualidad, nuestro grupo de trabajo se encuentra interesado en averiguar si el consumo de dichas sustancias puede activar el sistema dopaminérgico, lo cual sería la puerta de entrada para el establecimiento de una posible adicción. De esta forma las primeras regiones a evaluar en el cerebro son el núcleo del tracto solitario y área tegmental ventral. Para evaluar la actividad de estas áreas, se colocaron dos grupos de 5 ratas machos adolescentes (30-40 días postnatal) un grupo control y un grupo experimental, el grupo control tuvo acceso a agua y alimento *ad libitum*, respecto a los animales del grupo experimental, estos tuvieron acceso a una solución de extracto de stevia al 0.2% en su agua las 24 horas del día con alimento *ad libitum*. El tratamiento tuvo una duración de 20 días, al final del tratamiento las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico vía intraperitoneal y perfundidas vía intracardiaca con solución salina (0.9%) seguida de paraformaldehído al 4% en

PB 0.1 M a fin de lograr la perfusión de los tejidos y realizar la extracción del cerebro. Posteriormente se realizaron secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  del núcleo del tracto solitario (bregma -11.76) y del área tegmental ventral (bregma -6.84) para ser procesados con la técnica de inmunohistoquímica para  $\Delta\text{FosB}$ . Se cuantificaron los núcleos positivos a  $\Delta\text{FosB}$  y se compararon por medio de un Mann-Whitney test. Los resultados en núcleo del tracto solitario indican diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas del grupo tratado con extracto de stevia con respecto del control con un valor de  $U=532.5$  y  $P=0.0089<0.05$ , en área tegmental ventral indican que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas del grupo tratado con stevia respecto al grupo control con un valor de  $U=487.0$  y un valor de  $P=0.0017<0.05$ . Los hallazgos indican que en el núcleo del tracto solitario existe expresión del factor de transcripción por lo que la vía del gusto se activa tras el consumo del extracto, y en área tegmental ventral nos indica que el consumo de stevia, activa el sistema de recompensa.

## Introducción

El sistema de recompensa dopaminérgico mesolímbico es importante en conductas biológicamente esenciales como la alimentación y la reproducción. La activación de las neuronas mesolímbicas en el área tegmental ventral conduce a la liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Esta proyección mesolímbica es crítica para el comportamiento relacionado con la recompensa y ha sido bien estudiada en modelos de adicción a las drogas (Andrews y Horvath, 2008).

Se ha reportado que la sacarosa puede activar este sistema e inducir recompensas que son comparables en magnitud a drogas adictivas como el alcohol, cocaína y nicotina. Todo indica que esto se debe principalmente a su aporte calórico relacionado con su poder edulcorante (Lenoir *et al.*, 2007).

La percepción del sabor dulce es una capacidad innata que depende de dos receptores acoplados a proteína G, T1R2 y T1R3, localizados en la lengua. La estimulación de estos receptores por dietas dulces tales como bebidas azucaradas (refrescos, gaseosas, bebidas de frutas) genera una sensación que la mayoría de los humanos y otros mamíferos, incluyendo roedores, encuentran intensamente gratificante (Lenoir *et al.*, 2007).

Se sabe que la sacarosa y los edulcorantes como la stevia activan los receptores de sabor dulce T1R2-T1R3 (Lee y Owyang, 2017). La stevia es un edulcorante natural de alta potencia que consta de hasta diez glucósidos de esteviol. La sustancia ahora se emplea en varios alimentos, bebidas y como un sustituto del azúcar en la mesa. Es 250 veces más dulce que el azúcar en una equivalencia de sacarosa al 5% y tiene cero calorías. Fue uno de los primeros edulcorantes aislados de fuentes naturales (Chopade *et al.*, 2015).

Sin embargo, no se ha reportado la actividad del sistema de recompensa provocado por el consumo de edulcorantes como stevia. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la actividad neuronal de núcleos cerebrales clave, tanto en la detección del sabor como en la vía de recompensa cerebral mediante la detección del factor de transcripción  $\Delta$ FosB.

Entre muchos factores de transcripción que se sabe que influyen en el proceso de adicción, uno de los mejor caracterizados es el  $\Delta$ FosB, que se induce en las regiones de recompensa del cerebro por exposición crónica a prácticamente todas las drogas de abuso. Además,  $\Delta$ FosB sirve como indicador de la actividad cerebral a causa de su estabilidad (Nestler, 2008).

## **Antecedentes**

### **1. Sistema de recompensa cerebral**

El sistema de recompensa cerebral fue descrito por Olds y Milner en la Universidad McGill a principios de la década de 1950. Estos investigadores señalaron que los animales regresaban repetidamente a un área del laboratorio en la que habían recibido estimulación eléctrica leve, en estructuras subcorticales. Posteriormente, indicaron que los animales realizaron tareas como presionar palancas montadas en la pared, para recibir dicha estimulación cerebral (Gardner, 2011).

Es importante destacar que el circuito de recompensa cerebral evolucionó para la subsistencia de comportamientos biológicamente esenciales; como la alimentación, hidratación, conducta sexual, cuidado parental e interacciones sociales (Gardner, 2011). La vía de recompensa cerebral no es una estructura como tal, es un grupo de núcleos cerebrales que trabajan de manera conjunta formando una red a través de la cual circula la información. Entre los principales componentes del sistema se encuentran el área tegmental ventral, núcleo accumbens, amígdala, núcleos basales y corteza prefrontal. Su principal neurotransmisor es la dopamina (Gardner, 2011).

#### **1.1 Dopamina**

La dopamina (Figura 1) es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) en los mamíferos, participa en la regulación de funciones como conducta motora, emotividad y afectividad, así como en la comunicación neuroendócrina. Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de cinco tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias farmacológicas denominadas D1 y D2 (Bahena *et al.*, 2000).

La investigación acerca de la transmisión dopaminérgica puede remontarse a la década de los 50's, cuando la dopamina fue reconocida como un neurotransmisor, siendo detectada por vez primera en el SNC en 1958 (Bahena *et al.*, 2000).

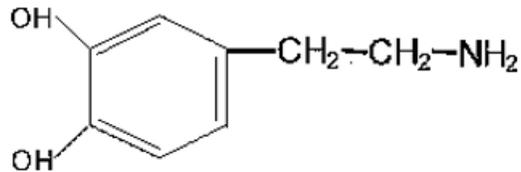


Figura 1.- Estructura química de la dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) (Tomada de Bahena *et al.*, 2000).

## 1.2 Sistema dopaminérgico

El sistema de dopamina mesolímbico es un elemento esencial en el inicio y la modulación de diversas formas de comportamiento dirigido a objetivos, incluidos el refuerzo de drogas y procesos de adicción. La neurotransmisión de dopamina aumenta con la administración aguda de todas las drogas de abuso. La exposición crónica a estos fármacos a través de la autoadministración voluntaria proporciona un modelo de abuso de estimulantes que es útil para evaluar las posibles adaptaciones conductuales y neuroquímicas que se producen durante la adicción (España y Jones, 2013).

Este sistema incluye a las neuronas de la región retrorubral del área tegmental ventral y de la sustancia negra compacta, las que envían proyecciones a tres regiones principales: el neostriado (núcleos caudado y putamen), la corteza límbica (entorrinal, prefrontal medial y cíngulo) y otras estructuras límbicas (el septum, el tubérculo olfatorio, el núcleo accumbens, la amígdala y la corteza piriforme) (Figura 2). Dentro de este grupo se encuentran dos de las vías dopaminérgicas más importantes, la vía nigroestriatal y la vía mesolímbica (Koob y Volkow, 2010).

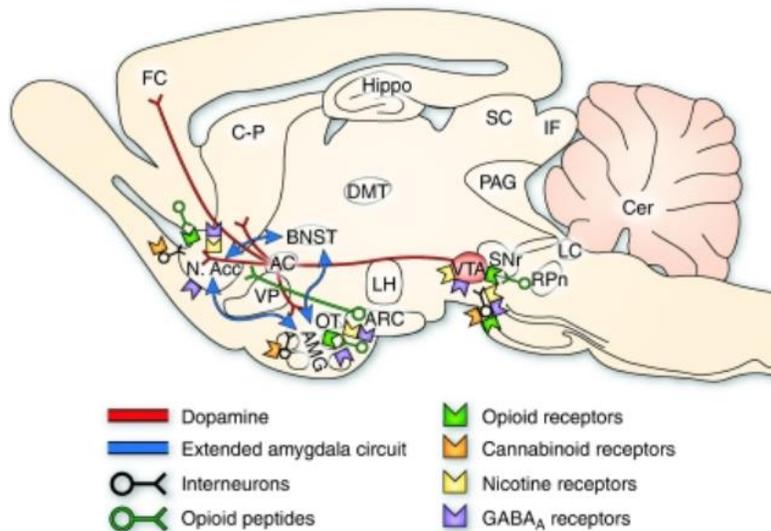


Figura 2.- Esquematación de un corte sagital de cerebro de ratona donde se muestran las estructuras cerebrales que forman parte del sistema de recompensa, señalando de manera específica en color rojo la vía dopaminérgica. Área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens (N.Acc), comisura anterior (AC), corteza frontal (FC). Tomado de Koob y Volkow, 2010.

### 1.3 Área tegmental ventral

El área tegmental ventral es una estructura evolutivamente conservada, a la cual se le atribuyen funciones en la búsqueda de recompensa, seguridad, aprendizaje, motivación y trastornos neuropsiquiátricos, como adicción y depresión. Las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio se asocian con mayor frecuencia al procesamiento de recompensas naturales (por ejemplo, alimentos o agua) y drogas de abuso. Más de cincuenta años de intensa investigación sugieren que las neuronas pertenecientes al área tegmental ventral, que incluye, pero no se limita a las neuronas dopaminérgicas, son fundamentales en el refuerzo conductual. Se han presentado muchas hipótesis sobre la función específica de las neuronas dopaminérgicas en el procesamiento de recompensa, como la toma de decisiones, abordaje, aprendizaje y formación de la memoria. Sin embargo, varios estudios también han demostrado que las neuronas dopaminérgicas del área tegmental

ventral están involucradas en el procesamiento de resultados aversivos (Barker *et al.*, 2016).

Después de identificar que la dopamina es un neurotransmisor químico a nivel cerebral, se identificaron mediante histofluorescencia las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral y se demostró que estas, junto con otras neuronas catecolaminérgicas y serotoninérgicas en todo el cerebro, comprenden doce grupos celulares discretos (etiquetados como grupos A1-A12). Una característica del grupo A10, en particular, es la morfología heterogénea entre sus neuronas (Barker *et al.*, 2016).

El área tegmental ventral contiene principalmente neuronas dopaminérgicas, sin embargo, también posee neuronas gabaérgicas, glutamatérgicas y es de las pocas zonas en las que las neuronas pueden comunicarse por más de un neurotransmisor (Morales y Margolis, 2017).

#### **1.4 Núcleo Accumbens**

La obesidad es un problema importante de salud pública. La palatabilidad (es decir, el valor reforzador de los alimentos, derivado de las señales orosensoriales) es un factor importante en la determinación de la ingesta de alimentos y contribuye a un mayor consumo que, a su vez, conduce a la obesidad. El núcleo accumbens es importante tanto para los comportamientos apetitivos como consumatorios, se ha implicado en la modulación de la palatabilidad. En particular, experimentos farmacológicos han demostrado que la señalización opioide endógena en el núcleo accumbens, contribuye significativamente a los comportamientos consumatorios, probablemente, a través de la modulación de la palatabilidad de los refuerzos consumidos. En apoyo de esta hipótesis, la micro-infusión de opioides en el núcleo accumbens es particularmente efectiva para aumentar la ingesta de alimentos con alto contenido de energía. Por el contrario, los antagonistas opioides inyectados en el núcleo accumbens pueden bloquear la ingesta de reforzadores normalmente preferidos, sin afectar el consumo de alternativas menos apetecibles (Taha y Fields, 2005).

Los hallazgos descritos previamente, indican que los péptidos opioides endógenos del núcleo accumbens juegan un papel importante en el control del apetito. En particular, se piensa que este sistema regula aspectos hedónicos de la ingesta de alimentos que rigen la respuesta emocional positiva a los alimentos altamente apetecibles como la grasa y el azúcar. Trabajos previos han demostrado que la administración de DAMGO (agonista opioide) aumenta notablemente la ingesta de alimentos y mejora preferentemente la ingesta de alimentos como la grasa, la sacarosa y la sal (Will *et al.*, 2003).

### 1.3 Core y Shell (Núcleo Accumbens)

Una rápida observación de la estructura anatómica del núcleo accumbens nos indica que su función más probable es la de integración limbicomotora. Esta, posee dos territorios diferentes, tanto en sus conexiones como neuroquímicamente; el core y la shell. El core es una extensión del estriado dorsal, de acusado carácter motor: recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora y dopaminérgicas de la sustancia nigra, y presenta conexiones gabaérgicas de salida hacia el pálido ventral que forman parte de los bucles motores córtico-estriado-pálido-talámicos de carácter extrapiramidal. La shell presenta conexiones de abierto carácter límbico: recibe importantes entradas glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala centromedial, así como dopaminérgicas desde el tegmento ventral (Fernández-Espejo, 2000).

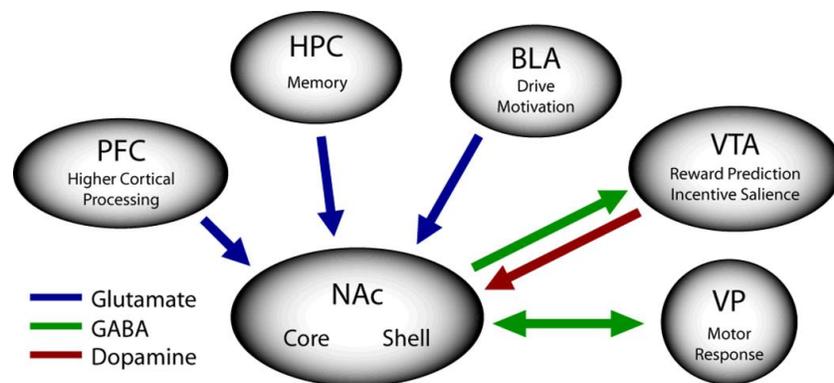


Figura 3.- Descripción general de las principales proyecciones aferentes y eferentes del núcleo accumbens. Las ubicaciones de las flechas no indican el grado o la ubicación precisa de la proyección. PFC, corteza prefrontal; HPC, hipocampo; BLA, amígdala basolateral; VTA, área tegmental ventral; VP, pallidum ventral; NAc, núcleo accumbens. (Tomada de Day y Carelli, 2007).

## 2. Vía del gusto

El sentido del gusto es un sistema quimiosensorial especializado, dedicado a la evaluación de alimentos y bebidas. A diferencia del tacto, la visión, la audición o el olfato, quienes funcionan en diversos contextos de comportamiento, el sentido del gusto ha evolucionado para servir como regulador dominante y conductor de la alimentación. Los sistemas gustativos detectan compuestos nutricionalmente relevantes y dañinos en los alimentos y desencadenan conductas innatas que conducen a la aceptación o rechazo de posibles fuentes de alimento (Yarmolinsky *et al.*, 2009).

Los humanos y probablemente la mayoría de los mamíferos clasifican los estímulos gustativos en una pequeña proporción de cualidades. Los sabores dulce, amargo, agrio y salado son familiares para todos, mientras que umami, un sabor salado provocado por ciertos L-aminoácidos, constituye una quinta modalidad de sabor primario. Umami y dulce son sabores agradables que promueven el consumo de alimentos nutritivos (como los bloques de construcción para la síntesis de proteínas y energía), mientras que el amargo y agrio son sabores aversivos que alertan al organismo de toxinas y pH bajo, promoviendo el rechazo de alimentos que contienen sustancias nocivas (por ejemplo, plantas tóxicas o frutas en mal estado o inmaduras). La sal puede ser atractiva o repulsiva, dependiendo tanto de la concentración de sodio como de las necesidades fisiológicas del consumidor. La amplitud modesta de este repertorio, junto con la relación innata de calidad con la valencia hedónica y la respuesta conductual, implican que la tarea del sistema del gusto no es una discriminación sutil, sino más bien, el conducir decisiones binarias sobre si consumir o rechazar un posible alimento (Yarmolinsky *et al.*, 2009).

El procesamiento del gusto se logra primero, a nivel de las células receptoras del gusto, (Figura 4) que se agrupan en las papilas gustativas de la lengua. Cuando las células receptoras del gusto se activan por catadores específicos, transmiten información a través de fibras sensoriales aferentes a áreas específicas en el cerebro, las cuales están involucradas en la percepción del gusto. Se han identificado cuatro subtipos morfológicos de células receptoras del gusto: las células parecidas a glía tipo I, detectan el sabor salado; las células tipo II expresan receptores acoplados a proteínas G (GPCR) para detectar sabores dulces, umami y amargos; las células tipo III detectan estímulos agrios; mientras que las células tipo IV probablemente, representan células de sabor progenitoras o de tallo (Janssen y Depoortere, 2013).

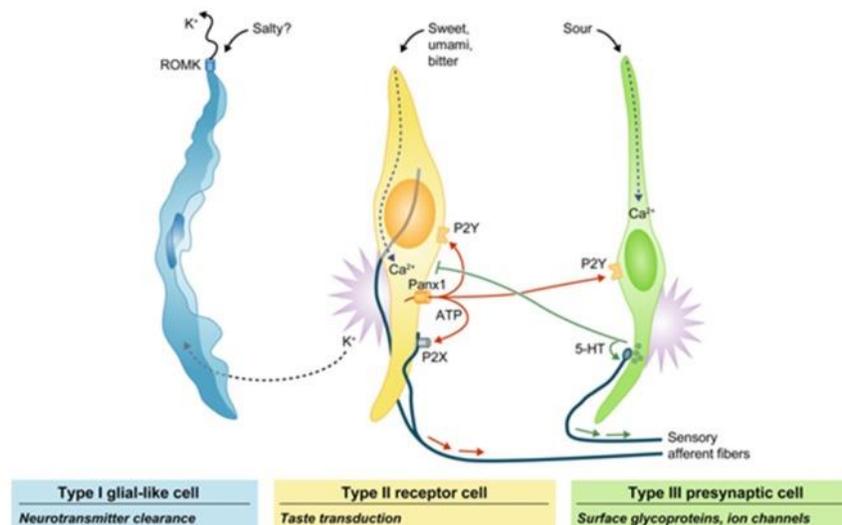


Figura 4.- Esquema de las principales células gustativas. Esta clasificación incorpora características ultraestructurales, patrones de expresión génica y las funciones de cada tipo, I, II (receptor) y III (presináptica). Las células tipo I (azul) degradan o absorben neurotransmisores. También pueden eliminar el  $K^+$  extracelular que se acumula después de los potenciales de acción en las células receptoras y presinápticas. El sabor salado puede ser activado por algunas células tipo I. Los compuestos dulces, amargos y de sabor umami activan las células receptoras induciéndolas a liberar ATP a través de pannexin 1 (Panx1). (Adaptado de Lee y Owyang, 2017).

## 2.1 Señalización celular

En el mecanismo bioquímico que ocurre en los botones gustativos los productos químicos asociados al sabor dulce y amargo se unen a ciertos receptores de la membrana celular que desencadenan una cascada de señales en el interior de las células, cuyo resultado final se manifiesta en la apertura y/o cierre de los canales iónicos. En 1992, Margolskee y colaboradores identificaron uno de los miembros clave de la cascada. La cual llamaron gustoducina, dada su similitud molecular con la transducina, una proteína de las células retinianas que ayuda a transformar o transducir la señal luminosa que alcanza la retina en un impulso eléctrico constitutivo de la visión. La gustoducina y la transducina son proteínas G que se encuentran unidas a la parte interna de distintos tipos de receptores de superficie. El trifosfato de guanosina o GTP regula su actividad (Lindemann, 2001). Cuando una molécula gustativa genuina se une a una célula gustativa receptora, con la especificidad de una llave en su cerradura, las subunidades de la gustoducina se separan y catalizan una serie de reacciones bioquímicas que desembocan en la apertura o cierre de los canales iónicos (Smith y Margolskee, 2001).

En la vía bioquímica asociada al sabor dulce, los estímulos dulces son producidos por el azúcar o los edulcorantes sintéticos, que no entran en las células gustativas, pero desencadenan cambios en el interior de estas. Las moléculas del edulcorante activan los receptores de la membrana celular, los cuales, activan las proteínas G. Como resultado, tales proteínas (compuestas de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) forman un complejo con moléculas de GTP y luego se separan liberando la subunidad  $\alpha$  que permanece asociada al GTP. Este nuevo complejo activa la fosfolipasa C- $\beta$ , una enzima unida a la membrana que cataliza la conversión de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5 trifosfato (PIP<sub>3</sub>) y diacilglicerol. Este inositol 1,4,5 trifosfato se constituye así en un segundo mensajero (el primero era la información obtenida de la molécula edulcorante en el exterior de la célula) y muy probablemente activa una quinasa, con la cual se propicia la fosforilación de un canal de iones potasio (Pacyniak, 2001).

El resultado de todo este proceso es, un cambio en la conductancia de dichos iones y, por tanto, una perturbación en el potencial de la membrana celular. Esta perturbación se propaga hacia abajo y mediante un efecto dominó induce la apertura de canales de iones sodio y estos la de canales de iones calcio. Estos últimos pasan a ser un tercer mensajero, pues al aumentarse su concentración se desencadena otra serie de reacciones que tienen como resultado la liberación de moléculas neurotransmisoras en la sinapsis. Dichas moléculas activan los receptores de los terminales de las fibras nerviosas dando origen a las señales eléctricas que finalmente llegarán al cerebro para ser interpretadas allí como sabor dulce (Figura 5) (Pacyniak, 2001).

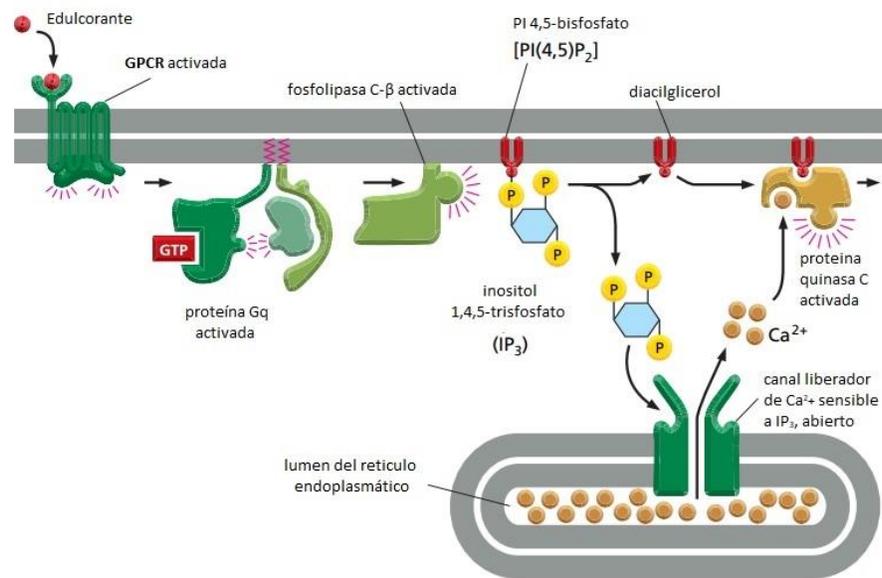


Figura 5.- Esquema de la señalización intracelular inducida por sustancias edulcorantes. (Adaptada de Alberts *et al.*, 2008).

## 2.2 Receptores al sabor dulce, familia T1r

La sensación de sabor permite a los animales detectar ciertas sustancias químicas dentro de los alimentos y evaluar si son nutritivas o venenosas. El proceso es evocado por interacciones específicas entre los estimulantes y los receptores del gusto que residen en la membrana plasmática de las células del gusto en las papilas gustativas de la cavidad oral. La familia del receptor del gusto tipo 1 (T1r) participa en la percepción de los sabores apetecibles en nutrientes, tales como azúcares y L-aminoácidos (Nelson *et al.*, 2001). La familia se conserva en vertebrados, incluidos los peces, las aves y los mamíferos, los receptores funcionan como heterodímeros constitutivos de T1r1-T1r3 y T1r2-T1r3. La especificidad del ligando probablemente esté sintonizada con la dieta de los animales. En humanos y roedores, el heterodímero T1r2-T1r3 reconoce sustancias dulces como los azúcares, mientras que el heterodímero T1r1-T1r3 percibe umami de L-aminoácidos incluyendo el glutamato. Por el contrario, en aves, un grupo que generalmente carece del gen *T1r2*, el heterodímero T1r1-T1r3 de especies que se alimentan de insectos responde a los L- aminoácidos, mientras que el de una especie que se alimenta de néctar detecta azúcares (Baldwin *et al.*, 2014).

La fisiología de la percepción del gusto está incorporada en las características de la función T1r. Muchos receptores T1r tienen una amplia especificidad de ligando (Figura 6), el receptor T1r2-T1r3 humano reacciona a mono-oligosacáridos, edulcorantes artificiales sin grupos sacáridos, algunos D- aminoácidos e incluso proteínas (Li *et al.*, 2002).

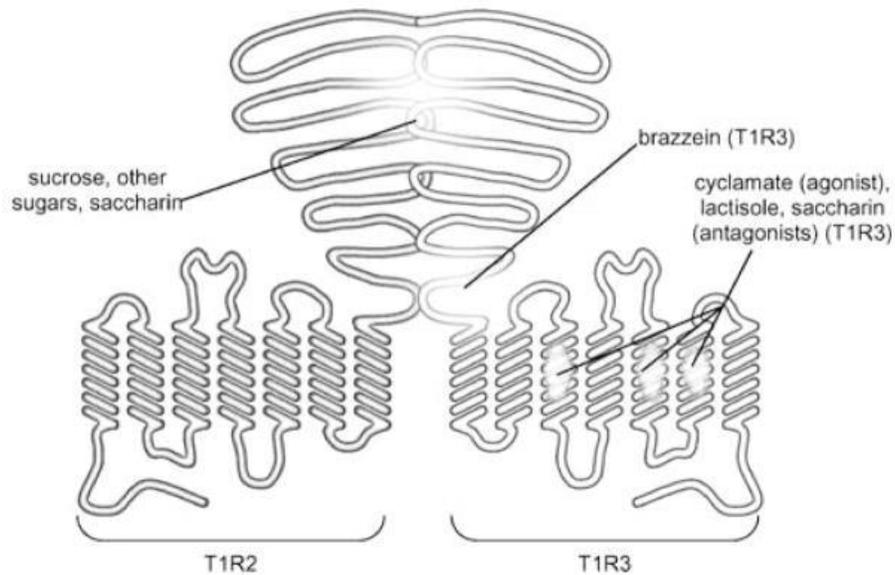


Figura 6.- Esquema del dímero de GPCR dulce T1R2 + T1R3, que muestra los múltiples sitios de unión del ligando. T1R2 se muestra a la izquierda, T1R3 está a la derecha (Roper, 2007).

## 2.3 Teoría molecular del sabor dulce

De acuerdo con la hipótesis propuesta por Shallenberger y Acree en 1967 (figura 7), la percepción del sabor dulce se basa en la existencia de un sistema donador/aceptor de protones. En el alimento hay un sistema AH/B que puede entrar en contacto con un sistema complementario AH/B del receptor en las papilas gustativas; A y B son átomos electronegativos (por ejemplo, oxígeno, nitrógeno o cloro) y H es un átomo de hidrógeno unido mediante enlace covalente a A (Kier, 1972). Entre las estructuras AH/B de la molécula dulce y el receptor se pueden formar enlaces por puentes de hidrógeno con carácter débilmente hidrofílico o bien del tipo hidrofóbico. Según estudios posteriores, este modelo se amplió añadiendo la existencia de grupos hidrofobos (X), que son atraídos por grupos similares dispuestos en el receptor gustativo. La estructura AH/B/X se conoce como la estructura glucófora de las sustancias edulcorantes o estructura tripartita, dicha estructura se debe situar de tal manera que sus componentes entren en contacto con el centro receptor. Para que un compuesto tenga sabor dulce, la distancia entre

A y B debe ser como mínimo 0.25 a 0.40 nm (2.5 a 4 Å). Una estructura AH/B con una distancia menor origina sabor amargo (Martínez y Román, 2002).

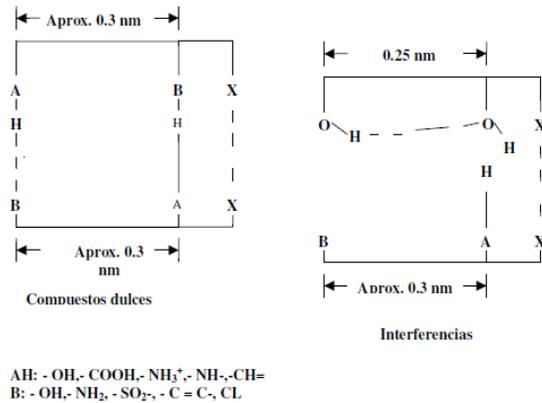


Figura 7.- Esquema de la teoría de Schallenberger y Acree sobre la percepción del sabor dulce (Martínez y Román, 2002).

## 2.4 Núcleo del tracto solitario (Sol)

Las terminaciones nerviosas de los nervios craneales, que contienen axones gustativos y somatosensoriales de la cavidad oral, se distribuyen en un orden rostrocaudal superpuesto dentro del núcleo del tracto solitario de roedores. Los componentes aferentes del nervio facial, llamado nervio intermedio de Wrisberg, inervan la lengua anterior, así como el paladar duro y blando, culminando densamente en la punta rostral del núcleo. Algunas fibras se extienden en una cola caudalmente a cierta distancia. El nervio glossofaríngeo inerva las papilas gustativas en la lengua caudal y sus axones terminan en la parte caudal del área del nervio facial principal. Algunos de estos axones continúan más caudalmente y pasan al lado contralateral. Caudal al área glossofaríngea principal, los axones del nervio vago dominan el Sol restante, que se une en la línea media y se adentra en la médula espinal (Paxinos, 2004).

Tras la activación de los receptores de sabor dulce, aferentes neurales de los nervios craneales, se envía información gustativa a la división rostral del Sol (Paxinos, 2004).

En roedores, las fibras ascienden ipsilateralmente al núcleo parabraquial. Desde el núcleo parabraquial se proyecta una vía dorsal a la parte parvocelular del núcleo ventroposteromedial del tálamo (núcleo talámico del gusto) y una vía ventral a las áreas amigdalas e hipotalámica lateral. Las aferencias talámicas se proyectan hacia la corteza gustativa primaria, que se define como el objetivo cortical localizado dentro de la corteza insular. En primates y humanos las proyecciones del Sol eluden el núcleo parabraquial y proceden directamente al núcleo ventroposteromedial del tálamo (Fernstrom *et al.*, 2012).

## 2.5 Anatomía del gusto

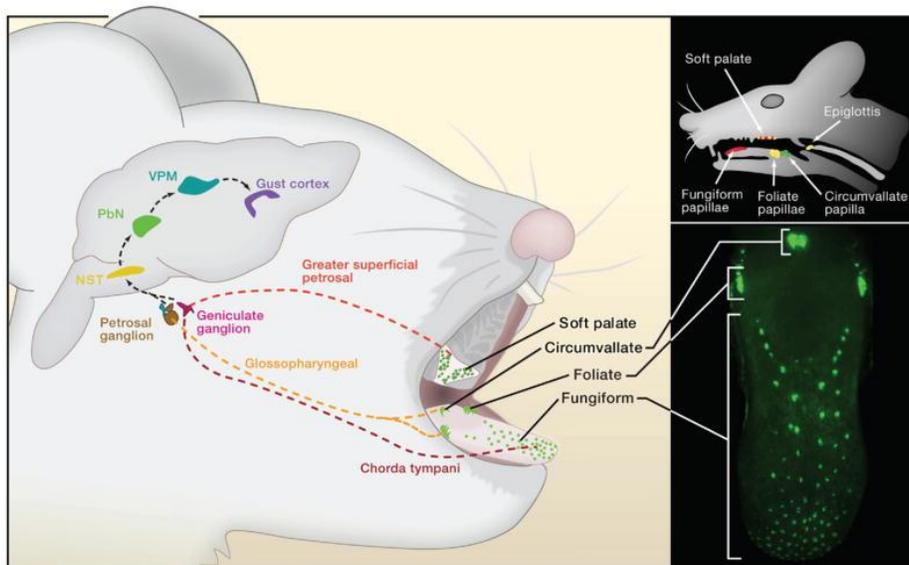


Figura 8.- Esquemización de la anatomía del gusto en ratón. Las papilas gustativas se distribuyen ampliamente en la lengua y paladar blando. En la lengua, las papilas gustativas se clasifican en tres clases: papila circunvalada ubicada en la parte posterior de la lengua; papilas foliadas que se encuentran en el borde lateral posterior, y las papilas fungiformes que se distribuyen en los dos tercios anteriores de la lengua; estas tres clases de papilas se pueden resaltar en ratones diseñados

para expresar la proteína verde fluorescente en las áreas papilares. Las papilas gustativas en la lengua y el paladar están inervadas por tres nervios aferentes: cuerda timpánica, glossofaríngeo y superficie mayor petrosal. Estos nervios llevan información del gusto desde las células receptoras hasta el núcleo del tracto solitario en el tronco encefálico. Desde el núcleo del tracto solitario, las respuestas del gusto se transmiten y procesan a través del núcleo parabraquial y el tálamo a la corteza gustativa primaria en la ínsula (Fernstrom *et al.*, 2012).

### **3. *Stevia rebaudiana***

Universalmente, el sabor dulce es considerado agradable y preferido para bebidas, alimentos, productos farmacéuticos y productos de higiene bucal/cosméticos (Belloir *et al.*, 2017). Para proporcionar un sabor dulce a estos productos, los azúcares calóricos naturales más utilizados son sacarosa, fructosa y glucosa. Dado que estos azúcares naturales proporcionan calorías, se deben utilizar fuentes alternativas cuando el consumidor desee un sabor dulce con pocas calorías o sin calorías. Los glucósidos de esteviol aislados de *Stevia rebaudiana* Bertoni se han explorado para producir un edulcorante ideal (dulce, bajo o sin calorías y natural) (Prakash *et al.*, 2014).

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un arbusto perenne, miembro de las Asteraceae, descubierto en la región de Amambay, al noreste de Paraguay, en la frontera con Brasil. Sus hojas intensamente dulces eran conocidas por las tribus guaraníes locales que la habían utilizado durante muchos siglos en la medicina popular y para endulzar el té. La planta fue clasificada por Bertoni en 1899, luego un producto natural dulce crudo (esteviosido) fue aislado por primera vez en 1909 y en una forma más pura por Bridel y Lavieille en 1931.

El esteviósido es un glucósido típico y comprende una aglicona, en este caso el esteviol diterpenoide y una porción de azúcar. Los glucósidos pueden proporcionar un mecanismo de almacenamiento para la aglicona e incluso, en algunos casos, poseen una actividad biológica específica (Hanson, 2016).

Rebaudiósido A y esteviosido, han sido identificados por su predominancia y son comercialmente interesantes como edulcorantes bajos en calorías. Se ha informado que ambas sustancias son 100-300 veces más dulces que la sacarosa, aunque la percepción puede variar según el método psicofísico y la concentración de referencia utilizada. Sin embargo, existe consenso en que tanto el esteviósido como el rebaudiósido A tienen un sabor amargo para los humanos cuando se presentan a concentraciones más altas (Nicklasson *et al.*, 2018).

Los estudios sobre la estructura del esteviósido se informaron en 1955 y 1956, posteriormente en el año 1960 se estableció la estructura completa y estereoquímica. El interés en el uso de los glucósidos de Stevia como edulcorantes no nutritivos, particularmente en Japón, comenzó en la década de 1970. *Stevia rebaudiana* ahora se cultiva comercialmente en muchos países, incluidos Japón, Corea, China, Canadá, Israel e India, Paraguay y Brasil (Hanson, 2016).

#### **4. $\Delta$ FosB**

La regulación de la expresión génica es uno de los mecanismos importantes por el cual la exposición crónica a una droga causa a largo plazo cambios en el cerebro, que subyacen a las alteraciones conductuales que definen un estado de adicción. Un hecho de esta hipótesis es que los cambios inducidos por las drogas en la transmisión dopaminérgica, glutamatérgica y en la morfología de ciertos tipos de neuronas en el cerebro, son mediados en parte, a cambios en la expresión de genes, lo cuál ha sido correlacionado con un estado de adicción (Nestler, 2008).

$\Delta$ FosB está codificado por el gen *FosB* (figura 9) y comparte homología con otros factores de transcripción de la familia Fos. Estas proteínas de la familia Fos se heterodimerizan con proteínas de la familia Jun para formar factores de transcripción activadores de la proteína (AP-1) (Nestler, 2008).

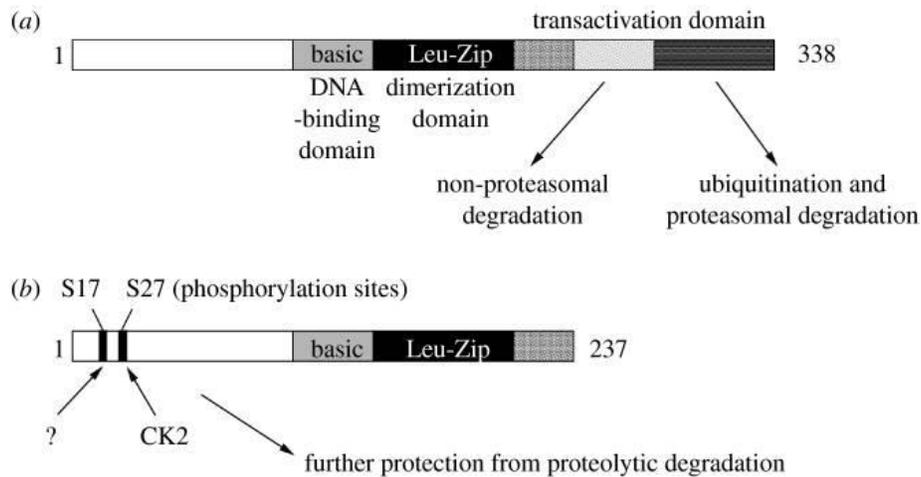


Figura 9.- Base bioquímica de la estabilidad única de  $\Delta$ FosB: (a) FosB y (b)  $\Delta$ FosB.  $\Delta$ FosB se genera mediante splicing alternativo y carece de los 101 aminoácidos C-terminales presentes en FosB. Se conocen dos mecanismos que dan cuenta de la estabilidad de  $\Delta$ FosB. En primer lugar, carece de dos dominios de degradación presentes en el extremo C de FosB y en segundo lugar es fosforilado por la caseína quinasa 2 (CK2) y probablemente por otras proteínas quinasas en su extremo N, lo que estabiliza aún más la proteína (Nestler, 2008).

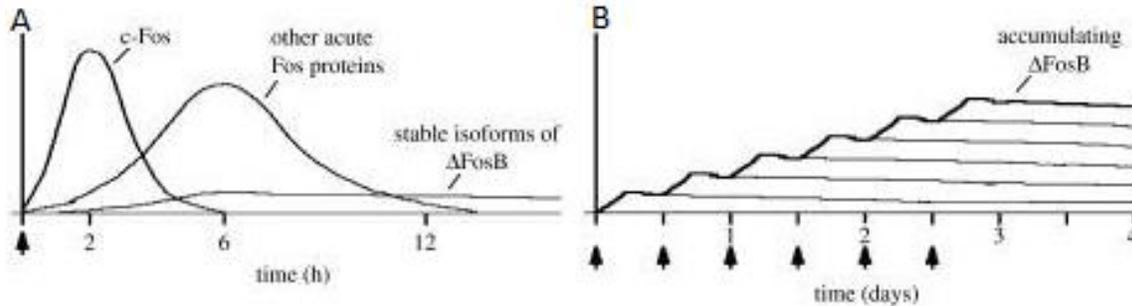


Figura 10.- Esquema que muestra la acumulación gradual de  $\Delta$ FosB frente a la inducción rápida y transitoria de otras proteínas de la familia Fos en respuesta a las drogas de abuso. (A) Se muestra la expresión de proteínas de la familia Fos (c-Fos, FosB y  $\Delta$ FosB) que se inducen en el núcleo accumbens y neuronas del estriado dorsal por administración aguda de un fármaco de abuso. (B) Con la administración repetida del fármaco, cada estímulo agudo induce un nivel bajo de las isoformas  $\Delta$ FosB estables. Esto se indica mediante el conjunto inferior de líneas superpuestas que indican  $\Delta$ FosB inducido por cada estímulo agudo. El resultado es un aumento gradual en los niveles totales de  $\Delta$ FosB con estímulos repetidos durante un curso de tratamiento crónico. Esto se indica con la línea progresiva creciente en el gráfico (Adaptado de Nestler, 2008).

## Justificación

Existen evidencias conductuales y fisiológicas que indican la activación del sistema de recompensa cerebral desencadenado por alimentos calóricos dulces como la sacarosa, equiparable a sustancias adictivas como la cocaína. La disponibilidad de productos calóricos dulces ha ido en aumento y se ha relacionado con desórdenes metabólicos y un incremento de obesidad en la población, por lo que se ha optado por el uso de stevia, un sustituto de azúcar con un poder edulcorante mayor y sin aporte calórico; sin embargo, se desconoce la actividad que puede desencadenar la ingesta de stevia y su efecto sobre el sistema de recompensa cerebral. Este trabajo requiere de uso de un modelo animal como la rata wistar, a fin de evaluar núcleos cerebrales claves, tanto en la percepción del sabor como en el inicio de una posible adicción.

## Hipótesis

Si la activación del sistema de recompensa mediante la vía del gusto implica la activación del núcleo del tracto solitario, entonces se encontrará inmunomarcaje al factor de transcripción  $\Delta$ FosB en núcleo del tracto solitario y área tegmental ventral por el consumo de stevia.

## Objetivos

- General  
Registrar la posible actividad del Núcleo del Tracto Solitario y Área Tegmental Ventral mediante inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en ratas Wistar tratadas con extracto de stevia.
- Específicos
  1. Comparar el número de células inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB en un grupo de ratas que hayan consumido stevia vs. consumo de agua en núcleo del tracto solitario.

2. Comparar el número de células inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB entre ratas con consumo de stevia y consumo de agua en área tegmental ventral.

## Método

### 1. Animales

Se utilizaron dos grupos de ratas macho Wistar (n=5) con un peso promedio de 85g de entre 30-46 días post natal.

#### 1.2 Alojamiento

Los animales estuvieron alojados en el cuarto de manejo experimental, o bioterio, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx). El manejo de los animales y las condiciones internas del bioterio se adecuaron a los estándares de la NOM-062 (1999).

Dentro del bioterio se mantuvo un ciclo luz-oscuridad invertido 12/12. A las 24:00 la luz se encendía y se apagaba a las 12:00 Horas. Para la iluminación se utilizó una lámpara con un foco de 60 Watts y si se necesitaba iluminación en la fase oscura se utilizaba un foco de luz roja de 60 Watts. La temperatura se mantuvo entre 20° y 26° C y la humedad relativa entre el 40% y el 50%. A los animales se les proporcionó agua potable y pellets de Rodent Chow de la marca Purina *ad libitum*, y se alojaron en cajas de polipropileno (45 cm de largo, 25 cm de ancho y 20 cm de alto) con tapa de acero inoxidable y viruta de madera de pino como material de cama. Se realizó aseo tres veces por semana, además de colocar viruta de madera limpia, agua y alimentos frescos.

#### 1.3 Obtención de las camadas

Se colocaron dos ratas machos Wistar en etapa reproductiva, cada macho con dos hembras adultas durante 16 días. Posterior a esta fecha se retiraron los machos y se comprobó que las hembras estuvieran preñadas, una vez confirmado se

separaron durante la gestación. Posteriormente se destetaron a las crías el día 21 y se aislaron hasta el día 30 PN.

#### 1.4 Aleatorización de las camadas

Se realizó identificación de los machos en cada camada obtenida, estos animales fueron colocados en una caja y fueron elegidos de forma aleatoria y asignados a un grupo.

#### 1.5 Grupos

Los animales fueron divididos en dos grupos:

- Cinco ratas fueron usadas para el primer grupo (Grupo Control) en el cual los animales tuvieron acceso a dos bebederos con agua (durante 20 días). Consumo de agua y alimento *ad libitum*.
- Cinco ratas fueron usadas para el segundo grupo (Grupo Experimental), grupo con consumo de stevia 0.2% (durante 20 días), los animales tuvieron acceso a dos bebederos con solución de extracto de stevia 0.2 % únicamente y alimento *ad libitum*.

Cuadro 1. Grupos experimentales

Variables	Grupos	
	Grupo Control (20 días)	Grupo Experimental (20 días)
Número de individuos	5	5
Tratamiento	Consumo de agua y alimento <i>ad libitum</i>	Consumo de extracto de stevia 0.2% y alimento <i>ad libitum</i>

## 2. Preparación del tejido nervioso

El marcaje de la proteína  $\Delta$ fosB se realizó mediante el procesamiento del tejido por medio de protocolos estandarizados para su fijación y preservación. Se utilizó la técnica de perfusión intracardiaca para poder extraer los cerebros fijados y libres de sangre. Posteriormente se realizó la crioprotección del tejido y se obtuvieron cortes

histológicos con ayuda de un criostato. Finalmente, los cortes fueron procesados mediante inmunohistoquímica.

## **2.1 Perfusión**

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital sódico (40 mg/Kg) por vía intraperitoneal. La perfusión se comenzó al comprobar que el individuo perdiera motilidad y no respondiera a la presión en la base de la cola o en las patas anteriores.

El procedimiento se llevó a cabo con un sistema de perfusión por gravedad. Se expuso el corazón del animal y se abrió el ventrículo izquierdo, por donde se insertó la cánula del sistema, introduciéndola hasta la aorta. Una vez que la cánula estaba bien colocada se realizó una incisión en la aurícula derecha para que drenara la sangre y las soluciones de la perfusión. Primero, se administró solución NaCl al 0.9% para eliminar de los tejidos la sangre y después, se aplicó una solución fijadora de paraformaldehído al 4 % en buffer de fosfatos (PB) 0.1 M. y sacarosa. La solución salina se dejó fluir hasta que el hígado, los ojos y las patas perdieran color (10 a 15 minutos), y la solución fijadora se dejaba fluir hasta que la columna vertebral se endureciera (10 a 15 minutos). Inmediatamente después de la perfusión, los cerebros fueron extraídos y colocados en la misma solución fijadora, durante 24 horas a 4 °C.

## **2.2 Crioprotección**

Después de que los cerebros se mantuvieron 24 horas en solución fijadora, estos fueron colocados en un tren de soluciones crioprotectoras de PB 0.1 M con sacarosa al 10 %, 20% y 30%. Los cerebros permanecieron entre tres y cinco días en cada solución, y se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

## 2.3 Cortes

Los cortes histológicos se obtuvieron empleando un criostato a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los niveles de bregma se localizaron con la ayuda del atlas de Paxinos y Watson (2007). Los cortes se realizaron a un grosor de 40 micras y fueron colectados en multiplatos con PB 0.1 M y refrigerados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la inmunohistoquímica.

Los cortes que se obtuvieron de Bregma fueron en distintas posiciones, tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (2007) donde Bregma  $-11.76\text{ mm}$  a  $-12.0\text{ mm}$  permite observar el Núcleo del Tracto Solitario (Figura 11A); Bregma  $-6.72$  a  $-6.88\text{ mm}$  para observar Área Tegmental Ventral (Figura 11B).

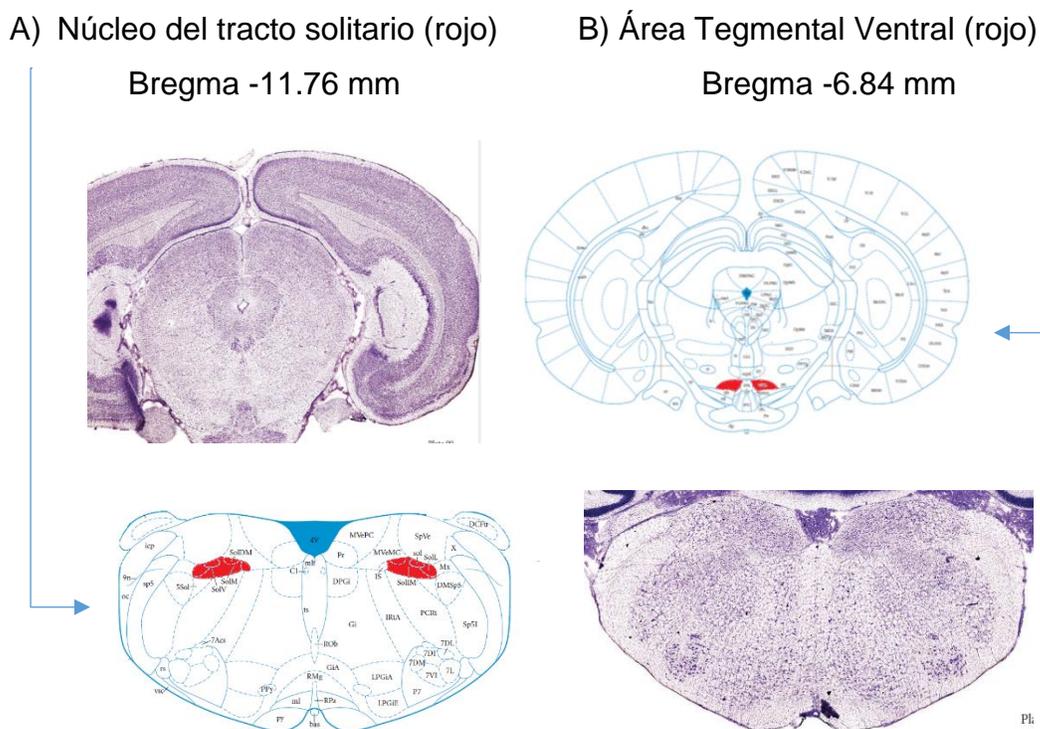


Figura 11.- Representación esquemática de los cortes a diferentes bregmas utilizados en este trabajo. Los esquemas fueron tomados de "The rat brain" de Paxinos y Watson, 2007. Para Núcleo del Tracto Solitario (A), un bregma de  $-11.76\text{ mm}$  y Área Tegmental Ventral  $-6.84\text{ mm}$  (B), mostrando el núcleo de interés con un color rojo y a lado una foto del corte teñido con Nissl.

## 2.4 Inmunohistoquímica

Se realizó en multiplatos, mediante el método para tejido cortado en congelación. Se escogieron cuatro cortes para el procedimiento. Para comenzar el procedimiento, los cortes fueron tratados durante 10 minutos con solución de peróxido de hidrogeno al 3 % diluido en PB 0.1 M para inhibir las enzimas peroxidasa endógenas. Posteriormente se incubó durante 1 hora en solución de PB 0.1 M, Tris (0.3%) y suero de cabra (3%), para romper la membrana celular y bloquear reacciones no específicas. Después se cambió la solución PBTS por la solución PBTS + anticuerpo primario para FosB (sc-48; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) incubado por 96 horas a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se cambió la solución PBTS a 1 y se colocó la solución PBT+anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (B2770; Life Technologies, Waltham, Massachusetts, USA). Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se colocó la solución del complejo Avidina-Biotina (avidina más enzima peroxidasa conjugada con biotina) y se dejó actuar por una hora. Para revelar se sustituyó por solución de diaminobenzidina 0.02%, níquel 0.004% y peróxido de hidrógeno 0.07% y se dejó actuar hasta observar presencia de reacción.

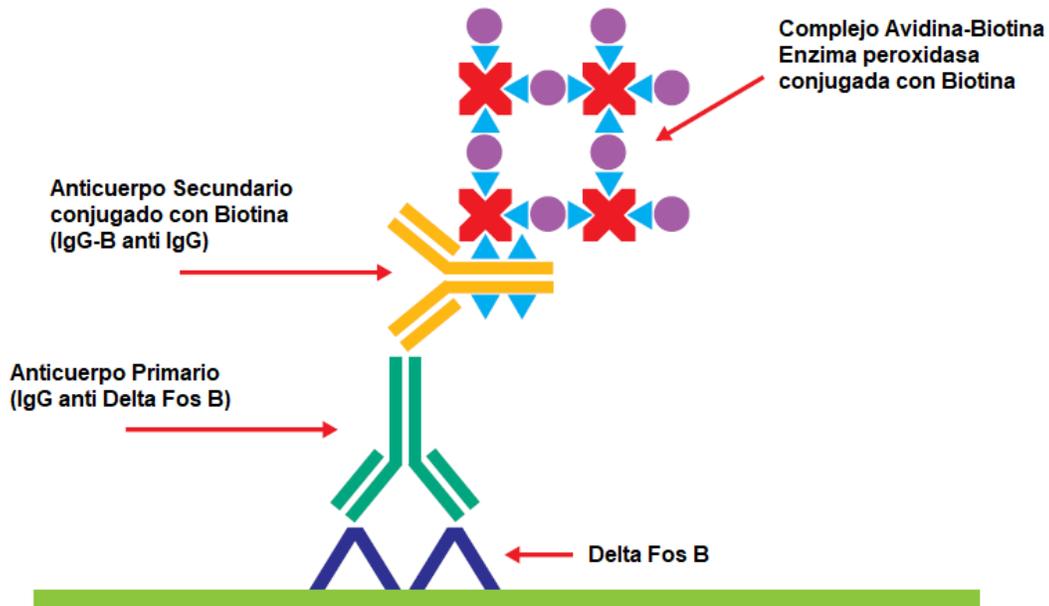


Figura 12.- Interacciones moleculares durante la prueba inmunohistoquímica (Tomado de Taylor y Rudbeck, 2013).

## **2.5 Montaje**

Los cortes se extendieron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar durante 3 días. Después de secarlos, las muestras fueron tratadas en un tren de alcoholes a diferentes concentraciones (70 %, 96 % y 100 %) para deshidratar, y en xilol al 100 % para aclarar el tejido. Finalmente se colocó la resina y el cubreobjetos para su montaje permanente.

## **3. Análisis histológico**

Los núcleos cerebrales se observaron mediante un microscopio óptico; para ubicar al núcleo del tracto solitario se realizaron tres tinciones diferentes (Figura 13).

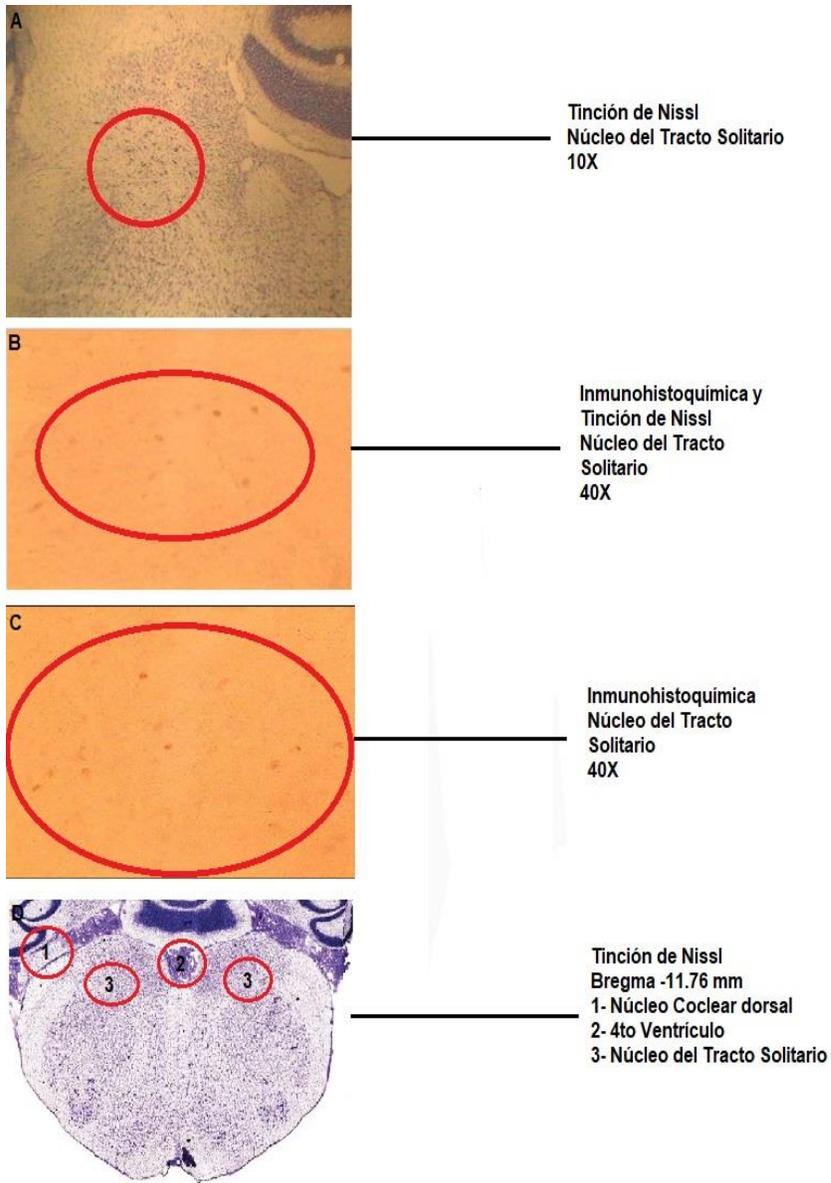


Figura 13.- Para la identificación del núcleo del tracto solitario se analizaron tres tinciones con tratamientos diferentes para encontrar patrones de expresión, en la figura 13 A) se muestra una tinción de Nissl, en la figura 13 B) se muestra una combinación de Nissl con inmunohistoquímica para C-Fos – con tratamiento de extracto de stevia y en la figura 13 C) se muestra una inmunohistoquímica en núcleo del tracto solitario para  $\Delta$ FosB – tratamiento de extracto de stevia, además de los patrones de expresión se identificaron referencias anatómicas como se muestra en la figura 13 D).

Para la identificación de área tegmental ventral se tomaron en cuenta tres referencias anatómicas (Figura 14).

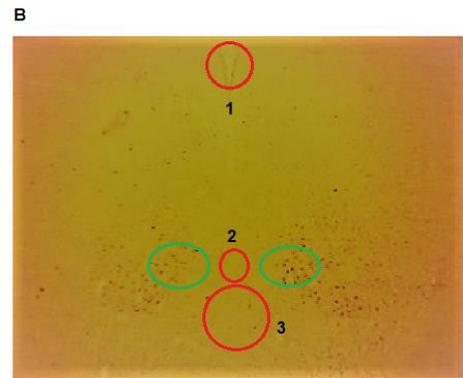
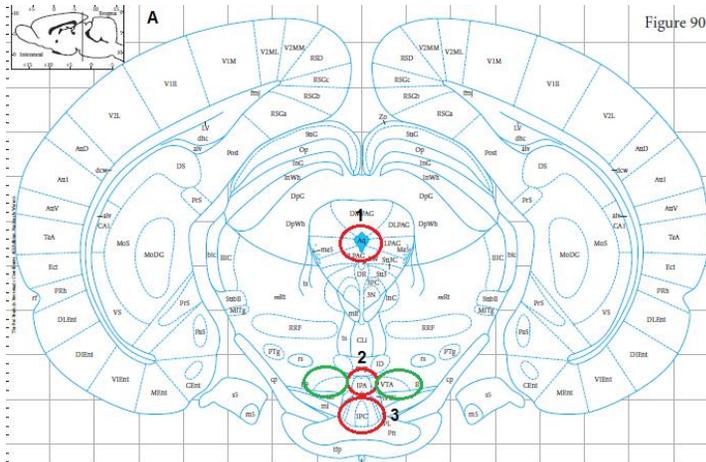


Figura 14.- Representación de las referencias anatómicas para la identificación de Área Tegmental Ventral, en la Figura 14 A) se muestra un esquema tomado de Paxinos y Watson, 2007 donde se pueden observar 3 círculos rojos con tres números, el número 1 muestra el acueducto, el número 2 muestra el núcleo interpeduncular apical y el número 3 muestra el núcleo interpeduncular caudal, además de dos círculos color verde que muestran el Área Tegmental Ventral, en la Figura 14 B) se observa un corte con inmunohistoquímica donde se resaltan las referencias anatómicas y en color verde Área Tegmental Ventral.

Para el conteo se separaron los núcleos contralaterales con referencia al campo visual del objetivo de 40X donde se dibujaron las neuronas vistas después de ubicar el área (Figura 16). Posteriormente se realizó el conteo celular inmunoreactivo para cada núcleo y se realizó la base de datos.

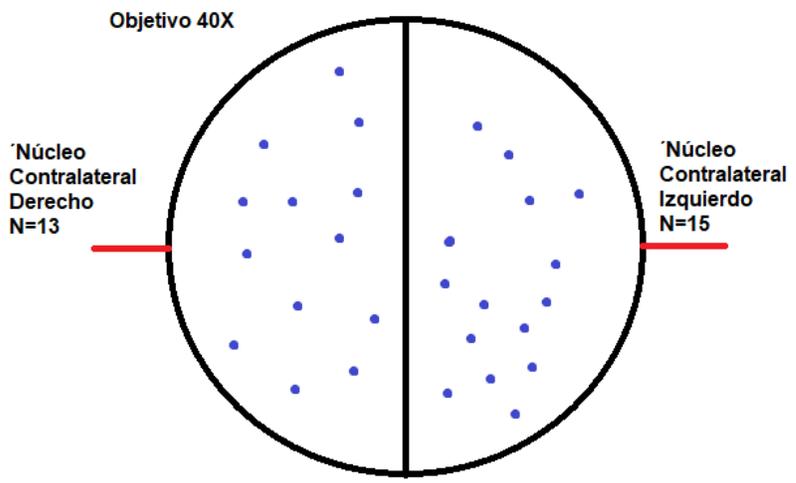


Figura 15.- Esquema del campo visual del objetivo 40X que se utilizó para dibujar y contar las neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB para cada núcleo.

#### **4. Análisis estadístico**

Para comparar los dos grupos con sus diferentes tratamientos e identificar si existieron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB, se utilizó el programa Statgraphics Centurion y GraphPad Prism. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk ( $\alpha$  0.05) para identificar la distribución de los datos y posteriormente, con la ayuda de GraphPad, se realizó una U de Mann-Whitney ( $\alpha$  0.05) para comparar los distintos grupos.

### **Resultados**

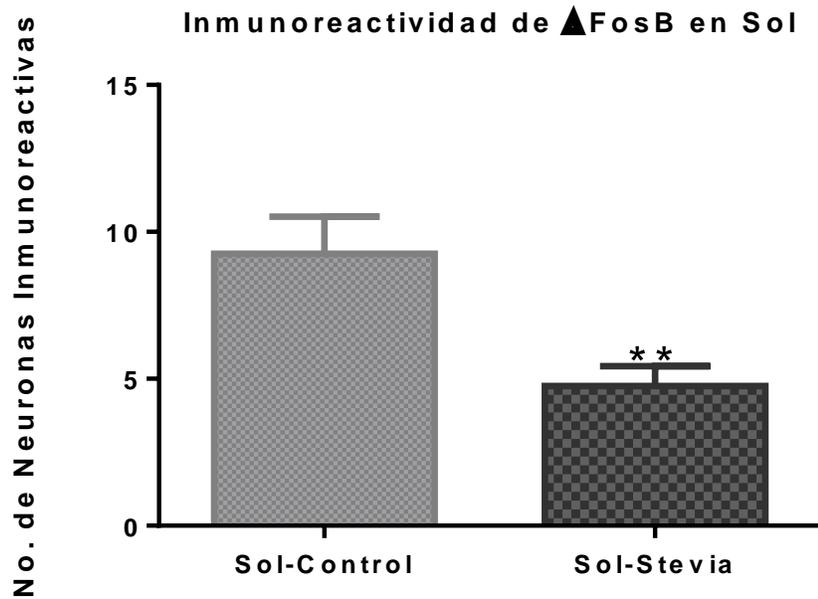
#### **1. Prueba de normalidad de datos**

Para identificar la distribución de las muestras de cada uno de los grupos (Sol-Control, Sol-Stevia, Atv-Control y Atv-Stevia) se aplicó una prueba de Shapiro-Wilk con un valor de  $\alpha$  de 0.05, los resultados mostraron una distribución diferente a la normal para cada uno de los grupos, por lo que, para la comparación de grupos, se utilizó una prueba no paramétrica.

#### **2. Inmunoreactividad de $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario (Sol)**

Los resultados muestran que el consumo de extracto de stevia induce una expresión de  $\Delta$ FosB en Sol, el número de células inmunoreactivas es menor comparado con el grupo control (Figura 16 A), se puede observar que el marcaje es diferente en intensidad, además de ser más específico y limitado (16 B).

A)



B)

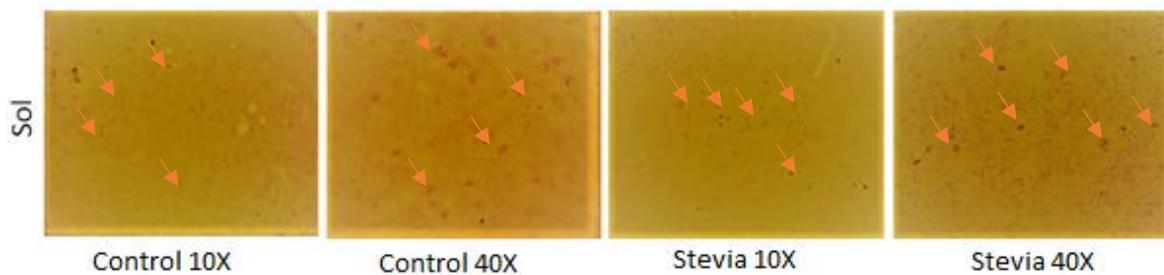


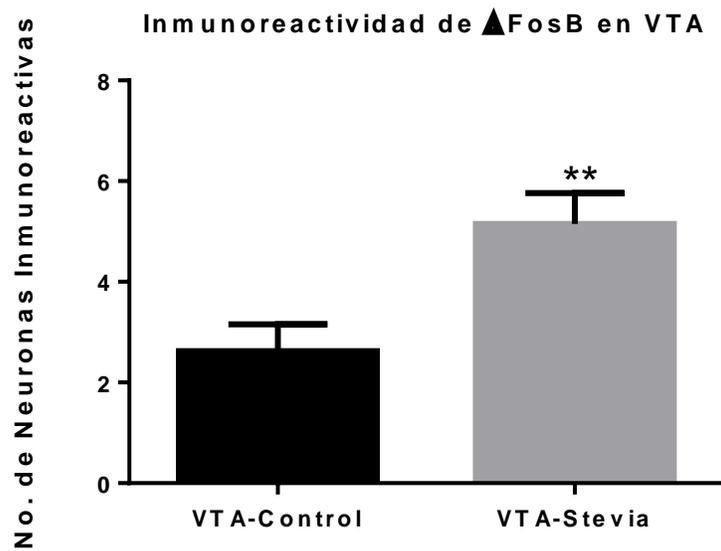
Figura 16 A). Gráfica de medias  $\pm$  el error estándar a partir de un Mann-Whitney test de neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario. En el eje de las X se observa los dos grupos utilizados en el experimento y en el eje de las Y se muestra el número de células inmunoreactivas. Se encontraron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas del grupo tratado con extracto de Stevia con respecto del control con un valor de  $U=532.5$  y  $P=0.0089 < 0.05$ . B)

Fotografías representativas de la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario de cada grupo en 10X y 40X, se puede observar el marcaje y la delimitación del núcleo, indicado por flechas color naranja, además se puede observar que la inmunoreactividad es diferente tanto en distribución como en concentración para cada grupo.

### 3. Inmunoreactividad de $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral (VTA)

En cuanto al análisis de área tegmental ventral mediante un Mann-Whitney test, los resultados indican que hay diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas en el grupo tratado con extracto de stevia respecto al grupo control (Figura 17 A).

A)



**B)**

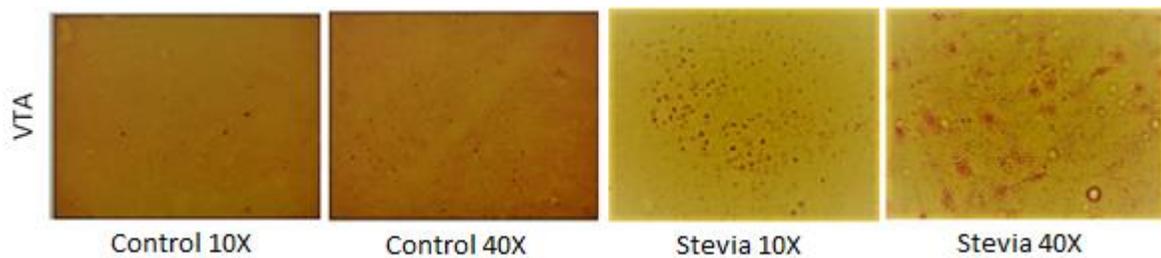


Figura 17. A) Gráfica de medias  $\pm$  el error estándar a partir de un Mann-Whitney test de neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral, en el eje de las X se muestran los dos grupos utilizados en el experimento y en el eje de las Y se muestra el número de neuronas inmunoreactivas. La prueba de Mann-Whitney indica que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas del grupo tratado con stevia respecto al grupo control con un valor de  $U=487.0$  y un valor de  $P=0.0017 < 0.05$ . B) Fotografías representativas de la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral de cada grupo en 10X y 40X, se puede observar que la inmunoreactividad en VTA-Control es escasa y en la mayoría de los cortes nula, también se puede observar que en VTA-Stevia a pesar de ser un núcleo relativamente pequeño se puede observar una gran cantidad de inmunoreactividad y un marcaje bien definido

## Discusión

### 1. Inmunoreactividad en núcleo del tracto solitario

Los resultados de la inmunoreactividad en núcleo del tracto solitario por una parte indican que, sí existe el marcaje para el factor de transcripción analizado, sin embargo, no en todos los animales se observó. Lo anterior, quizá, se deba a la dificultad que representa el núcleo del tracto solitario a la hora de escoger el mismo nivel de bregma en cada uno de los cerebros, lo que pudimos observar en este experimento es que, quizá no se tengan exactamente los mismos bregmas. Por otra parte, la distribución de núcleo del tracto solitario según (Paxinos y Watson, 2007), indica que va desde bregma -11.76 mm a -12.0 mm, esto nos indica que el núcleo mide aproximadamente 0.24 mm por lo cual los niveles rostrales del núcleo estarían desde bregma -11.76 mm hasta bregma -11.88 mm y los caudales van del bregma -11.88 mm a -12.0 mm, al parecer los niveles analizados en este experimento para el grupo control pertenecen a la parte caudal del núcleo, y para el grupo tratado con

extracto de stevia pertenecen en su mayoría a la parte rostral. Los reportes de las aferencias gustativas en este núcleo son para niveles rostrales según (Paxinos y Watson, 2004) y para la parte caudal los reportes indican que sirve como centro de integración para información térmica, mecanosensorial, viscerosensorial y cardiovascular (Stratford y Thompson, 2014). Debido a lo anterior es que quizá nuestro inmunomarcaje para este experimento se presentó de la forma ya descrita. Con respecto de la expresión del factor de transcripción analizado, podemos decir lo siguiente, en la actualidad no se han encontrado reportes de expresión de  $\Delta$ FosB en núcleo del tracto solitario en su parte rostral para aferencias gustativas, esto quizá se deba a que la mayoría de los trabajos se enfocan en analizar la expresión de este factor de transcripción y relacionarlo con conductas adictivas o condiciones estresantes por lo cual también se enfocan en analizar regiones como el sistema dopaminérgico, las regiones del estriado dorsal o bien algunas regiones corticales. En este trabajo muestra los primeros datos de expresión de  $\Delta$ FosB en el núcleo del tracto solitario con relación al consumo de bebidas endulzantes como la stevia. El núcleo del tracto solitario tiene aferencias directas que provienen del ganglio geniculado, petroso y nodoso (Paxinos y Watson, 2004). La teoría clásica de aferencias para los sistemas sensoriales y para el sistema nervioso autónomo indica que la mayoría de las neuronas sensoriales están en estos ganglios, sin embargo, existe otra posibilidad, la cual consiste en que haya neuronas del núcleo del tracto solitario que manden su axón y pasen directo por los ganglios y hagan sinapsis en las papilas gustativas, esto también pudo haber influido en el marcaje que estamos encontrando en el núcleo del tracto solitario ya que de ser así, la mayoría de la actividad sensorial se estaría dando en los ganglios sensoriales antes mencionados, sin embargo, esta posibilidad no fue explorada en este trabajo quedando como una hipótesis a explorar en futuros experimentos.

## **2. Inmunoreactividad en Área Tegmental Ventral**

Para el caso de la inmunoreactividad en Área Tegmental Ventral los resultados muestran que el extracto de stevia induce la expresión de  $\Delta$ FosB en este núcleo, además, se puede observar (Figura 18 A) que la expresión del factor de transcripción es mayor comparado con el grupo control, sin embargo, al igual que

en núcleo del tracto solitario, no en todos los organismos se registró marcaje para el factor de transcripción, una posible explicación para esto es que el núcleo es considerablemente pequeño, mide aproximadamente 0.16 mm (Paxinos y Watson, 2007) y probablemente en algunos organismos el nivel de bregma fue mal ubicado. Existen reportes para la expresión de  $\Delta$ FosB en área tegmental ventral, la mayoría relacionados con sustancias adictivas como la cocaína, nicotina y comida con un alto aporte calórico como el azúcar y la grasa (Sharma *et al.*, 2012), sin embargo, no existen reportes en la expresión de este factor de transcripción inducido por edulcorantes no calóricos como stevia, por lo que este es el primer trabajo en el que se reporta la expresión de  $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral, inducido por el extracto de stevia. La expresión de  $\Delta$ FosB en este núcleo nos indicaría la posible activación de las neuronas dopaminérgicas, o tal vez la activación de distintas vías en el sistema de recompensa. La primera y probablemente la vía que más se activó sea, Área Tegmental Ventral – núcleo accumbens, ya que Área Tegmental Ventral tiene poblaciones neuronales principalmente Gabaérgicas que se proyectan hacia interneuronas en núcleo accumbens aumentando los niveles de dopamina, o bien en menor cantidad proyecciones glutamatérgicas directamente hacia neuronas dopaminérgicas en núcleo accumbens, que igualmente aumenta los niveles de dopamina (Nieh *et al.*, 2016), la activación de esta vía ya sea a través de GABA o glutamato se asocia con conductas de refuerzo, condicionamiento y hedónicas. Ya que la expresión de  $\Delta$ FosB sólo se registró en Área Tegmental Ventral dentro del sistema de recompensa, existe la posibilidad que también se activara la vía entre la habénula lateral – Área Tegmental Ventral, teniendo como principal neurotransmisor al glutamato y Área Tegmental Ventral - corteza prefrontal medial, teniendo como principal neurotransmisor a la dopamina (Morales y Margolis, 2017), sin embargo, esta probabilidad es menor ya que la activación de esta vía se relaciona con conductas aversivas. Con base en lo anterior todo indica, que el consumo de extracto de stevia desencadena una percepción placentera en las ratas y también, parece ser que el sabor dulce tiene una función como refuerzo positivo en la alimentación. Se sabe que la sobre estimulación del sistema de recompensa provocado por el azúcar tiene una relación directa con obesidad y desordenes

metabólicos (Will *et al.*, 2003), y ya que el extracto de stevia ahora se usa en bebidas, alimentos y como sustituto de azúcar en la mesa, sería importante en futuros experimentos, registrar el peso de los animales tras el consumo de stevia a largo plazo para conocer su efecto. Por último, cabe mencionar que todos estos resultados indican que el extracto de stevia puede desencadenar una posible adicción evocada por su sabor dulce.

## **Conclusiones**

La expresión de  $\Delta$ FosB no sólo se limita al sistema de recompensa o a núcleos relacionados con el estrés.

El consumo de extracto de stevia induce la expresión de  $\Delta$ FosB en el área tegmental ventral y en el núcleo del tracto solitario. Estos resultados pueden ser indicativo que el consumo de este edulcorante puede activar la vía del gusto, específicamente la relacionada con el sabor dulce, además de activar la vía de recompensa del cerebro lo que daría el poder adictivo, esto sugiere que el sabor dulce participa como refuerzo positivo en la alimentación, incluso provocado por sustancias que no aporten calorías.

## Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). *Molecular Biology of THE CELL*. New York, USA: Garland Science.
- Andrews, Z.B., Horvath, T.L. (2008). Tasteless food reward. *Neuron*, 57(6), 806-808.
- Bahena, R.T., Flores, G., Arias, J.A. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Biomed*, 11, 39-60.
- Baldwin, M.W., Toda, Y., Nakagita, T., O'Connell, M.J., Klasing, K.C., Misaka, T., Edwards, S.V., Liberles, S.D. (2014). Evolution of sweet taste perception in hummingbirds by transformation of the ancestral umami receptor. *Science (New York)*. 345(6199), 929-933.
- Barker, D. J., Root, D. H., Zhang, S., Morales, M. (2016). Multiplexed Neurochemical Signaling by Neurons of the Ventral Tegmental Area. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 73, 33-42.
- Belloir, C., Neiers, F., y Briand, L. (2017). Sweeteners and sweetness enhancers. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 20(4), 279-285.
- Chopade, P.D., Sarma, B., Santiso, E.E., Simpson, J., Fry, J.C., Yurttas, N., Biermann, K.L., Chen, J. Trout, B.L., Myerson, A.S. (2015). On the connection between nonmonotonic taste behavior and molecular conformation in solution: The case of rebaudioside-A. *The Journal of Chemical Physics*, 143(24),244301-244311.
- Day, J.J., Carelli, R.M. (2007). The Nucleus Accumbens and Pavlovian Reward Learning. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 13(2), 148-159.
- España, R.A., Jones, S.R. (2013). PRESYNAPTIC DOPAMINE MODULATION BY STIMULANT SELF ADMINISTRATION. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 5, 261-276.

- Fernandez-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el *nucleus accumbens*?. *REV NEUROL*, 30 (9), 845-849.
- Fernstrom, J. D., Munger, S.D., Sclafani, A., de Araujo, I. E., Roberts, A., Molinary, S. (2012). Mechanisms for Sweetness. *The Journal of Nutrition*, 142(6), 1134S-1141S.
- Gardner, E.L. (2011). Introduction: Addiction and Brain Reward and Anti-Reward Pathways. *Advances in psychosomatic medicine*, 30, 22-60.
- Hanson, J.R. (2016). From Caá-ehé to a commercial sweetener – the diterpenoid glycosides of *Stevia rebaudiana*. *Science Progress*, 99(4), 413-419.
- Janssen, S., Depoortere, I. (2013). Nutrient sensing in the gut: New roads to therapeutics?. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 24(2), 92-100.
- Kier, L. B. (1972). A Molecular Theory of Sweet Taste. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(9), 1394-1397.
- Koob, G.F., Volkow, N.D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217-238.
- Lee, A.A., Owyang, C. (2017). Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients*, 9(7), 653-666.
- Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., Ahmed, S.H. (2007). Intense Sweetness Surpasses Cocaine Reward. *PLOS ONE*, 2(8), 698-708.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(7), 4692-4696.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413(6852), 219-225.
- Martínez, O.L.A., Román, M.O.M. (2002). TEORÍA SENSORIAL Y MOLECULAR DEL SABOR DULCE. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*, 9(1), 15-26.

- Morales, M., Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental área: celular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature REVIEWS NEUROSCIENCE*, 18(2), 73-85.
- Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381-390.
- Nestler, E.J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of  $\Delta$ FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3245-3255.
- Nicklasson, S., Sjöström, D., Amundin, M., Roth, D., Hernández Salazar, L.T., Laska, M. (2018). Taste responsiveness to two steviol glycosides in three species of nonhuman primates. *Current Zoology*, 64(1), 63-68.
- Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., Izadmehr, E. M., Tye, Kay. M. (2016). Inhibitory input from the Lateral Hypothalamus to the Ventral Tegmental Area Disinhibits Dopamine Neurons and Promotes Behavioral Activation. *Neuron*, 90(6), 1286-1298.
- Pacyniak, B. (2001). How sweet it's getting. *Candy Industry*, 66(4), 46-50.
- Paxinos, G. (2004). *The rat nervous system*. San Diego, CA, Estados Unidos: ELSEVIER.
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York, USA: Elsevier.
- Prakash, I., Bunders, C., Devkota, K.P., Charan, R.D., Ramirez, C., Priedemann, C., Markosyan, A. (2014). Isolation and Characterization of a Novel Rebaudioside M Isomer from a Bioconversion Reaction of Rebaudioside A and NMR Comparison Studies Of Rebaudioside M Isolated from *Stevia rebaudiana* Bertoni and *Stevia rebaudiana* Morita. *Biomolecules*, 4(2), 374-389.
- Roper, S.D. (2007). Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, 454(5), 759-776.

Will, M.J., Franzblau, E.B., Kelley, A.E. (2003). Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2882-2888.

Sharma, S., Fernandes, F. M., Fulton, S. (2012). Adaptations in brain reward circuitry underlie palatable food cravings and anxiety induced by high-fat diet withdrawal. *International Journal of Obesity*, 37, 1183-1191.

Smith, D.V., Margolskee, R.F. (2001). El sentido del gusto. *Investigación y Ciencia*, 296, 4-12.

Stratford, J.M., Thompson, J.A. (2014). Beta-Galactosidase Staining in the Nucleus of the Solitary Tract of Fos-Tau-LacZ Mice Is Unaffected by Monosodium Glutamate Taste Stimulation. *PLoS ONE*, 9(9), e107238.

Taha, S.A., Fields, H.L. (2005). Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neural populations in the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, 25(5), 1193-1202.

Taylor, CR., Rudbeck, L. 2013. Avidin-biotin immunohistochemistry, en: *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako. 6° ed: 79.

Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P. (2009). Common Sense about Taste: From Mammals to Insects. *Cell*, 139(2), 234-244.

## Anexo 1: Índice de figuras

<b>Figura 1.-</b> Estructura química de la dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina) .....	9
<b>Figura 2.-</b> Esquematación de un corte sagital de cerebro de rata donde se muestran las estructuras cerebrales que forman parte del sistema de recompensa, señalando de manera específica en color rojo la vía dopaminérgica. Área tegmental ventral (VTA), núcleo accumbens (N.Acc), comisura anterior (AC), corteza frontal (FC) .....	10
<b>Figura 3.-</b> Descripción general de las principales proyecciones aferentes y eferentes del núcleo accumbens. Las ubicaciones de las flechas no indican el grado o la ubicación precisa de la proyección. PFC, corteza prefrontal; HPC, hipocampo; BLA, amígdala basolateral; VTA, área tegmental ventral; VP, pallidum ventral; NAc, núcleo accumbens .....	13
<b>Figura 4.-</b> Esquema de las principales células gustativas. Esta clasificación incorpora características ultraestructurales, patrones de expresión génica y las funciones de cada tipo, I, II (receptor) y III (presináptica). Las células tipo I (azul) degradan o absorben neurotransmisores. También pueden eliminar el K <sup>+</sup> extracelular que se acumula después de los potenciales de acción en las células receptoras y presinápticas. El sabor salado puede ser activado por algunas células tipo I. Los compuestos dulces, amargos y de sabor umami activan las células receptoras induciéndolas a liberar ATP a través de pannexin 1 (Panx1) .....	14
<b>Figura 5.-</b> Esquema de la señalización intracelular inducida por sustancias edulcorantes .....	16
<b>Figura 6.-</b> Esquema del dímero de GPCR dulce T1R2 + T1R3, que muestra los múltiples sitios de unión del ligando. T1R2 se muestra a la izquierda, T1R3 está a la derecha .....	18
<b>Figura 7.-</b> Esquema de la teoría de Schallenberger y Acree sobre la percepción del sabor dulce ...	19
<b>Figura 8.-</b> Esquematación de la anatomía del gusto en ratón. Las papilas gustativas se distribuyen ampliamente en la lengua y paladar blando. En la lengua, las papilas gustativas se clasifican en tres clases: papila circunvalada ubicada en la parte posterior de la lengua; papilas foliares que se encuentran en el borde lateral posterior, y las papilas fungiformes que se distribuyen en los dos tercios anteriores de la lengua; estas tres clases de papilas se pueden resaltar en ratones diseñados para expresar la proteína verde fluorescente en las áreas papilares. Las papilas gustativas en la lengua y el paladar están inervadas por tres nervios aferentes: cuerda timpánica, glossofaríngeo y superficie mayor petrosal. Estos nervios llevan información del gusto desde las células receptoras hasta el núcleo del tracto solitario en el tronco encefálico. Desde el núcleo del tracto solitario, las respuestas del gusto se transmiten y procesan a través del núcleo parabraquial y el tálamo a la corteza gustativa primaria en la ínsula .....	20

**Figura 9.-** Base bioquímica de la estabilidad única de  $\Delta$ FosB: (a) FosB y (b)  $\Delta$ FosB.  $\Delta$ FosB se genera mediante splicing alternativo y carece de los 101 aminoácidos C-terminales presentes en FosB. Se conocen dos mecanismos que dan cuenta de la estabilidad de  $\Delta$ FosB. En primer lugar, carece de dos dominios de degron presentes en el extremo C de FosB y en segundo lugar es fosforilado por la caseína quinasa 2 (CK2) y probablemente por otras proteínas quinasas en su extremo N, lo que estabiliza aún más la proteína .....23

**Figura 10.-** Esquema que muestra la acumulación gradual de  $\Delta$ FosB frente a la inducción rápida y transitoria de otras proteínas de la familia Fos en respuesta a las drogas de abuso. (A) Se muestra la expresión de proteínas de la familia Fos (c-Fos, FosB y  $\Delta$ FosB) que se inducen en el núcleo accumbens y neuronas del estriado dorsal por administración aguda de un fármaco de abuso. (B) Con la administración repetida del fármaco, cada estímulo agudo induce un nivel bajo de las isoformas  $\Delta$ FosB estables. Esto se indica mediante el conjunto inferior de líneas superpuestas que indican  $\Delta$ FosB inducido por cada estímulo agudo. El resultado es un aumento gradual en los niveles totales de  $\Delta$ FosB con estímulos repetidos durante un curso de tratamiento crónico. Esto se indica con la línea progresiva creciente en el gráfico .....23

**Figura 11.-** Representación esquemática de los cortes a diferentes bregmas utilizados en este trabajo. Los esquemas fueron tomados de “The rat brain” de Paxinos y Watson, 2007. Para Núcleo del Tracto Solitario (A), un bregma de -11.76 mm y Área Tegmental Ventral -6.84 mm (B), mostrando el núcleo de interés con un color rojo y a lado una foto del corte teñido con Nissl .....28

**Figura 12.-** Interacciones moleculares durante la prueba inmunohistoquímica .....29

**Figura 13.-** Para la identificación del núcleo del tracto solitario se analizaron tres tinciones con tratamientos diferentes para encontrar patrones de expresión, en la figura 13 A) se muestra una tinción de Nissl, en la figura 13 B) se muestra una combinación de Nissl con inmunohistoquímica para C-Fos – con tratamiento de extracto de stevia y en la figura 13 C) se muestra una inmunohistoquímica en núcleo del tracto solitario para  $\Delta$ FosB – tratamiento de extracto de stevia, además de los patrones de expresión se identificaron referencias anatómicas como se muestra en la figura 13 D) .....31

**Figura 14.-** Representación de las referencias anatómicas para la identificación de Área Tegmental Ventral, en la Figura 14 A) se muestra un esquema tomado de Paxinos y Watson, 2007 donde se pueden observar 3 círculos rojos con tres números, el número 1 muestra el acueducto, el número 2 muestra el núcleo interpeduncular apical y el número 3 muestra el núcleo interpeduncular caudal, además de dos círculos color verde que muestran el Área Tegmental Ventral, en la Figura 14 B) se observa un corte con inmunohistoquímica donde se resaltan las referencias anatómicas y en color verde Área Tegmental Ventral .....32

**Figura 15.-** Esquema del campo visual del objetivo 40X que se utilizó para dibujar y contar las neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB para cada núcleo .....32

**Figura 16 A).** Gráfica de medias +/- el error estándar a partir de un Mann-Whitney test de neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario. En el eje de las X se observa los dos grupos utilizados en el experimento y en el eje de las Y se muestra el número de células inmunoreactivas. Se encontraron diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas del grupo tratado con extracto de Stevia con respecto del control con un valor de  $U=532.5$  y  $P=0.0089 < 0.05$ . B) Fotografías representativas de la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en Núcleo del Tracto Solitario de cada grupo en 10X y 40X, se puede observar el marcaje y la delimitación del núcleo, indicado por flechas color naranja, además se puede observar que la inmunoreactividad es diferente tanto en distribución como en concentración para cada grupo .....34

**Figura 17. A)** Gráfica de medias +/- el error estándar a partir de un Mann-Whitney test de neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral, en el eje de las X se muestran los dos grupos utilizados en el experimento y en el eje de las Y se muestra el número de neuronas inmunoreactivas. La prueba de Mann-Whitney indica que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas del grupo tratado con stevia respecto al grupo control con un valor de  $U=487.0$  y un valor de  $P=0.0017 < 0.05$ . B) Fotografías representativas de la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en Área Tegmental Ventral de cada grupo en 10X y 40X, se puede observar que la inmunoreactividad en VTA-Control es escasa y en la mayoría de los cortes nula, también se puede observar que en VTA-Stevia a pesar de ser un núcleo relativamente pequeño se puede observar una gran cantidad de inmunoreactividad y un marcaje bien definido .....35

## Anexo 2: Abreviaciones

AC: comisura anterior

BLA: amígdala basolateral

FC: corteza frontal

GPCR: receptores acoplados a proteínas G

GTP: trifosfato de guanosina

HPC: hipocampo

NAC: núcleo accumbens

PFC: corteza prefrontal

SNC: Sistema Nervioso Central

Sol: núcleo del tracto solitario

VP: pallidum ventral

VTA: área tegmental ventral