



---

---

**Universidad Autónoma del Estado de México**

Facultad de Medicina

Departamento de Estudios Avanzados

Maestría en Ciencias de la Salud

**“Cambios cognitivos de la memoria asociados al consumo prolongado de edulcorantes no nutritivos en un modelo murino”**

**TESIS**

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

Presenta:

M.C. Miriam Nava González

Comité de Tutores:

Directora de Tesis:

Irazú Contreras García, Ph.D.

Co-Director:

José Antonio Estrada Guadarrama, Ph.D.

Asesora:

Dra. en C.S. María del Sagrario López Meza

Toluca, Estado de México 2023

## ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Marco teórico .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Edulcorantes .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Clasificación de edulcorantes .....	3
1.1.2. Regulación de edulcorantes.....	6
1.1.3. Edulcorantes no nutritivos aprobados y disponibles en México.....	6
1.1.4. Sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol.....	7
<b>1.2 Cognición y funciones cognitivas .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Memoria .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Tipos de memoria .....	10
<b>1.4. Plasticidad sináptica .....</b>	<b>12</b>
1.4.3. Plasticidad, memoria y aprendizaje .....	12
<b>1.5. Métodos para evaluar la memoria .....</b>	<b>12</b>
1.5.1. Prueba conductual laberinto de Barnes.....	13
<b>1.6. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).....</b>	<b>14</b>
1.6.1. Relación del BDNF con el aprendizaje y la memoria.....	14
1.6.2. Señalización del BDNF en el aprendizaje y la memoria.....	15
<b>1.7. Edulcorantes y sus potenciales efectos en la cognición .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Planteamiento del Problema.....</b>	<b>19</b>
<b>3. Hipótesis .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>21</b>
<b>5. Justificación.....</b>	<b>22</b>
<b>6. Materiales y Métodos .....</b>	<b>23</b>
<b>6.1. Diseño de Estudio .....</b>	<b>23</b>
<b>6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación .....</b>	<b>23</b>
<b>6.3. Procedimientos.....</b>	<b>23</b>
6.3.1. Crianza de ratones .....	24
6.3.2. Suplementación con edulcorantes .....	24
6.3.3. Determinación de la ganancia de peso, consumo de bebida y alimento.....	24
6.3.4. Evaluación del aprendizaje y la memoria .....	24
6.3.5. Disección del tejido cerebral.....	26
6.3.6. Análisis de la expresión de BDNF mediante western blot. ....	26
<b>6.4. Variables de Estudio.....</b>	<b>27</b>

<b>6.5. Implicaciones Bioéticas .....</b>	<b>30</b>
<b>6.6. Recolección de Datos .....</b>	<b>30</b>
<b>6.7. Análisis Estadístico .....</b>	<b>30</b>
<b>7. Resultados .....</b>	<b>31</b>
<b>7.1. Carta de envío .....</b>	<b>31</b>
<b>7.2. Resumen del artículo .....</b>	<b>32</b>
<b>8. Discusión.....</b>	<b>33</b>
<b>9. Conclusiones.....</b>	<b>35</b>
<b>9. Referencias .....</b>	<b>36</b>

## **Resumen**

Actualmente, el mundo se enfrenta a una pandemia de obesidad y diabetes. El consumo excesivo de azúcar se ha asociado como un determinante de esta pandemia. En consecuencia, los edulcorantes no nutritivos (ENN) tales como sucralosa y glucósidos de esteviol han surgido como una atractiva estrategia para mitigar los riesgos en la salud. Sin embargo, existe una preocupación acerca de los posibles efectos de su consumo prolongado en la salud cognitiva. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar los posibles cambios en el aprendizaje, la memoria y la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un modelo murino después de la suplementación prolongada con ENN en sus presentaciones comerciales. Para este fin, sesenta y cuatro ratones BALB/c fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos conformados por 8 machos y 8 hembras cada uno: (1) control, (2) sucralosa SUCRA, (3) glucósidos de esteviol STV y (4) sacarosa SUC. El periodo de suplementación consistió en seis semanas; la ganancia de peso y el comportamiento alimentario fueron monitoreados semanalmente. Posteriormente, los cambios cognitivos y la expresión del BDNF fueron evaluados mediante el laberinto de Barnes y western blot, respectivamente. Nuestros resultados demuestran que los machos y hembras del grupo STV tuvieron menor ganancia de peso en comparación con el control. Así mismo, el consumo de bebida fue menor en los machos y hembras del grupo STV al finalizar la suplementación, mientras que el consumo de alimento de los machos del grupo SUCRA y STV fue menores en comparación con el control. Por otra parte, el laberinto de Barnes y el índice cognitivo demostraron que tanto machos como hembras de los grupos SUCRA y STV emplearon principalmente estrategias no dependientes del hipocampo en comparación con el control, indicando déficits cognitivos a corto y largo plazo. Finalmente, no encontramos diferencias significativas en la expresión del BDNF entre los grupos suplementados con ENN y el control. No obstante, es necesario evaluar la expresión de su receptor TrkB y su forma fosforilada pTrkB. En conjunto, estos datos sugieren que el consumo prolongado de ENN afecta las funciones cognitivas de memoria.

**Palabras clave: edulcorantes no nutritivos, aprendizaje y memoria, factor neurotrófico derivado del cerebro.**

## Abstract

Currently, the world is facing an obesity and diabetes pandemic. Excessive sugar consumption has been associated as a determinant of this pandemic. Consequently, non-nutritive sweeteners (NNS) such as sucralose and steviol glycosides have emerged as an attractive strategy to mitigate health risks. However, there is concern about the possible effects of its prolonged consumption on cognitive health. Therefore, the aim of this work was to determine the possible changes in learning, memory and the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in a murine model after prolonged supplementation with ENN in their commercial brands. For this purpose, sixty-four BALB/c mice were randomly divided into four groups consisting of 8 males and 8 females each group: (1) control, (2) SUCRA sucralose, (3) STV steviol glycosides and (4) sucrose SUC. The supplementation period consisted of six weeks; Weight gain and eating behavior were monitored weekly. Subsequently, cognitive changes and BDNF expression were evaluated using the Barnes maze test and western blot, respectively. Our results show that males and females in the STV group had less weight gain compared to the control. Likewise, water consumption was lower in males and females in the STV group at the end of supplementation period, while food consumption in males in the SUCRA and STV group was lower compared to the control. On the other hand, the Barnes maze and the cognitive index demonstrated that both males and females in the SUCRA and STV groups mainly used non-hippocampal-dependent strategies compared to the control, indicating short and long-term cognitive deficits. Finally, we found no significant differences in BDNF expression among the ENN supplemented groups compared to the control group. However, it is necessary to evaluate the expression of its receptor TrkB and its phosphorylated form pTrkB. Our results suggest that long-term consumption of ENN may affect cognitive memory functions.

**Keywords: non-nutritive sweeteners, learning and memory, brain-derived neurotrophic factor.**

## **1. Marco teórico**

### ***1.1. Edulcorantes***

Los azúcares son moléculas cuyas propiedades más importantes son el aporte de energía y del sabor dulce a los alimentos. Tradicionalmente, la sacarosa se ha utilizado como edulcorante en los alimentos durante años. No obstante, debido a los efectos adversos bien conocidos del consumo excesivo de la sacarosa, la industria alimentaria ha introducido edulcorantes no nutritivos (ENN) en sus productos como sustitutos de la sacarosa, la cual ha sido por años considerada como el edulcorante nutritivo (EN) más utilizado [1]. La característica más importante de los ENN definitivamente es su poder edulcorante, el cual se mide con respecto a la sacarosa, ya que es considerada como una referencia. En este sentido, los edulcorantes se definen como aditivos alimentarios, los cuales son incorporados en los alimentos procesados industrialmente con la finalidad de proporcionar un sabor dulce y disminuir el aporte energético [1,2]. Por lo tanto, los ENN se han convertido en uno de los grupos más relevantes de los aditivos alimentarios y su uso se ha incrementado en las últimas dos décadas, principalmente en personas que buscan controlar su peso corporal y concentraciones de glucosa en sangre [2].

#### ***1.1.1. Clasificación de edulcorantes***

Los edulcorantes se pueden clasificar de diferentes formas, ya sea considerando sus propiedades intrínsecas o su origen. Las clasificaciones más comunes se basan en su valor nutritivo, su naturaleza u origen y el poder edulcorante.

Los edulcorantes se han clasificado por su valor nutritivo como EN y ENN. Los EN, por lo general, son azúcares simples y entre los más importantes se encuentran monosacáridos como sorbitol, manitol, xilitol, disacáridos como la sacarosa, el maltitol y el lactitol [2,3]. Los EN a base de monosacáridos y disacáridos tienen un aporte energético de 4 kcal/g, mientras que los polioles proporcionan en promedio 2 kcal/g [4]. Estos compuestos se pueden encontrar de forma natural en las frutas, verduras y productos lácteos; así mismo, pueden ser adicionados a los alimentos durante su procesamiento o preparación. Los EN que se encuentran frecuentemente y de forma natural en los alimentos son: glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y maltosa.

Por otra parte, los ENN son sustitutos bastante populares de la sacarosa, ya que imparten fuertes efectos edulcorantes sin aportar energía en la dieta. Por lo tanto, desde la década de 1950, estos compuestos se convirtieron en una excelente alternativa para perder peso [5]. Dentro de los ENN más conocidos se encuentran el acesulfame K, el aspartame, el neotame, el advantame, la sacarina, la sucralosa y los glucósidos de esteviol.

Otra clasificación de los edulcorantes se basa en la división de acuerdo con su naturaleza u origen, dando lugar a los edulcorantes naturales y artificiales o sintéticos. La búsqueda de sustitutos de la sacarosa a partir de fuentes naturales condujo al descubrimiento de una amplia gama de compuestos que poseen un alto contenido de azúcares y polioles. Los edulcorantes naturales comprenden compuestos como azúcares, alcoholes de azúcares o polioles, aminoácidos, proteínas, glucósidos y algunos polifenoles [6]. Dentro de los azúcares se puede encontrar a la fructosa y la glucosa como dos de los monosacáridos más empleados como edulcorantes en la industria alimentaria y por otra parte, la trealosa y la tagatosa son dos edulcorantes que recientemente han sido aprobados como sustitutos de la sacarosa. Con respecto a los polioles, es importante destacar que son hidratos de carbono que se encuentran naturalmente en frutas, verduras, hongos y algas; los cuales también se han adoptado como sustitutos de la sacarosa en los últimos años [7]. Los polioles ofrecen dos ventajas principales como aditivos alimentarios, la primera está relacionada con un menor aporte energético, lo cual es importante para controlar el índice glucémico y la segunda es que no favorecen la formación de caries dental. Así mismo, los glucósidos son compuestos extraídos a partir de plantas como la *Stevia rebaudiana Bertoni* en la cual se encuentran principalmente dos compuestos comercialmente relevantes; el esteviósido y rebaudiósido A [8].

Finalmente, el poder edulcorante es considerado como otro criterio para clasificar a los edulcorantes. Es importante mencionar que dicho poder edulcorante se mide con relación a la sacarosa como referencia. De esta manera, se considera que una solución de sacarosa a una concentración de 30 g/L a 20°C tiene un poder edulcorante de 1 [3]. Bajo esta premisa, los azúcares y polioles como el sorbitol y el xilitol, son considerados de baja potencia ya que su valor se aproxima a 1, mientras que los edulcorantes como la sacarina y el aspartame presentan valores por encima de 10, por lo que son considerados como edulcorantes de alta potencia [2]. La tabla 1 muestra un resumen de la clasificación de los edulcorantes en función de su aporte energético, naturaleza/origen y poder edulcorante.

**Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes.**

<b>Aporte energético</b>			<b>Naturaleza/origen</b>		<b>Poder edulcorante</b>	<b>Referencias</b>
<b>Nutritivos</b>			<b>Naturales</b>		<b>Baja potencia</b>	
<b>Azúcares</b>	<b>Monosacáridos</b>	<b>Disacáridos</b>	<b>Glucosídicos</b>	<b>No glucosídicos</b>		
Glucosa	Eritrol	Isomaltosa	Glucosa	Maltitol	Sorbitol 60	
Fructosa	Manitol	Lactitol	Fructosa	Lactitol	Manitol 50	
Galactosa	Sorbitol	Maltitol	Galactosa	Isomaltitol	Ciclotame 20-45	
	Xilitol	Sacarosa	Lactosa	Taumatina	Fructosa 1.70	[9-13]
			Maltosa	Neohespiridina	Sacarosa 1	
			Manitol	dihidrochalcona	Glucosa 0.70	
			Sorbitol		Lactosa 0.25	
			Xilitol			
<b>No nutritivos</b>			<b>Sintéticos</b>		<b>Alta potencia</b>	
<b>Naturales</b>		<b>Artificiales</b>				
Glicirricina		Acesulfame	Sacarina		Advantame 37000	
Esteviósido		Alitame	Ciclotame		Neotame 7000-13000	
Taumatina		Ciclotame	Aspartame		Taumatina 3500	
Neohespiridina		Sucralosa	Sucralosa		Neohespiridina	[9-13]
dihidrochalcona		Sacarina	Neotame		dihidrochalcona 1500-1800	
		Aspartame	Advantame		Sucralosa 400-800	
			Alitame		Esteviósido 300	



### *1.1.2. Regulación de edulcorantes*

La legislación del uso de ENN en productos alimenticios se adoptó inicialmente en la Unión Europea en el año de 1994, en la cual se incluyeron los niveles máximos permitidos de los ENN en categorías específicas de alimentos [14]. De acuerdo con el reglamento europeo, todos los aditivos alimentarios deben someterse a evaluaciones de seguridad por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) antes de que se apruebe su uso. En los Estados Unidos de América, el uso de estos aditivos alimentarios se encuentra regulado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), dichos aditivos deben someterse a una revisión previa a su comercialización y finalmente son aprobados por la FDA antes de que sean empleados en los procesos de manufactura de alimentos. Es importante mencionar que los ENN que se encuentran bajo el estatus de Reconocidos Generalmente como Seguros (GRAS), no son sometidos a dichas revisiones y aprobaciones. En este sentido, la determinación del sistema GRAS se basa en procedimientos científicos conducidos por expertos calificados para evaluar la seguridad considerando el uso previsto de los edulcorantes [15]. Adicionalmente, las empresas pueden hacer una determinación GRAS independiente para un aditivo, ya sea notificando o no a la FDA. No obstante, se debe demostrar que cumplen con los estándares de seguridad, los cuales están definidos por la FDA. Así mismo, existen organismos adicionales que intervienen en la regulación de estos aditivos alimentarios a nivel mundial, tales como la Comisión del *Codex Alimentarius* (CCA) fundado por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [16]. En México, la Secretaría de Salud (SSA), de acuerdo con la Ley General de Salud, regula, controla y fomenta el uso de los edulcorantes, por medio de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), establecido en el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios [17].

Para cada edulcorante se ha establecido un consumo diario aceptable (ADI), en mg/kg de peso, el cual corresponde a la cantidad del aditivo que se puede ingerir diariamente a lo largo de la vida sin riesgos apreciables para la salud. Para determinar si el edulcorante podría ser aprobado para su uso, el ADI debe estar 100 veces por debajo de la dosis del edulcorante que causa toxicidad en modelos animales. También se puede fijar el consumo humano típico del edulcorante como Consumo Estimado Diario (EDI) y éste debe encontrarse por debajo del ADI. Si el EDI es inferior al ADI, el edulcorante se considera para su consumo humano [17,18].

### *1.1.3. Edulcorantes no nutritivos aprobados y disponibles en México*

Conforme a la SSA, la NOM-218-SSA1-2011 y el acuerdo mediante el cual se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias, los ENN aprobados para su uso como aditivos alimentarios se encuentran: aspartame, acesulfame K,

aspartame-acesulfame, sucralosa, sacarina, glucósidos de esteviol, ciclamatos, alitame, neotame, neohespiridina dihidrochalcona, eritrol, isomaltol, lactitol, maltitol, isomaltol, manitol, sorbitol, taumatina, xilitol, advantame y alulosa [19,20]. Dichos edulcorantes se pueden encontrar en diversos productos procesados industrialmente y que actualmente están disponibles comercialmente.

#### 1.1.4. Sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol

En el presente estudio se trabajarán con las presentaciones comerciales de sucralosa y glucósidos de esteviol como ENN. Adicionalmente, se utilizará sacarosa como EN para realizar comparaciones entre EN y ENN. Por lo tanto, a continuación, se describirán las propiedades más relevantes de los edulcorantes mencionados anteriormente.

##### *Sacarosa*

La sacarosa, también conocida como azúcar de mesa, es un EN que aporta 4 kcal/g y se considera que es el hidrato de carbono de menor peso molecular. Consiste en un disacárido conformado por el 50% de glucosa y 50% de fructosa, las cuales están unidas por un enlace O-glucosídico (figura 1) [21]. La sacarosa desempeña un papel importante en la dieta, pero su consumo excesivo se ha relacionado con problemas de salud, tales como caries dental, obesidad, diabetes *mellitus* tipo 2, ya que conduce a un rápido aumento de las concentraciones de glucosa en sangre, así como enfermedades cardiovasculares [22]. Por lo tanto, su consumo excesivo tiene importantes implicaciones en la salud, por lo que se han empleado diferentes edulcorantes con la finalidad de sustituir a la sacarosa.

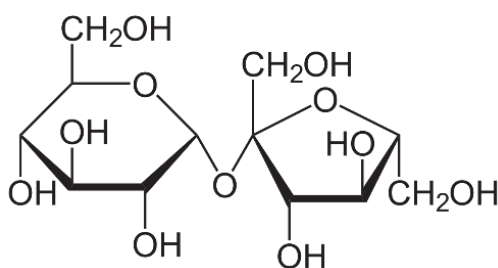


Figura 1. Estructura química de la sacarosa [20].

##### *Sucralosa*

La sucralosa es un ENN que fue descubierto en 1976 por la empresa británica Tate & Lyle, su elaboración se lleva a cabo a partir de la sacarosa mediante un proceso químico que sustituye tres átomos de cloro por tres grupos funcionales hidroxilo en la estructura química de la sacarosa (figura 2) [23]. Desde su aprobación en 1998 por la FDA, se ha empleado en diferentes alimentos y bebidas. Este aditivo tiene un poder edulcorante de 400-800 y no aporta valor energético en los alimentos. Dentro de sus propiedades fisicoquímicas destacan su elevada solubilidad acuosa, >25%, estabilidad

en un intervalo amplio de pH y temperatura [2,3]. Según la EFSA, la ADI de la sucralosa es de 5 mg/kg de peso/día. La absorción de la sucralosa se considera alrededor del 9-22% y la principal vía de eliminación es por heces fecales, sin evidencia de su descomposición. El metabolismo de la sucralosa se ha relacionado con la aparición de migraña, malestar intestinal, e inhibición de las bacterias del colon cuando se consume en cantidades elevadas [3,23]. No obstante, después de una intensa evaluación de seguridad, la sucralosa ha sido aprobada en más de 35 países alrededor del mundo, por lo que es incorporada como aditivo alimentario en una gran variedad de productos.

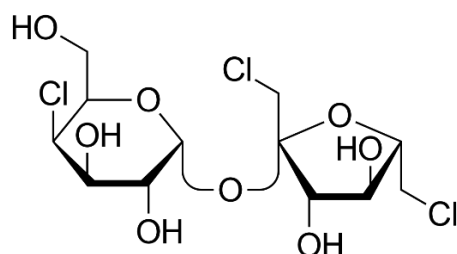


Figura 2. Estructura química de la sucralosa [22].

#### *Glucósidos de esteviol*

En los últimos años, la demanda de los consumidores de edulcorantes extraídos de fuentes naturales condujo a la obtención de los glucósidos de esteviol, los cuales son los más populares entre la población. Los glucósidos de esteviol (figura 3) consisten en mezclas de diferentes compuestos, entre los principales se encuentran los esteviósidos (5-10%), rebaudiósido A (5%), rebaudiósido C (1%), dulcósido A (0.5%), rebaudiósidos D, E y F (0.2%) [3]. La combinación de estas moléculas presenta un poder edulcorante superior a 300 veces el de la sacarosa, su ADI es de 4 mg/kg de peso/día y su aporte energético es insignificante. Estas moléculas son metabolizadas por las bacterias presentes en colon y finalmente se excretan por medio de la orina. Los glucósidos de esteviol son relativamente estables al calor y en un rango de pH de 2-9 [24]. Recientemente, existen preocupaciones sobre la potencial alteración endócrina de estos compuestos, convirtiéndose en un tema controversial ya que estudios afirman que los glucósidos de esteviol tienen efectos disruptivos, por lo cual, se sugieren investigaciones más profundas al respecto.

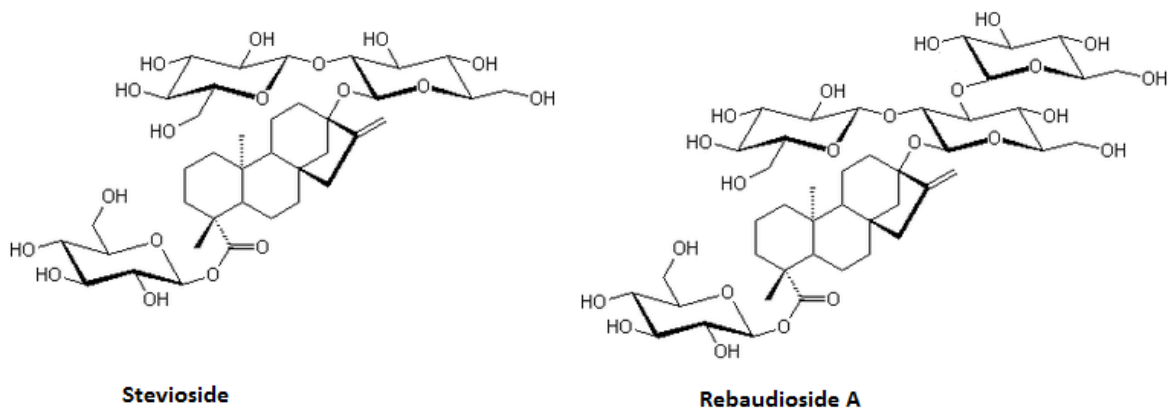


Figura 3. Estructura química del esteviósido y rebaunósido A presentes en los glucósidos de esteviol [24].

### ***1.2 Cognición y funciones cognitivas***

La cognición es conjunto de procesos mentales internos mediante los cuales la información se transforma, resume, elabora, almacena, recuerda o se utiliza, por lo cual constituye la base de cómo las personas perciben, recuerdan, hablan, toman decisiones y resuelven problemas [25]. Por lo tanto, la cognición es equivalente a la capacidad de procesar la información a partir de la percepción y la experiencia, desencadenando procesos como el pensamiento, la atención, la memoria y el aprendizaje.

Por otra parte, las funciones cognitivas son procesos mentales que permiten desempeñar cualquier tarea, involucran la capacidad de prestar atención y concentrarse, aprender cosas nuevas, recordar y tomar decisiones [26]. Dichas funciones, tienen un soporte en la corteza cerebral y cada función está relacionada con un área específica del cerebro. Así mismo, las funciones cognitivas pueden ser básicas tales como la percepción, la atención y la memoria, o en su caso, pueden ser complejas como el lenguaje y las funciones ejecutivas [27]. En este sentido, la memoria es una de las funciones cognitivas más estudiadas.

### ***1.3. Memoria***

La memoria es el proceso mediante el cual la información adquirida se transforma en conocimiento que se almacena para emplearse cuando es necesario. Del mismo modo, la memoria es una función cognitiva que se relaciona estructural y funcionalmente con el sistema nervioso central (SNC), se caracteriza por el almacenamiento y la reposición de la información, así como el aprendizaje de experiencias previas [28]. Las principales estructuras cerebrales involucradas con la memoria son el

hipocampo, el tálamo, la amígdala del lóbulo temporal, los cuerpos mamilares y el cerebelo. Adicionalmente, existen diferentes neurotransmisores implicados en la memoria, entre los que destacan dopamina, acetilcolina y glutamato.

### *1.3.1. Tipos de memoria*

La memoria puede clasificarse en dos, la primera es de acuerdo al tiempo de almacenamiento que es efectiva e incluye a la memoria a corto plazo y memoria a largo plazo. Así mismo, la segunda puede categorizarse de acuerdo con la naturaleza de la información almacenada, incluyendo la memoria declarativa o explícita y la memoria no declarativa, implícita o de procedimiento [29].

#### *Memoria a corto plazo*

La memoria a corto plazo (MCP), también es conocida como primaria, inmediata, activa o de trabajo [30]. Este tipo de memoria permite mantener la información por poco tiempo, que puede ir de segundos a minutos y tiene un sistema para almacenar de capacidad limitada. Generalmente menos de una docena de dígitos. Necesita de repetición continua basada en la ejecución y que permite realizar actividades cognitivas básicas e inmediatas para estímulos que acaban de ser percibidos [31]. Un ejemplo típico es el número de teléfono que retenemos en la mente durante el corto tiempo que necesitamos para marcarlos [30,32]. Se sabe que este tipo de memoria representa la parte activa de la memoria a largo plazo, manteniendo activas experiencias anteriores en la conciencia [29]. La MCP está basada en actividad y cambios eléctricos, así como procesos moleculares en redes neuronales que procesan la información, como consecuencia de la repetición continua de la experiencia. Los cambios neuronales de la MCP persisten activando mecanismos de plasticidad cerebral produciendo cambios estructurales en las sinapsis para consolidar la denominada memoria a largo plazo [32].

#### *Memoria de trabajo*

La memoria de trabajo es un elemento cognitivo que permite mantener la información el tiempo suficiente como para llevar a cabo acciones secuenciales [28]. En la actualidad, se sabe que está constituida por dos sistemas principalmente; un código acústico-verbal para almacenar información proveniente del lenguaje, así como un código viso-espacial responsable de manejar las imágenes mentales de objetos visuales y de la ubicación de los objetos en el espacio. Ambos sistemas son coordinados por un tercer sistema llamado proceso de control ejecutivo, el cual es el administrador central, asignando recursos de control de atención a los sistemas verbal y viso-espacial [28-30]. De esta manera, el funcionamiento de la memoria de trabajo involucra áreas sensoriales primarias, del lóbulo prefrontal, núcleo dorso-mediano, tálamo y neocórtex, asociadas a la repetición de información espacial y de objetos [28].

### *Memoria a largo plazo*

La memoria a largo plazo (MLP) almacena información durante un tiempo variable que puede ir desde minutos hasta tiempos indefinidos, se mantiene mediante cambios estables y permanentes en las conexiones neuronales que se extienden por todo el cerebro, además; es poco susceptible a las interferencias [30]. Mientras que la MCP codifica la información acústicamente, la MLP la codifica semánticamente. El hipocampo es esencial en aprender nueva información y consolidar desde la MCP a la MLP [32]. La MLP se subdivide en memoria declarativa o explícita y memoria no declarativa, implícita o procedimental [29,31]

### *Memoria declarativa o explícita*

Se conoce a la memoria declarativa o explícita como la memoria consciente, que se encarga del reconocimiento consciente de lugares, personas, objetos, hechos y sucesos; la cual se almacena en la corteza prefrontal. En el hipocampo se transforman en recuerdos a largo plazo y se archivan en distintas zonas de la corteza; por lo tanto, un daño en estas zonas puede afectar la formación de nuevos recuerdos de la memoria declarativa a largo plazo [30]. La memoria declarativa se subdivide en memoria semántica y memoria episódica [28].

El conocimiento de la memoria semántica (objetiva), comprende la conservación de los hechos, el conocimiento objetivo y el tipo de conocimiento que se adquiere en el colegio y los libros. En la formación de un nuevo conocimiento semántico está involucrada la corteza perirhinal y la región neocortical que proyecta hacia el hipocampo. Mientras que la memoria episódica o autobiográfica almacena los acontecimientos y la experiencia personal, su formación y recuperación dependen del hipocampo [29,31].

### *Memoria no declarativa o implícita*

La memoria implícita o procedimental es llamada memoria inconsciente y consiste en el aprendizaje de hábitos, habilidades, sensibilización y el condicionamiento clásico; al igual que destrezas perceptivas y motoras como andar en bicicleta o manejar un automóvil, se almacena en el cerebelo, en el cuerpo estriado y en la amígdala [29]. La sensibilización es parte de un aprendizaje no asociativo que ocurre por un único estímulo y el condicionamiento clásico que es un tipo de aprendizaje asociativo a estímulos condicionados y no condicionados [31]. Este tipo de memoria es de carácter automático, ya que se recuerda cuando se realiza la acción, sin esfuerzo consciente, por lo que un claro ejemplo es cuando se habla, ya que se hace sin recurrir de forma consciente al recuerdo de cómo hablar.

#### ***1.4. Plasticidad sináptica***

Una de las propiedades más importantes del cerebro en los mamíferos es la plasticidad, es decir, la capacidad de la actividad neuronal originada por una experiencia para cambiar la función del circuito neuronal. La plasticidad sináptica está relacionada estrechamente con la modificación dependiente de la eficacia de la transmisión sináptica en sinapsis generadas con anterioridad [33]. La plasticidad sináptica directamente regula la actividad de neuronas presinápticas y postsinápticas, induciendo cambios en el número de neurotransmisores en la membrana postsináptica, en la cantidad de neurotransmisores liberados de una neurona presináptica en el proceso de sinapsis o influyendo en la sensibilidad del receptor a los neurotransmisores que fueron liberados [34].

La plasticidad sináptica puede clasificarse en dos: a corto plazo y a largo plazo. La plasticidad sináptica a corto plazo se genera en periodos de tiempo que van desde un segundo hasta minutos, por su parte, la plasticidad sináptica a largo plazo cambia la eficacia de la sinapsis durante horas o años.

##### ***1.4.3. Plasticidad, memoria y aprendizaje***

Debido a que la plasticidad sináptica es clave para la función del cerebro, también resulta fundamental para la comprensión de los mecanismos del aprendizaje y la memoria, ya que los recuerdos están representados por redes neuronales que se encuentran conectadas en las sinapsis. Actualmente, se sabe que los recuerdos se almacenan como alteraciones en la fuerza de las conexiones sinápticas entre neuronas [35]. Por lo tanto, los cambios en la eficacia sináptica se han monitoreado durante horas a meses y se ha observado que el aumento en las respuestas postsinápticas, también conocido como potenciación a largo plazo (LTP), es el mecanismo celular empleado para almacenar información en circuitos neuronales durante tiempos prolongados. Así mismo, la disminución de la fuerza en la sinapsis denominada depresión a largo plazo (LTD), también se encuentra involucrada en el almacenaje de información [34]. Por lo tanto, la LTP y LTD se encuentran relacionadas con la memoria y aprendizaje. La plasticidad y la memoria vinculan los eventos celulares y los circuitos neuronales con el comportamiento, por lo que la LTP y LTD son la base directa de los cambios del comportamiento asociados con la memoria y a su vez con el aprendizaje.

#### ***1.5. Métodos para evaluar la memoria***

Durante las últimas décadas, la comunidad científica ha desarrollado y estandarizado una gran variedad de pruebas que exploran el estado de salud mental de los animales en busca de información de su capacidad para percibir desde un estímulo hasta evidenciar cuadros de depresión [36]. Por otra parte, el desarrollo de pruebas para evaluar la memoria requiere de experimentos en animales para que posteriormente se puedan trasladar a ensayos clínicos en humanos. Por lo tanto, se han propuesto

diferentes métodos que evalúan procesos cognitivos análogos en animales y humanos. En este sentido, existen modelos para evaluar la eficiencia de la capacidad de la memoria, entre los más importantes se encuentran: la prueba de reconocimiento de objetos y la prueba de reconocimiento social, que evalúan la memoria no espacial; la prueba de evitación pasiva, que evalúa la memoria y el aprendizaje adquirido; la prueba de evitación activa, que permite examinar funciones cognitivas complejas así como la adquisición y consolidación de la memoria; además de la prueba de condicionamiento aversivo al sabor, la prueba del sobresalto por el miedo, el laberinto acuático de Morris y el laberinto de Barnes, que evalúan la memoria espacial [37,38].

### 1.5.1. Prueba conductual laberinto de Barnes

El laberinto de Barnes es una prueba de comportamiento basada en tierra firme desarrollada por Carol Barnes en 1979 para evaluar la memoria espacial en ratas [39]. Consiste en una plataforma circular elevada con agujeros alrededor del perímetro; los animales de estudio emplean señales visuales externas al laberinto para localizar la caja de escape que se encuentra debajo del laberinto, lo cual les permite escapar de las luces y señales auditivas que producen estrés [40]. La figura 4 muestra la representación esquemática del laberinto de Barnes.

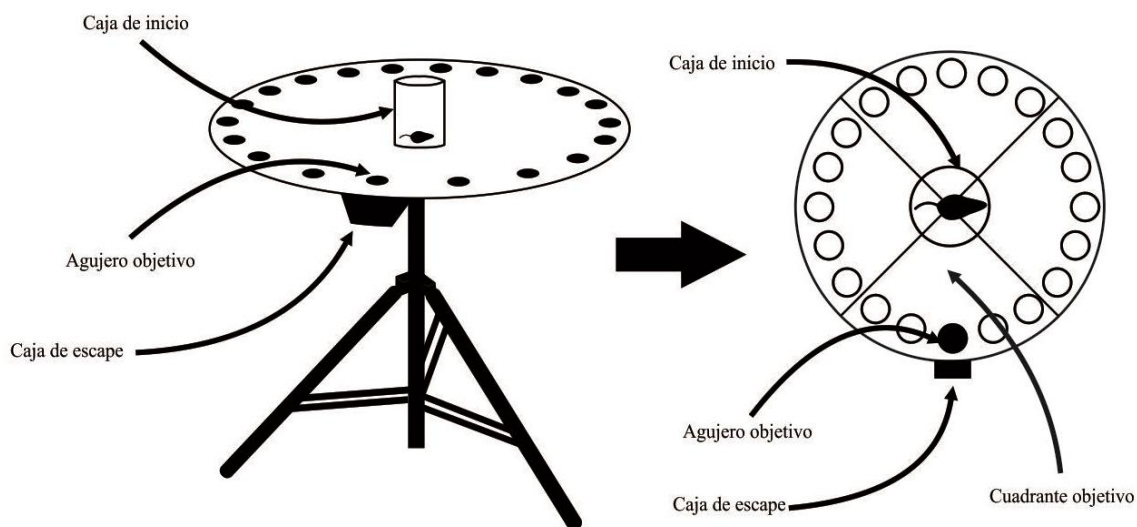


Figura 4. Representación esquemática del laberinto de Barnes. Lado derecho vista superior. Constructo del autor.

A diferencia del laberinto acuático de Morris, el laberinto de Barnes no requiere que los ratones naden, por lo tanto, puede ser menos estresante y exigente físicamente. En comparación con el laberinto de brazos radiales, en el laberinto de Barnes no se requiere restricción de alimentos, por lo que el rendimiento no está condicionado por las diferencias en la motivación debido a la variación en el



hambre [41]. El laberinto de Barnes se basa en la suposición de que el animal de estudio colocado en el entorno aversivo debe aprender y recordar la ubicación de la caja de escape como un refugio oscuro y seguro [42]. En este sentido, la prueba consiste en diferentes fases, incluyendo una fase de habituación en la que los animales se introducen en el medio ambiente de la prueba. Posteriormente, hay una fase de aprendizaje o adquisición, durante la cual los animales aprenden la ubicación de la caja de escape. Finalmente, la fase de sondeo o retención permite medir el aprendizaje espacial, la recuperación de la memoria y la flexibilidad cognitiva [43]. Considerando lo anterior, el laberinto de Barnes se ha empleado en diferentes modelos animales para evaluar memoria y aprendizaje; desde modelos de enfermedad de Alzheimer [44], hasta fármacos que pueden mejorar o deteriorar el aprendizaje y la memoria espacial [45].

### ***1.6. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)***

Los factores de crecimiento son proteínas implicadas en el crecimiento de las células, es decir, pueden promover o inhibir la mitosis y afectar la diferenciación celular mediante su unión a receptores localizados en la superficie celular [46]. Estas moléculas tienen importantes implicaciones en el neurodesarrollo debido a sus diferentes funciones que están relacionadas con el mantenimiento del desarrollo normal del cerebro. En este sentido, en el cerebro se expresa un grupo de cuatro principales proteínas denominadas neurotrofinas, las cuales comprenden al factor de crecimiento nervioso (NGF), BDNF, neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofina 4 (NT-4). Estas proteínas desempeñan funciones importantes en la supervivencia, el mantenimiento y el crecimiento de las neuronas en el SNC y sistema nervioso periférico (SNP) [47].

Particularmente, el BDNF es un péptido de 14 kDa que es sintetizado a partir del precursor pro-BDNF, que, a su vez, es un péptido de 32 kDa sintetizado en el retículo endoplásmico y que madura en el aparato de Golgi o en vesículas de secreción, para posteriormente dar lugar a la formación del BDNF [48]. Así mismo, el BDNF contribuye con la supervivencia de neuronas como las dopaminérgicas mesencefálicas, neuronas colinérgicas septales y neuronas GABAérgicas estriatales. Adicionalmente, el BDNF está implicado en la modulación de la transmisión sináptica excitatoria e inhibitoria, así como la plasticidad sináptica [49,50].

#### ***1.6.1. Relación del BDNF con el aprendizaje y la memoria***

Actualmente, se sabe que la cognición está asociada al entendimiento del medio que rodea a un individuo y el comportamiento que dicho individuo tiene dentro del mismo; por lo que incluye diferentes habilidades cognitivas tales como el aprendizaje, el pensamiento, el razonamiento, la memoria, la toma de decisiones y la atención. En este sentido, el BDNF es una de las proteínas más

estudiadas como biomarcador en la investigación de la adquisición, consolidación y almacenamiento a largo plazo de diferentes tipos de memoria.

El BDNF se expresa principalmente en el hipocampo, aunque también en estructuras como la corteza, la amígdala y el hipotálamo. Estudios *in vitro* han demostrado que la aplicación de BDNF provoca cambios rápidos en la transmisión sináptica tanto en la sinapsis excitatoria como inhibitoria [51]. También se ha demostrado en estudios *in vivo* que después de la administración de oligonucleótidos de BDNF o anticuerpo anti-BDNF en ratones afecta la formación de la memoria espacial [52]. Así mismo, se ha documentado en algunas revisiones que el BDNF se relaciona con los síntomas cognitivos de la esquizofrenia y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [53,54]. Interesantemente, se ha encontrado que el déficit de BDNF contribuye de manera importante con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, deteriorando regiones del prosencéfalo, el cual se sabe que interviene en las funciones cognitivas. Por lo tanto, recientemente se ha propuesto la administración exógena de BDNF como una estrategia para revertir este déficit y mejorar la sintomatología de la enfermedad [55,56].

#### *1.6.2. Señalización del BDNF en el aprendizaje y la memoria*

La unión del BDNF a su receptor específico de alta afinidad tirosin-cinasa tipo B (TrkB) conduce a la dimerización y autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor; como consecuencia, se activan las vías de señalización citoplasmáticas. Una vez que el TrkB se encuentra fosforilado, funciona como un andamio para el reclutamiento de proteínas y enzimas que transducen e intensifican la señal del BDNF. Las moléculas involucradas en la mediación de la señalización de neurotrofinas son principalmente tres: la proteína cinasa asociada a mitógenos (MAPK), la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) y la fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3-K) [49]. El BDNF mejora de manera importante la transmisión sináptica y este efecto puede estar involucrado en la plasticidad sináptica dependiente del BDNF. Estudios en ratones han confirmado mediante modelos que evalúan la memoria de trabajo que el aprendizaje está asociado a la vía de transducción de señales TrkB/PI3-K [57]. Así mismo, se ha demostrado que la inhibición de la PI3-K en ratones después de la administración del inhibidor específico wortmanina, que hay un deterioro en el aprendizaje espacial, utilizando modelos conductuales [58].

Por otra parte, las investigaciones sobre el BDNF y la plasticidad sináptica han revelado que el incremento de su concentración es el mecanismo principal mediante el cual se regula el procesamiento de la información en el hipocampo. Por lo tanto, una vez que el BDNF es secretado, actúa a través de la activación de su receptor TrkB, y que esta señalización es fundamental en el proceso de aprendizaje.

Como consecuencia, una disminución conduce a déficits en la memoria espacial, mientras que la sobreexpresión de TrkB consolida diferentes tipos de memoria [59,60].

### ***1.7. Edulcorantes y sus potenciales efectos en la cognición***

La sacarosa es degradada a glucosa en el intestino y posteriormente, la glucosa es transportada a la circulación sistémica. La mayor parte de la glucosa en circulación sistémica pasa rápidamente al músculo, tejido adiposo y otros tejidos periféricos como el cerebro, por medio de la acción de la insulina, y después puede ser utilizada como energía [61]. La glucosa es la principal fuente de energía para las células del cuerpo humano, y el cerebro es el órgano que más energía demanda. En este sentido, el requerimiento energético del cerebro prácticamente corresponde a la mitad de toda la energía de la glucosa en el cuerpo [62]. Así mismo, las funciones cerebrales como el pensamiento, la memoria y el aprendizaje están relacionadas con las concentraciones de glucosa en circulación sistémica y la eficiencia con la que el cerebro utiliza dicha fuente de energía [63]. Cuando existen bajas concentraciones de glucosa en el cerebro, no se produce una comunicación eficiente entre las neuronas, lo cual se relaciona estrechamente con deficiencias en las funciones cognitivas [64]. Estudios previos han demostrado que la administración de glucosa facilita la memoria [65-68].

Por otra parte, existe evidencia que indica que las concentraciones de glucosa en circulación mejoran los procesos de aprendizaje y memoria tanto en ratones como en humanos [67]. No obstante, el consumo crónico de sacarosa se ha relacionado con el desarrollo de diferentes enfermedades como la obesidad, la diabetes *mellitus* tipo 2 y el síndrome metabólico. Por lo tanto, los ENN se posicionaron rápidamente como sustitutos de la sacarosa para reducir los riesgos en la salud. Sin embargo, existe evidencia científica que señala que el consumo prolongado de ENN tiene importantes implicaciones en la salud, específicamente, a nivel del SNC.

Estudios en ratas revelan que el consumo crónico de ENN como el aspartame, sacarina y sucralosa afecta significativamente el rendimiento cognitivo, evidenciado mediante modelos conductuales. Adicionalmente, se observa una disminución significativa del recuento neuronal en el hipocampo, así como un aumento en el estrés oxidativo, el cual juega un papel importante en los efectos perjudiciales del consumo a largo plazo de ENN sobre el aprendizaje y la memoria. Por lo tanto, se concluye que el consumo prolongado de dichos ENN puede desencadenar efectos nocivos sobre la cognición y la integridad del hipocampo en ratas [69]. Así mismo, se ha demostrado que después de la administración de soluciones de aspartame en ratas durante 28 días, se presentan cambios neuroconductuales relacionados con la pérdida de memoria, los cuales son dependientes del tiempo de consumo [70].

Recientemente, se ha demostrado el impacto del consumo frecuente de EN y ENN sobre el SNC en humanos [71]. Los resultados indican que el consumo frecuente de sucralosa disminuye significativamente la memoria general, la memoria de codificación y las funciones ejecutivas después de la suplementación. Adicionalmente, se demostró mediante técnicas de electroencefalografía cuantitativa que el consumo frecuente de los ENN va acompañado de cambios en la actividad cerebral, así como la disminución del rendimiento cognitivo en pruebas neuropsicológicas.

Por otra parte, se ha observado que la ingesta prolongada de soluciones de acesulfame-K en ratones, promueve la preferencia de consumo en comparación con el agua; además, se observó un aumento en la liberación de neurotransmisores como la dopamina [72]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el consumo de soluciones de acesulfame-K promueve la liberación de neurotransmisores; lo cual se encuentra estrechamente relacionado con los comportamientos adictivos característicos de la sacarosa. Finalmente, en un estudio publicado recientemente, se suplementaron ratas con dietas altas en sacarosa y Stevia® durante el periodo de gestación y lactancia. El estudio concluye que el alto consumo de sacarosa y Stevia® favorece la aparición de deficiencias en el rendimiento de la memoria y el aprendizaje en su descendencia de ratas macho [73].

Considerando lo anterior, indudablemente se ha consolidado evidencia de la relación que existe entre el consumo de ENN y las afectaciones en los procesos cognitivos. Por otra parte, estudios moleculares asocian bajas concentraciones de BDNF al deterioro cognitivo [74] y concentraciones más altas del BDNF con un mejor rendimiento cognitivo [75]. No obstante, existe poca evidencia de los efectos neurotróficos relacionados con el consumo prolongado de ENN. En este sentido, en un estudio realizado en ratas Fisher 344 se investigó la influencia de una dieta típica de la mayoría de las sociedades occidentales industrializadas, rica en grasas saturadas y azúcar refinada en la estructura y función del cerebro a través de la regulación de las neurotrofinas. El estudio demostró que la dieta occidental disminuye la expresión de BDNF, sinapsina I y atenúa la liberación de neurotransmisores, que generalmente está modulada por BDNF y sinapsina I [76]. Por lo tanto, las reducciones de BDNF resultantes de una dieta alta en grasas y azúcar refinada pueden privar a las neuronas de su protección natural y tener impacto en los procesos cognitivos. Así mismo, otro estudio se observó en ratones C57BL/6J que el consumo de Acesulfame K durante 40 semanas deteriora la memoria cognitiva. Además, se encontraron anomalías neurosinápticas y desregulación del BDNF mediado por TrkB en las neuronas del hipocampo [77]. Adicionalmente, se demostró que el consumo crónico de Acesulfame K promueve reducciones en el soporte metabólico, en los niveles energéticos, en las funciones neurotróficas y reducción en quinasas neuroprotectoras; lo cual puede sustentar un estado neurometabólico alterado.

Por otra parte, son claras las implicaciones que tiene el consumo de alimentos, incluyendo macronutrientes y micronutrientes, como factores que afectan el rendimiento cognitivo [78]. Bajo este contexto, un estudio sugiere que el BDNF actúa como un modulador metabólico en humanos, al controlar y afectar los patrones de ingesta de alimentos [79]. Además, el BDNF interviene en el metabolismo energético no solo a través del cerebro, sino también a través de neuronas periféricas y órganos diana implicados en el mantenimiento del equilibrio energético [80]. Por lo tanto, las concentraciones del BDNF podrían influir en el apetito y el comportamiento alimentario. Al respecto, un interesante estudio clínico reportó una ligera disminución de la concentración de BDNF en personas que se sometieron a un ayuno en el mes del Ramadán [81]. No obstante, las mediciones fueron realizadas en muestras de suero sanguíneo. Por lo tanto, no es posible correlacionar dichas concentraciones con las presentes en el cerebro. En consecuencia, se desconoce la posible relación entre la cantidad de alimento que se consume y la expresión del BDNF en el cerebro.

Evidentemente, el consumo prolongado de ENN tiene potenciales efectos a nivel del SNC, específicamente, en la memoria y el aprendizaje, por lo que resulta importante investigar los cambios cognitivos asociados al consumo frecuente de ENN como la sucralosa y glucósidos de esteviol; así mismo, contrastar las observaciones experimentales con biomarcadores moleculares como el BDNF para consolidar la evidencia que se ha generado hasta la fecha.

## **2. Planteamiento del Problema**

Los ENN, también conocidos como edulcorantes intensivos, intensos o no calóricos, se han introducido en alimentos de uso cotidiano para sustituir a la sacarosa, con el objetivo de disminuir el consumo energético en la dieta. Entre los más comunes se encuentran: aspartame, sucralosa, sacarina, acesulfame-K, neotame y glucósidos de esteviol. Actualmente, el consumo de ENN se ha incrementado para controlar el peso corporal y las concentraciones de glucosa en sangre. Sin embargo, el efecto del consumo prolongado de ENN sobre el SNC y las funciones cognitivas está poco documentado.

Las investigaciones sobre la seguridad de los ENN y los potenciales efectos neurológicos han sido controvertidas, relacionando su efecto sobre los receptores de neurotransmisores, la inhibición en la producción de neurotransmisores, la elevación de cortisol y la producción de radicales libres. Estudios han demostrado que el aspartame, solo o en combinación con glutamato, pudiera generar retraso mental y alteración en la regulación del sistema neuroendócrino en humanos. Así mismo, reportes sugieren que el consumo frecuente de ENN induce cambios en la actividad eléctrica cerebral asociados con el rendimiento cognitivo en humanos. Por otra parte, se ha observado que el consumo prolongado de soluciones de acesulfame-K promueve la liberación de neurotransmisores en ratones. Estudios recientes sugieren que el consumo frecuente de ENN como la sucralosa y glucósidos de esteviol induce cambios significativos en la actividad del SNC, evidenciado por pruebas neuropsicológicas y electroencefalogramas cuantitativos. No obstante, existe poca evidencia científica del efecto que tiene el consumo prolongado de ENN sobre la producción de BDNF a nivel del cerebro. Al respecto, un estudio demostró que el consumo crónico de Acesulfame K induce una desregulación del BDNF mediado por TrkB en las neuronas del hipocampo.

Aunque existen estudios enfocados en los efectos de los ENN en la salud general, hay evidencia limitada de los efectos de estos compuestos en la actividad del SNC, específicamente, en la expresión de factores neurotróficos implicados en la regulación de la transmisión sináptica, la cual es fundamental para los procesos cognitivos como la memoria. Considerando la escasa información existente y la relevancia del consumo de ENN, surge la necesidad de investigar en qué medida dichos aditivos alimentarios podrían interferir en los procesos de memoria y aprendizaje, así como las alteraciones cognitivas como memoria espacial, memoria de trabajo, memoria a corto y largo plazo.

### **Pregunta investigación:**

¿Cuáles son los cambios cognitivos en la memoria y la expresión del BDNF asociados al consumo prolongado de edulcorantes no nutritivos en un modelo murino?

### **3. Hipótesis**

#### ***Hipótesis alterna:***

H<sub>1</sub>: El consumo prolongado de sucralosa y glucósidos de esteviol contenidos en sus presentaciones comerciales respectivas, disminuye la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro y las funciones cognitivas como memoria espacial, memoria de trabajo, memoria a corto y largo plazo en un modelo murino.

#### ***Hipótesis nula:***

H<sub>0</sub>: El consumo prolongado de sucralosa y glucósidos de esteviol contenidos en sus presentaciones comerciales respectivas, no disminuye la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro ni funciones cognitivas como memoria espacial, memoria de trabajo, memoria a corto y largo plazo en un modelo murino.

#### **4. Objetivos**

##### ***General:***

Determinar los cambios cognitivos de la memoria y la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro asociados a la suplementación prolongada con edulcorantes no nutritivos en un modelo murino.

##### ***Específicos:***

- Determinar y comparar los cambios en el aprendizaje, memoria espacial, memoria de trabajo, memoria a corto y largo plazo en ratones con suplementación prolongada de sucralosa y glucósidos de esteviol contenidos en sus respectivas presentaciones comerciales, mediante el empleo de la prueba conductual del laberinto de Barnes.
- Comparar mediante la técnica de western blot, los cambios en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro de los grupos con suplementación prolongada de sucralosa y glucósidos de esteviol contra el grupo sin suplementación y el grupo suplementado con sacarosa.
- Analizar la asociación entre la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro y la memoria en los diferentes grupos de estudio y el sexo.



## 5. Justificación

La sacarosa aporta principalmente energía y sabor dulce a los alimentos, sin embargo, cuando su consumo es excesivo y los estilos de vida son sedentarios, el excedente energético que aporta se asocia con alteraciones celulares que aumentan el riesgo de desarrollar diabetes y otras enfermedades crónico-degenerativas. En México, hasta el 85% de la población supera el consumo de azúcares recomendado por la OMS, lo cual representa un problema de salud pública. Por lo tanto, la industria de alimentos se ha enfocado en la búsqueda de sustancias que aporten el sabor dulce, limitando los efectos energéticos de la sacarosa. Los productos generados para reemplazar la sacarosa son conocidos como ENN. En este sentido, el uso de ENN es una de las estrategias del sector salud para disminuir el riesgo de enfermedades como la obesidad y la diabetes *mellitus* tipo 2; sin embargo, su consumo cada vez es mayor en la población en general.

Aunque el consumo de los ENN se encuentra regulado por agencias sanitarias para garantizar la seguridad de los consumidores. Actualmente, existe controversia sobre dicha seguridad, debido a que se ha generado evidencia científica sobre las posibles alteraciones bioquímicas y metabólicas derivadas del consumo frecuente de estos compuestos. Estudios epidemiológicos en humanos y modelos animales sugieren que el consumo de ENN puede alterar el balance energético, contribuyendo al desarrollo de obesidad y otras alteraciones en la salud. Así mismo, se ha observado que el consumo frecuente de ENN como la sucralosa y glucósidos de esteviol induce cambios significativos en la actividad del SNC, evidenciado por pruebas neuropsicológicas y electroencefalogramas cuantitativos. Aunque existen estudios sobre el efecto de los ENN sobre la salud en general, hay poca evidencia de sus efectos en el SNC, específicamente, en la salud cognitiva. Por lo tanto, es importante determinar en qué medida interfieren en las funciones cerebrales tales como el aprendizaje y la memoria. En este sentido, resulta fundamental estudiar los cambios en la expresión del BDNF, ya que este factor neurotrófico está involucrado en el aprendizaje, la formación de la memoria y su mantenimiento.

La relevancia del conocimiento generado a partir del estudio de los posibles cambios en la expresión del BDNF y las alteraciones en la memoria, radica en establecer evidencia clara sobre las consecuencias del uso prolongado de dichos aditivos alimentarios, con la finalidad de concientizar a la población sobre su consumo racionalizado y a los sistemas de salud para que desarrollen estrategias adecuadas de educación del consumidor acerca de estos productos, así como políticas públicas que apropiadas para su uso correcto.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1. Diseño de Estudio

*Tipo de estudio:* Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo.

*Universo y Muestra:* La conformación de cada grupo se realizó mediante selección aleatoria de ratones de la cepa BALB/c de ambos sexos. Se formaron 4 grupos de estudio conformados de acuerdo con la tabla 2.

*Método de muestreo:* No probabilístico, por conveniencia

Tabla 2. Conformación de los grupos de estudio.

Grupo	Concentración del edulcorante	Hembras	Machos	Edad
Control (Agua)	N/A	8	8	
Sacarosa	Solución al 10%	8	8	8
<sup>a</sup> Sucralosa	Solución al 0.012%	8	8	semanas
<sup>b</sup> Glucósidos de esteviol	Solución al 0.025%	8	8	

<sup>a</sup> Se empleó la presentación comercial, la cual contiene 0.012 g de sucralosa por cada gramo de producto. <sup>b</sup> Se empleó la presentación comercial, la cual contiene 0.25 g de glucósidos de esteviol por cada gramo de producto.

### 6.2. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación

*Criterios inclusión:* Ratones de la cepa BALB/c machos y hembras de 8 semanas de edad, que tengan un peso mínimo de 20 g al momento de la formación de los grupos experimentales.

*Criterios exclusión:* Ratones enfermos o con alteraciones fisiológicas evidentes antes de iniciar el estudio.

*Criterios eliminación:* Ratones que se enfermen o mueran durante el desarrollo del proyecto.

### 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 enero 2022–julio 2023.

### *6.3.1. Crianza de ratones*

La crianza de los ratones de la cepa BALB/c se realizó bajo condiciones estándar con ciclo luz/oscuridad de 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 de los ratones, se conformaron los grupos de estudio y se mantuvieron bajo las mismas condiciones estándar. La suplementación se realizó durante 6 semanas, asignando el edulcorante correspondiente a cada grupo (tabla 2).

### *6.3.2. Suplementación con edulcorantes*

Se prepararon 100 mL de cada una de las bebidas, en agua purificada a las concentraciones indicadas en la tabla 2. Para la preparación de las soluciones de suplementación, se utilizaron las presentaciones disponibles comercialmente de sucralosa y glucósidos de esteviol, donde 1 g de los respectivos productos contienen 0.012 g de sucralosa y 0.025 g de glucósidos de esteviol.

### *6.3.3. Determinación de la ganancia de peso, consumo de bebida y alimento*

Se determinó el peso corporal de los ratones una vez a la semana, a la misma hora y bajo las mismas condiciones. Así mismo, se registró diariamente el consumo de bebida y alimento bajo las mismas condiciones.

### *6.3.4. Evaluación del aprendizaje y la memoria*

Después del periodo de suplementación con edulcorantes, se realizó la evaluación del aprendizaje, memoria espacial, memoria de trabajo, memoria a corto plazo y memoria a largo plazo a los ratones hembra y macho correspondientes de cada grupo de estudio, mediante la prueba conductual laberinto de Barnes con algunas modificaciones [43].

Durante la prueba de aprendizaje, se obtuvieron los siguientes parámetros: 1) tiempo de latencia primario (tiempo de la primera investigación de cualquier agujero), 2) tiempo de latencia (tiempo para localizar el agujero de escape), 3) número de errores (número de agujeros incorrectos que se verificaron antes del primer encuentro con el agujero de escape en la plataforma) y 4) estrategia espacial, en serie o aleatoria. En la prueba de retención de memoria a corto y largo plazo se obtuvieron los siguientes parámetros: 1) tiempo de latencia (tiempo para localizar el agujero de escape), 2) tiempo en la zona objetivo (tiempo de permanencia en la zona donde se localiza el agujero de escape) y 3) número de errores (número de agujeros incorrectos que se verificaron antes del primer encuentro con el agujero de escape en la plataforma). La figura 5 muestra la representación esquemática de las evaluaciones que se realizaron a cada grupo de estudio durante el periodo de habituación, aprendizaje y retención a corto/largo plazo.

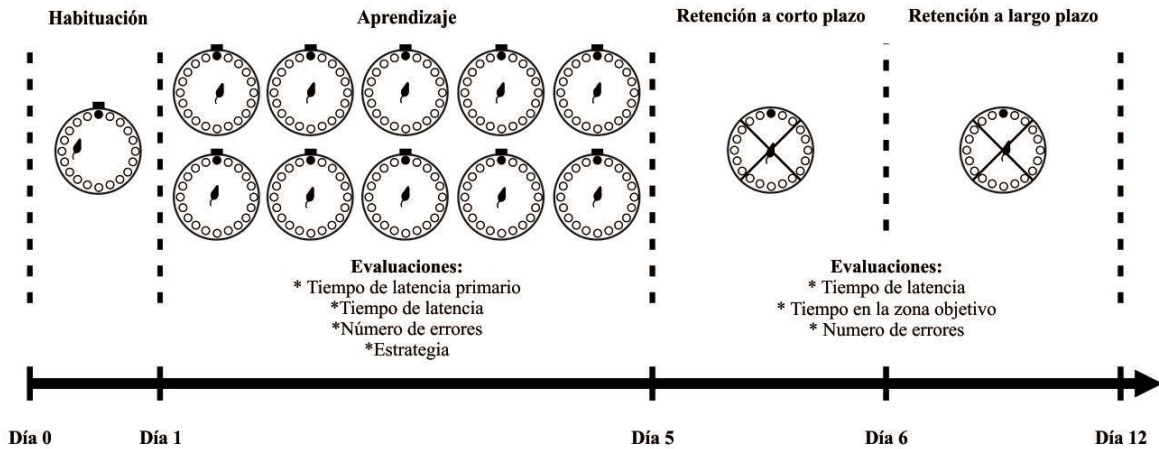


Figura 5. Representación esquemática de las etapas de la evaluación del aprendizaje y memoria de los diferentes grupos de estudio mediante el modelo conductual laberinto de Barnes. Constructo del autor.

*Prueba de habituación (día 0):* 24 horas antes de la etapa de adquisición, los ratones se sometieron a una sesión de habituación al laberinto de Barnes para reducir el comportamiento de ansiedad y habituarse a la caja de escape y la plataforma. Se colocó a cada ratón hembra y macho de cada grupo de estudio durante 15 segundos en la caja de inicio. Posteriormente, se les permitió explorar la plataforma durante 60 segundos y finalmente, se colocaron a los ratones en la caja de escape durante 120 segundos. Las luces permanecieron encendidas, el zumbador apagado y las señales distantes bloqueadas.

*Prueba de aprendizaje (día 1–5):* se colocó a cada sujeto de estudio en la caja de inicio y se ubicaron al centro de la plataforma. Se mantuvieron en la caja de inicio durante 15 segundos, posteriormente, se encendió el zumbador y se liberó al ratón de la caja de inicio para comenzar con la grabación. Durante toda la etapa de aprendizaje, las luces y señales distantes se mantuvieron activas. Se les permitió a los ratones la exploración del laberinto y hasta que localizaran el agujero de escape. Una vez localizado el agujero de escape, los ratones se mantuvieron durante 60 segundos en la caja de escape. Durante este tiempo, se desactivó el zumbador. Los ratones que no localizaron el agujero de escape después de 180 segundos se colocaron en la caja de escape. Al finalizar cada ensayo, los ratones fueron devueltos a su jaula de origen. Antes de la siguiente prueba, se limpió el laberinto de Barnes con etanol al 70% (p/v) para evitar que exista un rastro fijado por la orina y las heces fecales. La posición espacial del agujero de escape se mantuvo constante para cada sujeto de estudio. Se mantuvo un intervalo mínimo de 15 minutos entre ensayos para cada ratón. Durante esta etapa, se realizaron dos ensayos para cada ratón durante cinco días.

*Prueba de retención de memoria a corto plazo (día 6):* 24 horas después de la prueba de aprendizaje se retira la caja de escape. Posteriormente, los ratones se colocarán en la caja de inicio durante 15 segundos y finalmente se retirará la caja de inicio para permitirles la exploración del laberinto durante 90 segundos. Después de completar la prueba, los ratones se regresarán a su jaula de origen.

*Prueba de retención de memoria a largo plazo (día 12):* seis días después de la prueba de retención de memoria a corto plazo, los ratones se colocaron en la caja de inicio durante 15 segundos y finalmente se retiró la caja de inicio para permitirles la exploración del laberinto durante 90 segundos. Después de completar la prueba, los ratones se regresaron a su jaula de origen. Durante esta prueba, se retiró la caja de escape.

#### *6.3.5. Disección del tejido cerebral.*

Al término del periodo de evaluación de las pruebas conductuales, cada ratón fue sacrificado con pentobarbital sódico (6.3 g/100 mL) a una dosis de 40 mg/Kg de peso, por vía intraperitoneal. Posteriormente, se realizó la disección del tejido cerebral y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior.

#### *6.3.6. Análisis de la expresión de BDNF mediante western blot.*

El tejido cerebral se disgregó en buffer de lisis 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 durante 45 minutos, agitando con vórtex (Thermolyne 16700 Mixer) cada 15 minutos. A continuación, las muestras fueron centrifugadas (centrifugadora Beckman Coulter Avanti J-26S XPI) a  $4^{\circ}\text{C}$  y 13,000 rpm durante 20 minutos. Las proteínas contenidas en el sobrenadante se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.

Para cuantificar las proteínas, se utilizó una placa de 96 pozos, en la que se colocaron estándares de albumina (BSA) a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2 mg/mL, empleando 5  $\mu\text{L}$ /pozo de cada uno, por duplicado. Posteriormente, se agregó reactivo de Bradford (SIGMA<sup>®</sup>), para colocar 200  $\mu\text{L}$  de este reactivo a cada muestra. Las mediciones se realizaron con un lector de microplacas (Stat Fax<sup>®</sup> 4200) a una longitud de onda de 590 nm. Con los datos obtenidos, se calculó la concentración de proteínas y se prepararon las muestras a una concentración de 1-2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  agregando buffer de carga de muestra 1X. Las muestras se sometieron a  $95^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos y finalmente se incubaron durante 5 minutos en hielo antes de ser utilizadas, o se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para el análisis de la expresión del BDNF se preparó el gel de corrimiento al 12 % y el gel de apilamiento al 4%. Posteriormente, se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de la proteína obtenida. El corrimiento inicial de las proteínas se llevó a cabo en la cámara de electroforesis (BIO-RAD<sup>®</sup>) llenando con buffer de

corrida a voltaje constante 70 V, hasta que las muestras se alinearon y que la línea de corrido llegó al final del gel. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas en el gel fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Amersham™ Hybond™) previamente hidratada con metanol absoluto (MEYER®). Se colocó el gel junto con la membrana PVDF, en contacto estrecho, ensambladas entre capas de papel filtro (SIGMA®) humedecidas con buffer de transferencia semi-seca y se introdujeron en la cámara de transferencia semi-seca (BIO-RAD Trans-Blot® SD CEL) durante 30 minutos a 25mA (constante), para que las proteínas fueran transferidas desde el gel hacia la membrana.

La membrana se bloqueó con BSA al 5% en TBS-Tween-2 durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se incubó a 4 °C bajo agitación suave durante una noche con el anticuerpo primario: anti-BDNF policlonal de conejo (Bioss bs-4989R-TR) y anti-β-actina monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich®), seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-Conejo (SIGMA®) y anti-ratón (SIGMA®) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron mediante un método colorimétrico revelando con diaminobencidina (ChemCruz®). Las bandas de expresión obtenidas se cuantificaron mediante densitometría empleando el programa ImageJ/Fiji (National Institutes of Health).

#### ***6.4. Variables de Estudio***

Independientes: tratamiento de los sujetos experimentales (agua, sacarosa, sucralosa y glucósidos de esteviol en sus presentaciones comerciales), tiempo de tratamiento (6 semanas) y sexo (machos y hembras).

Dependientes: ganancia de peso, comportamiento alimentario, cambios cognitivos y expresión de BDNF.

La tabla 3 resume las variables que se emplearán en la presente investigación, su definición conceptual y operacional, sus respectivas escalas de medición, así como su análisis estadístico.

Tabla 3. Cuadro de operacionalización de variables.

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Análisis estadístico</b>
Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)	Proteína de la familia de las neurotrofinas que actúa como factor de crecimiento nervioso.	Expresión de BDNF. Cantidad de BDNF que las células cerebrales del hipocampo y la corteza sintetizan. Su determinación es mediante western blot.	Cuantitativa	Unidades arbitrarias	ANOVA Comparaciones múltiples Dunnett
Memoria espacial	Sistema responsable de registrar la información sobre el entorno y la orientación espacial.	Tiempo de retención de la información medido en segundos. Las mediciones se realizan en la etapa de sondeo del protocolo del laberinto de Barnes, considerando el tiempo en que los ratones permanecen en el cuadrante objetivo donde se localiza agujero objetivo.	Cuantitativa continua	De razón Tiempo en segundos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Memoria de trabajo	Procesos empleados en el almacenamiento temporal de la información.	Almacenamiento y manipulación de la información temporal en un lapso de 20 y 30 segundos. Las mediciones se realizan en la etapa de sondeo, contabilizando el número de errores que los ratones tienen durante la búsqueda del agujero objetivo.	Cuantitativa discreta	De razón Número de errores	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Memoria a corto plazo	Sistema para almacenar una cantidad limitada de información durante un corto periodo de tiempo.	Tiempo de retención y evocación de la información en un lapso de tiempo que va de segundos a minutos. Las mediciones se realizan en la etapa de sondeo del protocolo del laberinto de Barnes, considerando el tiempo en que los ratones permanecen en el cuadrante objetivo donde se localiza el agujero objetivo.	Cuantitativa continua	De razón Tiempo en segundos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Memoria a largo plazo	Sistema cerebral para almacenar gran cantidad de información durante un tiempo indefinido.	Tiempo de codificación y almacenamiento de la información en periodos de tiempo largos. Se mide el tiempo de latencia 7 días después de la etapa de aprendizaje y corresponde al tiempo en que los ratones permanecen en el cuadrante objetivo donde se localiza el agujero objetivo.	Cuantitativa continua	De razón Tiempo en segundos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni

Tabla 3. Cuadro de operacionalización de variables (Continuación).

<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Análisis estadístico</b>
Peso	La fuerza con la cual un cuerpo actúa sobre un punto de apoyo, originado por la aceleración de la gravedad, cuando esta actúa sobre la masa del cuerpo	Determinación de la masa corporal mediante el uso de una balanza digital.	Cuantitativa continua	De razón Peso en gramos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Consumo de bebida	Cantidad de agua, sacarosa, sucralosa o glucósidos de esteviol que consume cada grupo de estudio.	Gramos de bebida que cada grupo de estudio consume en promedio a la semana, de acuerdo a su tratamiento y tiempo de suplementación. Las mediciones se realizan diariamente durante seis semanas en una balanza digital.	Cuantitativa continúa	De razón Peso en gramos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Consumo de alimento	Cantidad de alimento que consume cada grupo de estudio.	Gramos de alimento que cada grupo de estudio consume en promedio a la semana, de acuerdo a su tratamiento y tiempo de suplementación. Las mediciones se realizan diariamente durante seis semanas en una balanza digital.	Cuantitativa continúa	De razón Peso en gramos	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni
Sexo	Conjunto de características biológicas y fisiológicas que definen a machos y hembras.	Distancia anogenital de los machos es mayor que la distancia anogenital de las hembras. Las mediciones se realizan a partir de la tercera semana de edad y corresponde a la distancia entre el ano y los genitales del ratón.	Cualitativa nominal	Nominal Macho/Hembra	ANOVA Prueba de comparaciones múltiples Bonferroni



### **6.5. Implicaciones Bioéticas**

Los experimentos se realizarán 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 en la NOM-062-ZOO-1999. Además, la experimentación se llevó a cabo siguiendo el Reglamentos de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título Séptimo, Capítulo Único, Artículos 121–126, el cual hace referencia a el manejo, cuidado y supervisión adecuada de los bioterios, así como el sacrificio de los animales de estudio con el mínimo de sufrimiento. Este protocolo de investigación se registró ante la Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados de la UAEMex, con el número MACSSD-03-0822.

### **6.6. Recolección de Datos**

Formatos para registrar las distancias que recorran los ratones en la plataforma del laberinto de Barnes, toma de fotografía para los resultados de western blot y uso de programas de cómputo para el análisis de las fotografías de los resultados obtenidos por western blot.

### **6.7. Análisis Estadístico**

Para determinar el efecto del tratamiento y el tiempo, los datos de la ganancia de peso, consumo de bebida y alimento fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores de medidas repetidas. Así mismo, los datos generados en el laberinto de Barnes, incluyendo la latencia primaria, latencia de escape, número de errores y tiempo de permanencia en el cuadrante objetivo fueron evaluados mediante un ANOVA de dos factores. Posteriormente, comparaciones múltiples entre los grupos fueron realizadas mediante el método de corrección de Bonferroni. Por otra parte, para conocer la dependencia de las estrategias y la suplementación en la etapa de aprendizaje, la prueba de chi cuadrada ( $X^2$ ) fue empleada. Así mismo, para conocer las diferencias en los días de aprendizaje L1 y L5 dentro de los grupos y entre grupos, una prueba de  $X^2$  fue empleada. Las intensidades de las bandas de expresión del BDNF se cuantificaron mediante densitometría con el software ImageJ (National Institutes of Health) y los resultados obtenidos se analizaron mediante ANOVA. Finalmente, a lo largo de nuestros análisis estadísticos los valores  $-p < 0.05$  fueron considerados como significativos. Para en análisis estadístico y la construcción de los gráficos el software GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad software, San Diego, CA, USA) fue utilizado. Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

## 7. Resultados

### 7.1. Carta de envío

10/13/23, 1:08 PM

[RNCM] Acuse de recibo del envío - Irazú Contreras García - Outlook

#### [RNCM] Acuse de recibo del envío

Diana Cárdenas <editor-rmnc@nutriclinicacolombia.org>

Fri 10/13/2023 2:04 PM

To:Irazú Contreras García <icontrerasg@uaemex.mx>

Irazú Contreras:

Gracias por enviar el manuscrito "Consumo prolongado de sucralosa y glucósidos de esteviol provoca déficits en el aprendizaje y la memoria en un modelo murino" a Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo. Con el sistema de gestión de publicaciones en línea que utilizamos podrá seguir el progreso a través del proceso editorial tras iniciar sesión en el sitio web de la publicación:

URL del manuscrito:

<https://revistanutricionclinicametabolismo.org/index.php/nutricionclinicametabolismo/authorDashboard/submit/589>

Nombre de usuario/a: icontrerasg

Si tiene alguna duda puede ponerse en contacto conmigo. Gracias por elegir esta editorial para mostrar su trabajo.

Diana Cárdenas

**Diana Cardenas Braz**

Editora

---

[Revista de Nutrición Clínica y Metabolismo](#)

## 7.2. Resumen del artículo

Actualmente, el consumo excesivo de azúcar se ha asociado como un determinante de la pandemia de obesidad y diabetes. En consecuencia, los edulcorantes no nutritivos (ENN) han surgido como atractiva alternativa para mitigar los riesgos en la salud. Sin embargo, la evidencia de los posibles efectos de su consumo prolongado en la salud cognitiva es limitada. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar los posibles cambios en el aprendizaje y la memoria, así como también en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en un modelo murino. Sesenta y cuatro ratones BALB/c fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos: 1) control, 2) sucralosa (SUCRA), 3) glucósidos de esteviol (STV) y 4) sacarosa (SUC). El periodo de suplementación consistió en seis semanas; el aumento de peso y el comportamiento alimentario fue monitoreado semanalmente. Posteriormente, los cambios cognitivos fueron evaluados mediante el laberinto de Barnes. Finalmente, la expresión del BDNF fue determinada mediante western blot. Nuestros resultados confirman que el consumo prolongado de NNS y sacarosa promueven cambios en el aumento de peso y el comportamiento alimentario. Así mismo, déficits significativos en el índice cognitivo (unidades arbitrarias) fueron observados tanto en machos del grupo SUCRA ( $5.75 \pm 0.76$ ,  $p=0.0008$ ) como en el grupo STV ( $4.50 \pm 0.96$ ,  $p<0.0001$ ). En hembras, los mismos déficits fueron observados; SUCRA  $8.00 \pm 0.63$ ,  $p<0.0001$  y STV  $5.00 \pm 0.74$   $p<0.0001$ . El análisis de la expresión de BDNF por western blot no mostró diferencias significativas en la expresión de esta proteína de los diferentes grupos, sin embargo, se observó una tendencia en una mayor expresión de BDNF en los grupos SUCRA, STV y SUC en machos comparado con el grupo control. En conjunto nuestros resultados sugieren que el uso prolongado de ENN a largo plazo afecta las funciones cognitivas de memoria.

## 8. Discusión

El presente estudio determinó los efectos del consumo prolongado de SUCRA, STV y SUC en ratones BALB/c sobre la ganancia de peso, el comportamiento alimentario, el aprendizaje y la memoria espacial, adicionalmente, determinamos la expresión del BDNF. Con nuestros resultados, observamos diferencias en la ganancia de peso de los machos y hembras suplementados con STV y SUC. Específicamente, el grupo STV registró una menor ganancia de peso en comparación con el control, mientras que sucedió lo contrario en el grupo SUC. Con respecto al comportamiento alimentario, observamos que los machos y hembras del grupo SUC consumieron mayor cantidad de bebida durante el estudio, en contraste, el grupo STV consumió menor cantidad de bebida al finalizar la suplementación. Finalmente, demostramos que los machos del grupo SUCRA, STV y SUC consumieron menor cantidad de alimento en comparación con el control. No obstante, en las hembras se observó este comportamiento hasta el final del estudio. En este sentido, previamente en nuestro grupo hemos demostrado en modelos in vivo que el consumo prolongado de SUCRA y STV promueven cambios en el peso corporal y el comportamiento alimentario. Estos cambios se encuentran relacionados con la alteración en las vías de señalización en el cerebro tales como JAK/STAT3 [82], MAPK y ERK [83], las cuales se encuentran relacionadas con la regulación de la ingesta de alimentos, la saciedad y cambios en el peso corporal.

Para demostrar los efectos de la suplementación con ENN sobre el deterioro cognitivo, empleamos el laberinto de Barnes ya que permite evaluar las funciones espaciales dependientes del hipocampo sin inducir mayor estrés como es el caso del laberinto de Morris [84]. Durante la etapa de aprendizaje, se detectaron diferencias significativas en machos y hembras con respecto al uso de la estrategia para localizar la caja de escape. Un hallazgo importante es que los machos suplementados con STV fueron afectados prácticamente durante toda la etapa de aprendizaje. En este sentido, emplearon tiempos más prolongados para iniciar la investigación del laberinto, así como para localizar la caja de escape, cometiendo más errores durante la tarea en comparación con el control. Así mismo, utilizaron menos estrategias de búsqueda dependientes de la memoria y utilizaron principalmente estrategias poco organizadas al finalizar la suplementación, mostrando desconocimiento del laberinto. Los déficits estuvieron presentes tanto en la fase de aprendizaje como en la fase de evaluación de la STM y LTM, lo cual confirma un deterioro cognitivo. Es conocido que el rendimiento de la memoria depende de la actividad del hipocampo [85]. Por lo tanto, concluimos que esta región cerebral se ve afectada en los machos por el consumo prolongado de STV en nuestro modelo.

Interesantemente, el rendimiento de las hembras del grupo STV no se afectó significativamente en la fase de aprendizaje en los parámetros de latencia primaria y número de errores. No obstante,

requirieron tiempos más prolongados para localizar la caja de escape y no optimizaron de la estrategia de búsqueda, mostrando un limitado conocimiento de la plataforma. En contraste, la STM fue afectada en los tiempos de latencia de escape, mientras que en la LTM no encontramos diferencias en comparación con el control, lo cual puede sugerir un efecto de compensación o recuperación de la memoria. Finalmente, observamos los mismos efectos que en los machos al ejecutar estrategias de búsqueda no dependientes de la memoria. En este sentido, la estevia (*stevia rebaudiana bertonii*) se compone principalmente de esteviósido y rebaudiósido A, la cual que es rica en componentes minerales como hierro, magnesio y cobalto, los cuales cumplen con importantes funciones biológicas [86]. No obstante, una ingesta excesiva puede conducir a daño neuronal [87].

Destacamos que la suplementación prolongada con SUCRA no afectó en los parámetros evaluados durante la etapa de aprendizaje, tanto en machos como en hembras. Estos resultados fueron confirmados durante la evaluación de la STM y LTM. Actualmente, es bien conocido que la SUCRA es muy similar estructuralmente a la sacarosa, a diferencia de que se encuentran presentes tres átomos de cloro los cuales reemplazan tres grupos hidroxilo [88]. Por lo tanto, las enzimas glucosídicas son incapaces de reconocer y digerir la SUCRA. Por otra parte, después de la administración oral de SUCRA, su absorción es limitada, cercana al 11-27% y puede eliminarse directamente por heces [89]. Su baja tasa de absorción y metabolización puede ser la razón de la ausencia de alteraciones del aprendizaje y la memoria durante esta etapa. No obstante, a largo plazo observamos que fue el único parámetro afectado fue la estrategia de búsqueda, tanto machos como hembras emplearon con menor frecuencia la estrategia espacial en comparación con el control. Estudios han informado que la SUCRA ingresa al cerebro a través de la circulación sistémica, inhibiendo el transporte de la D-glucosa a través del epitelio. Así mismo, compite por la absorción de glucosa en el cerebro lo cual conduce a un incremento en la concentración de la SUCRA [90]. En consecuencia, debido a que las neuronas no almacenan glucosa, dependen de la concentración de glucosa en circulación sistémica para funcionar de forma adecuada [91]. Lo anterior puede ser la causa de las afectaciones que surgen después de la suplementación prolongada con SUCRA.

Las preferencias de cuadrante es un parámetro ampliamente utilizado en el laberinto de Barnes para verificar si los animales recuerdan de forma general la zona donde se encuentra la caja de escape. En este sentido, esperábamos encontrar déficits durante la evaluación de la STM y LTM. Sin embargo, éste hecho no fue observado en los grupos SUCRA y STV de ambos sexos. Informes han demostrado que el número de ensayos realizados previos a la prueba afectan el rendimiento de los ratones [92, 93]. Por lo tanto, consideramos que este factor influyó en las preferencias del cuadrante.

Por otra parte, la evaluación del índice cognitivo de los grupos suplementados con SUCRA, STV y SUC confirman los déficits cognitivos observados en el laberinto de Barnes. En este sentido, las estrategias espaciales demuestran que los roedores se dirigen directamente al agujero de escape, enfocando su búsqueda en la zona objetivo e indicando que se establecieron un mapa de referencia espacial. A medida que los ratones emplean con menor frecuencia las estrategias espaciales dependientes del hipocampo, disminuye su índice cognitivo, reflejando un deterioro del aprendizaje y la memoria espacial. Finalmente, la expresión de BDNF se lleva a cabo principalmente en las neuronas del hipocampo y los niveles bajos de esta proteína pueden estar directamente relacionados con deterioro cognitivo [94]. En este sentido, nuestros resultados de la expresión del BDNF no mostraron diferencias significativas entre los grupos suplementados con ENN y el control. No obstante, una alteración en la vía de señalización BDNF/TrkB puede estar siendo afectada. Al respecto, una reducción en dicha vía se ha observado durante el envejecimiento en humanos y se relaciona con la plasticidad y supervivencia neuronal [95]. Por lo tanto, es importante resaltar que la expresión de su receptor de alta afinidad TrkB y su forma activada pTrkB pudiera estar afectada sin observar afectaciones en la expresión del BDNF.

## **9. Conclusiones**

Los resultados del presente estudio sugieren que el consumo prolongado de los edulcorantes SUC y STV promueve cambios en la ganancia de peso y el comportamiento alimentario. Específicamente, STV disminuye la ganancia de peso en machos y hembras, mientras que SUCRA y STV disminuyen el consumo de alimento principalmente en machos. Así mismo, dichos edulcorantes inducen déficits en el aprendizaje y la memoria espacial, los cuales fueron revelados por diferentes parámetros evaluados en el laberinto de Barnes. Por otra parte, el empleo del índice cognitivo como parámetro generalizado del desempeño de los grupos permitió confirmar claramente las diferencias en el uso de las estrategias dependientes del hipocampo. En cuanto a la expresión del BDNF, no observamos diferencias significativas entre los grupos de estudio. No obstante, es importante realizar estudios para determinar la expresión del receptor de alta afinidad TrkB y su forma fosforilada pTrkB, los cuales pueden estar afectados en la vía de señalización BDNF/TrkB.

## 9. Referencias

- [1] Yebra-Biurrun, MC. Sweeteners. *Encyclopedia of Analytical Science*. 2005; 2:562–572.
- [2] Das, A., Chakraborty R. *An Introduction to Sweeteners*. Reference Series in Phytochemistry. 2018; 1:1–13.
- [3] Carocho, M., Morales P., Ferreira I. CFR. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. *Food and Chem Toxicol*. 2017; 107:302–317.
- [4] Fitch, C., Keim, KS. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *J Acad Nutr Diet*. 2012; 5:739–758.
- [5] Farhat, G., Dewisom, F., Stevenson, L. Knowledge and Perceptions of Non-Nutritive Sweeteners Within the UK Adult Population. *Nutrients*. 2021; 13(2):444
- [6] Saraiva, A., Carrascosa, C., Rahem, D., Ramos F., Raposo, A. Natural Sweeteners: The Relevance of Food Naturalness for Consumers, Food Security Aspects, Sustainability and Health Impacts. *Int J Environ Res. Public Health*. 2020; 17(17):6285.
- [7] Grembecka, M. Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: A review. *Eur. Food Res. Technol*. 2015; 241:1–14.
- [8] Fry, JC. Natural low-calorie sweeteners. In *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*; Baines, D., Seal, R., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK. 2012; 41–75.
- [9] Jewel, J., Akkermans, S., Nimmegeers, P., et al. Bioproduction of the Recombinant Sweet Protein Thaumatin: Current State of the Art and Perspectives. *Front Microbiol*. 2019; 10:695.
- [10] Bellisle, F., Drewnowski, A. Intense sweeteners, energy intake and the control of body weight. *Eur J Clin Nutr*. 2007; 61:691–700.
- [11] Priya, K., Gupta, VRM., Srikanth, K. Natural sweeteners: A complete review. *J Pharm Res*. 2011; 4(7):2034–2039.
- [12] O'Brien, L. (2012). *Alternative sweeteners: An overview*. Alternative Sweeteners. CRC Press. USA, 4 Ed. Taylor & Francis.
- [13] Lindley, MG. (2012). *Natural High-Potency Sweeteners*. Sweeteners and sugar alternatives in food technology. UK, 2 Ed. John Wiley & Sons.
- [14] European Union (EU). European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on Sweeteners for Use in Foodstuffs. Disponible en línea: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:31994L0035&from=EN> (acceso 24 de octubre 2023).
- [15] Roberts, A. The Safety and regulatory process for low calorie sweeteners in the United States. *Physiol Behav*. 2016; 164(Pt B):439-444.
- [16] Jun-Shi, C. The role of science in Codex standards. *Biomed Environ Sci*. 2001 Jun; 14(1-2):145–8.
- [17] Diario Oficial de la Federación. Reglamento de control sanitario de productos y servicios. Mexico: Diario Oficial de la Federación. 2016.
- [18] 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.
- [19] Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Lista de edulcorantes con una ADI establecida. Secretaría de Salud, Estados Unidos Mexicanos. 2012.

Disponible en línea:

<http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/AcuerdosSecretario/acaditivo160712.pdf> (acceso 24 de octubre 2023).

[20] Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Lista de edulcorantes con una ADI establecida. Secretaría de Salud, Estados Unidos Mexicanos. 2017. Disponible en línea: <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/anexo-vii> (acceso 24 de octubre 2023).

[21] Amchra, FZ., Al Faiz, C., Chaouqi, S., et al. Effect of Stevia rebaudiana, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive review. *J Med Plants Stud.* 2018; 6(1):102-108.

[22] Choi, SW, Lee, JA, Yoo, SH. Sucrose-based biosynthetic process for chain-length-defined  $\alpha$ -glucan and functional sweetener by *Bifidobacterium amylosucrase*. *Carbohydr Polym.* 2019; 205:581–588.

[23] Magnuson, BA., Roberts, A., Nestmann., ER. Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food Chem Toxicol.* 2017; 106(Pt A):324-355.

[24] Gerwig, GJ., M. te Poele, E., Dijkhuizen, L., et al. Stevia Glycosides: Chemical and Enzymatic Modifications of Their Carbohydrate Moieties to Improve the Sweet-Tasting Quality. *Adv Carbohydr Chem and Biochem.* 2016; 73:1–72.

[25] Roy, E. (2013) Cognitive function. Gellman MD, Turner JR (eds) *Encyclopedia of Behavioral Medicine.* Springer, Nueva York, NY.

[26] Hölter, SM., Garrett, L., Einicke, J., et al. Assessing cognition in mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 2015; 5:331–358.

[27] Koekkoek, PS., Rutten, GE., et al. Cognitive disorders in diabetic patients. *Handbook of Clinical Neurology.* 2014; 126(11):145–166.

[28] Solís, H., López-Hernández, E. Neuroanatomía Funcional de la Memoria. *Arch Neurocién.* 2009; 14(3):176–187.

[29] Orrego-Cardozo, M., Tamayo-Alzate, OE. Bases moleculares de la memoria y su relación con el aprendizaje. *Arch Med.* 2016; 16(2):467–484.

[30] Gupta, A., Singh, MP., Sisodia, SS. A review on learning and memory. *J Drug Deliv Ther.* 2018; 8(2):153–157.

[31] Ortega, LC., Franco, JC. Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. *Plasticidad Neuronal. Archivos de Medicina.* 2010; 6(1):1–7.

[32] Morgado-Bernal, I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *CIC. Cuadernos de Información y Comunicación.* 2005; 10:221–233.

[33] Ctitori, A., Malenka, RC. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacol.* 2008; 33:18–41.

[34] Heinbockel, T. (2017). Mechanisms and Function of Synaptic Plasticity. *InTech open;* 1–13.

[35] Byrne, JH, LaBar, KS, LeDoux, JE, et al. Learning and memory: basic mechanisms. In: *From Molecules to Networks*, eds. Byrne JH, Roberts JL, 2 ed, 2009, Oxford, UK: Academic Press, pp. 539-608.

[36] Carter, M., Shiej, J. *Animal Behavior. Guide to Research Techniques in Neuroscience.* 2015; 2:39–71.



- [37] Brodziak, A., Kołat, E., Różyk-Myrta, A. In Search of Memory Tests Equivalent for Experiments on Animals and Humans. *Med Sci Monit.* 2014; 20:2733–2739.
- [38] Navarrete, F., Pérez-Ortíz, JM., Femenía, T., et al. Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Rev Neurol.* 2008; 47(3):137–145.
- [39] Barnes C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp Physiol Psychol.* 1979; 93(1): 74–101.
- [40] O'Leary T.P., Saboya V., Marrón R.E. Learning, memory and search strategies of inbred mouse strains with different visual abilities in the Barnes maze. *Behav Brain Res.* 2011; 216(2): 531–542.
- [41] Pompl PN, Mullan MN, Bjugstad K, Arendash GW. Adaptation of the circular platform spatial memory task for mice: use in detecting cognitive impairment in the APPsw transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *J Neurosci Meth.* 1999;87: 87–95.
- [42] Carrillo-Mora P., Giordano M., Santamaría A. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2009; 203(2): 151–164.
- [43] Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., Kotlinska, JH. Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2019; 392(1):1–18.
- [44] Nazari L, Somayeh K, Salehi I, et al. Investigation of the protective effects of lutein on memory and learning using behavioral methods in a male rat model of Alzheimer's disease. *J Func Food.* 2022; 99: 105319.
- [45] Hossein G, Moafi M, Mirbehmahani S, et al. Chronic administration of methylphenidate did not affect memory and GDNF levels but increase astrogliosis in adult male rat's hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 2020; 108:101818
- [46] Ramos, KS., Reyes-Reyes, E. Overview of Alterations in Cell Signaling. *Comprehensive Toxicology.* 2018; 8:221–243.
- [47] Notaras, M., Van den Buuse, M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. *Mol Psychiatry.* 2020; 25:2251–2274.
- [48] Jeanneteau, F., Arango-Lievano. M., Chao. MV. Neurotrophin and synaptogenesis. *Comprehensive Dev Neurosci.* 2020; 167-192
- [49] Kiyofumi, Y., Mizuno, M., Nabeshima, T. Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci.* 2002; 70:735–744.
- [50] Miranda, M., Morici, JF., Zanoni, MB., et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. *Front Cell Neurosci.* 2019; 7;13:363.
- [51] Baldelli, P., Novara, M., Carabelli, V., et al. Carbone E. BDNF up-regulates evoked GABAergic transmission in developing hippocampus by potentiating presynaptic Nand P/Q-type Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> channels signaling. *Eur J Neurosci.* 2002; 16:2297–2310.
- [52] Mu, JS., Li, WP., Yao, ZB., et al. Deprivation of endogenous BDNF results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res.* 2009; 835:259–265.
- [53] Nieto, RR., Carrasco, A., Corral, A. et al. BDNF as a Biomarker of Cognition in Schizophrenia/Psychosis: An Updated Review. *Front Psychiatry.* 2021; 12:662407.
- [54] Kheng Siang, T., Hui Ho, CS., San Tam, WW., et al. Decreased Serum Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Levels in Patients with Alzheimer's Disease (AD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(2):257

- [55] Fumagalli, F., Racagni, G., Riva, M. The expanding role of BDNF: a therapeutic target for Alzheimer's disease?. *Pharmacogenomics J.* 2016; 6:8–15.
- [56] Palasz, E., Wysocka, A., Gasiórowska A., et al. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(3):1170.
- [57] Mizuno, M., Yamada, K., Tran, MH, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase is mediating BDNF-dependent spatial learning. *Mol Psychiatry.* 2003; 8(2):217–224.
- [58] Yamada, K., Nabeshima, T. Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in Memory Processes. *J Pharmacol Sci.* 2003; 91(4):267–270.
- [59] Minichiello, L. TrkB signalling pathways in LTP and learning. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(12):850–860.
- [60] Koponen, E., Voikar, V., Riekkö, R., et al. Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLC gamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 26(1):166–181.
- [61] Jenkins, D.J.A., Augustin, L.S.A., Malick, A., Kendall, CWC. Glucose: Chemistry and dietary sources. *Encyc. Hum. Nutr.* 2013; 2:390–398.
- [62] Siesjö, BK. Brain energy metabolism. *Annuals of Neurology.* 2019; 5:308.
- [63] Siebert, G., Gesner, B., Klasser, M. Energy Supply of the central nervous system. *Bibl Nutr Dieta.* 2016; 38:1–26.
- [64] Borgmann, D., Ciglieri, C., Biglarin, N., et al. Gut-brain communication by distinct sensory neurons differently controls feeding and glucose metabolism. *Cell Metabolism.* 2021; 3(7):1466–1482.
- [65] Benton, D., Owens, DS., Parker, P.Y. Blood glucose influences memory and attention in young adults. *Neuropsychol.* 2013. 32:595–607.
- [66] Benton, D., Owens, D.S. Blood glucose influences memory and human memory. *Psychopharmacol.* 2015; 113:83–88.
- [67] Gold, P.E. Role of glucose in regulating the brain and cognition. *Am. J. Clin. Nutr.* 2015; 61:S987–995.
- [68] Van der Zwaluw, N.L., Van de Rest, O., Kessels, RP., de Groot, RC. Short-term effects of glucose and sucrose on cognitive performance and mood in elderly people. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2014; 36:517–527.
- [69] Erbaş, O., Erdoğan, AM., Khalilnezhad, A., et al. Evaluation of long-term effects of artificial sweeteners on rat brain: a biochemical, behavioral, and histological study. *J Biochem Mol Toxicol.* 2018; 32(6):1–6.
- [70] Suswiantoro, V., Saputri, FC., Mun'im, A. Memory Loss induced by Aspartame in Albino Rats: Study on neurobehavioral changes. *Jurnal Aisyah : Jurnal Ilmu Kesehatan.* 2021; 6(2):363–368.
- [71] López-Meza, MS., Otero-Ojeda, G., Estrada, JA., Esquivel-Hernández FJ., Contreras I. The impact of nutritive and non-nutritive sweeteners on the central nervous system: preliminary study. *Nutr Neuroscience.* 2021; 1–10.
- [72] Kai-Jing, Y., Ding-Yuan, X., Zhao, L., et al. Effects of different sweeteners on behavior and neurotransmitters release in mice. *J Food Sci Technol.* 2020; 57:113–121.

- [73] De la Garza, AL., Romero-Delgado, B., Martínez-Tamez, AM., et al. Maternal sweeteners intake modelates gut microbiota and exacerbates learning and memory in adult male offspring. *Front. Pediatr.* 2022; 9:1–12.
- [74] Yu H, Zhang Z, Shi Y, et al. Association study of the decreased serum BDNF concentrations in amnesic mild cognitive impairment and the Val66Met polymorphism in Chinese Han. *J Clin Psychiatry.* 2008; 69:1104–1111
- [75] Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-derived neurotrophic factor: a key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13:363.
- [76] Molteni R., Barnard R.J., Ying Z., et al. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neurosci.* 2002; 112(4):803–814.
- [77] Wei-na Cong, Rui Wang, Huan Cai, et al. Long-Term Artificial Sweetener Acesulfame Potassium Treatment Alters Neurometabolic Functions in C57BL/6J Mice. *PLoS One.* 2013; 8(8):e70257
- [78] Spencer, SJ, Korosi, A., Layé, S. et al. Food for thought: how nutrition impacts cognition and emotion. *npj Sci Food.* 2017; 1:7.
- [79] Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab.* 2014; 25(2):89–98.
- [80] Gravesteyn, E., Mensink, R.P., Jogchum, P. Effects of nutritional interventions on BDNF concentrations in humans: a systematic review. *Nutritional Neuroscience.* 2022; 25(7):1425-1436
- [81] Ghashang, S.K., Hamdan, I., Lichtinghagen, R. Alterations of Brain-Derived Neurotrophic Factor and Creatinine During Ramadan Fasting: A Prospective, Controlled Clinical Trial. *Iran Red Cres Med J.* 2019.
- [82] Contreras-Chávez GG., Estrada JA., Contreras I. Changes in Appetite Regulation-Related Signaling Pathways in the Brain of Mice Supplemented with Non-nutritive Sweeteners. *J. Mol. Neurosci.* 2021; 71:1144–1145.
- [83] Contreras-Chávez GG., Estrada JA., Contreras I. Changes in cerebral expression of ERK 1/2 related to commercial sweetener consumption in BALB/c mice. *FSEB J.* 2020; 34(S1): 1–1.
- [84] Harrison FE., Hosseini AH., McDonald MP. Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav. Brain Res.* 2009; 198:247–251.
- [85] McHugh, S. B., Campbell, T. G., Taylor, A. M., Rawlins, J. N. P., Bannerman, D. M. A role for dorsal and ventral hippocampus in inter-temporal choice cost-benefit decision making. *Behav. Neurosci.* 2008; 122(1): 1–8.
- [86] Gerwing GJ., Poele EM., Dijkhuizen L., Kamerling JP. Stevia Glycosides: Chemical and Enzymatic Modifications of Their Carbohydrate Moieties to Improve the Sweet-Tasting Quality. *Adv. Carbohydr Chem Biochem.* 2016; 73: 1–72.
- [87] Domingo J. Piñero and James R. Connor. Iron in the Brain: An Important Contributor in Normal and Diseased States. 2000; 6(6): 435–453.
- [88] Magnuson B, Carakostas M, Moore N, Poulos S, Renwick A. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr Rev.* (2016) 74:670–89.
- [89] Knight I. The development and applications of sucralose, a new high-intensity sweetener. *Can J Physiol Pharmacol.* (1994) 72:435–9.

- [90] Rodero AB., Rodero LS., Azoubel R. Toxicity of sucralose in humans: A review. 2009; 27(1): 239–244.
- [91] Schiffman SS., Rother KI. Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *J. Toxicol. Env. Heal. B.* 2013; 16: 399 – 451.
- [92] Attar, A., Liu, T., Chan, TC., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K., Bitan, G. A shortened barnes maze protocol reveals memory deficits at 4-months of age in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2013; 8(11): e80355.
- [93] Souza KA., Powell A., Allen GC., Earnest DJ. Development of an age-dependent cognitive index: relationship between impaired learning and disturbances in circadian timekeeping. *Front. Aging Neurosci.* 2022; 14:991833.
- [94] Zhang X.Y., Liang, J., Chen, D.C., Xiu, M.H., Yang, F.D., Kosten, T.A., Kosten, T.R. Low BDNF is associated with cognitive impairment in chronic patients with schizophrenia. *Psychopharmacol.* 2012; 222:277–84.
- [95] Wu, Z., Seong, C.C., Ye, K. Neurotrophic signaling deficiency exacerbates environmental risks for Alzheimer's disease pathogenesis. *PNAS.* 2021; 118(25): e2100986118.