



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Enfermería y Obstetricia

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Consecuencias del consumo frecuente de  
edulcorantes sobre el Sistema Nervioso”**

**TESIS**

Para Obtener el Grado de:

Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

M. en C.S. Esmeralda Morales González

Comité Tutorial:

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph. D.

Tutor Académico

Irazú Contreras García, Ph. D.

Tutor Interno

Dr. en C. Vladimir Paredes Cervantes

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, Noviembre de 2018.

## **VOTOS APROBATORIOS**



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia  
Coordinación del Doctorado en Ciencias de la Salud

### ACTA DE VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Fecha: 24 de septiembre de 2018

Nombre del Alumno (a): Esmeralda Morales González  
Título de la tesis: Consecuencias del consumo frecuente de edulcorantes sobre el sistema nervioso

	Nombre	Dictamen (Aprobado o Rechazado)	Observacio
Tutor Académico	José Antonio Estrada Guadarrama	Aprobado	Comentarios nuevos
Turno Interno	Irazú Contreras García	Aprobado	Correcciones menores
Tutor Externo	Vladimir Paredes Cervantes	Aprobado	PIEQUENA

TUTOR ACADÉMICO  
Nombre y firma

TUTOR INTERNO  
Nombre y firma

TUTOR EXTERNO  
Nombre y firma



Paseo Tolocan s/n. Sta. Jesús Cerranza  
col. Moderna de la Cruz C.P. 50180  
Toluca, Estado de México  
Tel. (722) 2706270 / 2702357  
teyo@uademax.mx

## DICTAMEN DE VOTOS APROBATORIOS TESIS

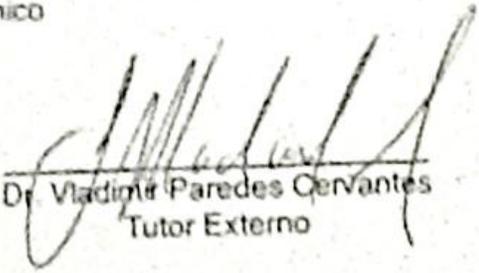
Los docentes que integran el **COMITÉ DE TUTORES** de la maestra (a) Esmeralda Morales González, egresada del programa del Doctorado en Ciencias de la Salud de la generación 2014-2017, quien realizó el trabajo de tesis titulado: "Consecuencias del consumo frecuente de edulcorantes sobre el sistema nervioso", bajo la Tutoría Académica del Dr. José Antonio Estrada Guadarrama, ha sido dirigido, revisado y discutido, por lo que se ha considerado **DICTAMINARLO COMO APROBADO**, ya que reúne los requisitos que exige el Artículo 75 del Reglamento de Estudios Avanzados de la Universidad Autónoma del Estado de México.

ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

*"2018, Año del 100 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"*

  
Dr. José Antonio Estrada Guadarrama  
Tutor Académico

  
Dra. Irazú Contreras García  
Tutor Interno

  
Dr. Vladimir Paredes Cervantes  
Tutor Externo

Paseo Idoxan s/n esq. Jesús Carranza  
col. Moderna de la Cruz, C.P. 50180  
Toluca, Estado de México  
Tel. (722) 2706270 / 2702357  
leyo@uaemex.mx



# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	4
<b>Introducción</b>	5
<b>1. Antecedentes</b>	6
Edulcorantes	6
<i>Historia de los edulcorantes no nutritivos</i>	6
<i>Relevancia del consumo de edulcorantes</i>	6
<i>Edulcorantes permitidos</i>	8
<i>Sacarosa (Azúcar de mesa)</i>	10
<i>Sucralosa</i>	11
<i>Estevia</i>	12
<i>Generalidades del sistema nervioso</i>	13
<i>Mecanismo de acción de edulcorantes en el sistema nervioso.</i>	14
<i>Mecanismo de transducción de los receptores gustatorios para los edulcorantes</i>	14
<i>Áreas del sistema nervioso relacionadas con la percepción del sabor dulce</i>	17
<i>Efecto de los edulcorantes en el sistema nervioso</i>	19
<i>Factores de Crecimiento de Insulina (IGFs) en el SNC</i>	20
<i>Cognición</i>	25
<i>Glucosa en la cognición</i>	26
<b>2. Planteamiento del problema</b>	28
<b>3. Justificación</b>	29
<b>4. Hipótesis</b>	30
<b>5. Objetivos: general y específicos</b>	31
<b>6. Diseño metodológico</b>	32
6.1 Diseño del estudio	32
6.2 Universo y Muestra	32
6.3 Procedimientos	32

Crianza de ratones	32
Suplementación con edulcorantes	32
Evaluación de memoria espacial mediante laberinto de Morris	33
Disección de tejido cerebral	33
Análisis de expresión de proteínas por el método de Western	33
Blot	33
6.4 Criterios de inclusión	35
6.5 Criterios de exclusión y eliminación	35
6.6. Instrumentos	35
6.7 Recolección de datos	35
6.8 Análisis de datos	36
6.9 Aspecto ético	36
<b>7. Resultados</b>	37
7.1 Capítulo de libro aceptado	37
7.1.1.Cambios en la expresión de factores de crecimiento similares a insulina en el sistema nervioso murino relacionados al consumo frecuentes de edulcorantes	37
7.1.2 Página frontal del capítulo de libro	37
7.1.3 Carta de aceptación	38
7.1.4 Resumen	39
7.1.5. Apartados del capítulo de libro	40
Introducción	40
Metodología	41
Análisis estadístico	43
Resultados	44
Discusión	45
Conclusión	47
Referencias	48
Figuras	51
7.1 Artículo enviado	52
7.2.1Título del artículo enviado	52

7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo	53
7.2.3 Abstract	54
7.2.4 Apartados del artículo	55
Introduction	55
Methods	56
Animals and experimental groups	56
Evaluation of spatial learning and memory by Morris water maze	57
Statistical analysis	58
Results	58
Discussion	61
References	64
Tables and figures	70
<b>8. Discusión general</b>	74
<b>9. Conclusiones generales</b>	77
<b>10. Bibliohemerografía</b>	78
<b>11. Anexos</b>	86
Anexo 1. Evaluación de memoria espacial con laberinto de Morris	86
Anexo 2. Soluciones para Western Blot	89
Anexo 3. Soluciones para la preparación de geles de acrilamida	91
Anexo 4. Soluciones para la transferencia de proteínas a membranas de PVDF	94
Anexo 5. Preparación de anticuerpos	95

## **“CONSECUENCIAS DEL CONSUMO FRECUENTE DE EDULCORANTES EN EL SISTEMA NERVIOSO”**

### **Resumen**

El uso de edulcorantes no nutritivos es una de las medidas de salud generadas para disminuir el riesgo de enfermedades como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2; no obstante, sus efectos metabólicos y sus posibles beneficios en la salud han sido recientemente cuestionados, ya que existe evidencia sobre alteraciones metabólicas inesperadas, derivados del uso frecuente de estos compuestos.

La regulación del metabolismo energético depende en gran medida de las funciones del sistema nervioso central, que depende principalmente de un suministro adecuado de glucosa para su homeostasis. Los efectos del consumo frecuente de edulcorantes sobre el tejido nervioso son aún desconocidos. El funcionamiento adecuado de las células neuronales depende asimismo de múltiples mediadores solubles, entre ellos, factores de crecimiento celular como los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) tipo I y tipo II, que son proteínas endógenas que favorecen tanto la supervivencia como la diferenciación celular. Dichos factores han sido relacionados en los últimos años con el desempeño adecuado de las funciones cognitivas, entre ellas, el aprendizaje y la memoria.

El objetivo de este proyecto fue determinar si el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos afecta los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria espacial y si esto se relaciona a cambios en la expresión de IGFs en el sistema nervioso central en un modelo murino. Para este fin, se emplearon ratones de la cepa BALB/c, machos y hembras, de 8 semanas de edad, que fueron suplementados con los edulcorantes sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol durante seis semanas. La evaluación del aprendizaje y memoria espacial se realizó por medio del laberinto de agua de Morris. Al término del tratamiento, se realizó la disección del tejido cerebral, que se empleó para determinar la expresión de IGFs por medio de western-blot. Los resultados mostraron diferencias significativas entre sexos en la capacidad de memoria espacial de los ratones suplementados con edulcorantes no nutritivos, aunadas a cambios en la expresión de IGF-1 en ratones macho, lo que sugiere que el consumo frecuente de estos compuestos afecta procesos cognitivos relacionados con la memoria de forma diferencial, dependiendo del sexo del animal.

## **Introducción**

Los edulcorantes son sustancias que proveen un sabor dulce, los cuales pueden ser clasificados en nutritivos y no nutritivos, naturales y artificiales. Inicialmente, el consumo de los edulcorantes no nutritivos fueron utilizados con fines preventivos o como tratamiento complementario en patologías como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo, debido a que se consideran como sustancias inocuas, su consumo cada vez es mayor en la población en general, sin conocer a fondo sus efectos en la salud. Entre los edulcorantes más utilizados por la población se encuentran la sacarosa, considerada como el estándar para comparar la intensidad de dulzor en otros edulcorantes, mientras que entre los no nutritivos más consumidos se encuentran la sucralosa, que es 600 veces más dulce, y los glucósidos de esteviol, que son 300 veces más dulces que la sacarosa. El Sistema Nervioso tiene como función controlar y regular los diversos estímulos recibidos que deben ser procesados por células nerviosas, con la finalidad de elaborar una respuesta adecuada. Su funcionamiento depende de una gran variedad de moléculas, incluyendo neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento. Entre ellos, los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) tipo I y tipo II han cobrado especial importancia, dado que son proteínas endógenas que favorecen la supervivencia y la diferenciación celular, permitiendo la homeostasis neuronal. Adicionalmente, estas moléculas se han relacionado al desempeño adecuado de funciones cognitivas, como los procesos de aprendizaje y memoria.

La homeostasis del tejido nervioso requiere concentraciones adecuadas de glucosa, debido a que es la principal fuente de energía para las neuronas. Debido a ello, el consumo frecuente de suplementos dietéticos que proporcionan pocas calorías podrían tener efectos en este sistema, motivo por el cual el objetivo de este proyecto de investigación fue determinar si el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos puede tener un efecto sobre los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria espacial y si los mismos se relacionan con la expresión de IGFs en el cerebro de ratones.

## **1. Antecedentes**

### **Edulcorantes**

Los edulcorantes son sustancias que proveen un sabor dulce, los cuales pueden ser clasificados en base al contenido nutritivo, pudiendo ser nutritivos y no nutritivos, o bien pueden clasificarse según su origen, en naturales o artificiales (1).

### **Historia de los edulcorantes no nutritivos**

Entre los primeros edulcorantes descubiertos en el siglo XIX en los Estados Unidos se encuentra la sacarina, potente edulcorante sintético no nutritivo aprobado para el consumo humano y por lo tanto, comercialmente disponible. Descubierta por Constatine Fahlberg en 1879, el hallazgo fue accidental, mientras trabajaba con derivados del alquitrán del carbón con la esperanza de encontrar un nuevo conservador para alimentos, él reportó que al “probar” sus dedos, encontró un sabor sorprendentemente dulce. Este hallazgo lo llevó a realizar experimentos secretos y en 1893, su producto debutó en la “World’s Columbia Exhibition”, en Chicago (1,2). Para 1930, el azúcar fue racionada durante la primera guerra mundial, generando un amplio uso de la sacarina; sin embargo, fue considerada como un sustituto inferior, un símbolo de codicia y un producto de uso exclusivo para diabéticos (2).

Entre 1945 y principios de los años 50’s, las mujeres americanas empezaron a usar la sacarina y los ciclamatos con la finalidad de mantenerse delgadas, o bien, debido a la restricción de azúcar en tiempos de guerra, por lo cual los empezaron a emplear como edulcorantes alternativos (1). A principios de 1977, la Food and Drug Administration (FDA) anunció que la sacarina sería removida del mercado de los Estados Unidos, al igual que los ciclamatos, debido a la posibilidad de producir cáncer, considerando estas sustancias como otro factor carcinógeno (1,3).

Posteriormente, se emplearon los ciclamatos, el aspartame y la sucralosa, los cuales permitían experimentar el sabor dulce en los alimentos junto con una reducción dramática en el consumo de calorías en relación a otros edulcorantes nutritivos, como la sacarosa (1).

### **Relevancia del consumo de edulcorantes**

El consumo de los edulcorantes, en base a las características de alimentos y bebidas que los contienen, se ha incrementado con el tiempo en todos los grupos de edad (4), lo cual es importante

particularmente en los niños, debido a su pequeña talla y al alto consumo relativo de estos azúcares en la actualidad (5).

Generalmente no se reportan las cantidades actuales de edulcorantes contenidos en alimentos y en bebidas (4). Por tal motivo, la cuantificación de la cantidad precisa de estas sustancias en los alimentos es difícil de realizar. Aunado a que el poder dulcificante de los azúcares artificiales es cientos de veces mayor que el de la sacarosa (6), ambas situaciones contribuyen a que su consumo sea cada vez mayor en la población en general, además de generar la idea de estar consumiendo una sustancia baja en energía, lo cual induce a su vez mayor consumo, generando una asociación entre los edulcorantes y la ganancia de peso, ocasionando alteraciones en el metabolismo corporal (7).

Actualmente, entre las medidas de salud generadas para disminuir el riesgo de patologías como la obesidad y la diabetes mellitus, se encuentran las modificaciones en la dieta, entre ellas el uso de edulcorantes no nutritivos (8,9). Estos compuestos satisfacen los deseos de dulzura y palatabilidad sin proporcionar energía extra, en comparación de los alimentos y bebidas que contienen azúcares nutritivos (10–14). La mayoría de los edulcorantes son consumidos de manera usual en sodas (bebidas carbonatadas), bebidas de frutas, limonadas y té helado (15). Cabe mencionar que además del uso de edulcorantes no nutritivos en bebidas de “dieta” o “light”, también son frecuentemente utilizados en alimentos como yogurths, pudines, pasteles y helados (16).

A principios de los años 90's, el consenso con respecto a los edulcorantes no nutritivos fue que no incrementaban el peso en humanos (17–19). Sin embargo, desde hace poco tiempo, un número significativo de estudios han publicado la relación entre el consumo de bebidas con endulzantes y la obesidad, la hipertensión y otras alteraciones metabólicas (20). Por lo tanto, han sido cuestionados sus efectos metabólicos, así como los beneficios en la salud (21,22), a pesar de considerarse metabólicamente inertes (23). Datos recientes de estudios epidemiológicos en humanos y hallazgos en modelos animales sugieren que el uso de edulcorantes no nutritivos puede alterar el balance de energía, contribuyendo a la obesidad y otras alteraciones negativas en la salud, como el síndrome metabólico (24,25). Adicionalmente, se ha relacionado con alteraciones en la circunferencia de la cintura, en la presión sanguínea y la concentración de glucosa en ayuno (26–29), además de resistencia a la insulina asociada con la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 y un pobre control de glucosa en pacientes con antecedentes de pacientes con esta enfermedad (30,31). Asimismo, se ha observado un incremento en la concentración de lipoproteínas de baja densidad,

colesterol y triglicéridos, así como disminución de lipoproteínas de alta densidad, relacionadas a su consumo (32,33). También se ha encontrado que los edulcorantes no nutritivos pueden interferir con la respuesta fisiológica intestinal, debido a que pueden modificar la microbiota y favorecer el proceso inflamatorio intestinal, que se asocia con alteraciones metabólicas en la capacidad de absorción de glucosa y su homeostasis (34).

Diversos estudios han analizado los efectos de los edulcorantes no nutritivos, en relación con el peso corporal, así como otros parámetros metabólicos, tanto en adultos como en niños, los cuales son necesarios para entender los efectos de los edulcorantes no nutritivos en el metabolismo y la salud (5).

### **Edulcorantes permitidos**

El consumo de edulcorantes es regulado por diferentes organismos a nivel mundial. En México, la Secretaría de Salud (SSA), conforme a la Ley General de Salud, ejerce las atribuciones de regulación, control y fomento sanitario de los edulcorantes, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), indicado en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios (35). Otros organismos que también participan en la regulación de estas sustancias a nivel mundial son la *Food and Drug Administration* (FDA), así como la Comisión del Codex Alimentarius (CAC), creado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (36), las cuales consideran como edulcorante aquel compuesto capaz de producir un sabor dulce en la boca, clasificándose de la siguiente manera:

- Por su origen: naturales y artificiales
- Por su valor nutritivo:
  - Nutritivos (hidratos de carbono: sacarosa, glucosa, fructuosa; alcoholes: sorbitol, xilitol; glucósidos, hermandulcina, filodulcina; proteínas: taumantina, miel, maple)
  - No nutritivos (sacarina, ciclamato, sucralosa, acesulfame-K, manitol, aspartame, alitame, neotamo y glucósidos de esteviol) (36).

Actualmente se han aprobado varios edulcorantes no nutritivos para el consumo en humanos (Tabla 1). Además, también se ha establecido un nuevo sustituto de azúcar, extremadamente dulce, el

rebaudiósido A, derivado del extracto de la *Stevia rebaudiana* (Bertoni), conocida como estevia, el cual es un complemento dietario, generalmente reconocido como seguro (GRAS, del inglés *Generally Recognized As Safe*). Los edulcorantes bajos en calorías y no nutritivos son reconocidos por muchos nombres, que incluyen edulcorantes no nutritivos, edulcorantes no calóricos, edulcorantes de bajas calorías, edulcorantes de alta intensidad, edulcorantes sin sacarosa, edulcorantes intensos, sustitutos de azúcar y edulcorantes libres de azúcar (5,36,37).

Para cada edulcorante se establece un consumo diario aceptable (ADI del inglés *Acceptable Daily Intake*), en miligramos (mg) por kilogramo (Kg) de peso, el cual es la cantidad del compuesto que se puede consumir a diario a lo largo de la vida sin riesgo apreciable para la salud. El ADI es típicamente 100 veces más bajo que la dosis del edulcorante que causa toxicidad en estudios en animales, para determinar si el edulcorante podría ser aprobado para su uso. También se puede establecer que el consumo humano típico de edulcorante, como Consumo Estimado Diario (EDI), puede ser inferior al ADI. Si el consumo diario estimado (EDI), es inferior al ADI, entonces el edulcorante es considerado seguro para su uso humano (35,37,38).

EDULCORANTE	ESTADO APROBADO POR LA FDA	CONSUMO DIARIO ACEPTABLE	DULZURA EN RELACION CON LA SUCRALOSA
<b>Acesulfame potasio</b>	NNS, REG	15 mg/Kg (~30 botellas de refresco de dieta)	200 X
<b>Aspartame</b>	NUTRS, REG, GMP	50 mg/Kg (~18 botellas de refresco de dieta)	160 – 220 X
<b>Neotame</b>	NNS, REG, GMP	2 mg/Kg	7,000 – 13,000 X
<b>Sacarina</b>	NNS, REG	5 mg/Kg	300 X
<b>Estevia</b>	GRAS	5 mg/Kg	300 X
<b>Sucralosa</b>	NNS, REG, GMP	5 mg/Kg (~6 botellas de refresco de dieta)	600 X
<b>Advantame</b>	NNS, GRAS	32.8 mg/Kg	20 000 X
<b>Extracto de fruta Luo Han Guo</b>	GRAS	NE	100 - 250 X

**Tabla 1.** Edulcorantes no nutritivos aprobados por la FDA. NNS: Edulcorantes no nutritivos (*Non-Nutritive Sweetener*); NUTRS: Edulcorante nutritivo (*Nutritive sweetener*); GMP: Bueno para las prácticas de manufactura (*Good Manufacturing Practice*); REG: Comida aditiva, para la cual una petición ha sido archivada y expedida una regulación; GRAS: Generalmente Reconocido como Seguro (*Generally Recognized As Safe*), NE: No especificado (37).

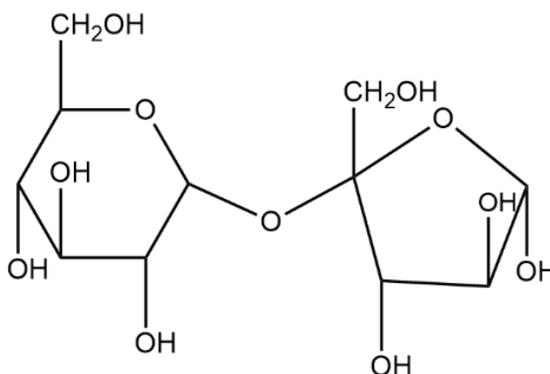
## Sacarosa (azúcar de mesa)

El azúcar común, también llamado sacarosa, es un carbohidrato de origen natural que se puede encontrar en frutas y vegetales (39), el cual está constituido como un disacárido natural formado por el enlace bioquímico de los monosacáridos glucosa y fructosa (Fig. 1) (40,41).

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) contiene entre 9 y 13% de sacarosa. El jugo obtenido de la molienda de la caña se concentra y cristaliza al evaporarse el agua por calentamiento, por lo cual, para su consumo se encuentra de forma sólida, constituido esencialmente por cristales sueltos (39,40).

Las características del azúcar común son las siguientes:

- Nombre químico: Sacarosa (alfa-D-glucopiranosil-1-2-B-fructofuranósido)
- Nombre comercial: Azúcar estándar industrial
- Familia química: Carbohidratos
- Sinónimos; Azúcar de caña
- Peso molecular: 342
- Fórmula:  $C_{12}H_{22}O_{11}$



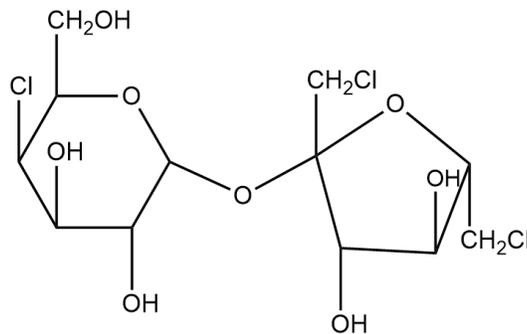
**Figura 1.** Estructura química de la sacarosa (42).

El azúcar es un producto de importancia para el ser humano por su alto contenido energético. Es un elemento de consumo básico en la dieta de los humanos. Es también un insumo importante para la industria fabricante de alimentos y bebidas. Se considera una sustancia químicamente pura, la cual carece de proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, suministrando únicamente

energía, además de ser considerado como el edulcorante estándar con el cual los demás edulcorantes pueden ser comparados (43).

### Sucralosa

La sucralosa (1,6 – dicloro - 1,6 – dideoxy –  $\beta$  – D – fructofuranosil – 4 – cloro – 4 – deoxy –  $\beta$  – D - galactopiranosido), es un disacárido que se origina de la sacarosa, a la cual se le substituyen selectivamente tres átomos de cloro por tres grupos hidroxilos en la molécula del azúcar. La molécula resultante (Fig. 2) es 600 veces más dulce comparada con la sacarosa (44,45).



**Figura 2.** Estructura química de la sucralosa (45).

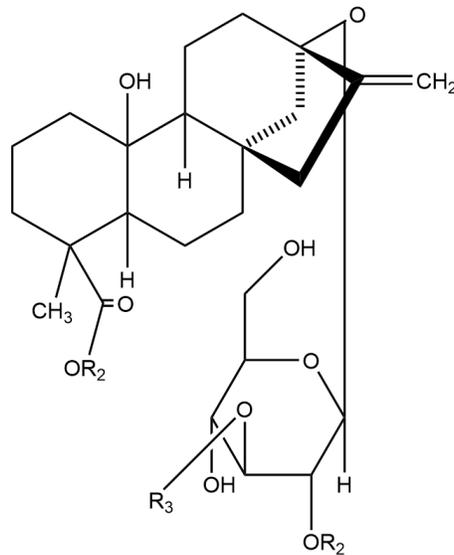
El producto se encuentra disponible comercialmente como “Splenda®”. Tiene una pequeña cantidad adicionada de maltodextrina, como un potenciador de volumen. La cantidad total de calorías que contiene es considerada como cero, aunque una despreciable cantidad de calorías son derivadas de la maltodextrina (44).

Muchos edulcorantes no nutritivos tienen un sabor característico que es fácilmente detectable, lo cual puede inducir una tendencia afectiva hacia la sustancia ingerida. El edulcorante artificial sucralosa se ha considerado ideal en diversos estudios por su amplio uso, además de su ligero sabor amargo (46). Al considerarse de buena calidad por el hecho de ser altamente estable, permite ser utilizado a altas temperaturas, tanto para su uso en la industria como en casa, manteniendo la estabilidad de productos alimenticios almacenados por más tiempo, así como con un pH bajo (45).

## Estevia

La estevia es una planta originaria de sudamérica, donde se consume desde hace más de 200 años por pueblos indígenas, y fue documentada científicamente por primera vez en 1899 como *Eupatorium rebaudianum*, por Moisés Santiago Bertoni, en Paraguay. Posteriormente, en 1905, se definió como *Stevia rebaudiana*, perteneciente a la familia de los girasoles. En 1970 se adoptó por primera vez como edulcorante en Japón. La seguridad del extracto de estevia para el consumo humano ha sido establecida por diversos estudios científicos (47,48).

Los componentes del sabor dulce de la estevia se llaman glucósidos de esteviol, los cuales se encuentran de forma natural en la planta y son responsables del sabor dulce de la misma. Estos principios aislados pueden llegar a ser 300 veces más dulces que la sacarosa. Los glucósidos de esteviol comparten una estructura común de esteviol (Fig. 3). No son absorbidos en estómago ni en el intestino delgado; se metabolizan en hígado y se eliminan a través de la orina (47).



**Figura 3.** Estructura de los glucósidos de esteviol (47).

La *Stevia rebaudiana* (Bertoni), es una planta herbácea con propiedades extremadamente favorables para la salud humana. Es utilizada como endulzante natural, pues sus hojas molidas son 30 veces más dulces que el azúcar de caña y si se seca la hoja entera, es 15 veces más dulce que el azúcar común (49). Actualmente se estudia un gran número de aplicaciones para la salud como anticariogénico, prevenir o disminuir la diabetes, cardiotónico, desparasitante, etc. (50–52).

## **Generalidades del sistema nervioso**

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas como el encéfalo, médula espinal y nervios periféricos, que tienen como función controlar y regular el funcionamiento de todos los órganos y sistemas del organismo, coordinando su interrelación y la relación con el medio externo (53), de tal forma que se encuentra organizado para detectar cambios tanto en el medio interno como externo, evaluar esta información y generar una respuesta para coordinar todas las funciones vitales (54). Las células encargadas de cumplir las tareas de relacionar y coordinar las funciones vitales del organismo son las neuronas, asociadas con otros tipos celulares para integrar el tejido nervioso y todos ellos en conjunto, el sistema nervioso (55).

Este sistema recibe estímulos externos que son de diversa calidad. Por ejemplo, pueden ser químicos, como los del olfato o el gusto; así mismo, percibe estímulos que se generan en el interior del organismo, como la secreción glandular y la motilidad de órganos internos, entre otros (53,55). Los diversos estímulos recibidos son procesados por las neuronas, con la finalidad de elaborar una respuesta, que puede ser a su vez de estimulación o de inhibición, y conducirla a las células, tejidos y órganos efectores, para generar una respuesta de movimiento o de secreción. Los estímulos percibidos y las respuestas que se producen pueden ser voluntarias, involuntarias o una mezcla de ambos (56).

El sistema nervioso se divide en dos grandes subsistemas (Fig. 4):

### 1) Sistema Nervioso Central (SNC)

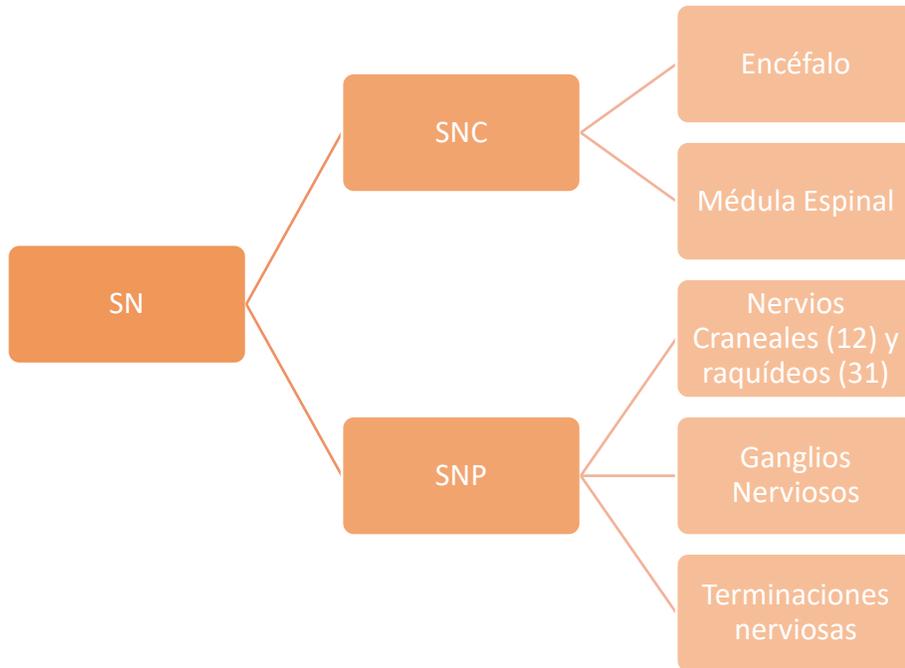
Compuesto por el encéfalo (cerebro y cerebelo) y médula espinal, integrados por un conjunto de neuronas y células gliales. Ambas estructuras están localizadas en el eje mayor del cuerpo, ocupando la alineación central, desde la región cefálica hasta la región sacro – coxígea.

### 2) Sistema Nervioso Periférico (SNP)

Está integrado por:

- Nervios, que son estructuras alargadas donde se concentran los axones neuronales, los cuales se originan principalmente del SNC;
- Ganglios nerviosos, los cuales están formados por acumulaciones de neuronas fuera del SNC. Pueden ser de dos tipos: ganglios sensitivos, localizados a los lados del eje posterior de la médula espinal, y ganglios autónomos, localizados generalmente en el interior de las cavidades del organismo o de otros tejidos y órganos;

- Terminaciones nerviosas, las cuales son estructuras que permiten captar estímulos, así como conducir y transportar una respuesta al estímulo captado (55,56).



**Figura 4.** División básica del Sistema Nervioso. (SN-Sistema Nervioso, SNC-Sistema Nervioso Central, SNP-Sistema Nervioso Periférico).

### **Mecanismo de acción de edulcorantes en el sistema nervioso.**

#### **a) Mecanismos de transducción de los receptores gustatorios para los edulcorantes.**

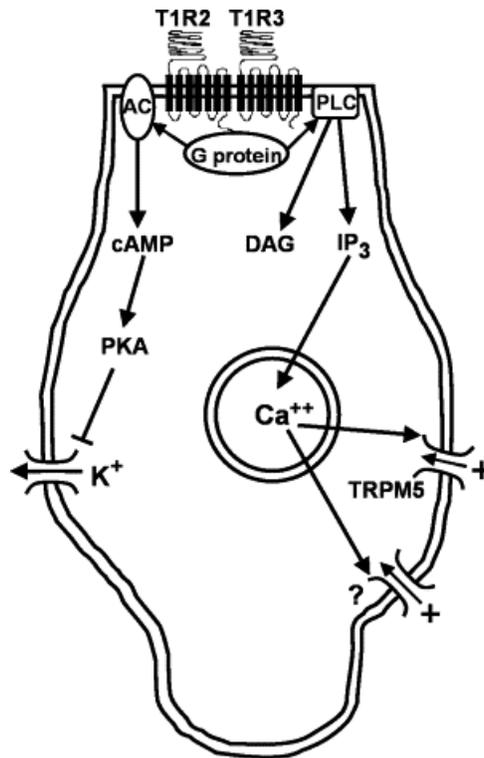
La mayoría de los mamíferos prefieren el gusto por lo dulce, debido a que la glucosa es una fuente esencial de energía y la supervivencia depende de las concentraciones de este hidrato de carbono en sangre, los cuales deben ser mantenidas dentro de los límites normales. Existen otros azúcares, como la sacarosa y la fructuosa, los cuales son útiles debido a que pueden ser convertidos en glucosa, además de tener un sabor dulce similar (57,58). Con respecto a los edulcorantes no nutritivos, pueden ser ingeridos prenatalmente a través del líquido amniótico, ejerciendo cambios en la preferencia por el sabor dulce al nacimiento y durante la infancia a través de la leche materna (59).

Los azúcares estimulan los mecanismos de transducción gustatorios, por lo que la percepción de la intensidad del sabor permite a los animales reaccionar a las diferentes concentraciones de dulce. Además, la percepción de palatabilidad y recompensa ayuda a regular el consumo de azúcar, basado en el proceso de los cambios fisiológicos a corto o largo plazo durante el desarrollo (60). La ingestión de azúcares estimula inmediatamente la respuesta neuronal y ambiental, que en los humanos genera la distintiva cualidad de dulzura. En los roedores, en base a sus reacciones por la ingesta de azúcares, se puede considerar que también tienen una calidad de sabor único, debido a que no generalizan su comportamiento a otros sabores conocidos, como el sabor salado, agrío, amargo o umami (61).

Cuando los azúcares son ingeridos, entran en contacto con papilas fungiformes para el gusto, las cuales se encuentran en los dos tercios anteriores de la lengua. Cada una de estas papilas forma un complejo donde interactúan de 50 – 150 receptores celulares, algunos de los cuales tienen contacto periférico con los nervios gustatorios, que permiten la transmisión de los potenciales de acción al cerebro (62,63). La transducción de señales con los azúcares es a través de la unión al receptor, formando un dímero con siete dominios transmembranales, constituyendo las proteínas T1R2 y T1R3. Este dímero es acoplado a la proteína G para la señalización intracelular (64,65). Los receptores de sabor dulce, incluida la familia del receptor T1R y  $\alpha$ -gustducina, responden tanto a los azúcares nutritivos, como la sacarosa, fructuosa y glucosa, como a los edulcorantes no nutritivos, incluida la sucralosa (Splenda<sup>®</sup>), la sacarina, dulcina, sucralosa y acesulfame-K, además de los aminoácidos glicina y triptófano y otros componentes, como el sorbitol (66).

Posterior de la unión a T1R2/T1R3, sigue una serie de eventos que eventualmente resulta en cambios en el funcionamiento neuronal (67). La activación de la proteína G inicia una cascada de eventos que causa la despolarización del receptor del gusto (Fig.5). Una vía importante involucra la estimulación de adenilato ciclasa, ocasionando un incremento en el AMP cíclico, el cual inhibe los canales de potasio ( $K^+$ ) por la vía de la proteína cinasa A, causando despolarización celular (68).

Otra vía propuesta involucra la activación de fosfolipasa C B<sub>2</sub> (PLCB<sub>2</sub>), la cual estimula los segundos mensajeros inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG). Hay evidencia de que la segunda vía es activada de forma débil por azúcares y tiene una gran función en la transducción de señales iniciada por edulcorantes no nutritivos (68–70).



**Figura 5.** Cascada intracelular en el receptor del gusto activada por azúcares. T1R2 y T1R3: receptores del gusto. G protein: proteína G. PLC: Fosfolipasa C, DAG: diacilglicerol. IP<sub>3</sub>: Inositol trifosfato. Ca<sup>++</sup>: calcio. TRPM5: canal catión activado por calcio. AC: Adenilato ciclasa. cAMP: Adenosin monofosfato cíclico. PKA: Proteína cinasa A. K<sup>+</sup>: Potasio (68).

Toda la información periférica gustatoria hace sinapsis con el núcleo del tracto solitario, seguido por proyecciones al núcleo parabraquial en el puente de Varolio, el tálamo y en la corteza agranular insular. Estas cuatro áreas son consideradas como las regiones gustativas del cerebro (71,72). Otras áreas cerebrales, como la amígdala, el hipotálamo lateral y la corteza orbitofrontal, contienen células que modifican su actividad después de la estimulación de las papilas gustativas (73). La percepción de la intensidad y calidad del gusto son generadas en el cerebro, la cual permite estimar la concentración de azúcar en un alimento (Fig. 6) (74–76).

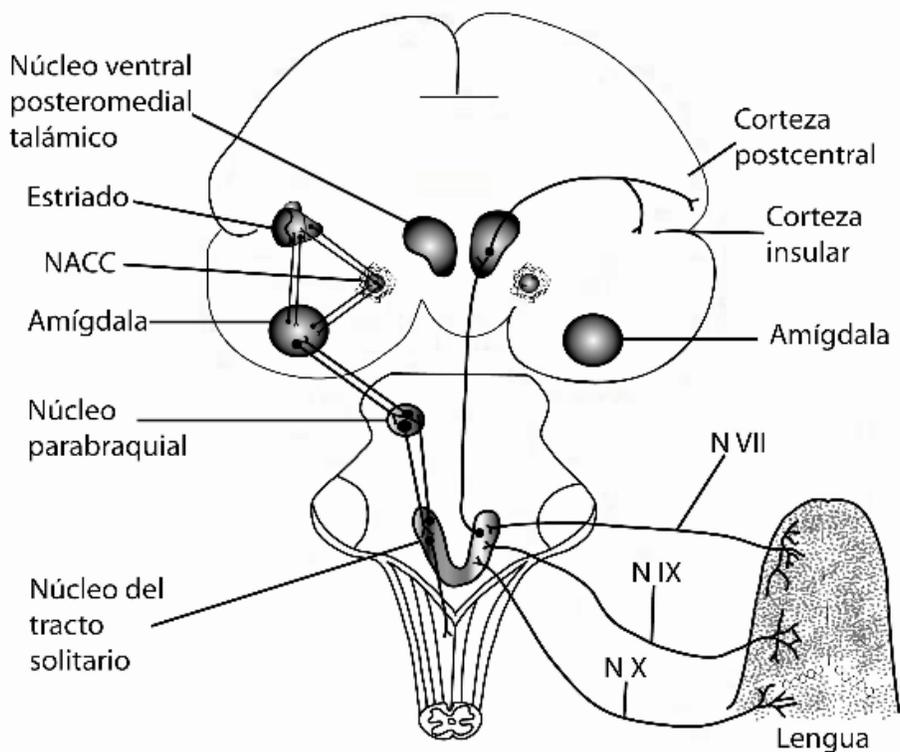


Figura 6. Vías gustativas en el cerebro (77).

Los azúcares evocan respuestas neuronales periféricas y centrales (72). El reconocimiento del azúcar tiene relativamente una mayor latencia, comparada con los componentes no dulces (78). El consumo de azúcar estimula fibras dopaminérgicas que se originan en el área tegmental ventral y se proyectan ampliamente a través de la concha del núcleo accumbens, donde la cantidad de dopamina está correlacionada con el comportamiento de recompensa (79). Se ha observado que la ingesta de sacarosa o sacarina incrementa las concentraciones endógenas del opioide  $\beta$ -endorfina en plasma y líquido cefalorraquídeo, y el consumo de sacarosa incluso puede tener efectos analgésicos (80,81).

#### **b) Áreas del sistema nervioso relacionadas con la percepción de sabores dulces.**

La percepción del sabor dulce, tanto de los edulcorantes naturales como artificiales, es periféricamente mediada por los receptores T1R3, en conjunto con los receptores T1R2 de la lengua (82,83). Esta información sensorial es transmitida por la vía de los nervios craneales VII,

IX y X al tracto del núcleo solitario, de ahí al núcleo talámico ventroposterior medial y hacia la corteza gustatoria primaria, que en humanos comprende el opérculo frontal y la ínsula anterior (84). La ínsula anterior está separada de la ínsula posterior por el sulcus central; la sección anterior está además dividida en un giro corto anterior, medio y posterior, y estudios por imagenología indican algunas diferencias funcionales de estas subunidades, en base a la respuesta por diferentes sabores (85). En algunos estudios se ha observado que los edulcorantes no nutritivos se unen a la subunidad de los receptores del sabor con mayor afinidad, debido a una baja constante de disociación comparada con la sacarosa (86). De hecho, en un estudio por resonancia magnética, se evaluaron a 12 mujeres saludables, a quienes se les dio a beber sacarosa y sucralosa con un gradiente de concentración al 10%, en el que encontraron que:

- 1) La sacarosa y la sucralosa activan funcionalmente las vías primarias del sabor.
- 2) El agrado por el sabor predice la respuesta de la ínsula izquierda.
- 3) La sacarosa provoca una respuesta cerebral más fuerte en la ínsula anterior, en el opérculo frontal y en el cíngulo estriado y anterior, comparado con la sucralosa.
- 4) La sacarosa estimula mejor el acoplamiento de las áreas cerebrales dopaminérgicas, en relación con el comportamiento de placer (87).

Adicionalmente, se observó que la sacarosa estimula 10 áreas cerebrales, incluyendo el opérculo frontal derecho e izquierdo – ínsula anterior – claustró, giro cíngulo, giro frontal superior derecho, núcleo dorsal medio del tálamo derecho y opérculo temporal derecho, en comparación con la sucralosa, que solo estimula 3 áreas cerebrales: el giro frontal superior derecho, el opérculo frontal derecho y el izquierdo (87).

La ingesta de una bebida con edulcorante nutritivo, en comparación con un edulcorante no nutritivo, lleva a una mayor activación de la amígdala en estudios por resonancia magnética (RM) (88). Otros estudios sugieren que los edulcorantes pueden estimular las vías de recompensa, en donde el valor nutritivo de los alimentos tiene una función en la señalización de recompensa cerebral, independientemente de la dulzura (89). Además, se ha propuesto que la frecuente exposición a alimentos altamente dulces altera la preferencia por los mismos, además de que induce tolerancia (89).

También se ha observado en ratones *knockout* la preferencia hacia los azúcares naturales en ausencia del receptor T1R3, mostrando que la respuesta neuronal gustatoria no actúa para los edulcorantes no nutritivos, como la sucralosa, lo cual sugiere que el receptor T1R3 puede ser el único receptor del sabor para los edulcorantes no nutritivos, pero pueden existir receptores adicionales que respondan a los azúcares naturales (90). Adicionalmente, se ha observado que el sabor dulce que los edulcorantes no nutritivos o nutritivos produce activación del sistema de recompensa dopaminérgico, en donde ratones con inactivación del sabor dulce solo incrementan la dopamina en respuesta a los azúcares nutritivos, pero no a los edulcorantes no nutritivos (91).

El agrado por el sabor cambia con diferentes estímulos dulces y varía de persona a persona (92), pero ha mostrado ser más que un estado independiente de deseo (93), aunque aún no se conocen bien las estructuras o circuitos de recompensa del cerebro en humanos que están específicamente relacionadas con este proceso (94,95).

Por lo tanto, existe la posibilidad de que la respuesta cerebral pueda distinguir los edulcorantes nutritivos de los no nutritivos, lo que en forma consciente no es así, pero que además pueda haber diferencias en la síntesis de neurotransmisores, o en la respuesta a algunas hormonas relacionadas con el apetito e incluso en la expresión de factores neurotróficos.

### **c) Efecto de los edulcorantes en el Sistema Nervioso.**

El comportamiento en la alimentación está altamente regulado por señales sensoriales internas que contribuyen a la decisión de comer, de tal forma que la palatabilidad y los nutrimentos de los alimentos, aunado a los requerimientos energéticos y su asociación con el aprendizaje, actúan como factores para tomar una decisión al comer (96).

Para que se transmitan adecuadamente las señales sensoriales internas participan diferentes moléculas, como hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores, entre los que se encuentran la colecistoquinina (CCK), el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (BDNF) y la serotonina, los cuales influyen en el comportamiento de la alimentación (97–99).

Investigaciones recientes han mostrado las propiedades adictivas del azúcar, donde el concepto de adicción es comúnmente caracterizado por un comportamiento compulsivo e incontrolable provocado por la ansiedad, de forma similar al comportamiento ocasionado por enfermedades adictivas por drogas y/o alimentos, lo cual puede sugerir que tanto el azúcar como otras sustancias dulces pueden ser fisiológicamente adictivas (100).

Tanto el consumo de drogas como el consumo de alimentos involucran hábitos de aprendizaje y reforzamiento intenso, así como vías de recompensa, las cuales persisten a pesar de las posibles consecuencias negativas (101,102). Las vías neurobiológicas para entender el gusto y la adicción a los azúcares son posiblemente similares a las involucradas en la adicción a las drogas, debido a que comparten los mismos neurotransmisores, los mismos receptores y activan muchas de las mismas regiones cerebrales (103,104). Esto se observó en un estudio reciente en niños, en el que se demostró que el alcoholismo familiar y los síntomas depresivos se asociaban a una mayor preferencia por soluciones con concentraciones altas de sacarosa, así como un mayor consumo de alimentos dulces (105).

Los azúcares pueden causar la liberación de opioides endógenos, endorfinas y dopamina en el cerebro (106); además, los edulcorantes no nutritivos, así como el azúcar, han mostrado ser efectivos para disminuir el dolor en los niños, lo cual provee una creencia sólida de que la percepción del sabor dulce puede alterar las respuestas fisiológicas centrales (107).

En ratas, la dependencia al azúcar, definida por indicios de sobreconsumo, retiro e incremento del consumo después de su privación, conlleva a un cambio neurológico y de comportamiento (106). Sin embargo, cabe mencionar que los animales pueden seguir un patrón de comida particular, lo cual puede evocar una respuesta con los azúcares. Este patrón puede ser difícil en humanos, debido a que la reacción puede depender de un patrón alimenticio específico, más que de una adicción fisiológica (89).

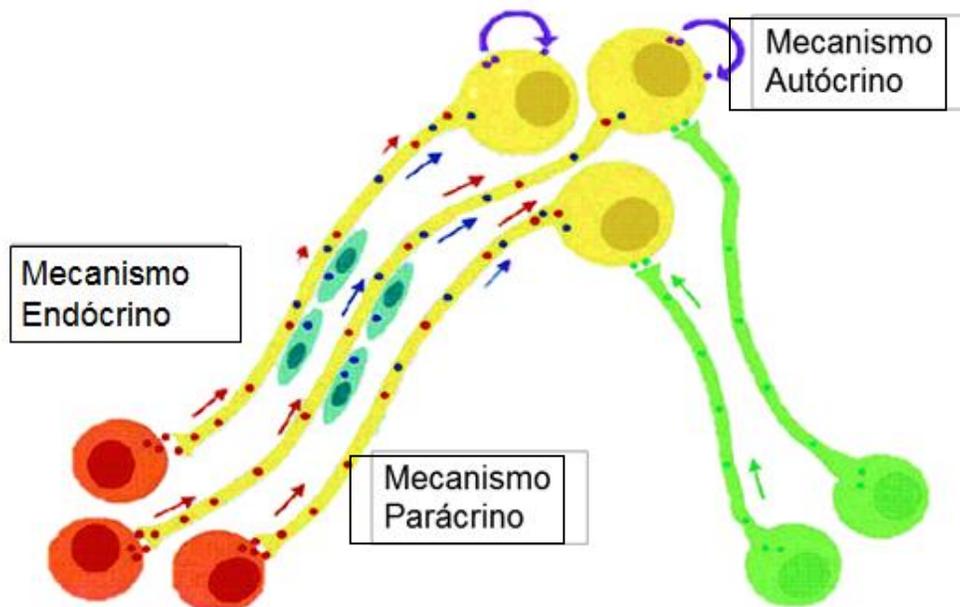
### **Factores de Crecimiento similares a Insulina (IGFs) en el SNC**

La teoría trófica propone que durante el desarrollo, las células nerviosas compiten por concentraciones limitantes de factores de crecimiento secretados por el tejido diana (108). Las células nerviosas que consiguen obtener las concentraciones suficientes y adecuadas, son las que desencadenan diferentes vías de señalización para sobrevivir y proliferar (109).

Los factores de crecimiento del SNC, o factores neurotróficos, son proteínas endógenas que junto con ciertas citocinas o por si solos, pueden actuar directamente sobre células precursoras de dicho sistema para favorecer tanto la supervivencia como la diferenciación celular, así como su regulación a través de la interacción con receptores específicos, y producen factores de transcripción para controlar su autorenovación, que entre otras funciones también permiten el establecimiento de conexiones sinápticas (109,110). Algunos de estos factores son el factor

neurotrófico derivado del encéfalo (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) (110).

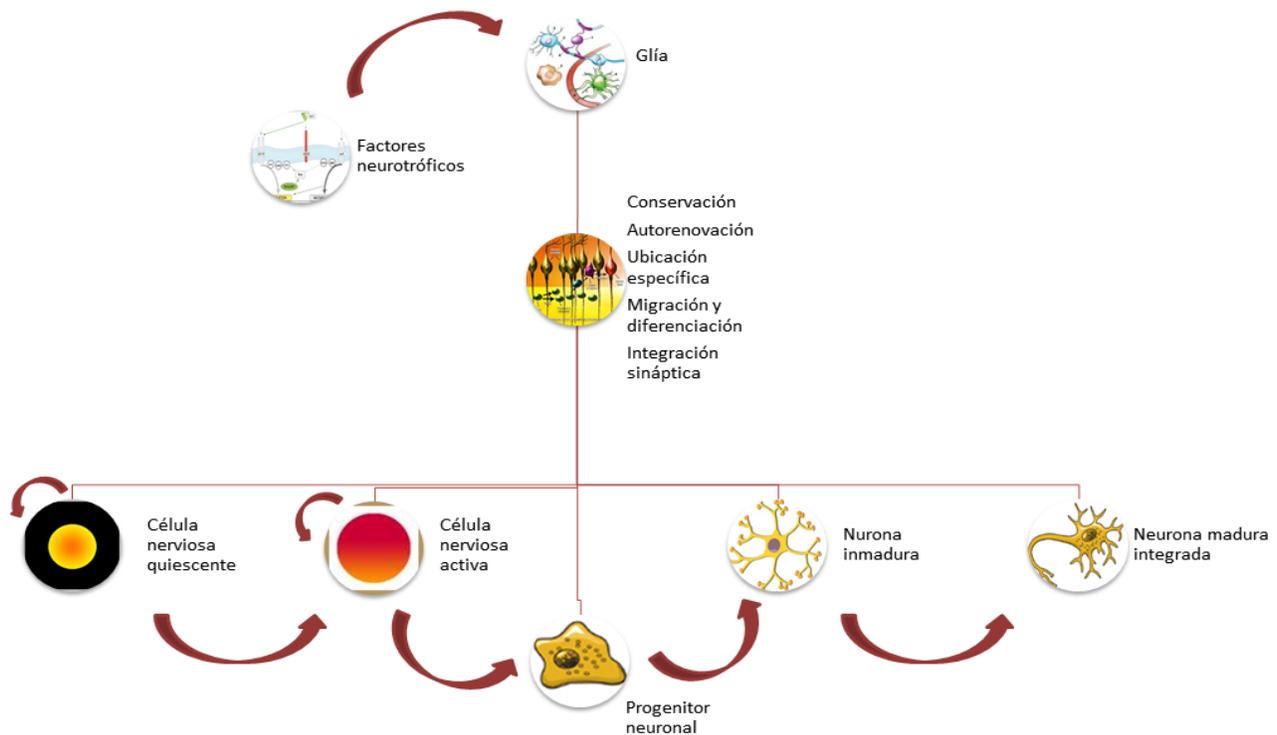
Estos factores tróficos pueden actuar de forma autocrina, paracrina o endocrina (111,112), como se ejemplifica en la (Fig. 7).



**Figura 7:** Mecanismo de acción de los factores tróficos (modificada) (112).

Sin embargo, las células progenitoras del adulto son menos resistentes y su mecanismo de renovación es generalmente limitado (113). En los últimos años se han descrito poblaciones de células precursoras multipotenciales en diferentes regiones del SNC del adulto, especialmente en la zona subventricular, el giro dentado del hipocampo, la retina y el canal central de la médula espinal (114).

Las células gliales, principalmente los astrocitos, tienen la capacidad de controlar algunos procesos de la neurogénesis en la etapa adulta, así como la integración hacia los circuitos preexistentes neuronales (Fig. 8) (115).



**Figura 8.** Neurogénesis en el adulto y su regulación por la glía (modificada) (115).

Una vez establecidas las células del SNC, se activan diferentes vías de señalización intracelular para estimular la sinaptogénesis. De hecho, en un área particular puede existir una ramificación guiada por axones de crecimiento y proteínas, con múltiples sitios de acoplamiento para neuronas, glucoproteínas y algunos factores tróficos (110,115). Sin embargo, las alteraciones nutricionales pueden actuar como un factor negativo, disminuyendo su desarrollo y por ende, su función (116–120).

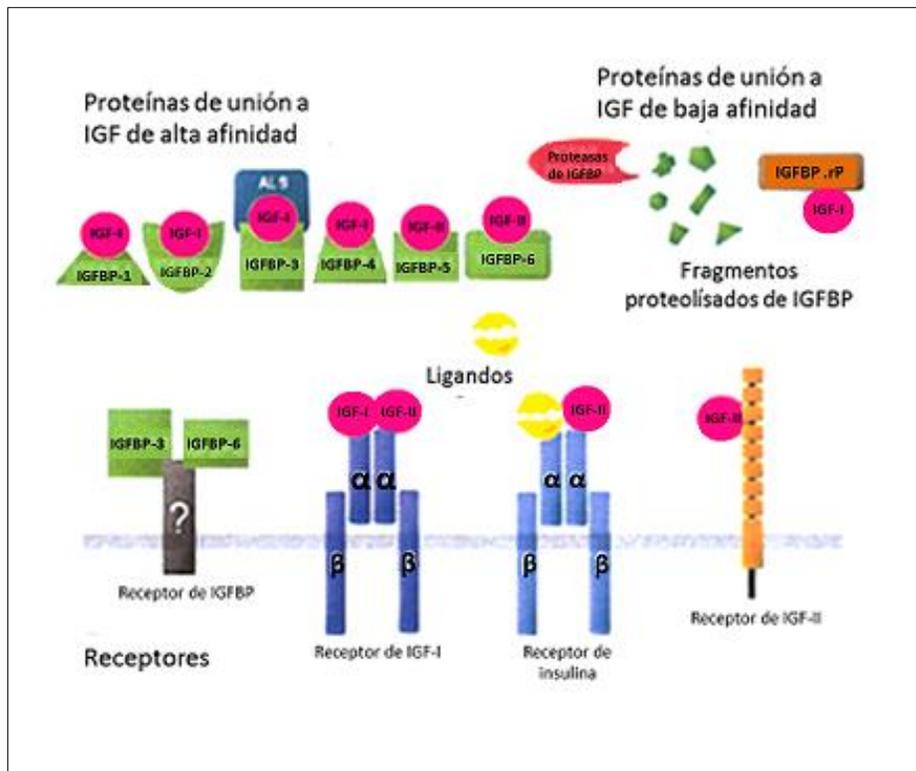
La expresión de factores tróficos en la regulación de los diferentes mecanismos celulares del SNC durante el desarrollo y en la etapa adulta, permiten establecer una correcta formación de circuitos cerebrales (117,118). Algunos de los factores que se han relacionado con la mejora en la función cognitiva del SNC son los IGFs.

Las primeras observaciones sobre los IGFs (del inglés, *Insulin-like Growth Factors*) iniciaron en 1957, con Salmon y Daughaday (121), quienes postularon que la hormona del crecimiento por sí misma no estimulaba el crecimiento *in vitro* ni *in vivo*, pero que inducía la formación de factores

que mediaban el mecanismo de la hormona de crecimiento. Estos en un inicio fueron llamados factores de sulfación, debido a que tenían la habilidad de estimular la incorporación de sulfato radiomarcado dentro del cartílago de rata. Posteriormente fueron denominadas somatomedinas (122), las cuales se observaron en músculo, tejido adiposo y otros tejidos, lo que permitió identificarlos más a fondo, para ser denominados Factores de Crecimiento similares a Insulina tipo I y II, los cuales son péptidos mitogénicos, pleiotrópicos, con secuencia y homología estructural con la insulina (121,123). Entre los principales órganos blanco para estos factores de crecimiento se encuentran el cerebro, músculo, hueso, cartílago, páncreas, ovario, piel y tejido adiposo (124). Los IGFs son expresados en el tejido fetal desde la formación del cigoto, durante su implantación, hasta el nacimiento, siendo más extensa su expresión en humanos que en roedores (125). A diferencia de muchas hormonas peptídicas, los IGFs no se producen ni almacenan dentro de las células de tejidos específicos, sino que se originan en la mayoría de las células del cuerpo; sin embargo, el hígado es el principal origen de estos factores, ejerciendo su actividad autocrina y paracrina en diferentes tejidos (126). Además, la expresión de IGF-II aparece antes que la de IGF-I en el tejido fetal, durante la segunda mitad del embarazo (127).

Estos péptidos promueven la diferenciación, migración y agregación celular, además de que intervienen en la inhibición de la apoptosis (128), proporcionando señales importantes para controlar el desarrollo en la etapa prenatal y posnatal en mamíferos. Son regulados a través de un sistema de receptores o proteínas transportadoras específicas, o mediante la unión a proteínas en circulación, por lo que no se encuentran de forma libre en el suero (129). Por otro lado, las concentraciones de hormona del crecimiento, el estado nutricional, la adecuada secreción de insulina, así como una adecuada función tiroidea, también participan en la regulación de las concentraciones de estos factores de crecimiento en otros tejidos, como el páncreas (130).

Los IGFs se consideran una familia que incluye dos ligandos (IGF-I e IGF-II), dos receptores de superficie celular (IGF-IR, IGF-IIR), por lo menos 6 proteínas de unión (IGFBP1 a IGFBP6) y múltiples proteasas, que en conjunto actúan en diversos tejidos, regulando su actividad (Fig. 9) (129).



**Figura 9.** Familia de Factores de Crecimiento de Insulina. IGFBP – Proteínas de unión a IGF (Modificado) (131).

La biodisponibilidad de los IGFs, tanto en la circulación como en tejidos, en función de la modulación e interacción con sus respectivos receptores, está determinada por su velocidad de producción, el espacio y afinidad de las proteínas de unión de alta afinidad, como IGFBP1 - 6 y péptidos de baja afinidad relacionados a IGFBP, como los IGFBP-rP1-4 (131). Las concentraciones de estos factores en sangre son aproximadamente 100 veces más altas que las de otras hormonas peptídicas (129).

Con respecto a su estructura, IGF-I e IGF-II son polipéptidos de cadena simple, con homología del 62% con la proinsulina. Ambos contienen dominios A y B, que son homólogos a las cadenas de insulina, pero que, a diferencia de la insulina, no son sometidos a proteólisis post-traducciona, sino que permanecen unidos en los péptidos maduros por un análogo de dominio C, similar al de la insulina, además de que también difieren en un dominio D, que tampoco está presente en la insulina (129,132,133).

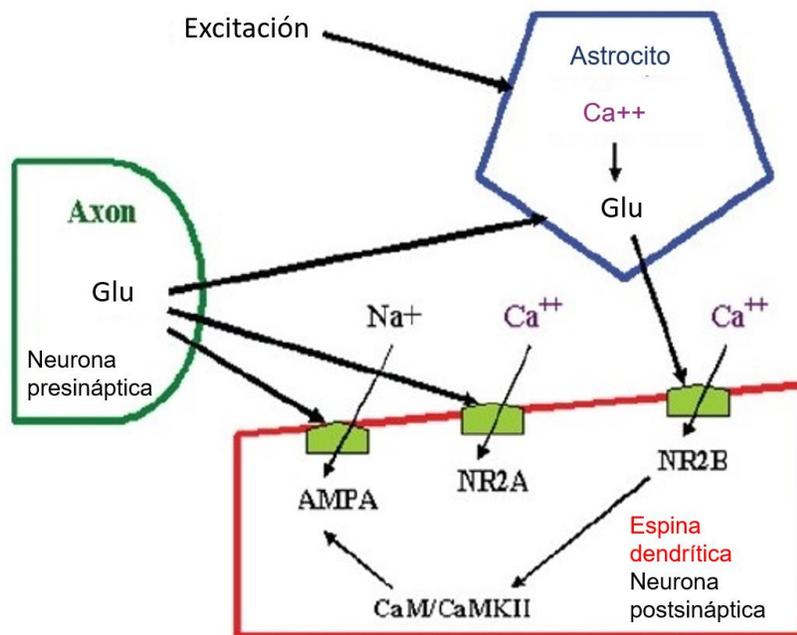
En los últimos años se han comenzado a estudiar las vías intracelulares y los mecanismos moleculares que involucran a estos factores de crecimiento en el sistema nervioso (124,129).

## Cognición

La cognición se ha definido como una estrategia de supervivencia, frente a las fuertes presiones ambientales que el hombre ha enfrentado durante su evolución, así como en su desarrollo y crecimiento, generada por el cerebro a partir de la sensación percibida por el estímulo sensorial así como el efecto que produce involucrando diversas manifestaciones conductuales como memoria, aprendizaje, atención, emoción, lenguaje, pensamiento y conciencia (134).

Los diferentes procesos cognitivos requieren de una compleja red de conexiones estructurales entre el hipocampo, la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo y el sistema límbico (135), estas conexiones son interneuronales e incluso la participación de los astrocitos es importante, debido a que componen aproximadamente la mitad del volumen del tejido cerebral, que se les conoce por su acción con mecanismos como dar estructura a las neuronas así como proporcionarles soporte metabólico y funcional; sin embargo, también se ha demostrado en estudios *in vitro* como *in vivo*, que debido a que también son células excitables, tienen una función relevante en el procesamiento de la información en el cerebro (136,137), de hecho, algunos estudios se han enfocado en su participación en sinapsis glutaminérgicas relacionadas con los procesos cognitivos, donde se observa una sinapsis tripartita glutaminérgica, es decir, el modelo donde se conectan las dos neuronas, una presináptica y otra postsináptica en relación con un astrocito con sus respectivas vías de señalización intracelular (138).

El incremento del glutamato liberado de las neuronas hacia los astrocitos, se une a los receptores metabotrópicos que permiten la liberación de calcio en los astrocitos generando una activación de la vía inositol trifosfato como se observa en la figura 10.



**Figura 10.** Sinápsis tripartita glutaminérgica. Glutamato liberado por la neurona presináptica, unido con el astrocito y la neurona postsináptica. Glu-glutamato, AMPA – receptor glutaminérgico ionotrópico ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol, NR2A/NR2B – subunidades del receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) (138).

Los astrocitos forman un red acoplada por uniones comunicantes, formando un sincitio funcional, donde las entradas glutaminérgicas heterosinápticas, entran hacia las neuronas corticales e hipocámpicas, activando a los receptores ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA), ocasionando la despolarización celular mediante la subunidad NR2A de los receptores N-metil-D-Aspartato (NMDA), promoviendo la entrada de calcio que causa la potenciación de la membrana relacionada con el aprendizaje, principalmente por cascadas de señalización y expresión genética que lleva a un incremento en la respuesta AMPA dependiente (139). Esta red astrocítica puede retroalimentar la actividad cerebral y el comportamiento, induciendo efectos perceptivos, cognitivos, endócrinos y motores (138).

### Glucosa en la cognición

Los procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria requieren de la interacción entre la red astrogliar, oligodendrocitos, elementos sanguíneos y el líquido cefalorraquídeo, para constituir un ambiente que favorece la red y función neuronal. Adicionalmente, factores externos, como la

nutrición, son importantes debido a que la glucosa es el principal requerimiento energético para el tejido cerebral (140).

Estructuras como la corteza o el hipocampo están relacionadas con procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, siendo susceptibles a modificaciones en la nutrición, por lo que cuando existe un aporte en exceso o en disminución en la cantidad o calidad de los nutrimentos, se observan alteraciones en el desarrollo, homeostasis, plasticidad y función neuronal de estas áreas cerebrales (141).

Las modificaciones nutricionales pueden alterar la disponibilidad de glucosa, afectando la producción energética necesaria para la síntesis de neurotransmisores, factores de crecimiento y hormonas (142,143). Actualmente el consumo de glucosa se ha visto modificado por las estrategias para disminuir o prevenir algunas enfermedades crónicas degenerativas, como la diabetes mellitus o la obesidad, mediante el uso de edulcorantes libres de calorías (144). No obstante, los efectos de estos compuestos en el sistema nervioso no se han reportado. Considerando que los cambios en la disponibilidad de glucosa en el tejido nervioso se ha relacionado con patologías degenerativas del sistema nervioso (145), es necesario determinar los posibles efectos fisiológicos derivados del consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos y su impacto en funciones cerebral relacionadas con procesos cognitivos complejos, como la memoria y el aprendizaje.

## **2. Planteamiento del problema**

El consumo en exceso de azúcares incrementa la susceptibilidad a sufrir patologías crónicas como la obesidad y la diabetes mellitus tipo II, por lo que se han buscado nuevas estrategias para disminuir este riesgo, entre ellas el consumo de edulcorantes no nutritivos. Estos compuestos son considerados benéficos para la salud, motivo por el cual el consumo de sustancias como la sucralosa y los glucósidos de esteviol ha dejado de ser exclusivamente para condiciones patológicas, incrementado su ingestión en la población en general. Sin embargo, estudios recientes han puesto en duda su efecto benéfico, debido a que el consumo de edulcorantes no nutritivos ha tenido efectos inesperados, y en algunos casos adversos, en el metabolismo energético y en la salud en organismos vivos.

El control del metabolismo energético depende en gran medida de las funciones del sistema nervioso central, donde las neuronas y células gliales regulan estos procesos a través de citocinas, hormonas, y factores neurotróficos como los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs), manteniendo la homeostasis y funcionalidad del tejido nervioso. Asimismo, el comportamiento alimentario en los organismos vivos depende a su vez de procesos cognitivos que incluyen funciones de aprendizaje y memoria, para que el organismo busque alimentos nutritivos o agradables al paladar.

El funcionamiento adecuado de las neuronas requiere de concentraciones adecuadas de glucosa, generalmente proporcionadas por la dieta; no obstante, las modificaciones a la disponibilidad de energía en la dieta pueden afectar la producción de factores de crecimiento como los IGFs a nivel sistémico y en el tejido nervioso, pudiendo tener efectos nocivos sobre las células neuronales.

Hasta el momento, se desconoce el efecto que estas sustancias puedan tener en las funciones celulares del tejido nervioso, así como en las funciones cognitivas, por lo que se plantea la siguiente pregunta de investigación:

### **Preguntas de investigación:**

¿Cuáles son las consecuencias del consumo frecuentemente de edulcorantes no nutritivos en la expresión de factores de crecimiento similares a insulina o sus receptores, así como en funciones de aprendizaje y memoria espacial, en el sistema nervioso central en un modelo murino?

### **3. Justificación**

Debido a que el principal combustible para el funcionamiento normal de las células del sistema nervioso es la glucosa, es importante determinar si las modificaciones en la dieta por el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos, pueden generar efectos potencialmente nocivos en el mismo.

Se sabe que un aumento crónico en la concentración de glucosa en sangre se relaciona con patologías en diversos tejidos, incluyendo el sistema nervioso; por ejemplo, las concentraciones elevadas de forma crónica promueven el desarrollo de resistencia a la insulina y cambios en el funcionamiento celular, originando trastornos cognitivos, como el déficit de memoria. Igualmente, se ha demostrado que las modificaciones nutricionales, incluyendo el uso de edulcorantes no nutritivos, afecta la producción de factores de crecimiento necesarios para mantener la homeostasis sistémica, incluyendo los factores de crecimiento similares a insulina, que a su vez se relacionan con el desempeño adecuado de funciones cognitivas de aprendizaje y memoria.

Debido a que el funcionamiento adecuado del sistema nervioso depende en gran medida de la disponibilidad energética a partir de glucosa y a que actualmente el uso de edulcorantes no nutritivos se emplea indiscriminadamente como alternativa para evitar el consumo de glucosa en la dieta, es importante determinar los posibles efectos fisiológicos que el consumo frecuente de estos compuestos puede tener sobre funciones de regulación de la homeostasis del tejido nervioso y del comportamiento alimentario en organismos vivos.

#### **4. Hipótesis**

Hipótesis alterna 1:

El consumo crónico de sacarosa incrementa excesivamente las concentraciones de glucosa en el sistema nervioso central, por lo que afecta negativamente los procesos de memoria espacial; mientras que el consumo de edulcorante no nutritivos como la sucralosa y glucósidos de esteviol, mejora los procesos de memoria espacial al contrarrestar el exceso de glucosa en el tejido nervioso.

Hipótesis alterna 2:

El consumo crónico de sacarosa incrementa excesivamente las concentraciones de glucosa en el sistema nervioso central, disminuyendo la expresión de los factores de crecimiento similares a insulina, relacionándose con efectos negativos en procesos de aprendizaje y memoria, mientras que el consumo de edulcorante no nutritivos contrarresta el exceso de glucosa en el tejido nervioso, mejorando la expresión de estas moléculas y favoreciendo la función cognitiva.

## **5. Objetivos: General y específicos**

### **General:**

Determinar si el consumo frecuente de los edulcorantes no nutritivos sucralosa o glucósidos de esteviol afecta la expresión de IGFs en el sistema nervioso central de ratones y el desempeño cognitivo en procesos de aprendizaje y memoria espacial.

### **Específicos:**

- Determinar si la suplementación frecuente con edulcorantes no nutritivos altera la expresión de factores de crecimiento similares a insulina o sus receptores en el cerebro de ratones, por medio de western-blot.
- Determinar si existen afectaciones en los procesos de aprendizaje y memoria espacial en ratones suplementados frecuentemente con edulcorante no nutritivos, empleando la prueba del laberinto de agua de Morris.
- Comparar los efectos de la suplementación con edulcorantes nutritivos y no nutritivos sobre las variables experimentales y con grupos control sin suplementación.
- Analizar las diferencias encontradas entre los grupos que consumieron los diferentes edulcorantes, y las posibles variaciones de las mismas en base al sexo de los animales.

## **6. Diseño metodológico**

### **6.1 Diseño del estudio**

Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo.

### **6.2 Universo y Muestra**

Ratones de la cepa BALB/c, de ambos sexos.

La conformación para cada grupo de edulcorante se realizó mediante selección aleatoria a partir de las camadas de ratones, donde fueron primero separados por sexo y posteriormente seleccionados al azar para conformar los grupos experimentales y controles.

Se formaron grupos de 8 ratones hembras y 8 ratones machos, de 8 semanas de vida, para cada edulcorante (sacarosa, glucósidos de esteviol y sucralosa), así como el grupo control (sin suplementación).

### **6.3 Procedimientos**

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Neuroquímica, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, en el periodo Junio 2014- Enero 2017.

#### **Crianza de ratones**

La crianza de los ratones de la cepa BALB/c se realizó bajo condiciones estándar: con ciclo luz/obscuridad 12h:12 horas, temperatura promedio de 22°C, alimento (5001 Rodent Diet – Lab Diet) y agua natural purificada *ad libitum*, durante 8 semanas, desde su nacimiento.

Posteriormente, a partir de las 8 semanas de vida, se establecieron los grupos para cada edulcorante, además del grupo control, con las mismas condiciones estándar pero con modificaciones en la bebida, los cuales estuvieron consumiendo durante 6 semanas dependiendo del grupo en el que se encontraban.

#### **Suplementación con edulcorantes**

Se prepararon 100 mL de cada una de las bebidas en agua purificada, a una concentración del 10% para la sacarosa y en su proporción comercial para glucósidos de esteviol (Svetia®) (1 g de presentación comercial conteniendo 0.025 g de glucósidos de esteviol); así como sucralosa (Splenda®) (1 g de presentación comercial conteniendo 0.012 g de sucralosa).

El consumo de bebidas y alimento se registró a diario a la misma hora y bajo las mismas condiciones, así como el peso corporal del ratón, el cual se determinó una vez a la semana.

### **Evaluación de memoria espacial mediante laberinto de Morris**

A las cinco semanas de la suplementación con edulcorantes, se realizó la evaluación de memoria espacial a cada ratón hembra y macho de cada grupo formado, usando el protocolo del laberinto de agua de Morris (anexo 1). Los primeros cinco días de prueba se consideran el periodo de entrenamiento y el sexto día fue para la evaluación de la memoria espacial.

### **Disección de Tejido cerebral.**

Al término del periodo de evaluación de la memoria espacial, cada ratón fue sacrificado con 40 mg/Kg de peso de pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL) por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó la disección del tejido cerebral y se almacenó a -70°C para su uso posterior.

### **Análisis de expresión de proteínas por el método de Western blot.**

El tejido cerebral fue disgregado en 100-500 µL de buffer de lisis, disgregándolo entre dos portaobjetos de vidrio previamente limpiados con etanol. Posteriormente, el tejido se recolectó en tubos de 1.5 mL y se colocó en hielo por 45 minutos, agitando con vórtex cada 15 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a 4°C y 13,000 rpm por 20 minutos (anexo 2), para obtener el botón celular, el cual se eliminó, mientras que las proteínas contenidas en el sobrenadante se dosificaron o almacenaron a -20° C hasta su posterior uso.

Para dosificar las proteínas se utilizó una placa de 96 pozos, en la que se colocaron estándares de albumina a concentraciones de 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL, 1.0 mg/mL y 1.2 mg/mL, empleando 5 µL/pozo de cada uno, por duplicado. Para las proteínas se colocó 1 µL/pozo de cada una, por duplicado. Se preparó una dilución 1:5 de reactivo de Bradford (BIORAD) con agua destilada, para colocar 200 µL de este reactivo a cada pozo de muestra. La lectura se realizó con un lector de microplacas con absorbancia a 595 nm. Con los datos obtenidos, se calculó la concentración de proteínas mediante una hoja de cálculo Excel y se prepararon las muestras a una concentración de 1-2 µg/µL agregando SLB (*Sample Loading Buffer 1X*) (anexo

2)), como amortiguador para la muestra. Se calentaron las muestras durante 5 minutos a 95°C y se incubaron 5 minutos en hielo, antes de ser utilizadas, o bien se almacenaron a – 20°C.

Se preparó el gel de corrimiento al 10 % y el gel de apilamiento al 4% (anexo 3) para el análisis de la expresión de IGF-I e IGF-II. Una vez polimerizado el gel de apilamiento, se cargaron 100 µg de proteína obtenida. El corrimiento inicial de las proteínas fue a 80 V, hasta que las muestras se alinearon y llegaron a la transición con el gel de corrimiento. A partir de ahí, se incrementó el voltaje a 100 V, monitorizando el corrimiento de las proteínas durante ~3-4 hrs.

Una vez que terminó la electroforesis (anexo 4), las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de PVDF previamente hidratada con metanol absoluto. Para ello, se colocó el gel junto con la membrana PVDF, en contacto estrecho, ensambladas entre capas de papel filtro y esponjas humedecidas con buffer de transferencia, en un “cassette”. El mismo fue colocado en la cámara de electrotransferencia, llena con solución amortiguadora pre-enfriada, durante 20 horas a 50 mA, para que las proteínas fueran conducidas desde el gel hacia la membrana.

El bloqueo de la membrana se realizó con leche baja en grasa al 5% durante ~1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar el bloqueo, se enjuagó la membrana con solución TBS-Tween 20, 3 veces por 5 minutos cada uno (anexo 5). Después del bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario (IGF-II o IGF-IIR) durante toda la noche, en agitación suave a 4°C. Al día siguiente, se lavó la membrana con TBS-T (*tris buffered saline and tween 20*), 3 veces por 5 minutos cada lavado, para eliminar el excedente del anticuerpo. Posteriormente, al eliminar el anticuerpo primario, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 hora 30 minutos, a temperatura ambiente, en agitación suave. Al término del tiempo, se enjuagó nuevamente la membrana con TBS-T, 3 veces por 5 minutos, para eliminar el anticuerpo que no se unió.

Para detectar las bandas de IGF-I e IGF-II se utilizó un método colorimétrico mediante el revelado con diaminobenzidina (Sigma – Aldrich) y peróxido de hidrogeno (Fermont), utilizando 150 µL y 30 µL, respectivamente, en 10 mL de PBS (*phosphate buffered saline*), en el cual la membrana se incubó con agitación suave durante ~15 minutos, hasta la aparición de las bandas de proteína teñidas con los anticuerpos. El análisis de las membranas obtenidas mediante western blot, se realizó con el programa ImageJ y los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA, con el programa GraphPad Prism versión 5.01.

#### **6.4 Criterios de inclusión**

- Ratones hembras y machos de la cepa BALB/c de 8 semanas de edad.
- Que consumieron agua o el edulcorante asignado durante 6 semanas.
- Ratones que pesaron más de 20 g.

#### **6.5 Criterios de exclusión**

- Ratones fuera del rango de edad.
- Ratones enfermos o con alteraciones fisiológicas evidentes antes del principio del estudio.
- Ratones que pesaron menos de 20 g.

#### **Criterios eliminación**

- Ratones que enfermaron o murieron durante el desarrollo del proyecto.

#### **6.6. Instrumentos**

- Laberinto de agua de Morris
- Equipo para western blot:
  - o Centrifuga
  - o Lector de microplacas
  - o Equipo de electroforesis
  - o Equipo de electrotransferencia
  - o Agitador
  - o Congeladores de -20 y -70°C

#### **6.7 Recolección de datos**

- Hojas de registro para evaluar tiempo que tardaban los ratones en llegar a la plataforma del laberinto de agua así como el registro del número de cruces por la misma área.
- Toma de fotografía para los resultados de western blot
- Programas de cómputo para el análisis de las fotografías de los resultados por western blot.

## **6.8 Análisis de datos**

Debido a que los datos obtenidos en el laberinto de agua de Morris no son paramétricos, se utilizó la prueba estadística de Kruskal – Wallis, con análisis de Dunn como post–hoc, como prueba de comparación múltiple, mediante el programa GraphPad Prims 5 para el análisis de datos. El análisis de las membranas obtenidas mediante western blot se realizó por densitometría con el programa ImageJ y los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA con el programa GraphPad Prism versión 5.01, para determinar las diferencias en la expresión de los IGFs.

## **6.9 Aspecto ético**

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, siguiendo las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio con base a la NOM-062-ZOO-1999, así como la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina.

## **7. Resultados**

### **7.1 Capítulo de libro aceptado**

#### **7.1.1 Cambios en la expresión de factores de crecimiento similares a insulina en el sistema nervioso murino relacionados al consumo frecuente de edulcorantes**

##### **7.1.2 Página frontal del capítulo de libro**

#### **Cambios en la expresión de factores de crecimiento similares a insulina en el sistema nervioso murino relacionados al consumo frecuente de edulcorantes**

**M. en C. S. Esmeralda Morales-González** - Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. – ID ORCID: 0000-0003-3407-4334 – Alumna.

**Irazú Contreras García, PhD** - Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. - ID ORCID: 0000-0002-8632-1782

**D. en C. Vladimir Paredes Cervantes** - Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México, México. - ID ORCID: 0000-0002-5327-1643

**José Antonio Estrada Guadarrama, PhD** - Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. ID ORCID: 0000-0002-9568-3224.

### 7.1.3 Carta de aceptación



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Enfermería y Obstetricia

La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias de  
la Salud a través de la Coordinación de Estudios  
Avanzados de la Facultad de Enfermería y Obstetricia

Otorga la presente:

## CARTA DE ACEPTACIÓN

**A: Mtra. Esmeralda Morales González**

Por haber realizado el Capítulo de Libro *"Cambios en la expresión de factores de crecimiento similares a insulina en el sistema nervioso murino relacionados al consumo frecuente de edulcorantes"* el cual se insertará en la edición del libro "Temas Selectos en Biomedicina en Ciencias de la Salud Vol. II".

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2018, Año del 190 Aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

  
  
DRA. EN C.S. PATRICIA CRUZ BELLO  
COORDINADORA DE ESTUDIOS AVANZADOS  
FACULTAD DE ENFERMERÍA  
Y OBSTETRICIA  
DOCTORADO EN CIENCIAS  
DE LA SALUD

Facultad de Enfermería UAEM,  
Paseo Tollocan s/n esq. Jesús Carranza col.  
Moderna de la Cruz. C.P. 50180.  
Toluca, Estado de México  
Tel. (722) 2706270 / 2702357  
[feyo@uaemex.mx](mailto:feyo@uaemex.mx)



#### 7.1.4 Resumen

##### Resumen

El consumo de edulcorantes no nutritivos como sustitutos de azúcar es cada vez mayor en la población a nivel mundial, debido a la necesidad de prevenir o tratar patologías crónicas relacionadas con alteraciones del metabolismo energético, como la diabetes mellitus tipo 2 y la obesidad, entre otras. Sin embargo, los beneficios del consumo de estos suplementos alimenticios han sido cuestionados, ya que se les ha relacionado con cambios metabólicos a nivel sistémico y en el sistema nervioso central. Entre las señales que regulan el metabolismo energético a nivel central se encuentran los factores de crecimiento similares a insulina, IGF-I e IGF-II, por lo que el objetivo de este estudio fue identificar la existencia de cambios en la expresión de estas moléculas en el sistema nervioso central de ratones adultos suplementados con los edulcorantes comerciales sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol, diariamente, durante 6 semanas. Los resultados obtenidos muestran que la suplementación con sucralosa disminuye la expresión de IGF-I y II, mientras que la suplementación con glucósidos de esteviol incrementa de forma no significativa la expresión de ambas moléculas, en el cerebro de los animales experimentales. Estos datos sugieren que el consumo frecuente de edulcorantes comerciales modifica la expresión de IGFs en el sistema nervioso central *in vivo*, lo que puede tener efectos relevantes sobre el metabolismo energético sistémico.

### **7.1.5. Apartados del capítulo de libro**

#### **Introducción**

La glucosa es un edulcorante con alto contenido energético, considerado como la principal fuente de energía en la dieta humana<sup>1</sup>, sin embargo, su consumo excesivo se ha relacionado con alteraciones celulares de diversos tipos, incluyendo cambios en el funcionamiento de las células neuronales<sup>2,3</sup>. El funcionamiento adecuado del sistema nervioso depende de un suministro adecuado de glucosa, por lo que condiciones como la hipoglucemia o hiperglucemia pueden ser deletéreos en el cerebro, ocasionando cambios en la producción de neurotransmisores y factores neurotróficos, alterando el funcionamiento de estructuras cerebrales implicadas en la regulación del metabolismo sistémico<sup>4,5</sup>.

Debido a esto, los edulcorantes no nutritivos (bajos en calorías), compuestos con sabor cientos de veces más dulce que la sacarosa y caracterizados por un bajo aporte energético, entre los que se incluyen compuestos artificiales y naturales como la sucralosa y los glucósidos de esteviol, se emplean comúnmente como alternativa para la prevención y tratamiento de patologías relacionadas con alteraciones en el metabolismo energético, como la obesidad o la diabetes mellitus, así como por la población en general, como alternativa para el control del peso corporal<sup>6,7</sup>. El consumo de edulcorantes, tanto nutritivos como no nutritivos, genera señales que son captadas en la periferia y transmitidas al sistema nervioso central (SNC), activando regiones cerebrales involucradas en la regulación del consumo de alimentos<sup>8,9</sup>. La activación de señales periféricas y centrales regula la liberación de hormonas, factores neurotróficos y neurotransmisores, que intervienen en la regulación del apetito, la percepción de la intensidad y calidad del sabor dulce y los aspectos hedónicos del consumo del alimento<sup>10</sup>.

Se ha observado que cuando los niveles de glucosa varían de manera crónica, como sucede en condiciones de hiperglucemia o hipoglucemia prolongadas, pueden alterar el tejido cerebral, afectando la producción de factores de crecimiento como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que es uno de los sustratos esenciales para mantener el adecuado funcionamiento de las neuronas<sup>11</sup>. Dado que la producción de factores de crecimiento puede relacionarse con modificaciones dietéticas que afectan la disponibilidad de energía en el tejido nervioso, existe la posibilidad de que el uso de edulcorantes bajos en calorías pueda tener algún efecto en el metabolismo energético a nivel sistémico y en el tejido cerebral, modificando la expresión y

función de otras moléculas relevantes para el metabolismo neuronal, como los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs).

El sistema de IGFs corresponde principalmente a dos moléculas, IGF-I e IGF-II, dos receptores, IGF-IR e IGF-IIR y diversas proteínas de unión<sup>12</sup>, los cuales, junto con la insulina y su respectivo receptor, contribuyen en la regulación del metabolismo y crecimiento celular con base en la disponibilidad de nutrimentos en el organismo<sup>13,14</sup>. En el SNC, los IGFs actúan sobre células neuronales en regiones específicas, como el hipocampo, meninges y plexos coroideos<sup>15,16</sup>, donde favorecen la supervivencia, diferenciación y proliferación celular, además de regular la homeostasis y funcionamiento de las sinapsis neuronales<sup>17,18</sup>. Se ha demostrado que la deficiencia de nutrimentos derivada de modificaciones en la dieta puede alterar la expresión de factores de crecimiento a nivel sistémico<sup>19,20</sup>, por lo que el consumo frecuente edulcorantes bajos en calorías podría influir tanto en la expresión como en la función de los IGFs a nivel central. El objetivo de este proyecto fue determinar si existen alteraciones en la expresión de IGFs en el tejido cerebral de ratones, relacionados con el consumo frecuente de los edulcorantes comerciales glucósidos de esteviol y sucralosa, que pudieran estar relacionadas con cambios en los mecanismos de hambre y saciedad en el organismo.

## **Metodología**

Los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Neuroquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México, siguiendo las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio con base a la NOM-062-ZOO-1999 adicionalmente se contó la aprobación del Comité de Ética en Investigación de la misma institución.

### *Animales y grupos experimentales*

Se criaron ratones macho de la cepa BALB/c bajo condiciones estándar (ciclo de luz – oscuridad de 12:12 h; temperatura promedio de 22 °C), alimentados con dieta completa en cuanto al contenido de nutrientes para ratón (*5015 Mouse Diet – Lab Diet*, México) y acceso a agua purificada *ad libitum*. A las ocho semanas de vida, se formaron cuatro grupos de 8 ratones cada uno, los cuales continuaron con la misma dieta, pero con las siguientes modificaciones en sus bebidas: el grupo control consumió agua purificada; el grupo sacarosa consumió agua suplementada con sacarosa (solución al 10% en agua purificada); el tercer grupo consumió agua suplementada con sucralosa,

1g de presentación comercial diluido en 100 mL de agua (1 g de presentación comercial contiene 0.012 g de sucralosa) y el cuarto grupo consumió agua suplementada con glucósidos de esteviol, 1g de presentación comercial diluida en 100 mL de agua (1 g de presentación comercial contiene 0.025 g de glucósidos de esteviol), durante seis semanas. Durante este periodo, la preparación de las diferentes bebidas, así como el registro del consumo de cada grupo, se realizó diariamente, a la misma hora desde el inicio hasta el fin del tratamiento.

#### *Disección de tejido cerebral*

Al término del periodo de suplementación, los ratones fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con 40 mg/kg de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó una perfusión transcardiaca con 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría y se procedió a realizar la disección del tejido cerebral.

#### *Obtención y cuantificación de proteínas totales del tejido cerebral*

El tejido cerebral fue disgregado en 1000  $\mu$ L de buffer de lisis (IGEPAL – Sigma Aldrich I3021), complementado con 20  $\mu$ l de inhibidores de proteasas y fosfatasas IP50X (coctel inhibidor de proteasas Sigma–Aldrich P8340), 100  $\mu$ l de fluoruro de sodio (Productos Químicos Monterrey 34902)), 20  $\mu$ l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM (Sigma – Aldrich P7626-16) y 20  $\mu$ l de ortovanadato de sodio 2 mM (Sigma – Aldrich S6508). El contenido se recolectó en tubos de 1.5 mL, que se mantuvieron en hielo durante 45 minutos con agitación cada 15 minutos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 13,000  $\times$ g a 4 °C durante 20 minutos. Finalmente, se obtuvieron las proteínas del sobrenadante, las cuales fueron cuantificadas con el método de Bradford (*Quick Start Bradford Protein Assay* de BIO-RAD), midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro (Labsystems ORIGINAL Multiskan). La concentración final se ajustó a 400 mg de proteína en 100 mL (4:1).

#### *Análisis de expresión de proteínas por Western Blot*

Se preparó un gel de corrimiento de poliacrilamida al 15% para los IGFs y 7.5% para el receptor. Se cargaron 60  $\mu$ g de proteína obtenida de los diferentes grupos experimentales y se realizó el corrimiento a 100 V durante 90 – 120 minutos en una cámara de electroforesis vertical (BIO – RAD Mini-PROTEAN® Tetra System). Terminada la electroforesis, las proteínas fueron

transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) prehidratada con metanol absoluto en una cámara de electrotransferencia húmeda (Cleaver scientific Ltd.). Al término de la transferencia, la membrana fue lavada con solución TBS-tween 20 (1:1000) y bloqueada con leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente, para proceder a la detección de las proteínas de interés. Para detectar los IGFs y el receptor de IGF-I, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Para IGF-I se utilizó anticuerpo policlonal de conejo anti-IGF-I (abcam ab9572) a una dilución de 1:1000; para IGF-II se empleó anticuerpo policlonal de conejo anti-IGF-II (abcam ab9574) a una dilución de 1:1000; para IGF-IR se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-IGF-IR (abcam ab39675) a una dilución de 1:2000. Los anticuerpos primarios se dejaron en agitación durante toda la noche a 4 °C. Al finalizar el lavado se agregó el anticuerpo secundario anti conejo conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti – rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase*, Thermo Scientific 31460) a una dilución de 1:2000 durante 90 minutos a temperatura ambiente. Como control de carga, se determinó la expresión de actina en las muestras, empleando anticuerpo para ratón monoclonal anti- $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich A5316) a una dilución de 1:500 y como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo de cabra-anti IgG de ratón (abcam ab9165) a una dilución de 1:2000, a temperatura ambiente, en agitación, en un tiempo de 90 minutos. Finalmente, se procedió al revelado con diaminobencidina (Sigma-Aldrich D5637) y peróxido de hidrógeno en PBS durante 15 – 30 minutos hasta detectar las bandas de interés.

### **Análisis Estadístico**

Para determinar la significancia estadística en la expresión de las proteínas de interés, las bandas obtenidas por *western-blot* fueron analizadas por densitometría (unidades arbitrarias) con el programa ImageJ y posteriormente analizadas por ANOVA, utilizando la prueba de Tuckey post-hoc para obtener la significancia entre grupos, considerando  $p < 0.05$  como significativa. Las pruebas se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 5.0.

## Resultados

### *Expresión de IGFs en el cerebro de ratones suplementados con edulcorantes*

Para determinar cambios en la expresión de IGF-I y II en el cerebro de los animales experimentales, empleamos el análisis de western-blot en extractos de proteínas totales obtenidas del cerebro de los animales de cada grupo de estudio.

En relación a la expresión de IGF-I, nuestros resultados muestran un incremento no significativo en la expresión de esta proteína en los grupos suplementados con sacarosa ( $35.51 \pm 17.11$ , unidades arbitrarias) y glucósidos de esteviol ( $24.91 \pm 11.38$ ), en contraste con una disminución en animales suplementados con sucralosa ( $5.35 \pm 1.63$ ), comparados con el grupo control ( $15.54 \pm 8.37$ ) (Figura 1A). El análisis estadístico muestra una diferencia significativa en la expresión de esta proteína entre los grupos sacarosa y sucralosa, siendo menor en este último ( $p < 0.05$ ) (Figs. 1A, B).

En contraste, el análisis de la expresión de IGF-II muestra una disminución en la expresión de esta proteína en los grupos suplementados con sacarosa ( $24.68 \pm 3.57$ ) y sucralosa ( $13.85 \pm 3.48$ ), en comparación con los grupos control ( $31.48 \pm 8.23$ ) y glucósidos de esteviol ( $30.00 \pm 6.61$ ), siendo significativa la disminución en la expresión de IGF-II en el grupo sucralosa en comparación con los demás grupos ( $p < 0.05$ ) (Figs. 1A, B). Estos resultados sugieren que la suplementación con edulcorantes nutritivos y no nutritivos modifica la expresión de IGFs en el cerebro de ratones macho, con la sucralosa disminuyendo la expresión tanto de IGF-I como de IGF-II, en comparación con otros grupos experimentales.

### *Expresión de IGF-IR en el cerebro de ratones suplementados con edulcorantes*

En relación a la expresión de los receptores para IGFs, nuestros resultados muestran un incremento significativo en la expresión de IGF-IR en los grupos suplementados con sacarosa ( $30.26 \pm 1.83$ ) o sucralosa ( $30.08 \pm 1.45$ ), comparados con los grupos control ( $21.15 \pm 3.92$ ) y glucósidos de esteviol ( $18.51 \pm 3.16$ ) ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1B). La expresión del receptor IGF-IIR no pudo ser detectada con el anticuerpo disponible, por lo que no fue considerada en el estudio. Estos resultados sugieren un control complejo de la expresión de IGF-IR en respuesta a los edulcorantes, ya que se observa un incremento en la expresión de esta molécula tanto en el grupo suplementado con sacarosa como en el suplementado con sucralosa, que tuvieron resultados contrarios en el análisis de expresión de IGFs.

## Discusión

Actualmente se está optando cada vez más por el consumo de edulcorantes no nutritivos, entre los que se encuentran los glucósidos de esteviol y la sucralosa. No obstante su empleo generalizado, el efecto benéfico en la salud de estos aditamentos no ha sido concluyente, además de que se sabe poco sobre su efecto en el SNC<sup>21,22</sup>, debido a que la glucosa es la fuente principal de energía para el cerebro<sup>23</sup>.

La relevancia de los IGFs en el SNC radica en la demostración de su importancia en la funcionalidad neuronal durante procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, regulando la neurogénesis y gliogénesis en áreas del hipocampo, además del bulbo olfatorio y el cerebelo<sup>14,24</sup>; sin embargo, estos procesos dependen tanto de la producción adecuada de estas moléculas como de la expresión de sus receptores específicos (IGF-IR e IGF-IIR). Al activarse, estos receptores desencadenan cascadas de señalización que convergen con vías como el de la proteína cinasa de serina/treonina mTOR, para regular procesos tanto anabólicos como catabólicos, con el fin de mantener la homeostasis celular, favoreciendo el crecimiento y proliferación neuronal<sup>25-27</sup>.

En algunos estudios se ha observado que las modificaciones dietéticas, como el consumo excesivo de grasas o de carbohidratos, pueden modificar la expresión de IGF-I, así como de proteínas de unión a IGFs como IGFBP-1 e IGFBP-3, a nivel sistémico, alterando la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina<sup>28-30</sup>. De hecho, nuestros resultados demuestran que existen diferencias en la expresión de los IGFs en el tejido cerebral de los ratones suplementados con diferentes edulcorantes. La suplementación con sacarosa y glucósidos de esteviol incrementa de manera no significativa la expresión de IGF-I, mientras que la suplementación con sucralosa parece disminuir la expresión de esta molécula, en comparación con los animales no suplementados. Un incremento en la expresión de IGF-I puede promover procesos anabólicos, la translocación y biosíntesis de lípidos y el almacenamiento de nutrientes<sup>31</sup>, así como tener un efecto neuroprotector al promover la neurogénesis, diferenciación así como la agregación celular e inhibir la apoptosis, favoreciendo la plasticidad cerebral al aumentar la señalización de las cascadas como la proteína cinasa B (Akt) así como de la cinasa reguladora de la señal extracelular (ERK)<sup>32,33</sup>.

Algunos de los cambios detectados en los animales en nuestro modelo experimental son las modificaciones en el peso; es decir, los ratones suplementados con sacarosa tienden a ganar peso en comparación con los demás grupos experimentales. De forma similar, los grupos suplementados con glucósidos de esteviol tienden a aumentar de peso durante el periodo de estudio (datos no

mostrados). En ambos casos, esto podría dar soporte a los cambios en el metabolismo energético esperados en relación al incremento en la expresión de IGF-I observada en este estudio en el cerebro de los animales suplementados con edulcorantes. En contraste, los animales suplementados con sucralosa no muestran cambios importantes en el peso en comparación con el grupo control, lo que correspondería a la expresión disminuida de IGF-I en el cerebro de los mismos reportada en este estudio.

En relación a la expresión de IGF-II, nuestros resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de esta molécula en el grupo suplementado con sucralosa, mientras que la expresión normal se mantuvo en el grupo de glucósidos de esteviol, en comparación con los ratones sin suplementación. Estudios recientes han reportado su participación en procesos cognitivos relacionados con el aprendizaje y memoria<sup>34</sup>, así como efectos neuroprotectores contra lesiones citotóxicas neurodegenerativas<sup>35</sup> y su contribución en mecanismos de neuroprotección, actuando como antioxidante, reduciendo alteraciones que inducen neurodegeneración *in vitro*<sup>36</sup>, e incluso se han observado las modificaciones de su expresión *in vitro* en condiciones de deficiencia de hierro<sup>19,37</sup>, por lo que es evidente que las modificaciones en la dieta afectan directamente su expresión. Debido a que en nuestro estudio no se observan cambios importantes en el peso de los animales suplementados con sucralosa en comparación con el grupo control, sería necesario explorar con mucha mayor profundidad los posibles efectos metabólicos de los cambios en la expresión de IGFs observados en este grupo experimental.

Aunque el funcionamiento adecuado de los IGFs depende de su interacción con los receptores adecuados, en nuestro estudio encontramos que la expresión de IGF-IR no sigue un patrón predecible, dado que se observa un incremento en la expresión de este receptor en los grupos suplementados tanto con sacarosa como con sucralosa, en los que se observan, respectivamente, un incremento y una disminución en la expresión de IGF-I en relación al grupo control. Con respecto al incremento en la expresión de IGF-IR en el grupo sucralosa, el resultado podría ser esperado como mecanismo de compensación ante la expresión disminuida de IGF-I en el cerebro de los ratones suplementados con este edulcorante, debido a que al disminuir la expresión del ligando, la expresión del receptor puede incrementarse para compensar la falta de señal de activación. De esta manera, se mantendría la señalización dependiente de IGF-I ante una disminución en su expresión, continuando con el funcionamiento celular normal.

No obstante, esta explicación no satisface la observación de un incremento en la expresión tanto de IGF-IR como de IGF-I en los animales suplementados con sacarosa, ya que en este caso lo que se esperaría sería una disminución en la expresión del receptor, para compensar el incremento en la señal derivada del ligando correspondiente. Más aún, debe tomarse en cuenta que el receptor IGF-IR es capaz de enlazarse con IGF-II además de IGF-I, por lo que es posible que no se observe el mismo mecanismo compensatorio en la expresión del receptor en el grupo suplementado con sacarosa debido a que la expresión de ambos IGFs se mantiene en relación al grupo control, mientras que en el grupo suplementado con sucralosa la expresión de ambos IGFs se encuentra disminuida, por lo que se esperaría que el efecto compensatorio en la expresión del receptor fuera más evidente en ese grupo, tal como observamos.

Asimismo, es necesario recordar que en este estudio no pudo detectarse la expresión del receptor IGF-IIR debido a la mala calidad del anticuerpo empleado, por lo que es necesario igualmente establecer la presencia de cambios en los patrones de expresión de este receptor en respuesta a la suplementación con edulcorantes para poder establecer una imagen más clara de la regulación de este sistema en las condiciones experimentales usadas en este estudio. En algunos estudios se sugiere utilizar inhibidores de receptores de IGF-I e IGF-II<sup>36</sup>, para obtener una respuesta más fidedigna; sin embargo, esto tampoco se realizó en este proyecto.

## **Conclusión**

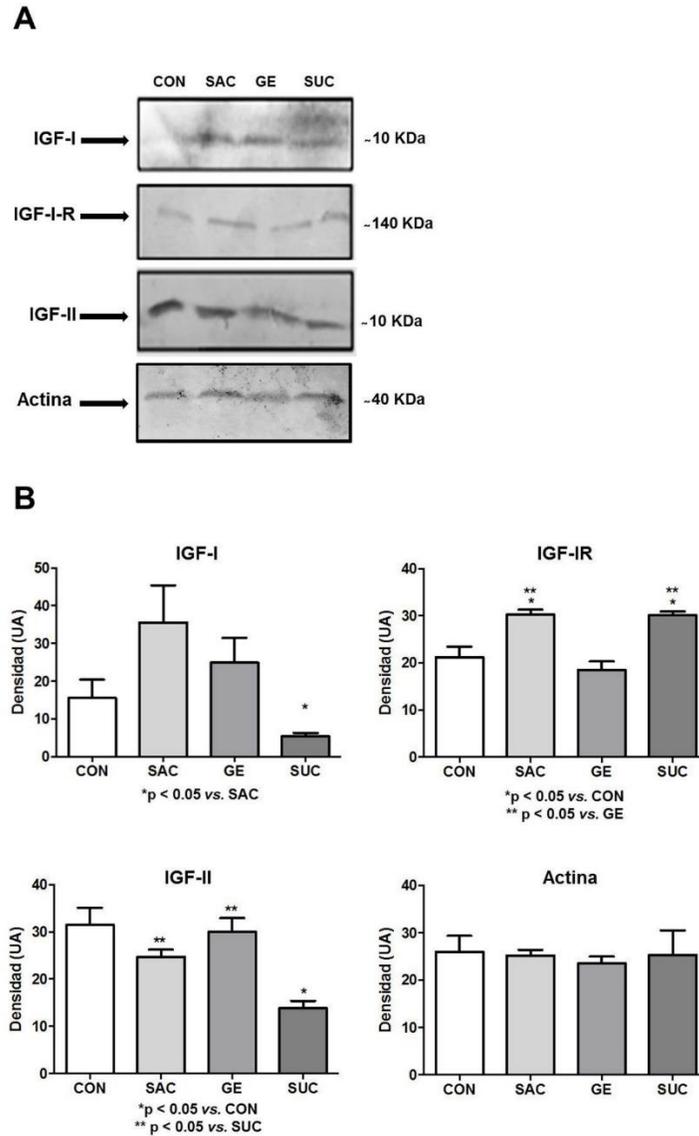
Algunos consideran que los edulcorantes no nutritivos pueden actuar como sustancias inertes, quizás por su baja absorción por lo que no alteran el metabolismo de manera significativa. Sin embargo, también se sabe que la modificación de la disponibilidad de glucosa dentro del organismo, derivada del uso frecuente de estos compuestos, puede tener diversos efectos inesperados, como la modificación de las características de la microbiota intestinal, reportada recientemente, que afectan finalmente al metabolismo energético y la función del organismo. Por lo que nuestros resultados muestran que la suplementación frecuente con edulcorantes, tanto nutritivos como no nutritivos, afecta la expresión de los factores de crecimiento similares a insulina en el cerebro de ratones macho, lo cual sugiere que el uso de estos compuestos puede tener efectos en las poblaciones neuronales, afectando la regulación de la homeostasis sistémica del organismo, por lo que es necesario explorar más a fondo los efectos de los edulcorantes in vivo, con miras a determinar adecuadamente sus posibles beneficios o daños a la salud humana.

## Referencias:

1. Zamora Navarro S, Pérez Llamas F. Importance of sucrose in cognitive functions: knowledge and behavior. *Nutr Hosp*. 2013 Jul 1;28 Suppl 4:106–11.
2. Cukierman-Yaffee T. The relationship between dysglycemia and cognitive dysfunction. *Curr Opin Investig Drugs*. 2009 Jan 4;10(1):70–4.
3. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, et al. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008 Jan 2;18(11):1085–8.
4. Wuarin L, Namdev R, Burns JG, Fei ZJ, Ishii DN. Brain insulin-like growth factor-II mRNA content is reduced in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Neurochem*. 1996 Aug 4;67(2):742–51.
5. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1994 Jul 37(7):643–50.
6. Sylvetsky A, Rother K, Brown R. Artificial Sweetener Use Among Children: Epidemiology, Recommendations, Metabolic Outcomes, and Future Directions. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Dec 58(6):1467-80.
7. Wood S, John B, Hawkins D. The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the dog. *Food Chem Toxicol*. 2000 38 Suppl 2:S99–106.
8. Gutierrez R, Carmena JM, Nicolelis MA, Simon SA. Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol*. 2006 Jan;95(1):119–33.
9. Verhagen JV, Giza BK, Scott TR. Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in rats. *J Neurophysiol*. 2003 Jan 3;89(1):265–75.
10. Fulton S. Appetite and reward. *Front Neuroendocrinol*. 2010 Jan 5;31(1):85–103.
11. Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*. 2004 Jul;25(2):77–107.
12. Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003 Nov;69(4):257–71.
13. Mainardi M, Fusco S, Grassi C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plast*. 2015 Jan 4;2015:1-10.

14. Liu J, Spéder P, Brand AH. Control of brain development and homeostasis by local and systemic insulin signalling. *Diabetes Obes Metab*. 2014 Sep;16 Suppl 1:16–20.
15. Werner H, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014 Dec; 24(12): 1947-53.
16. D’Ercole J, Ye P, Calikoglu A, Gutierrez-Ospina G. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol Neurobiol*. 1996 Dec;13(3):227–55.
17. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jan;2(1):24-32.
18. Lu B, Chow A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J Neurosci Res*. 1999 Oct 1;58(1):76–87.
19. Morales González E, Contreras I, Estrada JA. Effect of iron deficiency on the expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in neuronal and glial cells. *Neurologia*. 2014 Sep ;29(7):408–15.
20. Salazar-Ortiz J, Monget P, Guillaume D. The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid and plasma from adult female horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Jul 31;12:72.
21. Duffey KJ, Gordon-Larsen P, Steffen LM, Jacobs DR, Popkin BM. Drinking caloric beverages increases the risk of adverse cardiometabolic outcomes in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*. 2010 Oct;92(4):954–9.
22. Bremer AA, Auinger P, Byrd RS. Relationship between insulin resistance-associated metabolic parameters and anthropometric measurements with sugar-sweetened beverage intake and physical activity levels in US adolescents: findings from the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009 Apr 3;163(4):328–35.
23. Fillenz M. Glucose Metabolism During Neural Activation. *Advances in Neurobiology* 2012 Jan;Vol 4. Springer, Boston MA:675–97.
24. Anderson MF, Aberg MA, Nilsson M, Eriksson PS. Insulin-like growth factor-I and neurogenesis in the adult mammalian brain. *Dev Brain Res*. 2002 Mar;134(1-2):115–22.
25. Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature*. 2015 Jan;517(7534):302–10.
26. Kim SG, Buel GR, Blenis J. Nutrient regulation of the mTOR Complex 1 signaling pathway. *Mol Cells*. 2013 Junn;35(6)463–73.

27. Ochocki JD, Simon MC. Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J Cell Biol.* 2013 Oct;203(1):23–33.
28. Boucher J, Mori MA, Lee KY, Smyth G, Liew CW, Macotela Y, et al. Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun.* 2012 Jun;3:902.
29. Melnik BC, John SM, Schmitz G. Over-stimulation of insulin/IGF-1 signaling by western diet may promote diseases of civilization: lessons learnt from laron syndrome. *Nutr Metab (Lond).* 2011 Jun;8:41.
30. Sandhu MS, Heald AH, Gibson JM, Cruickshank JK, Dunger DB, Wareham NJ. Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and development of glucose intolerance: a prospective observational study. *Lancet.* 2002 May;359(9319):1740–5.
31. Aberg MA, Aberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci.* 2000 Apr;20(8):2896–903.
32. Sohrabji F. Estrogen-IGF-1 interactions in neuroprotection: ischemic stroke as a case study. *Front Neuroendocrinol.* 2015 Jan;36:1–14.
33. Quesada A, Lee BY, Micevych PE. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol.* 2008 Apr 2;68(5):632–44.
34. Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, et al. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature.* 2011 Jan ;469(7331):491–7.
35. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL. Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical-mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *Exp Neurol.* 1993 Nov;124(1):89–95.
36. Martin-Montañez E, Pavia J, Santin LJ, Boraldi F, Estivill-Torres G, Aguirre JA, et al. Involvement of IGF-II receptors in the antioxidant and neuroprotective effects of IGF-II on adult cortical neuronal cultures. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jul 2;1842(7):1041–51.
37. Tran PV, Fretham SJ, Wobken J, Miller BS, Georgieff MK. Gestational-neonatal iron deficiency suppresses and iron treatment reactivates IGF signaling in developing rat hippocampus. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Feb;302(3):E316–24.



**Figura 1. Expresión de IGFs en cerebro de ratones BALB/c suplementados con edulcorantes.**

A) Western-blot de proteínas totales extraídas de cerebro de ratones macho BALB/c, para determinar la expresión de las proteínas IGF-I, IGF-IR e IGF-II.  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga.  $n=6$ , un experimento representativo de seis es mostrado. B) Análisis densitométrico (promedio de seis diferentes experimentos) expresado en media de unidades arbitrarias (UA)  $\pm$  E.E. Las diferencias estadísticamente significativas son mostradas en cada gráfica, tomando  $p < 0.05$  como valor significativo.

## 7.2.1 Título del artículo enviado

### **Alterations in spatial learning and memory in sweetener-supplemented mice**

Esmeralda Morales-González<sup>1</sup>, Irazú Contreras<sup>1</sup>, José Antonio Estrada<sup>1</sup>

Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de  
México, Toluca, México

#### *Author note*

This project did not receive financial support from any institution.

Correspondence should be addressed to: José Antonio Estrada. Laboratorio de Neuroquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza s/n Colonia Moderna de la Cruz. C.P. 50180, Toluca, México.  
+52(722) 217-3552 ext. 218. [jaestrada@uaemex.mx](mailto:jaestrada@uaemex.mx)

## 7.2.2 Carta de envío y/o recepción del artículo

9/23/2018 Gmail - Cognitive Neuroscience - Co-Author Account Created in ScholarOne Manuscripts

 Esmeralda Morales <draesmog@gmail.com>

---

**Cognitive Neuroscience - Co-Author Account Created in ScholarOne Manuscripts**  
1 mensaje

---

**Cognitive Neuroscience** <onbehalfof@manuscriptcentral.com> 8 de marzo de 2018, 11:34  
Responder a: pcns-peerreview@journals.tandf.co.uk  
Para: draesmog@gmail.com

08-Mar-2018

Dear Miss Esmeralda Morales-González,

The following manuscript has been submitted to Cognitive Neuroscience by Miss Esmeralda Morales-González

MS Number: CNS-ER 18-23  
Title: 'Alterations in spatial learning and memory related to commercial sweetener intake'  
Authors: Morales-González, Esmeralda; Contreras, Irazú; Estrada, José

Miss Morales-González listed you as a co-author for this manuscript, so the online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, has automatically created a user account for you.

The site URL and your USER ID for your account is as follows:

SITE URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/pcns>  
USER ID: draesmog@gmail.com  
PASSWORD: To set your password please click the link below. Clicking the link will take you directly to the option for setting your permanent password.

[https://mc.manuscriptcentral.com/pcns?URL\\_MASK=6b333ce631584520a61d0ead17ba482f](https://mc.manuscriptcentral.com/pcns?URL_MASK=6b333ce631584520a61d0ead17ba482f)

Please note that your password is case-sensitive.

When logged into the site you will be able to check the status of papers you have authored/co-authored. Please do log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/pcns> to update your account information, and to change your password to one of your choice.

Thank you for your participation.

Sincerely,

Cognitive Neuroscience  
Editorial Office

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ui=52877d0&view=pt&search=all&permthid=thread-F%3A1504387902958095001&siml=msg-F%3A1504387902958095001> 1/1

### 7.2.3 Abstract

Learning and memory are essential cognitive processes for development and survival in response to external stimuli. Nutrition, and glucose availability in particular, is known to play a relevant role in their adequate functioning on memory. Non-nutritive sweeteners are a widely used alternative to substitute sucrose for health reasons, reducing the calorie content in food while maintaining a sweet flavor. Although these compounds are considered safe for human consumption, accumulating evidence indicates possible metabolic alterations related to their habitual intake. The present study sought to determine the effect of non-nutritive sweetener intake on spatial learning and memory *in vivo*, using a murine model of dietary supplementation with sucrose, sucralose or steviol glycosides in the Morris water maze test. Our results revealed that sucrose, sucralose and steviol glycosides had differential sex-dependent effects on spatial learning and memory, with steviol glycosides-supplemented males showing the best performance, followed by sucralose-supplemented females, whereas both steviol glycosides- and sucrose-fed females showed the poorest performance overall. Our data provides further evidence of cognitive alterations derived from dietary modification of glucose availability, using a model of habitual sweetener consumption *in vivo*, and encourages further exploration of the role of non-nutritive sweeteners in metabolic alterations that may be relevant for human health.

**Keywords:** Spatial learning; spatial memory; non-nutritive sweeteners; frequent intake; sucrose; sucralose; steviol glycosides; sex.

#### **7.2.4. Apartados del artículo**

##### **Introduction**

###### *Alterations in spatial learning and memory in sweetener-supplemented mice*

Learning and memory are cognitive processes implicated in the acquisition of knowledge for the survival of an organism in its environment (van der Beek, 2008). There is evidence that brain structures related to these processes, such as the hippocampus and brain cortex, are susceptible to functional alterations related to external factors, including nutritional changes (Dauncey, 2009); this is especially evident in early life, since it is a critical period for neurodevelopment (Dauncey, 1999). Nutritional modifications affecting glucose availability in the brain are relevant for neuronal homeostasis and plasticity, as these processes depend on the proper distribution and availability of nutrients within the central nervous system (CNS) (Mainardi, 2015). Neurons require an adequate supply of glucose to maintain energy production necessary for biosynthesis of neurotransmitters and other signaling molecules; thus, metabolic alterations like hyperglycemia and hyperinsulinemia have been related to cognitive deterioration in different studies (Cukierman-Yaffee, 2009; Darling, 2013), with various forms of dementia being present in up to 40% of diabetic patients, compared with 18% in non-diabetic individuals (Crane, 2013). Furthermore, these conditions are linked with a decrease in hippocampal volume and cognitive impairment (Crichton, 2016; Grabenhenrich, 2014)

Diabetes mellitus and other metabolic diseases, such as obesity and metabolic syndrome, are related in part to consumption of carbohydrate- and fat-rich diets, which disrupt the organism's energy metabolism, leading to development of chronic degenerative conditions (Shankar, 2013). As these pathologies are widespread and considered serious public health issues, there is extensive research into strategies for decreasing their incidence, among which, the use of non-nutritive sweeteners as sucrose substitutes is one of the most commonly used, not only by patients with specific pathologies, but by healthy individuals (Chattopadhyay, 2011). Sweeteners are substances that provide sweet flavor and may be classified on the basis of their caloric content as caloric or non-nutritive (Swithers, 2010). Due to their characteristics, they are used in the food and beverage industry as additives to replace both the taste and energy content provided by common sugar.

Although commercially available sweeteners are considered safe for regular use, recent studies have disputed the beneficial effects of these substances, due to findings of unexpected sweetener-related side effects on the intestinal microbiota, energy metabolism and the immune system (Brown, 2010; Lutsey, 2008; Pepino, 2011). Intake of non-nutritive sweeteners has been associated with a positive energy balance due to alterations in feeding behavior, including increased food intake, as well as body weight gain, accumulation of body fat and decreased caloric compensation (Chen, 2009; Swithers, 2010). These effects may be explained in part by changes in insulin production due to non-nutritive sweetener consumption, sucrose is known to promote cephalic-phase insulin release and to stimulate thyroid activity, whereas sucralose supplementation decreases thyroxine and triiodothyronine concentrations, as well as thyroid peroxidase activity, thus possibly slowing systemic metabolism and favoring weight gain (Palkowska-Goździk, 2016; Glendinning, 2017). Additionally, regular sugar consumption has been related to decreased cognitive performance, particularly in spatial learning and memory tasks, in animal models, as well as diabetic and non-diabetic humans (Kendig, 2014; Ye, 2011). However, despite extensive research on the effects of glucose availability on CNS homeostasis and functions, the effects of habitual non-nutritive sweetener intake on CNS-dependent processes, such as learning and memory, have not been previously determined. The present study aimed to evaluate spatial learning and memory in animals under long-term supplementation with non-nutritive sweeteners, in an effort to determine if their chronic use may affect cognitive process *in vivo*.

## **Methods**

All experiments were performed following national guidelines for animal care in research and were approved by the Ethics in Research Committees from the authors' institutions.

### *Animals and experimental groups*

BALB/c male and female mice were raised under standard conditions (12:12 h light:dark cycle; 22° C temperature), fed with commercially available rodent-specific diet (5001 PMI, Nutrition International L.L.C, USA), complete in nutrient content, and provided with purified water *ad libitum*. At eight weeks of life, animals were separated by sex and randomly assigned to one of four different experimental groups, which continued under the same standard conditions and

rodent diet, but with modified drinking solutions, as follows: control group (female: n=11; male: n=11) with regular purified water; Sucrose group (female: n=11; male: n=10), supplemented with 10% sucrose in purified water; Sucralose group (female: n=12; male: n=12), supplemented with 1 g commercial sucralose (0.012 g) (Splenda® McNeil Nutritionals, LLC) in 100 mL purified water and; Steviol group (female: n=11; male: n=12), supplemented with 1g commercial steviol glycosides (0.025 g) (Svetia® Metco®) In 100 mL purified water. All groups were allowed to drink at will. Supplementation was provided daily for 6 weeks.

#### *Evaluation of spatial learning and memory by Morris water maze*

Analysis of spatial learning and memory in experimental animals was performed with the Morris water maze test. A circular pool (93 cm diameter and 50 cm depth) was placed in a semi-dark room and filled with water (23 – 24 °C temperature) to a depth of 27 cm. The water was made opaque by addition of non-toxic colorant. The pool was divided in four equal-area quadrants and a rectangular, transparent acrylic platform (10 cm x 12 cm) was located, submerged, in a specific quadrant. Two visual cues, a purple rectangle and a yellow circle, were placed in close proximity to the maze, to serve as orientation markers for the animals. The evaluation consisted of a “training period” of five days, during which mice were placed, individually, at four different starting points inside the pool, and allowed to find their way to the hidden platform. Elapsed time, from the beginning of the test at each starting point until arrival at the platform area, was recorded daily. This period represents the learning process. After the 5-day learning period, we performed the evaluation of memory by running a test where the hidden platform was removed from the pool. Every mouse was placed once at each of the previous starting points in the pool and allowed to explore for sixty seconds in search of the platform. The final evaluation day was video recorded. Subsequently, the latency (time spent finding the platform area), number of crosses (times crossing the platform area) and time spent in the quadrant where the platform was previously located, were noted and analyzed.

### *Statistical analysis*

Analysis of the results from both the learning period and memory tests was done by non parametric Kruskal–Wallis and Dunet post–hoc tests, to determine statistical significance between groups, considering p values <0.05 as significant, using GraphPad Prism version 5.0 software.

## **Results**

### *Evaluation of spatial learning in sweetener-supplemented mice.*

We used the Morris Water Maze (MWM) to assess the learning process in our experimental animals. The analysis consisted in determining the amount of time taken by each animal to find a submerged, hidden platform, which was located in a single fixed position at a specific quadrant of the swimming pool, across a five-day learning period. The experiments were assessed individually for each animal, considering male and female mice separately for determination of sex differences within groups, as well as differences among groups.

Among groups (including both male and female mice), our results show that mice from both control (CON) and sucrose (SUG) groups spent close to 30 seconds in average to reach the hidden platform during the 5-day span ( $27.36 \pm 1.64$  s and  $29.67 \pm 1.95$  s average, respectively), with the SUG group taking the longest amount of time to complete the task. In contrast, the sucralose (SUC) and steviol glycosides (SG) groups spent almost 10 seconds less time to reach the platform ( $20.82 \pm 1.38$  s and  $19.80 \pm 1.39$  s), with the SUC groups being significantly faster at day 1 ( $23.38 \pm 3.03$  s,  $p < 0.05$ ) and the SG group being significantly faster at day 5, compared to controls ( $14.54 \pm 3.04$  s,  $p < 0.001$ ) (Table 1, Fig. 1A-B). Slight variations were observed within groups in each training day, with all groups showing the most relevant decrease in time taken to reach the hidden platform on the second day of training. Decreases in time taken to find the platform ranged from 3 s for the SUC group to 11 s for the SG group (Table 1, Fig. 1B). The SG group showed the best performance after 5 days, significantly cutting the time taken to reach the platform by half, from 30.65 s at day 1 to 14.54 s at day 5 ( $p < 0.001$ ) (Table 1, Fig. 1B).

In contrast to the group data, results from sex-grouped animals show that, for female animals, the SUC group had the best results in the learning period, with the fastest time to reach the platform at day 1 ( $19.92 \pm 3.05$  s,  $p < 0.05$ ) and the fastest average time after 5 days ( $18.67 \pm 4.19$  s), while SUG females had the slowest average time throughout ( $37.05 \pm 4.81$  s). There was a

significant difference between SUG and SUC groups ( $p < 0.05$ ) (Table 1, Figs. 1C-E). For males, the CON group showed the worst performance ( $32.23 \pm 5.86$  s), with the SG group once again being significantly better ( $p < 0.001$ ), recording the fastest average time after 5 days ( $16.31 \pm 1.68$  s), while also recording the lowest average time taken to reach the platform among all animals at day 5 of training ( $6.66 \pm 0.99$  s,  $p < 0.001$ ) (Table 1, Figs. 1C-D, F). All animals showed a decrease in average time taken to reach the platform at day 2 of the learning period, regardless of sex and there were significant differences between males and females in both the SUG and SG groups ( $p < 0.05$ ) (Figs. 1B-D).

Taken together, our data suggests that mice supplemented with the non-nutritive sweeteners sucralose or steviol glycosides perform better on average in the training period of the Morris water maze test than animals consuming sucrose or plain purified water; however, differences by sex suggest that female mice decrease their performance at the learning task when supplemented with sucrose, while improving it when supplemented with sucralose, whereas male mice supplemented with steviol glycosides were the best during the learning period.

#### *Evaluation of spatial memory in sweetener-supplemented mice.*

Evaluation of spatial memory in our model consisted in determining the behavior of previously trained animals when the hidden platform was removed from the test. Parameters evaluated included latency (time taken from the moment the animal is placed in the water to its reaching the platform's last known position), number of crosses performed by each animal over the area where the hidden platform was previously placed and finally, the amount of time spent by each animal swimming in the area where the hidden platform was previously located.

Regarding latency, results for group data (male + female) show that the SUC group had the lowest latency, taking the least average time to reach the area where the hidden platform was previously found ( $17.08 \pm 2.63$  s), followed by CON and SG ( $19.55 \pm 3.12$  s and  $19.83 \pm 4.31$  s, respectively), with SUG having the highest latency ( $25.24 \pm 4.71$  s). No statistically significant differences were found among groups (Table 2, Fig. 2A). These results correspond with group data by sex, as comparisons among female mice show the SUC group having the lowest latency ( $16.08 \pm 3.66$  s), followed by CON ( $18.55 \pm 4.32$  s), with SUG and SG having latencies at, or above, 30 s ( $29.55 \pm 6.24$  s and  $35.82 \pm 5.98$  s, respectively). A statistically significant difference was found for the SG group ( $p < 0.05$ ). (Table 2, Fig. 2A). Interestingly,

SG females took even more time to reach the platform area than they did during the training period ( $35.82 \pm 5.98$  s vs.  $23.85 \pm 2.07$  s average, respectively) (Tables 1-2). In contrast, male mice from the SG group had the lowest latency of all animals ( $5.16 \pm 0.88$  s), followed by SUC, SUG and CON ( $18.08 \pm 3.91$  s,  $20.50 \pm 7.17$  s and  $20.55 \pm 4.69$  s, respectively). Latency from SG males was significantly lower than control ( $p < 0.001$ ). Male animals from the SG group performed significantly better in this test than their female counterparts ( $p < 0.001$ ), having the best results overall (Table 2, Fig. 2A).

For the number of crosses over the area of the hidden platform, our results show no significant statistical differences among groups, with CON, SUC and SG groups crossing an average of 5 times over the area ( $5.27 \pm 0.63$ ,  $5.37 \pm 0.66$  and  $5.65 \pm 0.73$ , respectively), and the SUG group showing a non significant tendency to decreased number of crossings ( $4.57 \pm 1.00$  average) (Table 2, Fig. 2B). Results for sex-grouped animals show that males from the SG group had a significantly better performance, crossing over the platform area an average of 8 times in 60 seconds ( $8.00 \pm 0.50$ ,  $p < 0.001$ ), whereas females from the SG and SUG groups had the lowest number of crosses in the same amount of time ( $3.09 \pm 0.94$ ,  $p < 0.05$ , and  $3.27 \pm 0.99$ , respectively). There was a significant difference between males and females from the SG group ( $p < 0.001$ ) (Table 2, Fig. 2B).

Finally, results for time taken by each animal surveying the area where the platform was previously located show no significant differences among groups. Female mice from the SUG and SG groups showed a tendency towards spending the least amount of time swimming over the platform area ( $14.27 \pm 2.25$  s and  $15.82 \pm 3.21$  s, respectively), with the SUC group spending significantly more time on average surveying the area, among all animals ( $23.33 \pm 2.74$  s,  $p < 0.05$  compared to SUG) (Table 2, Fig. 2C). In contrast, male mice from the SG group spent the most time surveying the platform area among all males ( $21.00 \pm 1.18$  s) and SUC males spent the least time ( $16.58 \pm 2.91$  s). No significant differences were found among males (Table 2, Fig. 2C).

Collectively, our results for the memory task appear to correspond with data obtained in the training period, showing that female mice from the SUG and SG groups have decreased performance and female mice from the SUG group showing a tendency toward enhanced performance, decreasing their latency and increasing the number of crosses and survey time over the platform area. Similarly to results from the learning period, male mice from the SG

group had the best global performance among all animals, showing the lowest latency and highest number of crosses, as well as the second most time spent surveying the platform area. Overall, our combined data from the learning and memory tasks suggest that female mice supplemented with sucralose and male mice supplemented with steviol glycosides show enhanced performance in our experimental model, with significant differences observed mainly for male mice supplemented with SG.

## **Discussion**

The consolidation of acquired knowledge in the form of memories requires structural and functional modifications of the nervous tissue in order to make the memory permanently available. Multiple factors intervene in memory consolidation, among which nutrition is especially relevant due to the high metabolic rate of nervous tissue and its dependence on glucose to supply the required energy (Isaacs, 2008). Thus, substituting glucose in the diet for non-nutritive sweeteners, although useful to preserve or enhance the palatability of food while limiting caloric intake, may affect the process of memory formation and consolidation.

Although the effects of non-nutritive sweetener supplementation have been more extensively assessed on systemic metabolism (Anton, 2010; Sylvetsky, 2011), their effects on the central nervous system have not been thoroughly determined. Our goal was to determine the effects of non-nutritive sweetener supplementation on spatial learning and memory in mice. Our analysis of spatial learning in sweetener-supplemented mice using the Morris water maze test, a useful model for research on these aspects of memory (Wenk, 2004), suggests that mice fed with either the non-nutritive sweetener sucralose or steviol glycosides daily, during a 6 week period, perform better overall than mice supplied with sucrose or under a regular diet without supplementation, as non-nutritive sweetener-supplemented mice decreased their average time to reach the platform by approximately 10 seconds, compared to the other groups in a 5 day training span. Interestingly, these differences were mostly derived from the performance of steviol glycosides-supplemented male mice, which improved their time progressively, being the fastest in average among all animals and having the fastest average time at the end of the learning period (6.66 s), whereas females from the sucralose group were the fastest among all females, with an average time of 19.01 s, while sucrose-fed female mice had the slowest average time overall (34.17 s).

A detrimental effect of sucrose supplementation on cognitive functions, particularly those related to spatial learning and memory, has been previously demonstrated in animal models in studies with rats fed sucrose solutions ranging from 10-35%. These studies showed impaired cognitive performance in spatial learning and memory in the Morris water maze and Y maze tests, an effect that lasted several weeks after the end of supplementation in some cases (Kendig, 2014). Furthermore, cognitive impairment derived from habitual sucrose intake has also been observed in humans, and has been suggested to relate to uric acid accumulation and/or increased inflammatory activity in affected individuals (Ye, 2011). Our results seem to corroborate cognitive deficits derived from habitual sucrose intake in female rodents, while non-nutritive sweeteners appear to improve cognitive performance in our model. However, the effect observed in non-nutritive sweetener-supplemented mice may be related to decreased dietary intake of glucose and fructose derived from sucrose, as opposed to an actual effect of the sweetener itself on cognition.

These differences were maintained in the spatial memory stage of the test, where the steviol glycosides group had the best performance overall, with male animals having the lowest overall latency, highest number of crosses over the platform area and spent the second most amount of time surveying the hidden platform area after platform removal, only behind sucralose-fed females, which spent the most time surveying the area overall and had the lowest latency among females. Similarly to the learning period, differences between male and female sweetener-supplemented mice were clearly evident in the memory test, as steviol glycosides-supplemented males were the best performers among all animals, followed by sucralose-supplemented females, while females from the steviol glycosides group performed worse than during the learning period and had the worst performance overall. It is relevant to emphasize the differential effect of steviol glycosides on cognitive performance in female and male mice, as our results suggest that males supplemented with these compounds improved their performance significantly, whereas females had the poorest performance overall. To our knowledge, there are no reports on the possible detrimental effects of steviol glycosides on cognition in either animal models or humans; therefore, these data should be explored further.

Collectively, our data suggest that sweetener supplementation may have a differential effect on learning in male or female mice, which may be derived from differences in their metabolic rates, visuospatial development or area-specific functions in the brain due to hormonal factors. Supporting this notion, previous studies of spatial learning in meadow voles and deer mice have also reported differential performance in male and female animals, with females with high estradiol levels showing poorer performance compared to all other animals (Galea, 1995 and 1996). The correlation of cognitive performance with female hormones such as estradiol and progesterone may be related to their effects on the hippocampus, where they have been shown to modulate synaptic excitability and plasticity through effects on GABAergic (gamma-aminobutyric acid-dependent) signaling by altering the expression of opioid and GABA receptors (Wójtowicz & Mozrzymas, 2010). Estradiol has also been shown to modulate both long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) in the hippocampus, relevant components in the mechanisms of memory formation and retention, by alterations in hippocampal dendritic spine density and up-regulation of N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptors and non-nuclear estrogen receptors ( $ER\alpha$  y  $ER\beta$ ) in neurons (Ogiue-Ikeda, 2008). However, as we did not assess hormonal status on female animals, it is likely that some of the variation observed in our experimental results in female groups may be attributed to differences in hormonal concentrations throughout the estrous cycle, which should be addressed in future studies.

On the other hand, improved performance of non-nutritive sweetener-supplemented mice may be related to decreased energy availability from glucose in the brain, as caloric restriction has been previously shown to decrease circulating glucose and insulin concentrations in plasma and to improve neurogenesis and neuronal survival in the hippocampus through up-regulated expression of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) (Lee, 2002). Although non-nutritive sweeteners are not commonly used to model caloric restriction per se, it is possible they may have a similar effect on the organism if used properly. Further investigation of the role of non-nutritive sweeteners on the production of neurotrophic factors in the brain and the activation of signaling pathways involved in the regulation of appetite and energy balance is ongoing in our laboratory.

Even though the non-nutritive sweeteners sucralose and steviol glycosides are not known to be metabolized within the organism, they are still able to stimulate both gustatory and olfactory

receptors throughout the gastrointestinal tract, which respond to dietary components and deliver signals to diverse brain areas, affecting central functions relating to appetite, feeding behavior and energy balance in the organism. Since memory formation depends not only on energy availability but on the integrated functions of multiple structures in the central nervous system, in particular the hippocampus and its projections through the nucleus accumbens, ventral tegmental area, thalamus, amygdala and entorhinal cortex, it is possible that non-nutritive sweeteners may promote metabolic effects through both direct (in the CNS) and indirect (gastrointestinal) sensory pathways related to taste and olfaction. Indeed, sucralose has already been demonstrated to stimulate primary taste pathways in the human brain in a different manner than sucrose (Frank et al., 2008) and it has also been shown to affect blood glucose and insulin concentrations in humans, probably related to enhanced secretion of intestinal hormones, such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Pepino, 2013; Temizkan, 2015). Therefore, it is also possible to suggest that non-nutritive sweeteners may modify a variety of CNS functions via effects on gustatory and olfactory receptors during consumption. This possibility warrants further investigation.

In conclusion, our results provide further evidence for the effects of sweetener supplementation on cognitive functions and suggest that particular non-nutritive sweeteners may have sex-specific consequences on cognitive processes related to spatial learning and memory. Differential outcomes of steviol glycosides supplementation on cognitive performance in male and female mice deserve further attention in order to determine the specific mechanisms involved.

## References

- Aronov, D., Nevers, R., & Tank, D. (2017). Mapping of a non-spatial dimension by the hippocampal–entorhinal circuit. *Nature*, 543(7647):719–22. doi:10.1038/nature21692
- Brown, R. J., de Banate, M. A., & Rother, K. I. (2010). Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *International journal of pediatric obesity*, 5(4):305–12. doi:10.3109/17477160903497027

- Chattopadhyay, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2011). Artificial sweeteners - a review. *Journal of food science and technology*, 51(4):611–21. doi:10.1007/s13197-011-0571-1
- Chen, L., Appel, L., Loria, C., Lin, P.-H., Champagne, C., Elmer, P., Caballero, B. (2009). Reduction in consumption of sugar-sweetened beverages is associated with weight loss: the PREMIER trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5):1299–306. doi:10.3945/ajcn.2008.27240
- Crane, P., Walker, R., Hubbard, R., Li, G., Nathan, D., Zheng, H., Larson, E. (2013). Glucose Levels and Risk of Dementia. *The New England Journal of Medicine*, 369(6):540–8. doi:10.1056/NEJMoa1215740
- Crichton, G. E., Elias, M. F., & Torres, R. V. (2016). Sugar-sweetened soft drinks are associated with poorer cognitive function in individuals with type 2 diabetes: the Maine-Syracuse Longitudinal Study. *The British journal of nutrition*, 115(8):1397–405. doi:10.1017/S0007114516000325
- Cukierman-Yaffee, T. (2009). The relationship between dysglycemia and cognitive dysfunction. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 10(1):70–4. PMID:19127489
- Darling, J. N., Ross, A. P., Bartness, T. J., & Parent, M. B. (2013). Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. *Obesity*, 21(5):910–7. doi:10.1002/oby.20167
- Dauncey, M. J. (2009). New insights into nutrition and cognitive neuroscience. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 68(4):408–15. doi:10.1017/s0029665109990188

- Dauncey, M. J., & Bicknell, R. J. (1999). Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. *Nutrition research reviews*, 12(2):231–53. doi:10.1079/095442299108728947
- Dineley, K., Jahrling, J., & Denner, L. (2014). Insulin resistance in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 72(Pt A):92–103. doi:10.1016/j.nbd.2014.09.001
- Frank, G. K., Oberndorfer, T. A., Simmons, A. N., Paulus, M. P., Fudge, J. L., Yang, T. T., & Kaye, W. H. (2008). Sucrose activates human taste pathways differently from artificial sweetener. *NeuroImage*, 39(4):1559–69. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.10.061
- Galea, Kavaliers, & Ossenkopp. (1996). Sexually dimorphic spatial learning in meadow voles *Microtus pennsylvanicus* and deer mice *Peromyscus maniculatus*. *The Journal of experimental biology*, 199(Pt 1):195–200. PMID:8576690
- Galea, Kavaliers, Ossenkopp, & Hampson. (1995). Gonadal hormone levels and spatial learning performance in the Morris water maze in male and female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Hormones and behavior*, 29(1):106–25. doi:10.1006/hbeh.1995.1008
- Glendinning, J., Frim, Y., Hochman, A., Lubitz, G., Basile, A., & Sclafani, A. (2017). Glucose elicits cephalic-phase insulin release in mice by activating K(ATP) channels in taste cells. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 312(4):R597-610. ajpregu.00433.2016. doi:10.1152/ajpregu.00433.2016
- Grabenhenrich, L., Roll, S., Kerti, L., Witte, V., Grittner, U., & Floeel, A. (2014). Higher glucose levels associated with lower memory and reduced hippocampal microstructure. *Neurology*, 83(1)102. doi:10.1212/WNL.0000000000000558

- Isaacs, E., Gadian, D., Sabatini, S., Chong, W., Quinn, B., Fischl, B., & Lucas, A. (2008). The Effect of Early Human Diet on Caudate Volumes and IQ. *Pediatric Research*, 63(3):308-14. pr200860. doi:10.1203/PDR.0b013e318163a271
- Jin, J., & Maren, S. (2015). Prefrontal-Hippocampal Interactions in Memory and Emotion. *Frontiers in systems neuroscience*, 9:170. doi:10.3389/fnsys.2015.00170
- Kendig, M. (2014). Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. *Appetite*, 80:41–54. doi:10.1016/j.appet.2014.04.028
- Lee, J., Seroogy, K., & Mattson, M. (2002). Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*, 80(3):539–547. doi:10.1046/j.0022-3042.2001.00747.x
- Li, X., Servant, G., & Tachdjian, C. (2011). The discovery and mechanism of sweet taste enhancers. *BioMolecular Concepts*, 2(4):327–32. doi:10.1515/bmc.2011.021
- Lutsey, P. L., Steffen, L. M., & Stevens, J. (2008). Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation*, 117(6):754–61. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.716159
- Mainardi, M., Fusco, S., & Grassi, C. (2015). Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural plasticity*, 2015:657928. doi:10.1155/2015/657928
- Ogiue-Ikeda, M., Tanabe, N., Mukai, H., Hojo, Y., Murakami, G., Tsurugizawa, T., Kawato, S. (2008). Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disrupters in hippocampal neurons. *Brain Research Reviews*, 57(2):363–75. doi:10.1016/j.brainresrev.2007.06.010

- Pepino, M., & Bourne, C. (2011). Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 14(4):391. doi:10.1097/MCO.0b013e3283468e7e
- Pepino, Y. M., Tiemann, C. D., Patterson, B. W., Wice, B. M., & Klein, S. (2013). Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care*, 36(9):2530–5. doi:10.2337/dc12-2221
- Patkowska-Gozdziak E., Bigos A., & Rosolowska-Huszcz D. (2016). Type of sweet flavour carrier affects thyroid axis activity in male rats. *European Journal of Nutrition*, 57(2):1–10. doi:10.1007/s00394-016-1367-x
- Schmitt, J. (2010). Nutrition and cognition: meeting the challenge to obtain credible and evidence-based facts. *Nutrition Reviews*, 1:S2–5. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00329.x
- Shankar, P., Ahuja, S., & Sriram, K. (2013). Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition*, 29(11-12):1293–9. doi:10.1016/j.nut.2013.03.024
- Swithers, S., Martin, A., & Davidson, T. (2010). High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiology & Behavior*, 100(1):55-62. doi:10.1016/j.physbeh.2009.12.021
- Sylvetsky, A., Rother, K., & Brown, R. (2011). Artificial Sweetener Use Among Children: Epidemiology, Recommendations, Metabolic Outcomes, and Future Directions. *Pediatric Clinics of North America*, 58(6):1467-80. doi:10.1016/j.pcl.2011.09.007
- Temizkan, Deyneli, Yasar, Arpa, Gunes, Yazici, Yavuz. (2015). Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Nutrition*, 69(2):162–6. doi:10.1038/ejcn.2014.208

- Van der Beek, E. M., & Kamphuis, P. J. (2008). The potential role of nutritional components in the management of Alzheimer's Disease. *European journal of pharmacology*, 585(1),:197–207. doi:10.1016/j.ejphar.2008.01.049
- Wenk, G. L. (2004). Assessment of spatial memory using the radial arm maze and Morris water maze. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 8, Unit 8.5A. doi:10.1002/0471142301.ns0805as26
- Wójtowicz, T., & Mozrzymas, J. (2010). Estradiol and GABAergic transmission in the hippocampus. *Vitamins and hormones*, 82:279–300. doi:10.1016/s0083-6729(10)82015-1
- Ye, X., Gao, X., Scott, T., & Tucker, K. (2011). Habitual sugar intake and cognitive function among middle-aged and older Puerto Ricans without diabetes. *British Journal of Nutrition*, 106(9):1423–32. doi:10.1017/S0007114511001760

## Tables and figures

**Table 1. Evaluation of spatial learning in sweetener-supplemented mice.**

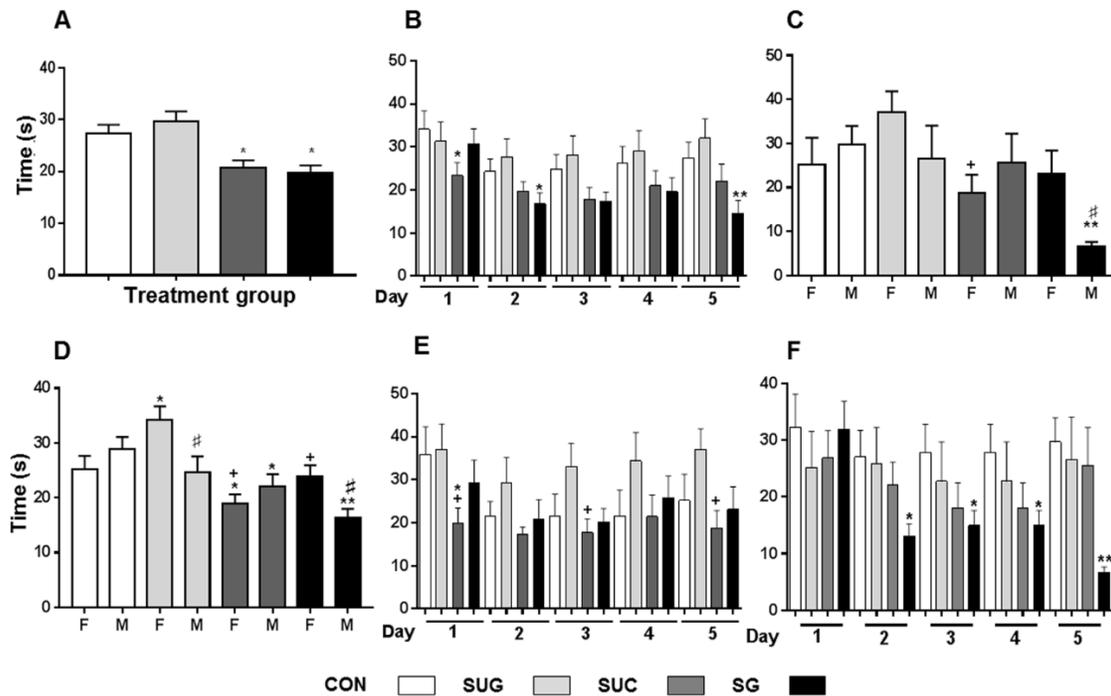
Time to reach platform (s)						
Group	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	5-day avg.
<b>Male + Female</b>						
CON	34.09 ± 4.26	24.32 ± 2.87	24.75 ± 3.51	26.2 ± 3.89	27.43 ± 3.68	27.36 ± 1.64
SUG	31.36 ± 4.49	27.69 ± 4.22	28.17 ± 4.39	28.07 ± 4.73	32.05 ± 4.42	29.67 ± 1.95
SUC	23.38 ± 3.03*	19.71 ± 2.21	17.88 ± 2.68	21.02 ± 3.45	22.1 ± 3.93	20.82 ± 1.38*
SG	30.65 ± 3.5	16.8 ± 2.53*	17.43 ± 2.08	19.57 ± 3.28	14.54 ± 3.04**	19.8 ± 1.39*
<b>Female</b>						
CON	35.95 ± 6.37	21.55 ± 3.48	21.64 ± 5.04	21.55 ± 6.06	25.18 ± 6.13	25.17 ± 2.49
SUG	37.05 ± 5.98	29.49 ± 5.87	33.09 ± 5.39	34.36 ± 6.57	37.05 ± 4.81	34.17 ± 2.5*
SUC	19.92 ± 3.05* <sup>+</sup>	17.33 ± 1.71	17.71 ± 3.20 <sup>+</sup>	21.42 ± 5.06	18.67 ± 4.19 <sup>+</sup>	19.01 ± 1.61* <sup>+</sup>
SG	29.23 ± 5.33	20.86 ± 4.53	20.18 ± 3.14	25.86 ± 4.99	23.14 ± 5.21	23.85 ± 2.07 <sup>+</sup>
<b>Male</b>						
CON	32.23 ± 5.86	27.09 ± 4.64	27.86 ± 4.94	27.86 ± 4.94	29.68 ± 4.28	28.95 ± 2.15
SUG	25.1 ± 6.43	25.9 ± 6.34	22.75 ± 6.95	22.75 ± 6.95	26.55 ± 7.51	24.61 ± 2.94 <sup>#</sup>
SUC	26.83 ± 4.89	22.08 ± 4.07	18.04 ± 4.45	18.04 ± 4.45	25.54 ± 6.7	22.11 ± 2.13*
SG	31.96 ± 4.88	13.08 ± 2.18*	14.92 ± 2.67*	14.92 ± 2.67*	6.66 ± 0.99** <sup>#</sup>	16.31 ± 1.68** <sup>#</sup>

*Note:* Time to reach the hidden platform during the 5-day and 5-day average learning period, by group. Data is shown as mean ± SEM. n=10-12 animals per group/sex. \* p<0.05 and \*\* p<0.001, compared to control group. <sup>+</sup> p<0.05, sucralose compared to sucrose. <sup>#</sup> p<0.05, comparing males and females from the same group.

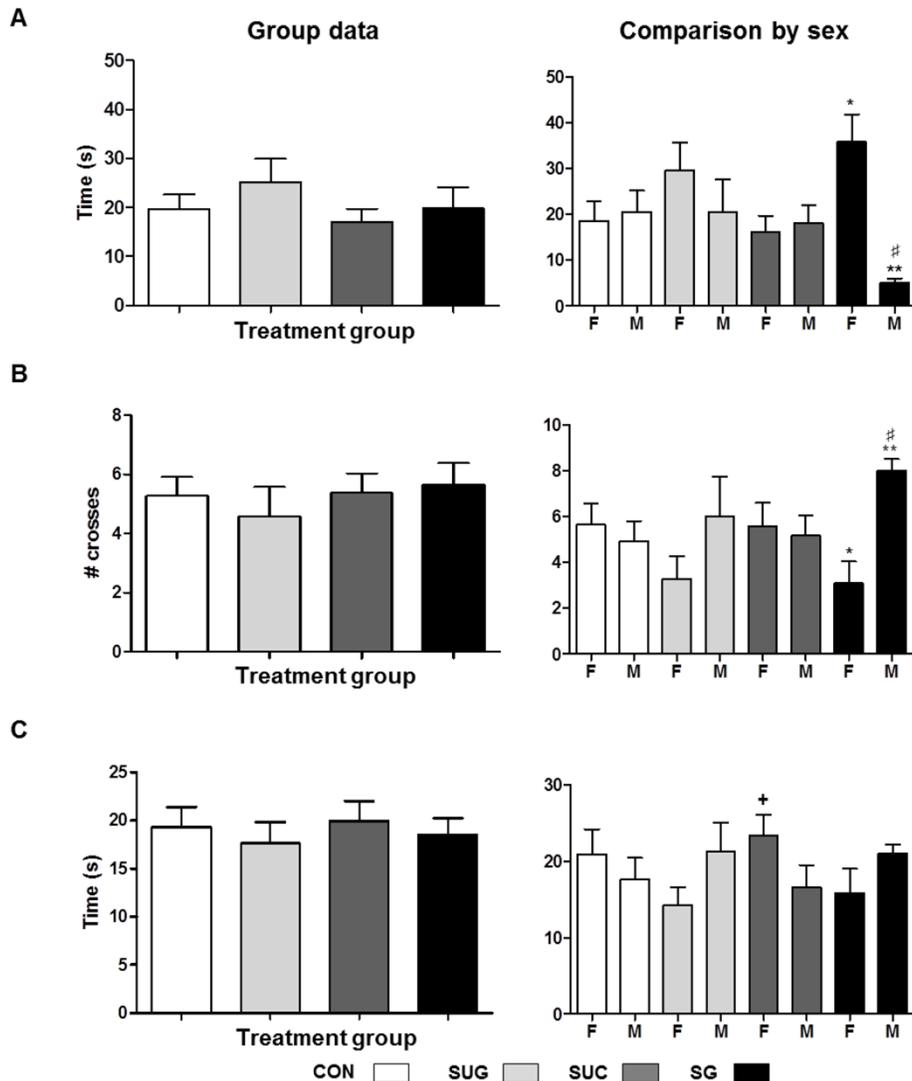
**Table 2. Evaluation of spatial memory in sweetener-supplemented mice.**

Group	Latency (s)		
	Female + male	Female	Male
CON	19.55 ± 3.12	18.55 ± 4.32	20.55 ± 4.69
SUG	25.24 ± 4.71	29.55 ± 6.24	20.50 ± 7.17
SUC	17.08 ± 2.63	16.08 ± 3.66	18.08 ± 3.91
SG	19.83 ± 4.31	35.82 ± 5.98*	5.16 ± 0.88 ** #
Number of crosses			
CON	5.27 ± 0.63	5.63 ± 0.93	4.90 ± 0.88
SUG	4.57 ± 1.00	3.27 ± 0.99	6.00 ± 1.75
SUC	5.37 ± 0.66	5.58 ± 1.01	5.16 ± 0.88
SG	5.65 ± 0.73	3.09 ± 0.94*	8.00 ± 0.50** #
Time in quadrant (s)			
CON	19.27 ± 2.13	20.91 ± 3.27	17.64 ± 2.80
SUG	17.62 ± 2.20	14.27 ± 2.25	21.30 ± 3.70
SUC	19.96 ± 2.08	23.33 ± 2.74 <sup>+</sup>	16.58 ± 2.91
SG	18.52 ± 1.71	15.82 ± 3.21	21.00 ± 1.18

*Note:* Results for latency, number of crosses and time in quadrant. Data is shown as mean ± SEM. n=10-12 animals per group/sex. \* p<0.05 and \*\* p<0.001, compared to control group. <sup>+</sup> p<0.05, sucralose compared to sucrose. # p<0.05, comparing males and females from the same group.



**Figure 1: Evaluation of spatial learning in sweetener-supplemented mice.** (A) Average results from the training period, by group (female + male). (B) Daily results from the training period, by group. (C) Results from the final day of the training period, compared by sex (F=female; M=male). (D) Average results from the training period, compared by sex. (E) Daily results from the training period, females only. (F) Daily results from the training period, males only. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $n=10-12$  animals per group/sex. \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.001$ , compared to control group. + $p<0.05$ , SUC compared to SUG. # $p<0.05$ , comparing males and females from the same group.



**Figure 2:** Evaluation of spatial memory in sweetener-supplemented mice. Analysis of the platform-seeking behavior after the 5-day training period in the Morris water maze test, with platform removed. (A) Latency. (B) Number of crosses. (C) Time in quadrant. All data are presented as complete group (female + male) and compared by sex (F=female; M=male). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. n=10-12 animals per group/sex. \* $p$ <0.05 and \*\* $p$ <0.001, compared to control group. + $p$ <0.05, SUC compared to SUG. # $p$ <0.05, comparing males and females from the same group.

## **8. Discusión general**

Las cantidades adecuadas de glucosa son necesarias para el desarrollo y crecimiento favorable del sistema nervioso central (SNC), a través de procesos celulares como la neurogénesis y la gliogénesis, además de la síntesis de neurotransmisores, hormonas y factores de crecimiento, que en conjunto permiten la formación y consolidación de complejas redes neuronales durante la etapa prenatal (146). Sin embargo, en etapas postnatales, los circuitos y redes neuronales ya formados continúan consolidándose, por lo que los primeros años de vida son críticos para la maduración del SNC, dada la vulnerabilidad a las concentraciones de glucosa. Sin embargo, también se ha visto que los efectos derivados de alteraciones en el suministro de glucosa en el SNC pueden persistir incluso en etapas tardías, especialmente en funciones relacionadas con áreas cerebrales específicas donde existe neurogénesis adulta, como el hipocampo, el estriado y el bulbo olfatorio, que tienen importancia por sus funciones relacionadas con la cognición (147). El consumo excesivo de carbohidratos se relaciona con cambios en el funcionamiento del SNC, debido a su alto aporte energético, además de que están implicadas en el desarrollo de enfermedades metabólicas crónicas, como la diabetes mellitus tipo 2, la obesidad y el síndrome metabólico, las cuales a su vez promueven alteraciones en el funcionamiento normal del SNC y cambios en las funciones cognitivas (143). Debido a esto, se ha sugerido que el consumo de edulcorantes no nutritivos, que disminuyen el aporte energético proveniente de los carbohidratos en la dieta, es útil en la prevención de estas patologías (148). Sin embargo, diversos estudios han demostrado lo contrario, dejando en duda si realmente existe un efecto benéfico a la salud. Debido a esto, el presente proyecto se enfocó en indagar si el consumo frecuente de estos aditivos alimentarios puede afectar procesos cognitivos como la memoria y el aprendizaje, así como la expresión de proteínas relacionadas al funcionamiento normal de estos procesos, como los factores de crecimiento similares a insulina (IGFs).

Los resultados de este estudio muestran que la expresión de IGFs se altera en ratones machos suplementados de manera frecuente con edulcorantes comerciales durante un periodo de 6 semanas. Notablemente, la expresión de IGF-I disminuye en ratones suplementados con sucralosa, mientras que aumenta en ratones suplementados con sacarosa. Igualmente, se observó una disminución significativa en la expresión de IGF-II en los animales suplementados con sucralosa, aunque esta molécula también disminuye su expresión en los ratones suplementados

con sacarosa. Finalmente, la disminución en la expresión de ambos IGFs en los animales suplementados con sucralosa corresponde a un aumento significativo en la expresión de IGF-IR en sus cerebros. Como se sabe la función de los IGFs especialmente el IGF-II, están relacionados con la función cognitiva (149), considerándolos como algunos mecanismos moleculares que intervienen en los procesos de memoria y aprendizaje, por lo que en este proyecto hemos podido ver que las concentraciones de glucosa modificadas por el consumo de los diferentes edulcorantes nutritivos como la sacarosa y no nutritivos como la sucralosa así como los glucósidos de esteviol ocasionan que la expresión de estos factores de crecimiento sean alterados y como consecuencia podrían estar relacionados con algunas alteraciones en su vía de señalización teniendo como consecuencias alteraciones relacionadas con algunos procesos cognitivos, quizás no sea la causa directa de las posibles alteraciones pero existe la posibilidad de su relación con ellas; como en nuestro proyecto, en el que el exceso de sacarosa se observó aumento en la expresión de IGF-I, lo cual puede sugerir que el receptor no estuviera captando adecuadamente a esta molécula. Esto da pauta a buscar la expresión de los receptores de los IGFs, sin embargo, este paso se consideró durante la elaboración de este proyecto, pero los anticuerpos utilizados que pudimos adquirir no fueron de buena calidad, debido que durante el desarrollo de los experimentos obtuvimos bandas de pesos moleculares diferentes a los esperados o bien no hubo una expresión de los receptores de manera clara, por lo que sugerimos indagar más en la búsqueda de estos receptores así como de otros mecanismos básicos de señalización, para consolidar que los efectos por la diferencia en el consumo de edulcorantes, si puede tener efecto en el ambiente neuronal y este su vez en la función dependiendo del área de las neuronas donde sean susceptibles a esta alteración.

Los resultados obtenidos de la expresión de IGFs también corresponden con algunos cambios relevantes en la capacidad de aprendizaje y memoria espacial de los animales en estudio. Los grupos de animales suplementados con edulcorantes no nutritivos mostraron mejorías en su desempeño durante los periodos de entrenamiento y evaluación en el laberinto de agua de Morris. Tanto los grupos suplementados con glucósidos de esteviol como los suplementados con sucralosa mejoraron sus tiempos de adquisición de la plataforma escondida en la prueba, disminuyendo su latencia e incrementando su número de cruces sobre el área de la plataforma y su tiempo de rastreo en la misma área durante la evaluación final de la memoria espacial. Hay que notar, asimismo, que los resultados de estas pruebas variaron en relación al sexo de los

animales, con los ratones machos mejorando significativamente su desempeño en relación a todos los demás grupos experimentales cuando fueron suplementados con glucósidos de esteviol, mientras que en los ratones hembra la mejoría significativa se notó en el grupo suplementado con sucralosa, mientras que los glucósidos de esteviol tuvieron un efecto contrario en ellas.

Las diferencias de aprendizaje y memoria pueden variar entre géneros por múltiples factores, algunos de ellos por diferencias anatómicas, es decir, los hombres suelen ser más hábiles para la memoria espacial a diferencia de la memoria verbal que está más desarrollada en las mujeres debido a su dimorfismo neuroanatómico (150); otro factor que puede influir en dicha diferencia es la presencia del ambiente hormonal que tienen las mujeres, lo cual varía según el ciclo ovárico, haciendo que las fluctuaciones de los estrógenos influyan en la fisiología del sistema nervioso (151).

Considerar los factores internos como externos, que influyen en la fisiología tanto neuronal como de cualquier otra célula del organismo, es importante, por lo que, se requiere de investigación que permita relacionar estos factores, tanto a nivel cerebral como en otros sistemas.

## **9. Conclusiones generales**

En conjunto, nuestros resultados sugieren que el consumo frecuente de edulcorantes no nutritivos, se relaciona con cambios en la producción de factores de crecimiento similares a insulina en el SNC y con cambios en la capacidad de memoria espacial en ratones machos y hembras.

La expresión de IGF-I e IGF-II disminuye significativamente en ratones macho suplementados con sucralosa, mientras que la expresión del receptor IGF-IR se incrementa en el mismo grupo. Sin embargo, las alteraciones en la memoria espacial varían de acuerdo al sexo del animal, con los glucósidos de esteviol mejorando el desempeño en ratones macho y la sucralosa mejorándolo en ratones hembra.

El presente proyecto provee evidencia adicional sobre el posible efecto del consumo frecuente de edulcorantes en la producción de moléculas relevantes para el funcionamiento del organismo, particularmente el tejido nervioso, así como sobre las funciones cognitivas de aprendizaje y memoria espacial. Estas alteraciones merecen ser estudiadas con mayor profundidad, para determinar los mecanismos específicos implicados en su desarrollo.

## 10. Bibliohemerografía

1. De la Peña C. Artificial sweetener as a historical window to culturally situated health. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Mar;1190:159–65.
2. Linda Nash. *Inescapable ecologies: A History of Environment, Disease, and Knowledge.* First edition. University of California . 2007;422–4.
3. Rehn S, Onuma T, Rooney KB, Boakes RA.. Sodium saccharin can be more acceptable to rats than pure saccharin. *Behav Processes*, 2018 Sep;157:188-191.
4. Sylvetsky A, Rother KI, Brown R. Artificial Sweetener Use Among Children: Epidemiology, Recommendations, Metabolic Outcomes, and Future Directions. *Pediatr Clin North Am.* 2011 Dec;58(6):1467-80.
5. American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *J Am Diet Asso.* 2004 Feb;104(2):255–75.
6. Renwick AG, Molinary SV. Sweet-taste receptors, low-energy sweeteners, glucose absorption and insulin release. *Br J Nutr.* 2010 Nov;104(10):1415–20.
7. Mattes RD, Popkin BM. Nonnutritive sweetener consumption in humans: effects on appetite and food intake and their putative mechanisms. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jan;89(1):1–14.
8. Rodarmel SJ, Wyatt HR, Stroebele N, Smith SM, Ogden LG, Hill JO. Small Changes in Dietary Sugar and Physical Activity as an Approach to Preventing Excessive Weight Gain: The America on the Move Family Study. *Pediatrics.* 2007 Oct;120(4)e869–e879.
9. Benton D. Can artificial sweeteners help control body weight and prevent obesity? *Nutr Res Rev.* 2005 Jun;18(1):63–76.
10. Williams CL, Strobino BA, Brotanek J. Weight control among obese adolescents: A pilot study. *Int J Food Sci Nutr.* 2007 May;58(3):217–30.
11. Bellisle F, Altenburgde Assis MA, Fieux B, Preziosi P, Galan P, Guy-Grand B, et al. Use of “light” foods and drinks in French adults: biological, anthropometric and nutritional correlates. *J Hum Nutr Diet.* 2001 Jun;14(3):191–206.
12. Bellisle F, Drewnowski A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *Eur J Clin Nutr.* 2007 Jun;61(6):691-700.
13. Husøy T, Mangschou B, Fotland TØ, Kolset SO, Jakobsen NH, Tømmerberg J, et al. Reducing added sugar intake in Norway by replacing sugar sweetened beverages with beverages containing intense sweeteners – A risk benefit assessment. *Food Chem Toxicol.* 2008 Sep;46(9):3099–105.
14. Vermunt SH, Pasma WJ, Schaafsma G, Kardinaal AF. Effects of sugar intake on body weight: a review. *Obes Rev.* 2003 May;4(2):91–9.
15. Rehm CD, Peñalvo JL, Afshin A, Mozaffarian D. Dietary Intake Among US Adults, 1999-2012. *JAMA.* 2016 Jun;315(23):2542–53.
16. Malik VS, Schulze MB, Hu FB. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *AmJ Clin Nutr.* 2006 Aug;84(2):274–88.
17. Rolls BJ. Effects of intense sweeteners on hunger, food intake, and body weight: a review. *AmJ Clin Nutr.* 1991 Apr;53(4):872–8.
18. Renwick AG. Intense sweeteners, food intake, and the weight of a body of evidence. *Physiol Behav.* 1994 Jan;55(1):139–43.

19. Grotz VL, Henry RR, McGill JB, Prince MJ, Shamooh H, Trout JR, et al. Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc.* 2003 Dec;103(12):1607–12.
20. Stolarz-Skrzypek K. Sugar and Salt in the Pathogenesis of Elevated Blood Pressure. *Hypertension.* 2011 Apr;57(4):676–8.
21. Friedhoff R, Simon JA, Friedhoff AJ. Sucrose solution vs. no-calorie sweetener vs. water in weight gain. *J Am Diet Assoc.* 1971 Nov;59(5):485–6.
22. Blundell JE, Hill AJ. Paradoxical effects of an intense sweetener (aspartame) on appetite. *Lancet.* 1986 May;1(8489):1092–3.
23. Brown RJ, de Banate MA, Rother KI. Artificial sweeteners: a systematic review of metabolic effects in youth. *Int J Pediatr Obes.* 2010 Aug;5(4):305–12.
24. Duffey KJ, Popkin BM. Adults with healthier dietary patterns have healthier beverage patterns. *J Nut.* 2006 Nov;136(11):2901–7.
25. Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the Obesity Epidemic? Artificially Sweetened Beverage Use and Long-term Weight Gain. *Obesity (Silver Spring).* 2008 Aug;16(8):1894–900.
26. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Circulation.* 2008 Feb;117(6):754–61.
27. Winkelmayr WC, Stampfer MJ, Willett WC, Curhan GC. Habitual Caffeine Intake and the Risk of Hypertension in Women. *JAMA.* 2005 Nov;294(18):2330–5.
28. Dhingra R, Sullivan L, Jacques PF, Wang TJ, Fox CS, Meigs JB, et al. Soft Drink Consumption and Risk of Developing Cardiometabolic Risk Factors and the Metabolic Syndrome in Middle-Aged Adults in the Community. *Circulation.* 2007 Jul;116(5):480–8.
29. Nettleton JA, Lutsey PL, Wang Y, Lima JA, Michos ED, Jacobs D. Diet Soda Intake and Risk of Incident Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care.* 2009 Apr;32(4):688–94.
30. Mackenzie T, Brooks B, O'Connor G. Beverage Intake, Diabetes, and Glucose Control of Adults in America. *Ann Epidemiol.* 2006 Sep;16(9):688–91.
31. McNaughton SA, Mishra GD, Brunner EJ. Dietary Patterns, Insulin Resistance, and Incidence of Type 2 Diabetes in the Whitehall II Study. *Diabetes Care.* 2008 Jul;31(7):1343–8.
32. Bremer AA, Auinger P, Byrd RS. Relationship between insulin resistance-associated metabolic parameters and anthropometric measurements with sugar-sweetened beverage intake and physical activity levels in US adolescents: findings from the 1999-2004 National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2009 Apr;163(4):328–35.
33. Duffey KJ, Gordon-Larsen P, Steffen LM, Jacobs DR, Popkin BM. Drinking caloric beverages increases the risk of adverse cardiometabolic outcomes in the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr.* 2010 Oct;92(4):954–9.
34. Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011 Jul;14(4):391-5.
35. Diario Oficial de la Federación. Reglamento de control sanitario de productos y servicios. Mexico: Diario Oficial de la Federación. 2016.
36. Jun-Shi C. The role of science in Codex standards. *Biomed Environ Sci.* 2001 Jun;14(1-2):145–8.

37. Sharma A, Amarnath S, Thulasimani M, Ramaswamy S. Artificial sweeteners as a sugar substitute: Are they really safe? *Indian J Pharmacol.* 2016 May-jun;48(3):237–40.
38. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nation. *Codex Alimentarius International Food Standards. Annex B. Codex General Standard for Food Additives.* 2018:2-4.
39. Villegas-Romero M, Castrejón-Téllez V, Pérez-Torres I, Rubio-Ruiz ME, Carreón-Torres S, Díaz-Díaz E, et.al. Short-Term Exposure to High Sucrose Levels near Weaning Has a Similar Long-Lasting Effect on Hypertension as a Long-Term Exposure in Rats. *Nutrients.* 2018 Jun;10(6):E728.
40. Gatineau E, Cluzet S, Krisa S, Papet I, Migne C, Remond D, et.al. Effects of nutritional state, aging and high chronic intake of sucrose on brain protein synthesis in rats: modulation of it by rutin and other micronutrients.. *Food Funct.* 2018 May;9(5):2922-2930.
41. Davis EA. Functionality of sugars: physicochemical interactions in foods. *Am J Clin Nutr.* 1995 Jul;62(1 Suppl)170S–177S.
42. Asif HM, Akram M, Saeed T, Khan MI, Akhtar N, Riaz U.. Carbohydrates. *Internat Res J Biochem Bioinf.* 2011 Feb;1(1) 001-005.
43. Linhardt R.J., Bazin H.G. Properties of Carbohydrates. *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I–III.* Springer, Berlin, Heidelberg 2001:59.
44. Food and Drug Administration, HHS, Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Folic Acid. Final rule. *Fed Regist.* 2016 Apr;81(73):22176–83.
45. Knight I. The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener. *Can J Physiol Pharmacol.* 1994 Apr;72(4):435–9.
46. Schiffman SS, Booth BJ, Losee ML, Pecore SD, Warwick ZS. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res Bull.* 1995;36(5):505–13.
47. Yadav SK, Guleria P. Steviol glycosides from Stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012 Jan;52(11):988–98.
48. Abudula R, Jeppesen PB, Rolfsen SE, Xiao J, Hermansen K. Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency. *Metaboism Clin Exp.* 2004 Oct;53(10):1378–81.
49. Camara de Diputados. *La agroindustria azucarera en México.* 2001 Sep;13-15.
50. Anton SD, Martin CK, Han H, Coulon S, Cefalu WT, Geiselman P, et al. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite.* 2010 Aug;55(1):37–43.
51. Atteh JO, Onagbesan OM, Tona K, Decuypere E, Geuns JM, Buyse J. Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, *bertoni*) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2008 Dec;92(6):640–9.
52. Barriocanal LA, Palacios M, Benitez G, Benitez S, Jimenez JT, Jimenez N, et al. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2008 Jun;51(1):37–41.
53. Hall JE. Guyton y Hall. *Tratado de fisiología médica.* Elsevier 13a ed. 2016;174-180.
54. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto atlas de histología.* Mc Graw Hill, 3a ed. 2008 Jan;162-95.
55. Tortora GJ, Derrickson B. *Principios de anatomía y fisiología.* Panamericana, 13ª ed. 2013:84-94.

56. Wojciech P. Ross histología texto y atlas. Correlación con biología molecular y celular. LWW, 7ª ed. 2015:421-38.
57. Sclafani A. Starch and sugar tastes in rodents: An update. *Brain Res Bull.* 1991 Sep-Oct;27(3-4):383-6.
58. Sako N, Shimura T, Komure M, Mochizuki R, Matsuo R, Yamamoto T. Differences in taste responses to Polycose and common sugars in the rat as revealed by behavioral and electrophysiological studies. *Physiol Behav.* 1994 Oct;56(4):741-5.
59. Zhang GH, Chen ML, Liu SS, Zhan YH, Quan Y, Qin YM, et al. Effects of Mother's Dietary Exposure to Acesulfame-K in Pregnancy or Lactation on the Adult Offspring's Sweet Preference. *Chem Senses.* 2011 Nov;36(9):763-70.
60. McCaughey SA. The taste of sugars. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(5):1024-43.
61. Morrison GR. Relative discriminability of sugars for the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1969 May;68(1):45-9.
62. Lee H, Macpherson LJ, Parada CS, Zuker C, Ryba NJ. Rewiring the taste system. *Nature.* 2017 Aug;548:330-333.
63. Herness MS, Gilbertson TA. Cellular mechanisms of taste transduction. *Ann Rev Physiol.* 1999;61:873-900.
64. Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y, Hino A. Molecular Genetic Identification of a Candidate Receptor Gene for Sweet Taste. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr;283(1):236-42.
65. Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS. Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell.* 2001 Aug;106(3):381-90.
66. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Apr;99(7):4692-6.
67. Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X. Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Sep;101(39):14258-63.
68. Bernhardt SJ, Naim M, Zehavi U, Lindemann B. Changes in IP3 and cytosolic Ca<sup>2+</sup> in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. *J Physiol.* 1996 Jan;490(Pt2):325-36.
69. Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, et al. Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell.* 2003 Feb;112(3):293-301.
70. Dotson CD, Roper SD, Spector AC. PLCbeta2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands. *Chem Senses.* 2005 Sep;30(7):593-600.
71. Karimnamazi H, Travers SP, Travers JB. Oral and gastric input to the parabrachial nucleus of the rat. *Brain Res.* 2002 Dec;957(2):193-206.
72. Verhagen JV, Giza BK, Scott TR. Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in rats. *J Neurophysiol.* 2003 Jan ;89(1):265-75.
73. Gutierrez R, Carmena JM, Nicolelis MA, Simon SA. Orbitofrontal ensemble activity monitors licking and distinguishes among natural rewards. *J Neurophysiol.* 2006 Jan;95(1):119-33.
74. Cagan RH, Maller O. Taste of sugars: Brief exposure single-stimulus behavioral method. *J Comp Physiol Psychol.* 1974 Jul;87(1):47-55.
75. Weingarten HP, Watson SD. Sham feeding as a procedure for assessing the influence of diet palatability on food intake. *Physiol Behav.* 1982 Mar;28(3):401-7.

76. Spector AC, Klumpp PA, Kaplan JM. Analytical issues in the evaluation of food deprivation and sucrose concentration effects on the microstructure of licking behavior in the rat. *Behav Neurosci*. 1998 Jun;112(3):678-94.
77. Rubio-Navarro L, Torrero C, Regalado M, Salas M. Desarrollo de la discriminación a los sabores. *Neurobiol*. 2010;2010(1).
78. Yamamoto T, Kawamura Y. Gustatory reaction time in human adults. *Physiol Behav*. 1981 Apr;26(4):715-19.
79. Norgren R, Hajnal A, Mungarndee SS. Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol Behav*. 2006 Nov;89(4):531-35.
80. Yamamoto T, Sako N, Maeda S. Effects of taste stimulation on  $\beta$ -endorphin levels in rat cerebrospinal fluid and plasma. *Physiol Behav*. 2000 May;69(3):345-50.
81. Segato EN, Rebouças EC, Freitas RL, Caires MP, Cardoso AV, Resende GC, et al. Effect of chronic intake of sweet substance on nociceptive thresholds and feeding behavior of *Rattus norvegicus* (Rodentia, Muridae). *Nutr Neurosci*. 2005 Apr;8(2):129-40.
82. Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. 2006 Nov;444(7117):288-94.
83. Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Tränkner D, et al. The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*. 2006 Aug;442(7105):934-38.
84. Ogawa H. Gustatory cortex of primates: anatomy and physiology. *Neurosci Res*. 1994 Jul;20(1):1-13.
85. Nitschke JB, Dixon GE, Sarinopoulos I, Short SJ, Cohen JD, Smith EE, et al. Altering expectancy dampens neural response to aversive taste in primary taste cortex. *Nat Neurosci*. 2006 Mar;9(3):435-42..
86. Nie Y, Vignes S, Hobbs JR, Conn GL, Munger SD. Distinct Contributions of T1R2 and T1R3 Taste Receptor Subunits to the Detection of Sweet Stimuli. *Current Biology*. 2005 Nov;15(21):1948-52.
87. Frank GK, Oberndorfer TA, Simmons AN, Paulus MP, Fudge JL, Yang TT, et al. Sucrose activates human taste pathways differently from artificial sweetener. *NeuroImage*. 2008 Feb;39(4):1559-69.
88. Smeets PA, Weijzen P, de Graaf C, Viergever MA. Consumption of caloric and non-caloric versions of a soft drink differentially affects brain activation during tasting. *NeuroImage*. 2011 Jan;54(2):1367-74.
89. Benton D. The plausibility of sugar addiction and its role in obesity and eating disorders. *Clin Nutr*. 2010 Jun;29(3):288-303.
90. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, et al. Detection of Sweet and Umami Taste in the Absence of Taste Receptor T1r3. *Science*. 2003 Aug;301(5634):850-53.
91. De Araujo IE, Oliveira-Maia AJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MA, et al. Food Reward in the Absence of Taste Receptor Signaling. *Neuron*. 2008 Mar;57(6):930-41.
92. Moskowitz HR. The sweetness and pleasantness of sugars. *AmJ Psychol*. 1971 Sep;84(3):387-405.
93. Finlayson G, King N, Blundell JE. Is it possible to dissociate “liking” and “wanting” for foods in humans? A novel experimental procedure. *Physiol Behav*. 2007 Jan;90(1):36-42.
94. Peciña S, Berridge KC. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J Neurosci*. 2005 Dec;25(50):11777-86.

95. Tindell AJ, Smith KS, Peciña S, Berridge KC, Aldridge JW. Ventral pallidum firing codes hedonic reward: when a bad taste turns good. *J Neurophysiol.* 2006 Nov;96(5):2399–409.
96. Marella S, Mann K, Scott K. Dopaminergic Modulation of Sucrose Acceptance Behavior in *Drosophila*. *Neuron.* 2012 Mar;73(5):941–50.
97. Ramos EJ, Meguid MM, Campos AC, Coelho JC. Neuropeptide Y,  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition.* 2005 Feb;21(2):269–79.
98. Srinivasan S, Sadegh L, Elle IC, Christensen AG, Faergeman NJ, Ashrafi K. Serotonin Regulates *C. elegans* Fat and Feeding through Independent Molecular Mechanisms. *Cell Metab.* 2008 Jun;7(6):533–44.
99. Goodman A. Neurobiology of addiction An integrative review. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jan;75(1):266–322.
100. Avena NM, Rada P, Hoebel BG. Evidence for sugar addiction: Behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008;32(1):20–39.
101. Volkow ND, Wise RA. How can drug addiction help us understand obesity? *Nat Neurosci.* 2005 May;8(5):555-60.
102. Kalivas PW, Volkow ND. The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice. *Am J Psychiatry* 2007 Aug;162(8):1403-13.
103. Fortuna JL. Sweet Preference, Sugar Addiction and the Familial History of Alcohol Dependence: Shared Neural Pathways and Genes. *J Psychoactive Drugs.* 2010 Jun;42(2):147–51.
104. Levine AS, Kotz CM, Gosnell BA. Sugars: hedonic aspects, neuroregulation, and energy balance. *Am J Clin Nutr.* 2003 Oct;78(4):834S–842S.
105. Mennella JA, Pepino MY, Lehmann-Castor SM, Yourshaw LM. Sweet preferences and analgesia during childhood: effects of family history of alcoholism and depression. *Addiction.* 2010 Apr;105(4):666–75.
106. Rada P, Avena NM, Hoebel BG. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. *Neuroscience.* 2005;134(3):737–44.
107. Bucher HU, Baumgartner R, Bucher N, Seiler M, Fauchère JC. Artificial sweetener reduces nociceptive reaction in term newborn infants. *Early Hum Dev.* 2000 Jul;59(1):51–60.
108. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature.* 1988 Nov;336(6195):123-28.
109. Altman J. Programmed cell death: the paths to suicide. *Trends in Neurosciences.* 1992;278–80.
110. Pascual-Leone A, Grafman J, Hallett M. Modulation of cortical motor output maps during development of implicit and explicit knowledge. *Science.* 1994 Mar;263(5151):1287–89.
111. Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand CD. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993 Jul;90(14):6439–43.
112. Altar CA, Cai N, Bliven T, Juhasz M, Conner JM, Acheson AL, et al. Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature.* 1997 Oct;389(6653):856-60.
113. Rojas-Mayorquín AE, Ortuño Sahagun D. Diferenciación celular en el sistema nervioso, el caso de las células precursoras Neuro-Gliales. *Rev Biosci.* 1995;1(3):3-17.

115. Ma DK, Ming GL, Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2005 Oct;15(5):514–20.
116. Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2001 Aug;251(4):152–8.
117. Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal Growth Factor and Fibroblast Growth Factor-2 Have Different Effects on Neural Progenitors in the Adult Rat Brain. *J Neurosci.* 1997 Aug;17(15):5820–29.
118. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Lateral Ventricle of the Adult Rat Leads to New Neurons in the Parenchyma of the Striatum, Septum, Thalamus, and Hypothalamus. *J Neurosci.* 2001 Sep;21(17):6706–17.
119. Aberg MA, Aberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS. Peripheral Infusion of IGF-I Selectively Induces Neurogenesis in the Adult Rat Hippocampus. *J Neurosci.* 2000 Apr;20(8):2896–903.
120. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular Administration of BDNF Increases the Number of Newly Generated Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Mol Cell Neurosci.* 1998 Jul;11(4):234–45.
121. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978 Apr;253(8):2769–76.
122. Salmon WD, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. 1956. *J Lab Clin Med.* 1990 Jun;49(6):825–36.
123. Castilla-Cortázar I, García-Fernández M, Delgado G, Puche J, Sierra I, Barhoum R, et al. Hepatoprotection and neuroprotection induced by low doses of IGF-II in aging rats. *J Transl Med.* 2011 Jul;9:1–9.
124. Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. Actions of Insulin-Like Growth Factors. *Ann Rev Physiol.* 1985;47:443–67.
125. El-Shewy HM, Luttrell LM. Insulin-like growth factor-2/mannose-6 phosphate receptors. *Vitam Horm.* 2009;80:667–97.
126. O'Dell SD, Day IN. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Jul;30(7):767–71.
127. Randhawa R, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab.* 2005 Sep;86(1-2):84–90.
128. Han VK, Carter AM. Spatial and Temporal Patterns of Expression of Messenger RNA for Insulin-Like Growth Factors and their Binding Proteins in the Placenta of Man and Laboratory Animals. *Placenta.* 2000 May;21(4):289–305.
129. Dupont J, Holzenberger M. Biology of insulin-like growth factors in development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003 Nov;69(4):257–71.
130. Zapf J, Walter H, Froesch ER. Radioimmunological determination of insulinlike growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest.* 1981 Nov;68(5):1321–30.
131. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Aug;16(4-5):421–39.
132. Adams TE, Epa CV, Garrett TP, Ward CW. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Jul;57(7):1050–93.

133. Hawkes C, Kar S. The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res Rev.* 2004 Mar;44(2-3):117–40.
134. Mesulam MM. From sensation to cognition. *Brain.* 1998 Jun;121(6):1013–52.
135. Buzsáki G. Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 May;75(5):508–15.
136. Perea G, Araque A. Properties of Synaptically Evoked Astrocyte Calcium Signal Reveal Synaptic Information Processing by Astrocytes. *J Neurosci.* 2005 Mar;25(11):2192–203.
137. Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol.* 2008 Dec;86(4):342–67.
138. Pereira AJr, Ornelas Pererira MA, Furlan FA. Recent advances in brain physiology and cognitive processing. *Mens Sana Monogr.* 2011 Jan-Dec;9(1):183–92.
139. Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurología.* 2012 Jun;27(5):301–10.
140. Isaacs EB, Gadian DG, Sabatini S, Chong WK, Quinn BT, Fischl BR, et al. The Effect of Early Human Diet on Caudate Volumes and IQ. *Pediatr Res.* 2008 Mar;63(3):308-14.
141. Dauncey MJ. New insights into nutrition and cognitive neuroscience. *Proc Nutr Soc.* 2009 Nov;68(4):408–15.
142. Darling JN, Ross AP, Bartness TJ, Parent MB. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. *Obesity (Silver Spring).* 2013 May;21(5):910–17.
143. Cukierman-Yaffee T. The relationship between dysglycemia and cognitive dysfunction. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 Jan;10(1):70–74.
144. Chattopadhyay S, Raychaudhuri U, Chakraborty R. Artificial sweeteners - a review. *J F Sci Technol.* 2014 Apr;51(4):611–21.
145. Kendig MD. Cognitive and behavioural effects of sugar consumption in rodents. A review. *Appetite.* 2014 Sep;80:41–54.
146. Dauncey MJ, Bicknell RJ. Nutrition and neurodevelopment: mechanisms of developmental dysfunction and disease in later life. *Nut Res Rev.* 1999 Dec;12(2):231–53.
147. Mainardi M, Fusco S, Grassi C. Modulation of hippocampal neural plasticity by glucose-related signaling. *Neural Plast.* 2015 Apr;2015:1-10.
148. Shankar P, Ahuja S, Sriram K. Non-nutritive sweeteners: Review and update. *Nutrition.* 2013 Nov-Dec;29(11-12):1293–99.
149. Werner H, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: Physiological and pathological aspects. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2014 Dec;24(12):1947–53.
150. Hofman MA, Swaab DF. Sexual Dimorphism of the Human Brain: Myth and Reality. *Exp Clin Endocrinol.* 1991;98(2):161–70.
151. O'Connell LA, Ding JH, Hofmann HA. Sex differences and similarities in the neuroendocrine regulation of social behavior in an African cichlid fish. *Horm Behav.* 2013 Aug;64(3):468–76.

## 11. Anexos

### *Anexo 1.*

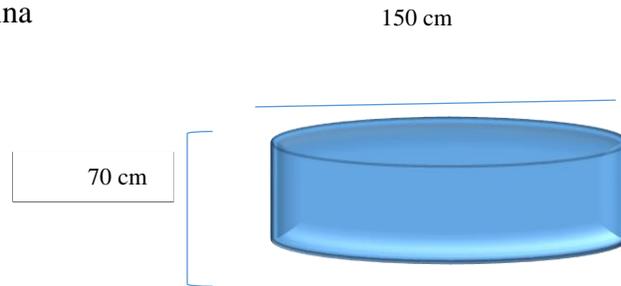
#### *Evaluación de memoria espacial con laberinto de agua de Morris.*

El laberinto de agua es uno de los más empleados en el estudio de la memoria espacial en roedores. En este laberinto los animales tienen que nadar para encontrar una plataforma oculta, el cual fue diseñado por R.G Morris para evaluar la memoria espacial en ratas.

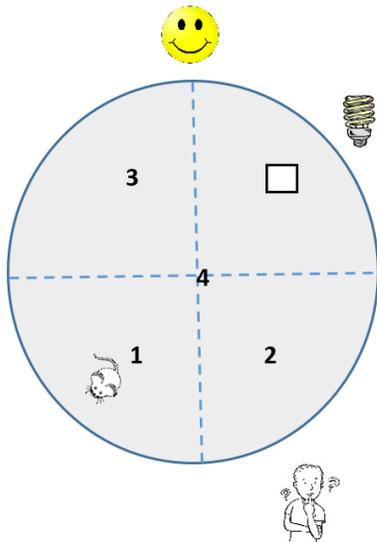
1. En una piscina circular de 150 cm de diámetro y una altura de las paredes de 70 cm, se coloca agua con o sin colorante no tóxico, con temperatura de 22 – 23°C, dentro del contenedor se sitúa una plataforma de 10 x 12 cm.
2. Se divide la piscina en cuatro cuadrantes (de forma imaginaria), se numera como uno al cuadrante inferior izquierdo, dos al cuadrante inferior derecho, tres al cuadrante superior izquierdo y cuatro en el centro; en ese orden se introducirá al ratón. Se colocan dos puntos de referencia, además del evaluador con posición en el exterior del cuadrante uno.
3. Se agarra al ratón de la cola para introducirlo con el hocico apuntando hacia las paredes de la piscina, se inicia colocando al ratón en el cuadrante uno, para que busque la plataforma con un tiempo máximo de 60 segundos, si la encuentra antes se dejará al ratón durante 10 segundos en ella, pero de no encontrarla después de los 60 segundos, se le tomará de la cola y se le deja 10 segundos en la plataforma, posteriormente se le dejará descansar durante 25 segundos fuera del agua y se realizará el mismo procedimiento consecutivamente en los cuadrantes 2, 3 y 4.
4. Finalmente se seca al ratón con una toalla absorbente para regresarlo a su caja.
5. Este procedimiento se realizará durante cinco días consecutivos de la misma forma y a la misma hora.
6. En el sexto día se le realiza la evaluación del aprendizaje, para lo cual se coloca una videocámara para filmar los movimientos del ratón.
7. Para la evaluación, se quita la plataforma de su lugar, luego se introduce al ratón de la misma forma que en el entrenamiento, solo que en esta ocasión en el cuadrante 1 y se le dejará durante un minuto, se le tomará de la cola y se secará con papel absorbente para introducirlo de nuevo a su caja. El procedimiento es el mismo para cada ratón entrenado previamente.
8. Se hace el análisis del video identificando:

- a. Latencia. Tiempo en que tarda en llegar al cuadrante de la plataforma.
  - b. Cruces. Número de veces que paso o cruzo por el cuadrante de la plataforma.
  - c. Tiempo que permanece en el cuadrante de la plataforma. Durante el minuto evaluado se medirá el tiempo que permaneció en el cuadrante donde se encontraba la plataforma.
9. Se hará el promedio y análisis estadístico de los datos durante el entrenamiento y la evaluación.

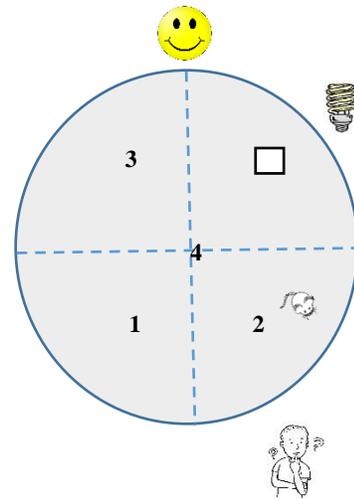
A) Piscina



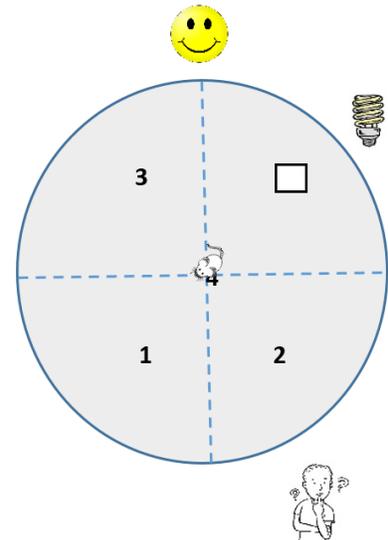
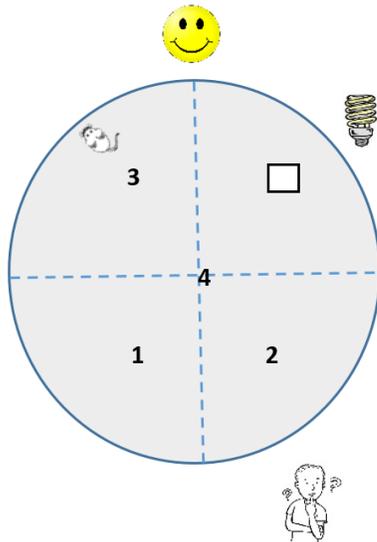
B) Entrenamiento:



1. Colocar al ratón en el cuadrante uno y dejarlo durante 60 segundos máximo para que encuentre la plataforma.



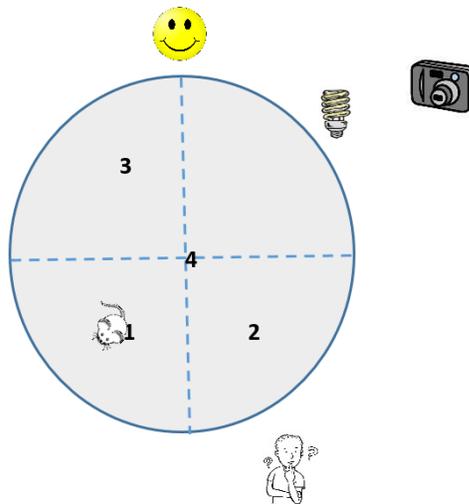
2. Colocar al ratón en el cuadrante dos y dejarlo durante 60 segundos máximo para que encuentre la plataforma.



3. Colocar al ratón en el cuadrante tres y dejarlo durante 60 segundos máximo para que encuentre la plataforma.

4. Colocar al ratón en el punto cuatro (centro) y dejarlo durante 60 segundos máximo para que encuentre la plataforma.

### C) Evaluación



Colocar al ratón en el cuadrante uno y dejarlo que nade durante 60 segundos para que encuentre el área de la plataforma, mientras se filman sus movimientos.

## *Anexo 2.*

### *Soluciones para Western blot.*

- BUFFER DE LISIS.

- 1 mL de IGEPAL NP40 (Octilfenil de polietilenglicol éter) (Sigma – Aldrch)
- 5 mL Tris (tris(hidroximetil)aminometano) 0.5M pH 6.8
- 25  $\mu$ L de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.2M pH8.0
- 100  $\mu$ L de EGTA (etilenenglicol-bis(2-aminoetiletér)N,N,N',N'-ácido tetraácetico) 50 mM pH7.9
- 51  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoetanol (SIGMA – ALDRICH)

Complementar a 50 mL con agua destilada en tubo de 50 mL, envolver con papel aluminio a 4°C. La solución es estable aproximadamente por un mes si se mantiene en condiciones adecuadas, al utilizarlo por cada mL de buffer de lisis se complementara con:

- 20  $\mu$ L de IP50X (inhibidor de proteasas)
- 20  $\mu$ L de PMFS ((fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
- 20  $\mu$ L de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (ortovanadato de sodio)
- 100  $\mu$ L de NaF (500 mM) (fluoruro de Sodio)

- ESTANDARES DE ALBUMINA.

Solución de trabajo: albumina bovina 2mg/mL (Sigma – Aldrich)

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Albúmina (2mg/mL)</b>	<b>Agua destilada</b>
10	50 $\mu$ L	950 $\mu$ L
20	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L
40	200 $\mu$ L	800 $\mu$ L
60	300 $\mu$ L	700 $\mu$ L
80	400 $\mu$ L	600 $\mu$ L
100	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L
120	600 $\mu$ L	400 $\mu$ L

Los tubos con estándares se guardan a 4°C

● SLB-4X (SAMPLE LOADING BUFFER 4-X)

- 3.8 mL de agua destilada
- 1 mL Tris 0.5 M pH 6.8
- 0.8 mL de glicerol
- 0.4 mL de azul de bromofenol al 1%
- 1.6 mL de SDS10% (dodecilsulfato sódico) (Sigma – Aldrich)

Alicuotar 950  $\mu$ L de la mezcla en tubos de 1.5 mL y guardarlos a -20°C. Antes de su uso completar con 50  $\mu$ L de 2- $\beta$ -mercaptoetanol por cada tubo. Cuando el tubo ya tiene 2- $\beta$ -mercaptoetanol se guarda a 4°C.

### Anexo 3.

#### *Soluciones para la preparación de geles de acrilamida.*

- ACRILAMIDA/BIS 30%, 2.67%

- 146 gr de acrilamida (Nota: Altamente neurotóxica, utilizar doble guante y cubrebocas) (Sigma – Aldrich).
- 4 gr de N'N metilene-bis-acrilamida (Sigma – Aldrich)

Disolver en 300 mL de agua destilada, mezclar bien y completar a 500 mL. Filtrar la solución con gasa.

Almacenar en frasco ámbar o envolver en papel aluminio y almacenar a 4°C

- GEL DE CORRIDA 30%.

	<b>7.5%</b>	<b>10%</b>	<b>12%</b>
<b>Agua destilada</b>	4.8 mL	4 mL	3.3 mL
<b>Tris 1.5 M pH 8.8</b>	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
<b>SDS 10%</b>	100 µL	100 µL	100 µL
<b>Acrilamida/bis 30%, 2.67</b>	2.5 mL	3.3 mL	4.0 mL
<b>APS 10%</b>	100 µL	100 µL	100 µL
<b>TEMED</b>	25 µL	25 µL	25 µL
<b>Volumen total</b>	10 mL	10 mL	10 mL

- Tris 1.5 M pH 8.8
  - 18 gr de Tris base. Disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 8.8 y aforar a 100 mL con agua destilada.
  
- Lauril Sulfato de Sodio 10% (SDS 10%) (Sigma – Aldrich).
  - 10 gr de SDS, disolver en 70 mL de agua, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua destilada.
  
- Persulfato de Amonio 10% (APS 10%) (Sigma – Aldrich).
  - 1 gr de Persulfato de Amonio en 10 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.
  
- GEL DE APILAMIENTO 4%.

	<b>4%</b>
<b>Agua destilada</b>	6.1 mL
<b>Tris 0.5 M pH 6.8</b>	2.5 mL
<b>SDS 10%</b>	100 µL
<b>Acrilamida/bis 30%,2.67</b>	1.33 mL
<b>APS 10%</b>	100 µL
<b>TEMED</b>	25 µL
<b>Volumen Total</b>	10 mL

- Tris 0.5 M pH 6.8
  - 6 gr de Tris base. Disolver en 70 mL de agua destilada, ajustar pH a 6.8 y aforar a 100 mL con agua destilada.
- Lauril Sulfato de Sodio 10% (SDS 10%) (Sigma – Aldrich)
  - 10 gr de SDS, disolver en 70 mL de agua, evitando hacer espuma, completar a 100 mL con agua destilada.
- Persulfato de Amonio 10% (APS 10%) (Sigma – Aldrich).
  - 1 gr de Persulfato de Amonio en 10 mL de agua destilada. Almacenar a 4°C.
- BUFFER DE CORRIDA (RUNNING BUFFER) 5X.
  - 15 gr de Tris base (Sigma – Aldrich).
  - 72 gr de glicina (Sigma – Aldrich).

Disolver en 700 mL de agua destilada y completar 1 L, filtrar con gasa doble. Almacenar a T° ambiente.

- BUFFER DE CORRIDA 1X
  - 200 mL de buffer de corrida 5X.
  - 10 mL de SDS 10%
  - 790 mL de agua destilada.

#### *Anexo 4.*

##### *Soluciones para la transferencia de proteínas a membranas de PVDF.*

- BUFFER DE TRANSFERENCIA (25Mm Tris, 192 mM Glicina, 20% metanol).
  - 200 mL de buffer de corrida 5X.
  - 200 mL de metanol (J. T. Baker).
  - 600 mL de agua destilada.
- TBS 10X
  - 80 gr de NaCl (J. T. Baker).
  - 24.2 gr de Tris base (Sigma – Aldrich).

Disolver en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.6 con HCl y ajustar el volumen final a 1 L.

- TBS 1X-TWEEN 20.
  - 100 mL de TBS 10
  - 899 mL 900 mL de agua destilada
  - 1 mL de tween-20 (concentración final al 0.01%) (Sigma – Aldrich).

### ***Anexo 5. Preparación de anticuerpos***

- Leche al 5%.
  - 100 mL de TBS-Tween.
  - 5 gr de leche baja grasa.

### ***Anticuerpos para incubación de membranas***

- Rb pAb to IGF2 (Abcam) (anticuerpo primario).
  - 10 mL de leche sin grasa al 5%.
  - 5  $\mu$ L de IGF-IIR conejo.
- IGF-IIR (H300) (policlonal de conejo IgG) (anticuerpo primario).
  - 10 mL de leche baja en grasa al 5%.
  - 40  $\mu$ L de IGF-IIR conejo.
- Anti-rabbit IgG VeriBlot for IP secondary antibody (AP) (anticuerpo secundario)
  - 10 mL de albumina al 1%
  - 5  $\mu$ L de anti-conejo.