



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN LA CORTEZA PREFRONTAL DE RATAS
WISTAR DE 90 DÍAS TRATADAS CON EDULCORANTES ASPARTAMO Y
ACESULFAMO DE POTASIO.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SOLIS MEDINA ANAYELLY.

DIRECTOR: DRA. ALMA DELIA GENIS MENDOZA.

ASESOR: Q.F.B. MARÍA DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURAN.

MÉXICO D.F a 8 de Febrero del 2016.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Resumen

Antecedentes: La obesidad es una enfermedad que tiene gran impacto sobre la salud, además de traer grandes costos para el sector salud, por lo que se han tomado medidas para prevenirla. Una medida es la eliminación del azúcar de algunos productos comerciales y en su lugar emplear edulcorantes sintéticos. Los edulcorantes sintéticos aportan el sabor dulce, con o sin aporte de calorías por lo que en los últimos años se ha incrementado el consumo de edulcorantes en el mundo. Los edulcorantes más utilizados por la industria son el acesulfamo de potasio (acesulfamo k) y el aspartamo su consumo durante tiempos prolongados se ha asociado a problemas neurobiológicos uno de ellos es el cambio en la morfología neuronal.

Objetivo: Determinar si el consumo de aspartamo y acesulfamo k modifican la cantidad de NSE (Enolasa Específica de Neuronas) y GFAP (Proteína Ácida Fibrilar Glial) presentes en la corteza prefrontal de las ratas Wistar de 90 días de edad.

Método: Se realizó un estudio en ratas Wistar de casos y controles, con técnicas histológicas en un modelo animal con consumo de aspartamo y Acesulfamo k.

Resultados: El consumo de aspartamo y acesulfamo k provocó un aumento de GFAP y la disminución de NSE en la corteza prefrontal de ratas Wistar.

Conclusiones: Se observó cambios histológicos en la corteza prefrontal de rata por el consumo de los edulcorantes aspartamo y acesulfamo k durante 90 días.

Abreviaturas.

Acesulfamo K: Acesulfamo de potasio.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
Del inglés Food and Agriculture Organization.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

JECFA: Expertos en Aditivos Alimentarios en el ámbito internacional. Del inglés
Experts on Food Additives internationally.

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Del inglés European Food
Safety Authority.

FDA: Secretaria de administración de alimentos y fármacos. Del inglés Food and
Drug Administration.

IDA: Ingesta diaria admisible. Del inglés Acceptable Daily Intake.

INS: Sistema de numeración internacional. Del inglés international numbering
system.

E.U.A: Estados unidos de américa.

SNC: Sistema Nervioso Central.

ADH: Enzima alcohol deshidrogenasa. Del inglés enzyme alcohol
dehydrogenase

AEAC: Transportador de aminoácidos. Del inglés amino acid transporter

BBB: Barrera hematoencefálica. Del inglés blood brain barrier.

NMDA: N- metil- D- aspartato. Del inglés N- methyl-D-aspartate.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

SNS: Sistema Nervioso Somático.

SNA: Sistema Nervioso Autónomo

Cg1: Cingulada anterior. Del inglés anterior cingulate.

PL: Prelímbico.

IL: Infralímbico.

mo: orbital medial.

PrC: precentral.

vo: orbital ventral.

vlo: orbital ventral lateral.

LO: orbital lateral.

AIV: área insular ventral.

AID: área insular agranular dorsal.

NSE: Enolasa específica de neuronas. Del inglés Neuron specific enolase.

NNE: Enolasa No Específica de Neuronas. Del inglés. No Specific Enolase Neuron.

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial. Del inglés Glial fibrillary acidic protein.

MF: microfilamentos.

MT: microtúbulos.

IF: filamento.s intermedios.

ENSANUT: Sistema Nacional de Encuestas de Salud.

PFA: Paraformaldehído.

PBS: Solución buffer de fosfatos.

DAPI: 4 ,6-diamino-2-fenilindol.

Índice General.

1	Introducción.....	1
2	Marco Teórico.....	3
2.1	Edulcorantes.....	3
2.1.1	Aspartamo.....	8
2.1.1.1	Efectos del metanol.....	10
2.1.1.2	Efectos de la Fenilalanina.....	11
2.1.1.3	Efectos del ácido aspártico.....	11
2.1.2	Acesulfamo de potasio.....	12
2.2	El sistema Nervioso.....	13
2.2.1	Sistema Nervioso Periférico.....	13
2.2.2	Sistema Nervioso Central.....	14
2.2.2.1	El Cerebro.....	14
2.3	La Corteza Cerebral.....	15
2.31	Neuronas de la corteza Cerebral.....	15
2.32	Capas de la corteza cerebral.....	17
2.4	La Corteza Prefrontal.....	19
2.5	Modelos animales.....	20
2.6	Enolasa específica de neuronas.....	22
2.7	Proteína ácida fibrilar glial.....	23
3	Planteamiento del problema.....	25
4	Hipótesis de trabajo.....	26

5	Objetivos.....	27
6	Diseño experimental.....	28
7	Material y Métodos.....	30
8	Análisis estadístico.....	34
9	Resultados.....	36
10	Discusión de resultados.....	46
11	Conclusiones.....	49
12	Referencias.....	50
13	Anexos.....	59

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes.....	5
Tabla 2. Tipos y distribuciones celulares de los filamentos intermedios.....	23

Índice de cuadro.

Cuadro 1. Edulcorantes aprobados en Europa, E.U.A. y México.....	6
Cuadro 2. Funciones de los lóbulos cerebrales.....	15

Índice de Figuras.

Figura 1. La estructura del Aspartamo.....	8
Figura 2 La estructura del Acesulfamo K.....	12
Figura 3. El cerebro de la rata.....	14
Figura 4. Las capas de la corteza cerebral.....	18
Figura.5 Corteza prefrontal de rata.....	19
Figura 6. Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con hematoxilina – eosina.....	39
Figura 7.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con la técnica de inmunohistoquímica para GFAP.	40

Figura 8.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar teñidas mediante la técnica de inmunohistoquímica para NSE.....41

Figura 9.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con la técnica de inmunofluorescencia para GFAP.....42

Figura 10.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar teñidas mediante la técnica de inmunofluorescencia para NSE.....43

Figura 11. Astrocitos GFAP positivos de la corteza prefrontal del grupo de ratas Wistar tratadas con Aspartamo y Acesulfamo K y controles..... 44

Figura 12. Neuronas NSE positivos de la corteza prefrontal de la rata Wistar tratadas con edulcorantes y controles..... 45

1. Introducción.

Debido a la incidencia de obesidad en nuestro país se ha disminuido el empleo de azúcares en los productos alimenticios y el consumo de edulcorantes ha ido en aumento. [1] Los edulcorantes son compuestos químicos ampliamente utilizados en la industria alimentaria para mimetizar el sabor dulce del azúcar con un aporte menor de calorías. Su uso frecuente en una mayor cantidad de productos alimenticios trae como consecuencia que los consumidores estén expuestos a sus efectos por períodos. [1-5]

La ingesta durante períodos prolongados de algunos edulcorantes, como aspartamo y acesulfamo de potasio (Acesulfamo K) se han asociado con el desarrollo de algunos padecimientos mentales. Las patologías que más se han asociado al consumo de estos edulcorantes son ansiedad y depresión. [7 ,8] Sumado a esto, existen evidencias de que el consumo de aspartamo provoca aumento de estrés oxidativo y cambios histológicos en las neuronas del hipocampo y la corteza prefrontal en ratas. [3, 9, 10, 11]

Aunque se han reportado problemas neuronales debido al consumo de edulcorantes como el aspartamo en la corteza prefrontal de cerebros de ratas, no se ha podido correlacionar el consumo de aspartamo y acesulfamo k con daño en cerebros humanos. Pues la poca disponibilidad de este órgano nos lleva a experimentar en distintos modelos alternativos como las líneas celulares y en modelos animales. [12]

El presente trabajo pretende evaluar el daño neuronal sufrido tras el consumo prolongado de Aspartamo y Acesulfamo K utilizando la corteza prefrontal de ratas Wistar como modelo, mediante técnicas histológicas.

2. Marco Teórico.

2.1. Edulcorantes.

Los edulcorantes son compuestos que brindan sabor dulce a los alimentos [2], son capaces de mimetizar el efecto del sabor dulce del azúcar aportan menor energía que el azúcar pueden ser extractos naturales o sintéticos [3]. Están frecuentemente presentes en los alimentos, por tal motivo pueden ser considerados como aditivos alimentarios [4].

El edulcorante ideal debe poseer como características un alto grado edulcorante, sabor agradable sin gusto amargo, sin color ni olor, además de solubilizarse rápidamente, ser estable, funcional y económico, no ser toxico, ni provocar caries dentales, debe ser metabolizado o excretado normalmente.[5,13]

Los edulcorantes son muy utilizados en comidas, bebidas, confiterías y la industria farmacéutica [2-6]. Hay un gran número de edulcorantes pero son muy pocos los aprobados para el uso en comida, estos pueden variar de país en país [6]. Los edulcorantes artificiales han incrementado su uso en la dieta, ya que proporcionan el sabor dulce del azúcar, pero sin el aporte calórico [14,3-5]. La industria alimentaria está promoviendo el uso de productos con edulcorantes (llamados de dieta o light), destacando sus beneficios en la salud de diversas enfermedades, como, la obesidad, diabetes, síndrome metabólico sin tomar en cuenta la salud dental. [6] Los edulcorantes pueden ser usados separados o en combinación con otros edulcorantes para hacer mezclas [6, 15, 16].

En lo que concierne a los aspectos legales, los edulcorantes son considerados aditivos alimentarios [5] y por ende deben ser analizados. La regulación de los edulcorantes es realizada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios en el ámbito internacional (JECFA), y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el ámbito europeo, además de agencias alimentaria tales como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los E.U.A. (FDA) [3,17] y la Secretaría de Salud en México [18]. Estas autoridades aportan la información de la Ingestión Diaria Aceptable o Admitida (IDA) y los niveles máximos en que pueden ser empleados los aditivos. La IDA de una sustancia es la centésima parte de una cantidad, que suministrada diariamente, no es capaz de provocar daño para la salud [3,17], se expresan en mg/kg de peso corporal del individuo. Estos valores encontrados son difundidos al resto del mundo como recomendaciones, por las diferentes organizaciones científicas, nacionales o internacionales.

Los edulcorantes se pueden clasificar de diferentes maneras: en función de su contenido calórico (calóricos o acalóricos) [14, 17, 19], según su origen (natural o artificial) [3, 14] o incluso según su estructura química [3]. La clasificación actual de los principales edulcorantes se presenta en la tabla 1.

Clasificación de edulcorantes.

Calóricos	Naturales.	Azúcares.	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructuosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa, tagatosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce o sorgo y azúcar de palma o coco.
	Artificiales.	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido.
		Alcoholes del azúcar.	Sorbitol, xilitol, manitol, eritriol, maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol.
Acalóricos	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías.	Luo Han Guo, stevia, taumatina, pentadina, monelina, brazzeína.
	Artificiales.	Edulcorantes artificiales.	Aspartamo, sucralosa, sacarina, neotamo, acesulfamo de potasio, ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo.

Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes. (Modificado de Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación Nutrición Hospitalaria, 2013)

En la actualidad se utilizan muchos edulcorantes pero muy pocos son los aprobados para su uso en alimentos, los cuales pueden variar de país en país [6]. En el cuadro 1 se pueden ver los aprobados en Europa, E.U.A. y México. [20, 6, 3]

Edulcorantes	Unión Europea.	Estados Unidos.	México.
Acesulfamo de Potasio.	*	*	*
Aspartamo.	*	*	*
Sal de Aspartamo-Acesulfamo	*		
Ciclamato	*		*
Neohesperidina Dihidrocalcona.	*		*
Sacarina.	*	*	*
Sucralosa.	*	*	*
Taumatina.	*		
Neotamo	*	*	*
Estevia.		*	*
Luo han guo.		*	
Alitame.			*
Eritritol.			*
Lactitol.			*
Maltitol.			*
Manitol.			*

Cuadro1. Edulcorantes aprobados en Europa, E.U.A. y México. [20, 6, 3, 21].
*Permitidos en cada país.

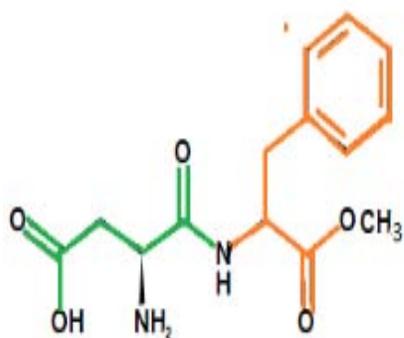
Los edulcorantes más utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica son los edulcorantes de alta intensidad, también llamados edulcorantes artificiales o edulcorantes bajos en calorías. [2,6]

El interés de la comunidad científica se ha tornado hacia los edulcorantes [3,18] debido que se han asociados a diferentes trastornos en el sistema nervioso central (SNC) provocando efectos adversos como: alteraciones neuronales como dolores de cabeza, insomnio, migraña, vértigo, náuseas, fatiga, irritabilidad, depresión, ataques de ansiedad y pérdida de memoria. [9,22, 23]

Los edulcorantes de alta intensidad de mayor consumo en el mundo son sacarina de sodio, ciclamato de sodio, aspartamo, sucralosa, estevia y acesulfamo k; de estos, el aspartamo y el acesulfamo k han sido de gran interés para el estudio de enfermedades neurodegenerativas [6,3,9] por la alteración que trae su ingesta en el organismo [9,22], como cambios morfológicos a nivel neuronal [10], páncreas [24], hígado [8] y aumento de la concentración plasmática de lípidos [11].

2.1.1. Aspartamo.

El Aspartamo fue descubierto en 1965 por James Shlatter, pero fue hasta 1981 cuando fue autorizada por la FDA para su comercialización [23, 25], en la industria de alimentos y bebidas con el nombre comercial de NutraSweet [4, 23].



L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester

Aspartate Phenylalanine Methanol

Figura 1. Estructura del aspartamo

El Aspartamo (N-L- α -aspartil-L-fenilalanina-1-metil ester) [2, 14, 15, 18, 9, 23, 10] es un dipéptido [8], compuesto por: fenilalanina y ácido aspártico, unidos a una molécula de metanol [9, 23, 15]. Los aminoácidos le dan características hidrofóbicas e hidrofílicas [2]. Estos están presentes de forma natural en la mayoría de los alimentos ricos en proteínas (carne, productos lácteos y verduras).

[25] El Aspartamo es utilizado como edulcorante artificial (E-951) [2-6, 13-17] en más de 90 países [2, 18]. Se encuentra en forma de cristales blancos, sin olor [4], es ligeramente soluble en agua (aprox. 1 g / 100 ml), alcohol e insoluble en grasas y aceites [15], su peso molecular es de 294.3 Da [26, 4], es 200 veces más dulce que la sacarosa, aporta 4 cal/g [3-4], tiene sabor similar a la sacarosa y no deja sabor amargo o metálico [4], a pH 3-5 es estable [26]. Tiende a ser susceptible a la degradación bajo ciertas condiciones de calor, humedad y pH. [4, 26], por lo tanto no se puede utilizar en productos ácidos, horneados o bebidas carbonatadas debido a su inestabilidad, dado que el aumento de temperatura en el horneado asociado con la humedad provoca la ruptura de la molécula de aspartamo

dando un metabolito intermediario, dicetopiperazina [4, 15]. La dicetopiperazina, no se encuentra en la dieta corrientemente, y puede que se ligue a proteínas plasmáticas, produciendo reacciones alérgicas [4]. Presenta sinergismo con sacarina, acesulfamo K y sorbitol [26, 27, 15]. Presenta una IDA de 40 mg/kg en E.U.A; 50 mg/Kg en Europa y 350mg/L en México [3, 18, 23, 25, 20, 21]. Es utilizado en más de 6000 productos como: bebidas carbonatadas, bebidas no alcohólicas en polvo, chocolates, gomas de mascar, caramelos, postres, yogurt, edulcorantes de mesa y algunos productos farmacéuticos (vitaminas y grajeas) sin azúcar para la tos [6, 10, 9, 15].

El aspartamo es quizás el edulcorante artificial más controversial [5], ya que ha sido ampliamente estudiado en todo el mundo, debido a sus efectos secundario [4, 28, 10]. Los efectos secundarios se presentan cuando se acumulan grandes cantidades, debido a que aumentan sus metabolitos o intermediarios, los cuales producen daño neuronal, como: problemas de comportamiento como la ansiedad [4, 8, 9, 23, 24, 25, 29].

Los efectos secundarios debidos a los metabolitos del aspartamo se localizan principalmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), los cuales producen efectos adversos como: alteraciones neuronales y desórdenes conductuales [4, 9, 10, 8, 30]. Las alteraciones neuronales que se presentan son: daño morfológico, apoptosis y alteración en el nivel de concentración de catecolaminas [4, 8, 10, 30, 31, 28]. Los desórdenes conductuales son depresión, ansiedad, insomnio e irritabilidad. [4, 9, 10, 8, 30, 28].

Las alteraciones no solo afectan al SNC, sino también a diferentes partes del cuerpo, causando problemas como: gastritis, defectos de nacimiento, disminución

del apetito, daño a células del hígado y riñón, además pueden ser un detonante de lupus sistémico, leucemia, problemas visuales, dolor de cabeza, espasmos, vértigo, pérdida de memoria y convulsiones. [4, 6, 8, 9, 10, 17, 22, 23, 28, 30].

Después de la administración oral, el aspartamo es metabolizado en el intestino delgado, donde se hidroliza por la enterasas y peptidasas [18] para generar 50% fenilalanina, 40% ácido aspártico y 10% metanol libre. [9, 15, 30, 32] Estos metabolitos se incrementan en el torrente sanguíneo tras la ingesta de aspartamo. [23, 33]

2.3.1.1. Efectos del metanol.

El metanol libre se forma cuando el grupo metilo de aspartamo se encuentra con la enzima quimotripsina en el intestino delgado, esto hace que se aumenten los niveles de metanol en el plasma [27]. La toxicidad del metanol es causada por su metabolismo. Este ocurre en el hígado con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) que oxida al metanol en formaldehído, posteriormente el formaldehído es oxidado por la deshidrogenasa de formaldehído a ácido fórmico, y por último el ácido fórmico se convierte a dióxido de carbono por medio de agua y la 10-formil tetrahidrofolato sintetasa [34]. El metanol daña a las células del hígado, porque es oxidado a formaldehído y ácido fórmico [18,30,34], a esto se le une la formación de anión superóxido y peróxido de hidrógeno [30].

El ácido fórmico inhibe al complejo de citocromo oxidasa al final de la cadena respiratoria en las mitocondrias, causando hipoxia celular, produciendo acidosis metabólica, con incremento de radicales libres, los cuales podrían dañar al SNC, especialmente el nervio óptico [18, 27, 30].

2.3.1.2. Efectos de la Fenilalanina.

La concentración de fenilalanina plasmática se duplica una hora después de su ingesta [32]. El hígado convierte a la fenilalanina en tirosina por la enzima fenilalanina hidroxilasa. La forma en la que fenilalanina llega al cerebro es mediante su unión a un transportador de aminoácidos (AEAC) que hace que cruce la barrera hematoencefálica (BBB). Esto da una sobrecarga de fenilalanina en las áreas circulantes, lo que limita el transporte de otros aminoácidos (tirosina, triptófano y metionina). La disminución de los aminoácidos en el cerebro puede tener como consecuencia cambios en las concentraciones de catecolaminas [35,36], ya que al no haber tirosina en el cerebro, no habrá producción de dopamina, lo cual daña principalmente a personas que sufren de Parkinson. [28, 31, 36]

La fenilalanina actúa como agonista de glutamato sobre los receptores NMDA (N-metil- D- aspartato), activándolos continuamente. La activación continua puede causar daño a las neuronas del cerebro. [28, 18]

2.1.1.3. Efectos del ácido aspártico.

El ácido aspártico actúa como neurotransmisor excitador en el SNC [36]. Es precursor del Glutamato, asparagina y glutamina, se inactiva por la reabsorción en la membrana presináptica y abre un canal de iones. El ácido aspártico es un neurotransmisor excitatorio y tiene una mayor probabilidad para la despolarización de la membrana postsináptica. Incluso los aumentos de corta vida son suficientes para inducir alteraciones neuroendocrinas [28].

2.1.2. Acesulfamo de potasio. (Acesulfamo K)

El acesulfamo k fue descubierto en 1967 por el químico Karl Clauss, pero fue hasta 1988 aprobado en E.U.A para uso específica de edulcorante de mesa. En 1998 la FDA aprobó su uso en bebidas y en 2003 se aprobó para utilizarlo en todo tipo de comida, excepto para carne o aves de corral. Se utiliza principalmente en productos horneados, postres congelados, dulces, bebidas y pastillas para la tos.

[2, 4]

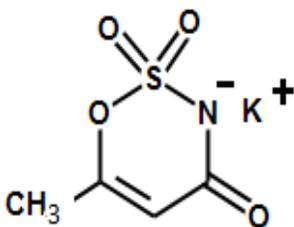


Figura 2. Estructura del acesulfamo K.

El Acesulfamo de potasio (5, 6-dimetil-1, 2, 3-oxatizaina-4(3H)-ona-2,2-dióxido) es un endulzante no calórico sintético (E-950), conocido comercialmente con el nombre de Sunett® [3,18]. Es un polvo cristalino, inodoro, incoloro, se descompone a 225°C, su peso molecular es 201.1 g/mol, pKa 2 [29], densidad de 1.81 g/cm³, altamente soluble en agua, tiene una vida media amplia, 200 veces más dulce que la azúcar y tiene

efecto sinérgico combinado con otros edulcorantes para intensificar su grado de dulzor y disminuir su sabor amargo. Su IDA permitida en E.U.A es de 0.9 mg/kg peso/día, la FDA y 15 mg/kg peso/día.y 350mg/L en México [9, 18, 20, 21, 23]

Después de la administración oral, el acesulfamo de potasio se absorbe en el intestino delgado. En 30 min alcanza su concentración sanguínea máxima en ratas. En el momento de concentración máxima en sangre, los niveles más altos se encuentran en el tracto gastrointestinal, biliar, riñones y vejiga urinaria. El 98.4% de la dosis administrada se excreta en la orina como el compuesto original en rata, por lo tanto no es metabolizado, por lo que no produce energía. [18, 23, 37]

En dosis altas (60, 450 mg/kg) el acesulfamo de potasio está relacionado con daños clastogénicos y genotóxicos. [23] Además tiene influencia moderada sobre la homeostasis metabólica, incluyendo, alteraciones en ayuno, niveles de insulina, tamaño de islotes pancreáticos, niveles de lípidos y funciones cognitivas. [11] Por lo que su daño depende de la dosis. [23, 38]

2.2. El sistema Nervioso.

El sistema nervioso es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que tiene como misión controlar y regular el funcionamiento de los diferentes órganos que forman los sistemas del organismo. Coordinando la relación del organismo con el medio externo.

Se divide en SNC y sistema nervioso periférico (SNP). El sistema nervioso central se sitúa dentro de la cavidad craneana y el conducto de la columna vertebral. Mientras que el SNP es la parte localizada fuera de estas estructuras anatómicas. [39-43]

2.2.1. Sistema Nervioso Periférico.

El sistema nervioso periférico está compuesto por los nervios craneales, nervios espinales y ganglios. [43,44] Los nervios conectan a los órganos con el SNC para coordinar, regular e integrar el organismo, por medio de respuestas involuntarias. [40,42,43] El sistema nervioso periférico se divide en: sistema nervioso somático (SNS) y sistema nervioso autónomo (SNA).

El sistema nervioso somático interactúa con el medio exterior, llevando señales sensoriales hacia el sistema nervioso central. Su función es transmitir señales motoras del sistema nervioso central al músculo.

El SNA transmite señales que regulan el medio interno por medio de los nervios simpático y parasimpático. Los nervios simpáticos estimulan, organizan y movilizan los recursos energéticos ante situaciones de peligro. A diferencia de los nervios parasimpáticos, los cuales tienen la función de conservar energía para el organismo. Cada órgano del cuerpo recibe señales tanto simpáticas como parasimpáticas. El equilibrio entre las señales emitidas por los nervios simpáticos y parasimpáticos son las que regulan la homeostasis del organismo [39-42].

2.2.2. Sistema Nervioso Central.

El SNC se encuentra formado por cerebro, cerebelo, tronco encefálico y médula espinal [45]. Su función es recibir aferencias así como eferencias de estímulos internos y externos; para integrarlas, relacionarlas y producir una respuesta [46].

2.2.2.1 El Cerebro.

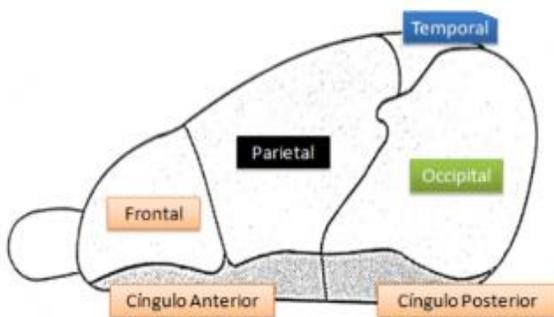


Figura.3. El cerebro de la rata (modificado de Zeman, 1965)

El cerebro consta de dos hemisferios derecho e izquierdo. Cada hemisferio esta subdividido en surcos o cisuras, los cuales forman cinco lóbulos: frontal, occipital, parietal, lateral e insula. [39-43]. Sus funciones son

complejas, las cuales se pueden ver resumidas en el cuadro 2.

Lóbulos del cerebro.	Funciones.
Frontal.	Responsables de la iniciativa, el juicio, el razonamiento abstracto, la creatividad, control voluntario del músculo esquelético y la conducta socialmente aceptada.
Occipital.	Integración de movimientos en el enfoque de los ojos, correlación de imágenes visuales con experiencias visuales previas.
Parietal.	Somatoestésica, entendimiento del habla, formulación de palabras para expresar pensamientos, emociones e interpretación de texturas y figuras.
Temporal.	Interpretar sensaciones auditivas, memoria de experiencias auditivas y visuales.
Ínsula.	Codificación de la memoria e integración de la información sensitiva con respuesta visceral.

Cuadro 2. Funciones de los lóbulos cerebrales.

2.3. La Corteza Cerebral.

2.3.1. Neuronas de la corteza Cerebral.

Los lóbulos cerebrales se encuentran cubiertos por una capa de células, de 2-4 mm de grosor, llamada **corteza cerebral**. Las células que forman la corteza cerebral son de dos tipos: **neuronas** y **neuroglia**.

La **neurona** es la unidad básica del sistema nervioso. La función principal de la neurona es: recepción, conducción y transmisión de señales electroquímicas. Se clasifican, de acuerdo a su forma, en: neuronas horizontales de Ramón y Cajal, neuronas estrelladas, neuronas piramidales, neuronas de Martinotti y neuronas fusiformes [44].

Neuronas horizontales de Cajal: son medianas, de cuerpo fusiforme, poseen dendritas que se extienden a corta distancia. El axón a menudo forma parte de una de sus dendritas y se aleja del soma.

Neuronas de Martinotti: poseen forma multipolar con un campo dendrítico restringido y axón poco ramificado.

Neuronas estrelladas: presentan forma poligonal, su tamaño puede variar de 8 a 15 micras. La dendrita presenta múltiples ramificaciones y sus axones son cortos terminando en una neurona cercana.

Neuronas fusiformes: son neuronas piramidales modificadas de cuerpo triangular u ovoide, [44] de cada extremo del soma parte un frondoso árbol dendrítico. El axón se bifurca y orienta sus ramas verticalmente.

Neuronas piramidales: presentan un soma triangular, una dendrita apical orientada hacia la superficie cortical (observada en cortes coronales) y dendritas basales muy ramificadas que emergen de la base del soma. La superficie dendrítica está recubierta por protrusiones citoplasmáticas llamadas espinas dendríticas, que incrementan su número distalmente. Los axones emergen como prolongaciones finas de la base del soma neuronal o de la porción proximal de un tallo dendrítico.

Las otras células de la corteza son la **neuroglia**. La neuroglia da sostén, nutre y protegen a las neuronas; ayudándolas a su funcionamiento. El tamaño de las células de la neuroglia es menor comparado con la neurona. La neuroglia se encuentra en mayor proporción que las neuronas y tiene la capacidad de regenerarse. La regeneración de la neuroglia es estimulada cuando las neuronas presentan daño. [39]

2.3.2. Capas de la corteza cerebral.

La corteza cerebral se divide de acuerdo a su morfología en seis capas: [44].

Capa molecular (capa plexiforme): es la más superficial, predominan las ramas terminales de dendritas, axones y neuronas horizontales de Caja.

Capa granular externa: contiene un gran número de neuronas piramidales pequeñas y estrelladas.

Capa piramidal externa: compuesta por neuronas piramidales típicas, que aumentan de tamaño del borde externo al interno de la lámina

Capa granular interna: compuesta por neuronas estrelladas y neuronas piramidales que están entre mezcladas. Esta capa no se puede diferenciar a simple vista [48].

Capa piramidal interna: contiene neuronas piramidales muy grandes con piramidales de tamaño intermedio. Las neuronas piramidales gigantes están en el área motora primaria de la corteza en el lóbulo frontal.

Capa multiforme: La mayoría son neuronas fusiformes, además de células Martinotti. [44]

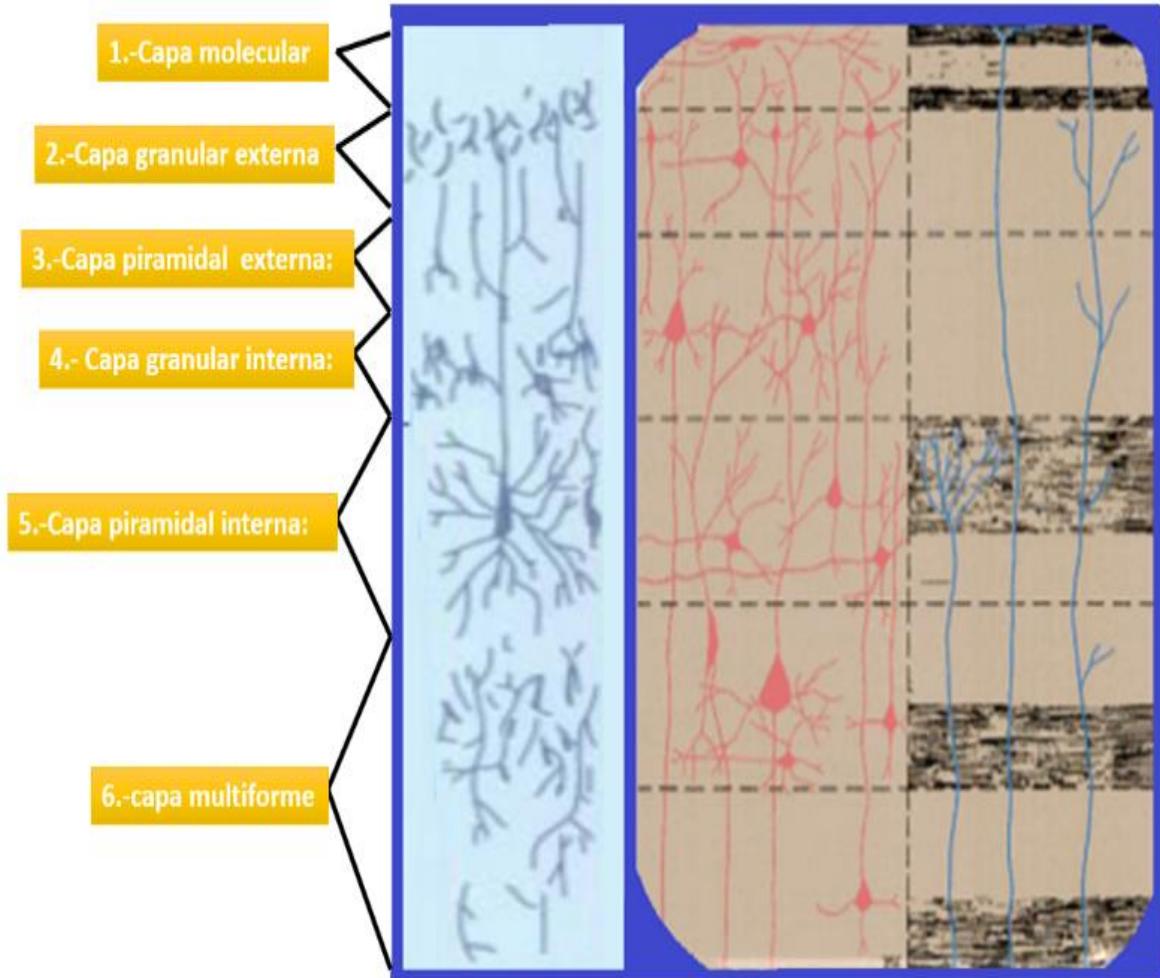


Figura 4. Las capas de la corteza cerebral.

Otra manera de dividir a la corteza es por su citoarquitectura en corteza granular y agranular. [44] La corteza granular se llama así porque contiene un alto porcentaje de células granulares y estrellares que se localizan en regiones visuales, auditivas y somatosensoriales en las capas II y IV. La corteza agranular contiene un alto porcentaje de células piramidales (comparada con las células granulares). Se localiza principalmente en la corteza motora y el campo frontal óptico. Localizadas en las capas III y V [45].

2.4. La Corteza Prefrontal.

La corteza prefrontal (CPF) se localiza rostralmente a las áreas motoras y premotoras del lóbulo frontal. [47- 48] Recibe proyecciones del núcleo medial dorsal del tálamo, estas proyecciones son el criterio para que la corteza sea considerada corteza prefrontal. La rata cumple el criterio, por tal motivo, la rata tiene corteza prefrontal. [47]

Es una estructura que recibe información de la mayoría del cerebro. Está implicada en procesos cognitivos como: memoria de trabajo, funciones ejecutivas, toma de decisiones, además de planificación del comportamiento y procesamiento de señales emocionales. [39, 47]

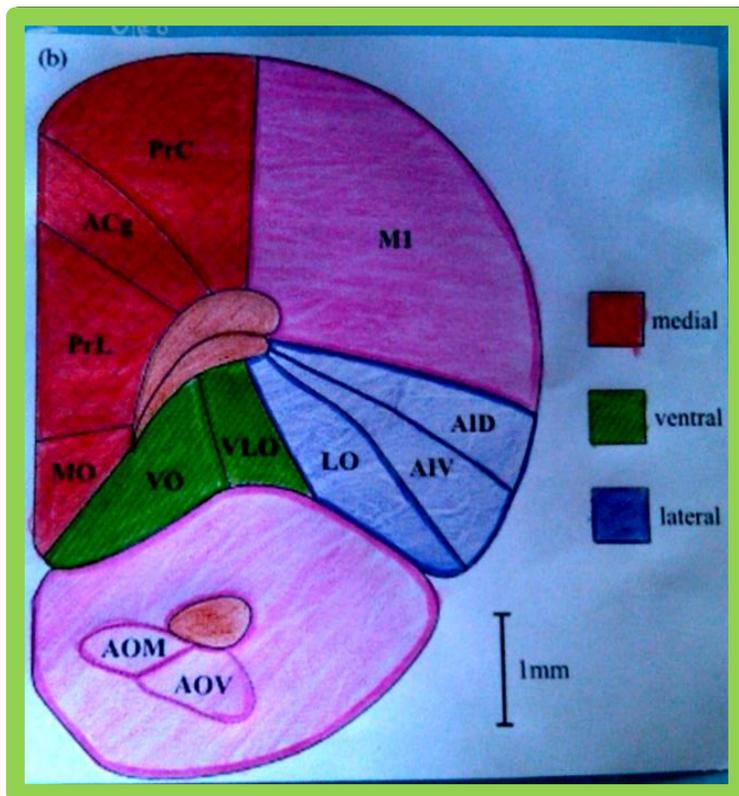


Figura.5 Corteza prefrontal de rata.

Se subdivide en tres regiones principales: medial, ventral y lateral

La CPF se encuentra dividida en tres regiones principales: medial, ventral y lateral. La corteza medial [47] es la parte principal de la pared medial de la parte anterior del hemisferio y dorsal a la rodilla del cuerpo caloso. Se subdivide en cuatro regiones: cingulada anterior (Cg1), Prelimbico (PL) e infralimbico (IL), orbital medial (mo) y precentral (PrC). El área Ventral o también llamada

orbital se situada en la zona ventral del lóbulo frontal. Se subdivide en dos: orbital ventral (vo) y orbital ventral lateral (vlo) [47]. El Área Lateral se localiza en la zona lateral del lóbulo frontal. [48] Se subdivide en tres regiones: orbital lateral (LO), área insular ventral (AIV) y área insular agranular dorsal (AID).

La característica citoarquitectónica más importante de la CPF es que está compuesta exclusivamente de áreas corticales agranulares (neuronas piramidales) en su corteza cerebral debido a que la capa IV está muy junta que casi no se distingue. [47]

2.5. Modelos animales.

Los animales han sido utilizados desde hace muchos años porque se han considerado como modelos en miniatura de los problemas humanos. [12, 49, 50] Por lo que son usados como modelos en investigación, en diagnóstico, para proporcionar un tratamiento en enfermedades que afectan al humano, además de sus importantes aportes en la docencia y la industria. Por lo cual el uso de los animales de laboratorio representa un elemento fundamental e insustituible. [12, 49, 50]

La razón por la cual son insustituibles se basa en que los códigos de ética internacionales para la investigación biomédica consideran los ensayos con animales como una obligación para poder hacer ensayos clínicos en seres humanos. Según el Código de Nuremberg, cualquier experimento hecho en seres humanos “debe ser diseñado y basado en los resultados de investigación animal”. La Declaración de Helsinki considera que la investigación clínica en seres humanos

“debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales”. [49]

Estos animales son considerados como un reactivo biológico, por lo que su pureza debe ser vigilada, controlada y regulada. La regularización de estos animales varía de país en países pero todas se basan en la aplicación del Principio de las 3 R's formulados por Russel y Burch, en Inglaterra en 1959. [12,49-53] En México el Consejo Internacional de Ciencias Médicas ha publicado principios para guiar la investigación biomédica que involucra animales:, como la Declaración Mexicana y principios Básicos de la experimentación en Animales, y la Norma Oficial Mexicana sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999).[51-55].

Los animales que se utilizan deben de estar estandarizados para garantizar que los resultados sean confiables y sean aceptados a nivel mundial, lo cual exige bioterios acreditados. Los bioterios alojan principalmente roedores que son los principales modelos de estudio. [12, 50, 51]

El animal más empleado dentro de los modelos es el ratón, se considera que es casi perfecto como modelo debido a su corto tiempo generacional, fácil reproducción y fácil mantenimiento. Gracias a estas características del ratón, es el modelo animal más utilizado por los investigadores.

El segundo lugar de utilidad como modelo animal, lo ocupa la rata porque es un modelo donde se pueden plantear protocolos de evaluación del comportamiento, ensayos endocrinológicos y nutricionales. [12,49-51]

2.6. Enolasa específica de neuronas (NSE).

La enolasa (E.C 4.2.1.11) fue descubierta en 1934 por Lohman y Mayerhof. La enolasa es una metaloenzima glucolítica citoplasmática que cataliza la reacción de deshidratación del 2 – D - fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato en la segunda mitad de la vía Embden Mayerhoff – Parnas. [56] Estructuralmente la enolasa es un homodímero de dos cadenas de 434 aminoácidos cada una, teniendo tres isoformas distintas: α , β y γ . La isoenzima $\alpha\alpha$ se encuentra distribuida principalmente en muchas células pero se encuentra principalmente en las células gliales y se le conoce con el nombre de enolasa no específica de neuronas (NNE). La isoenzima $\beta\beta$ se encuentra principalmente en el músculo y se llama enolasa específica de músculo (MSE). La isoenzima $\gamma\gamma$ se encuentra específicamente en las neuronas y las células neuroendocrinas y se conoce como enolasa específica de neuronas (NSE). [57 – 60]

La enolasa específica de neuronas (NSE) al ser una proteína sintetizada específicamente en las neuronas y estar involucrada en el proceso de generación de energía por la neurona, se ha utilizado como un marcador importante para medir daño neuronal. [61] Debido a la utilidad de la NSE como marcador de daño neuronal, se utilizará para cuantificar de manera relativa el daño provocado por el consumo de edulcorantes en la corteza prefrontal de la rata.

2.7. Proteína ácida fibrilar glial (GFAP).

Dentro del citoplasma de las células animales se encuentra una entramada red compuesta de tres estructuras, microfilamentos (MF), microtúbulos (MT) y filamentos intermedios (IF). Los MF y MT se encuentran constituidos de actina y tubulina respectivamente. Pero los IF se encuentran constituidos de proteínas distintas, dependiendo del tipo celular. Existen seis familias de proteínas que constituyen los IF, la clasificación se puede ver en el cuadro 4. [62]

Filamentos intermedios	Familia	Tipo celular
Citoqueratinas ácidas	I	Células epiteliales
Citoqueratinas neutras - básicas	II	Células epiteliales
Vimentina	III	Células mesenquimales
GFAP		Astroцитos
Desmina		Células musculares
Sinemina		Células musculares esqueléticas
Periferina		Neuronas
Nestina	IV	CNS y células precursoras musculares
Neurofilamentos		Neuronas
Internexina		Neuronas
Filensina	nc	Células ópticas
Transitina		Células gliales radiales
Lamininas	V	Ubiquitos

Tabla 2.- Tipos y distribuciones celulares de los filamentos intermedios (Tomada y modificada de [4]).

Dentro de la familia III de filamentos intermedios se encuentra la GFAP que es la principal de los filamentos intermedios de los astrocitos. [63] La proteína ácida fibrilar glial se encuentra codificada en el cromosoma 17q21 en el humano y el gen consta de nueve exones y ocho intrones, además de cuatro exones y dos intrones alternativos. La GFAP está formada por 432 aminoácidos. Su función específica aún no se ha descubierto. [64]

La GFAP al ser un componente principal de los astrocitos puede ser utilizada para medir el aumento de astrocitos en el SNC, proceso conocido como astrogliosis. Las causas de la astrogliosis pueden ser diversas, como: trauma, isquemia, enfermedades neurológicas o infecciosas y recientemente se ha descubierto que también puede deberse a la exposición a químicos. [64] El GFAP al ser un marcador de astrogliosis se puede emplear para medir el aumento relativo de la cantidad de astrocitos debido al consumo de edulcorantes.

3. Planteamiento del problema.

Según el Sistema Nacional de Encuestas de Salud (ENSANUT, 2012), México ocupa uno de los primeros lugares en obesidad a nivel mundial. La obesidad es una enfermedad que tiene un gran impacto sobre la salud debido a las patologías asociadas a está, como: problemas cardiovasculares, diabetes mellitus, hipertensión, etc. Las consecuencias debido a los efectos secundarios de la obesidad traen grandes costos para el sector salud, por lo que se han tomado ciertas medidas para prevenir esta enfermedad.

Una medida que se ha implementado es la eliminación del azúcar de algunos productos comerciales. Una consecuencia de esta eliminación es el sabor amargo. Para conservar el sabor dulce de los productos comerciales sin azúcar por lo que se utilizan edulcorantes sintéticos. Los edulcorantes sintéticos aportan el sabor dulce, sin el aporte de calorías. Debido a esta medida, en los últimos años se ha incrementado el consumo de edulcorantes en México. Los edulcorantes más utilizados por la industria son el acesulfamo k y el aspartamo.

El consumo de aspartamo y acesulfamo k durante tiempos prolongados se ha asociado a problemas neurobiológicos, como es cambio en la morfología neuronal. Por lo que en este trabajo se pretende explorar el efecto de dichos edulcorantes en un modelo animal, así como las consecuencias de uso prolongado en las neuronas de la corteza prefrontal en ratas Wistar. Por lo que se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Existirá aumento de GFAP y disminución de NSE en la corteza prefrontal de ratas tratadas con aspartamo y acesulfamo k

4. Hipótesis.

Se han reportado estudios en donde el uso de edulcorantes durante períodos prolongados puede causar daño a nivel neurobiológico en la corteza prefrontal de ratas Wistar. Por tal evidencia, se cree que existirá relación entre el consumo de edulcorantes en períodos prolongados y el aumento de GFAP y la disminución de NSE.

5. Objetivos.

General.

- Determinar si existe daño en la CPF de ratas Wistar tratadas con edulcorantes, aspartamo y acesulfamo k, mediante técnicas histológicas.

Particulares.

- Determinar si existe daño neuronal en la CPF de la rata debido al consumo de aspartamo y acesulfamo k, mediante el marcador histológico NSE (enolasa específica de neuronas).
- Determinar si existe un aumento de astrocitos en la CPF de rata, debido al consumo de aspartamo y acesulfamo k, mediante el marcador histológico GFAP (proteína fibrilar glial ácida).
- Comparar si existe diferencia en la CPF de la rata debido al consumo de dos edulcorantes distintos, aspartamo y acesulfamo k, mediante los marcadores NSE y GFAP.

6. Diseño experimental.

6.1. Tipo de estudio.

Estudio de casos y controles en un modelo animal.

6.2. Diseño del modelo animal.

Se utilizó un modelo anteriormente estructurado en el laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica. El modelo se encuentra estructurado por tres grupos:

- a) El primer grupo (n = 2 ratas Wistar), considerado como control, se le administro para su consumo diario agua corriente *ad libidum*, a partir del destete y hasta los 90 días de edad.
- b) Al segundo grupo (n = 4 ratas Wistar) se le administro *ad libidum* una solución de aspartamo, preparada diariamente en agua corriente a una concentración de aspartamo de 160 mg/L, para su consumo diario a partir del destete y hasta los 90 días de edad.
- c) Al segundo grupo (n = 4 ratas Wistar) se le administro *ad libidum* una solución de acesulfamo k, preparada diariamente en agua corriente a una concentración de acesulfamo k de 240 mg/L, para su consumo diario a partir del destete y hasta los 90 días de edad.

6.3. Variables independientes.

Número de campos de la corteza prefrontal.

6.4. Variables dependientes.

- Cantidad de células positivas a NSE.

-
-
- Cantidad de células positivas a GFAP.

6.5. Criterios de inclusión.

- El cerebro se encuentre conservado y en buenas condiciones.
- Que el corte histológico se encuentre dentro de la corteza prefrontal.
- Para que las células se consideren NSE positivas el citoplasma debe ser dos terceras partes positivo a la reacción con el anticuerpo.

6.6. Criterios de exclusión.

- Cortes que no se encuentren dentro de la corteza prefrontal.
- Cerebros que no se encuentren en buen estado.

7. Material y métodos.

7.1. Material biológico.

Se utilizarán los cerebros de ratas Wistar machos, anteriormente utilizados en el Laboratorio de Genómica de Enfermedades Psiquiátricas y Neurodegenerativas del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Las ratas se agruparon de acuerdo al tratamiento en: un grupo tratado con Aspartamo, un segundo grupo tratado con acesulfamo k y el tercer grupo donde solo consumieron agua corriente, considerado como control. Los edulcorantes se administraron, posteriormente al destete, en el agua de bebida ad *libidum*, consumiendo un grupo exclusivamente aspartame y el otro grupo exclusivamente acesulfamo k. La concentración de los edulcorantes en el agua son las siguientes: 1) aspartamo a 160 mg/L y 2) acesulfamo k a 240 mg/L. Posteriormente al consumo de edulcorantes, las ratas fueron sacrificadas a los 90 días de edad. Una vez sacrificadas las ratas, los cerebros se extrajeron y se congelaron inmediatamente en hielo seco. Los cerebros se conservaron a -80°C, hasta su uso.

7.2. Cortes histológicos.

Para fijar los cerebros se sumergieron, en una disolución al 4% de paraformaldehído (PFA), durante 24 horas a una temperatura de 4°C. Una vez transcurrido el tiempo de fijación, los cerebros se lavaron con PBS a pH 7.4, para eliminar los remanentes de fijador.

Al terminar los lavados con PBS, se deshidrataron los cerebros sumergiéndolos de manera consecutiva en ocho diluciones de alcohol en agua, de concentración creciente. Al finalizar se sumergieron de nuevo los cerebros en una solución de alcohol al 100 por ciento durante una hora.

Los cerebros se fijaron, sumergiendo los cerebros consecutivamente en las siguientes soluciones: xilol1, xilol2, parafina1 y parafina2; durante una hora, a una temperatura de 58°C.

Una vez incluidos en parafina, los cerebros se cortaron en el micrótopo marca LEICA modelo RM212RT. Los bulbos olfatorios se devastaron hasta llegar a la corteza prefrontal. Al alcanzar la corteza prefrontal se realizaron cortes de 3 µm de ancho y se colocaron cuatro cortes consecutivos por cada portaobjetos.

Al terminar de colocarlos en los portaobjetos, se desparafinaron los cortes histológicos, sumergiéndolo en una solución de xilol1 y posteriormente en una solución de xilol2 a una temperatura de 58°C. Para rehidratar los cortes se sumergieron en diluciones de concentración decreciente de alcohol en agua. Al finalizar los cortes se sumergieron durante 5 minutos en agua destilada. Al concluir este paso, los cortes estuvieron listos para ser teñidos, mediante las diferentes técnicas.

7.3. Tinciones.

7.3.1 Hematoxilina – eosina

Se colocaron las laminillas en un vaso Coplin® con hematoxilina durante 3 minutos a una temperatura de 60°C. Se lavaron con solución de alcohol – ácido. Se enjuagaron con agua amoniacal durante 30 segundos. Se enjuago durante un minuto con una disolución de alcohol en agua al 70%. Inmediatamente después del enjuague con alcohol, se realizaron quince lavados consecutivos con eosina alcohólica. Al concluir los lavados con eosina, se enjuago tres veces con una disolución de alcohol en agua al 96 % y dos veces con alcohol al 100%.

Para terminar se montaron con medio de montaje permanente (EcoMount de Biocare®).

7.3.2. Inmunohistoquímica.

Se realizó el **bloqueo** antigénico, sumergiendo las laminillas en un vaso Coplin® con buffer de citratos a pH 6, a alta presión.

Se inactivo la peroxidasa endógena mediante un lavado con disolución de peróxido de hidrógeno en agua destilada al 0.9% durante 5 minutos. Se montaron los portaobjetos en el sistema coverplate.

Se incubaron a temperatura ambiente las laminillas durante 45 minutos, con 100 µL de una disolución 1:200 de anticuerpo primario GFAP de biogenex® en buffer TRIS salino. Por separado se incubaron otros portaobjetos diferentes, con 100 µL de una disolución 1:300 de anticuerpo primario NSE de biogenex® en buffer TRIS salino, bajo las mismas condiciones para GFAP.

Se incubaron durante 30 minutos, 100 µL de anticuerpo secundario peroxidasa de rábano picante HRP, anticonejo de Cell signaling®.

Se revelaron con diaminobenzidina durante 30 segundos. Posteriormente al revelado, se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Mayers de biocare® durante 30 segundos. Se incubaron durante 30 segundos los portaobjetos en un vaso Coplín con agua caliente.

Se deshidrataron con disoluciones secuenciales de alcohol en agua. Se incubaron las laminillas durante 2 minutos a 60°C y se montaron con medio de montaje permanente (EcoMount de Biocare®).

7.3.3. Inmunofluorescencia.

Se realizó el **bloqueo** antigénico, sumergiendo las laminillas en un vaso Coplin® con buffer de citratos a pH 6, a alta presión.

Se montaron las laminillas en el sistema coverplate® con buffer salino de fosfatos. Al terminar de montarse, se incubaron las laminillas durante 10 minutos con una disolución de Triton en buffer de fosfatos salino al 1%.

Se bloquearon durante dos horas con un disolución de albumina en buffer de fosfatos salino al 1%. Posteriormente se incubaron durante toda la noche las laminillas con 100 µL de una disolución 1:300 de anticuerpo primario GFAP en una disolución al 1% de albumina disuelta en buffer de fosfatos salino y por separado se incubaron otras laminillas diferentes con 100µL de una disolución 1:300 de anticuerpo primario NSE en una disolución al 1% de albumina disuelta en buffer de fosfatos salino. Se incubaron nuevamente durante una hora, con una disolución 1:200 del anticuerpo secundario Alexa 546. Se lavaron de nuevo con buffer de fosfatos salino y se contratiñeron los núcleos celulares con DAPI durante 10 minutos. Se montaron con medio acuoso para florescencia.

8. Análisis estadístico.

8.1. Análisis de astrocitos.

Para el análisis de los astrocitos se realizó un conteo de las células GFAP positivas en las laminillas teñidas con inmunohistoquímica con este anticuerpo, en cinco campos que no se repitieran. Los cerebros se agruparon en tres grupos: (A) Grupo control (n = 1), (B) Grupo tratado con aspartamo (n = 4) y (C) Grupo control tratado con Acesulfamo K (n = 4). Para cada cerebro se realizaron cinco conteos. Posterior al conteo se realizó un promedio de los cinco campos y de todos los cerebros de cada grupo. Se realizó la prueba Fischer para ver si existía homocedasticidad en las mediciones. Se realizaron comparaciones entre grupos: grupo control – aspartamo, grupo control – acesulfamo de potasio y aspartamo – acesulfamo de potasio, mediante una prueba de comparación de medias; si el resultado para el valor de p fue menor a 0.05 para la prueba de Fischer la prueba utilizada para comparar los grupos fue una T de Student y si el valor de p fue mayor a 0.05 se aplicó una prueba de Welch.

8.2. Análisis de neuronas.

Para el análisis de las neuronas se realizó un conteo de las células NSE positivas y de las células NSE negativas en las laminillas teñidas con inmunohistoquímica con este anticuerpo, en cinco campos que no se repitan. Los cerebros se agruparon en tres grupos: (A) Grupo control (n = 2), (B) Grupo tratado con aspartamo (n = 4) y (C) Grupo control tratado con acesulfamo K (n = 4). Para cada cerebro se realizaron cinco conteos. Posterior al conteo se realizó un promedio de los cinco campos y de todos los cerebros de cada grupo. Se realizó la prueba Fischer para ver si existía homocedasticidad en las mediciones. Se

realizaron comparaciones entre grupos: grupo control – aspartamo, grupo control – acesulfamo k y aspartamo – acesulfamo k, mediante una prueba de comparación de medias; si el resultado del valor de p fue menor a 0.05 para la prueba de Fischer la prueba utilizada para comparar los grupos fue una T de Student y si el valor de p fue mayor a 0.05 se aplicó una prueba de Welch.

9. Resultados.

9.1. Tinción de hematoxilina y eosina.

En las ratas control las neuronas piramidales de la corteza prefrontal presentaron una morfología normal. Mientras que en las ratas tratadas con edulcorantes, las neuronas piramidales de la corteza prefrontal presentaron modificaciones morfológicas al compararlas con las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de las ratas control. Las modificaciones morfológicas más observadas fueron la reducción de tamaño, la formación de vacuolas en el núcleo y presencia de núcleos picnóticos. Como se muestra en la figura 6.

9.2. Tinción de inmunohistoquímica con GFAP.

En la corteza prefrontal de las ratas tratadas con edulcorantes se observa una cantidad significativamente mayor en los astrocitos GFAP positivos al compararse con la cantidad de astrocitos GFAP positivos presentes en la corteza prefrontal de las ratas control (t de Student, $p < 0.0001$, figura 10). La corteza prefrontal de las ratas tratadas con aspartamo no presentan una cantidad significativamente mayor de astrocitos GFAP positivos (t de Student, $p = 0.6399$, figura 10) al compararse con la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio, sin embargo los astrocitos GFAP positivos presentes en la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio fueron más gruesas. Como se observa en la figura 6.

9.3. Tinción de inmunohistoquímica con NSE.

La corteza prefrontal de las ratas tratadas con edulcorantes presenta un número significativamente menor de neuronas NSE positivas (t de Student, $p = 0.0420$

figura 11) al compararse con la cantidad de neuronas NSE positivas de la corteza prefrontal de las ratas control. La corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo presenta una cantidad de neuronas NSE positivas significativamente mayor (t de Student, $p=0.0420$, figura 11) que la cantidad de neuronas NSE positivas de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio. Como se observa en la figura 7.

9.4. Tinción de inmunofluorescencia con GFAP.

En la corteza prefrontal de las ratas tratadas con edulcorantes se observa una cantidad apreciablemente mayor de astrocitos GFAP positivos al compararse con la cantidad de astrocitos GFAP positivos presentes en la corteza prefrontal de las ratas control. La corteza prefrontal de las ratas tratadas con aspartamo no presentan una cantidad apreciablemente mayor de astrocitos GFAP positivos al compararse con la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio, sin embargo los astrocitos GFAP positivos presentes en la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio fueron más gruesas. Como se observa en la figura 8.

9.5. Tinción de inmunofluorescencia con NSE.

La corteza prefrontal de las ratas tratadas con edulcorantes presenta un número apreciablemente menor de neuronas NSE positivas al compararse con la cantidad de neuronas NSE positivas de la corteza prefrontal de las ratas control. La corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo presenta una cantidad de neuronas NSE positivas apreciablemente mayor que la cantidad de neuronas NSE positivas de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio. Como se observa en la figura 9.

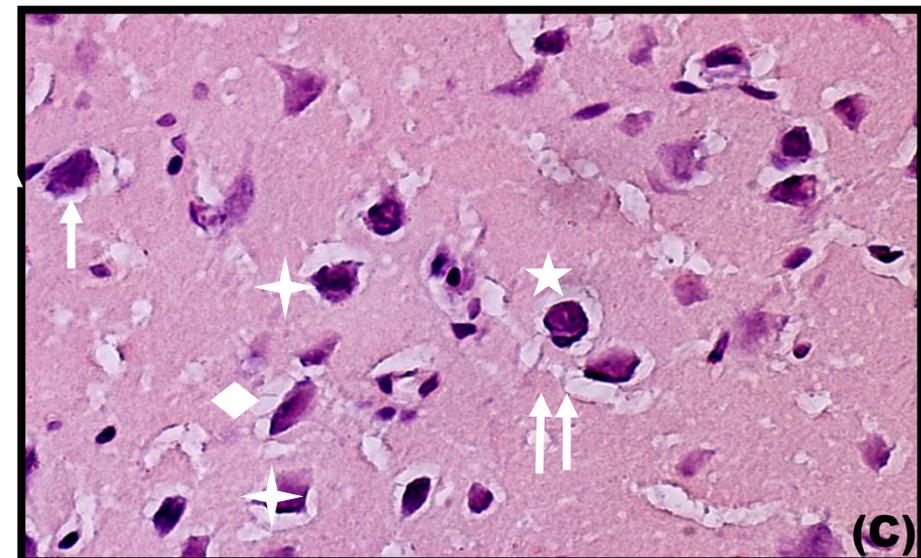
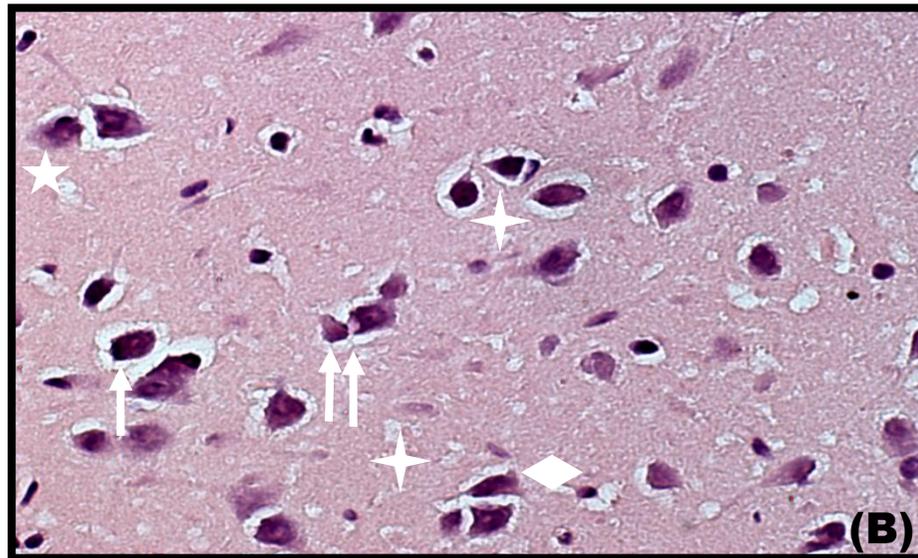
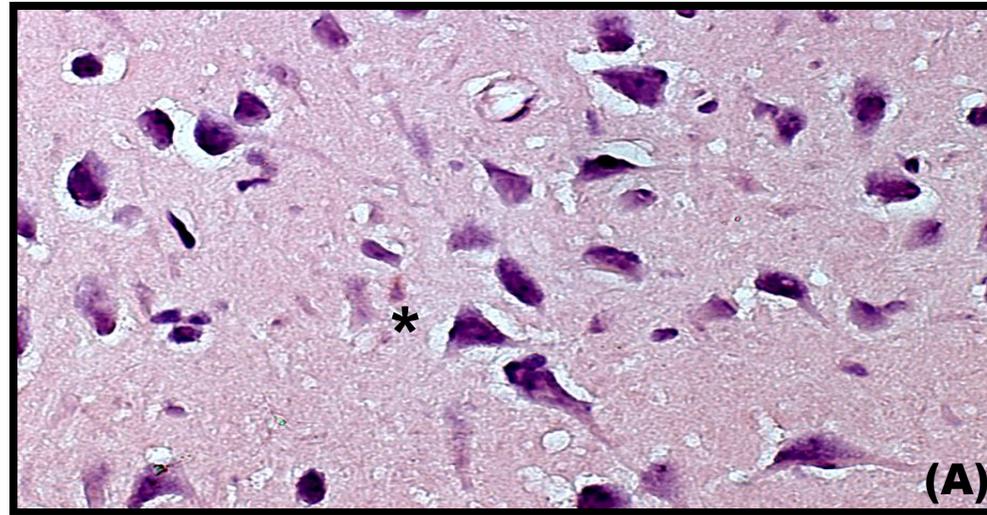


Figura 6.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con hematoxilina – eosina. En las microfotografías se observan cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A), cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con acesulfamo de potasio (B) y cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con aspartamo (C) teñidos con la técnica de hematoxilina – eosina. En el grupo control (A) las neuronas piramidales presentan una morfología normal caracterizada por su soma triangular (*). En la corteza prefrontal del grupo de ratas tratadas con Acesulfamo de potasio (B) y aspartamo (C), se puede distinguir modificaciones morfológicas de la neurona piramidal, como: núcleos picnóticos (↑), reducción de tamaño de las células piramidales (↑↑), contracción del citoplasma (◇), formación de vacuolas dentro del núcleo (★) y halos rodeando a las neuronas (★). Microfotografías tomadas a 400X.

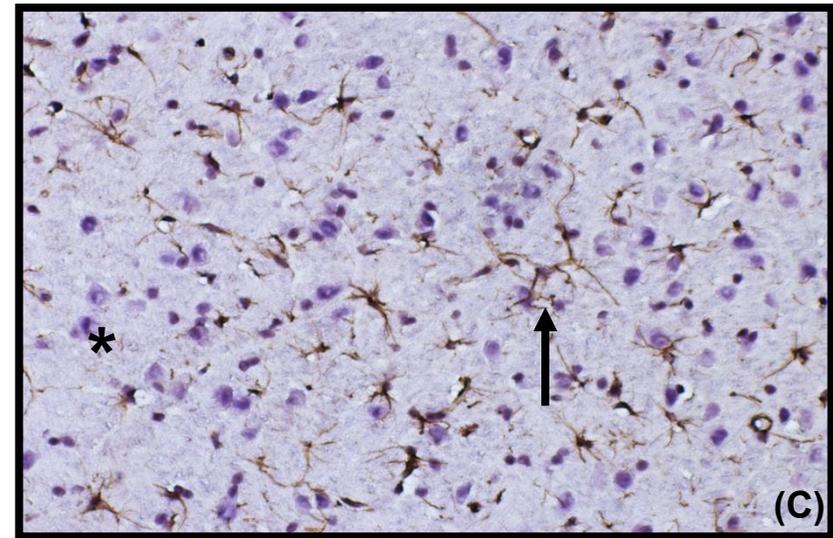
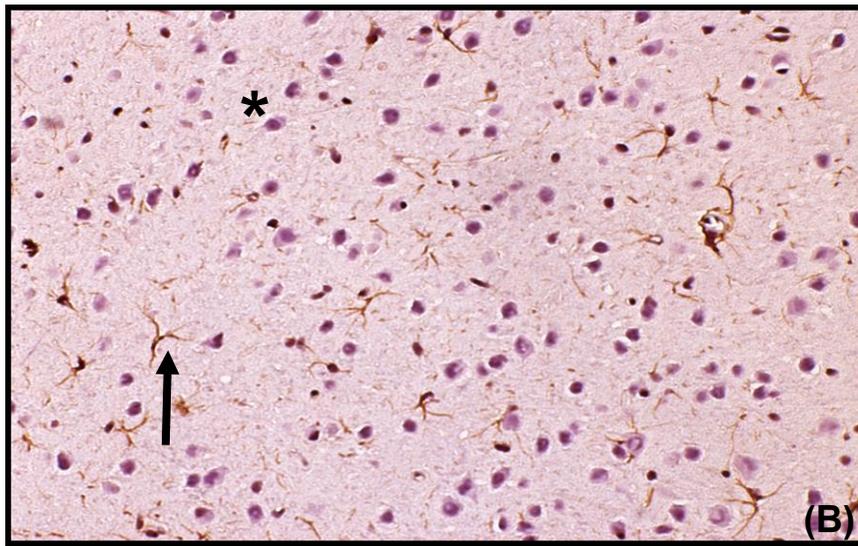
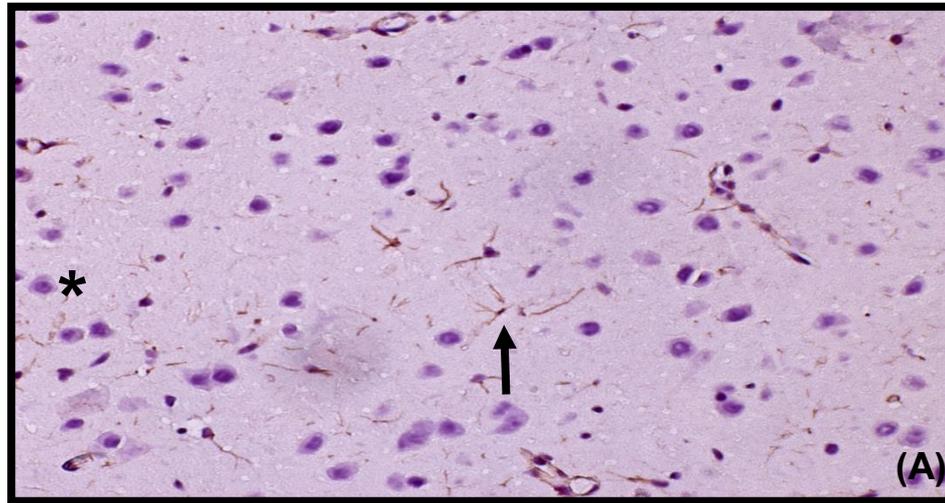


Figura 7.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con la técnica de inmunohistoquímica para GFAP. En las microfotografías se observan cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A), cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con acesulfamo de potasio (B) y cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con aspartamo (C); todos teñidos con la técnica de inmunohistoquímica para GFAP. En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A) existe presencia de un gran número de neuronas piramidales (*) y pocos astrocitos GFAP positivos (estructuras café↑) En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio (A) y aspartamo (B) existe una mayor cantidad de astrocitos GFAP positivos comparado con los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A). Microfotografías tomadas a 200X.

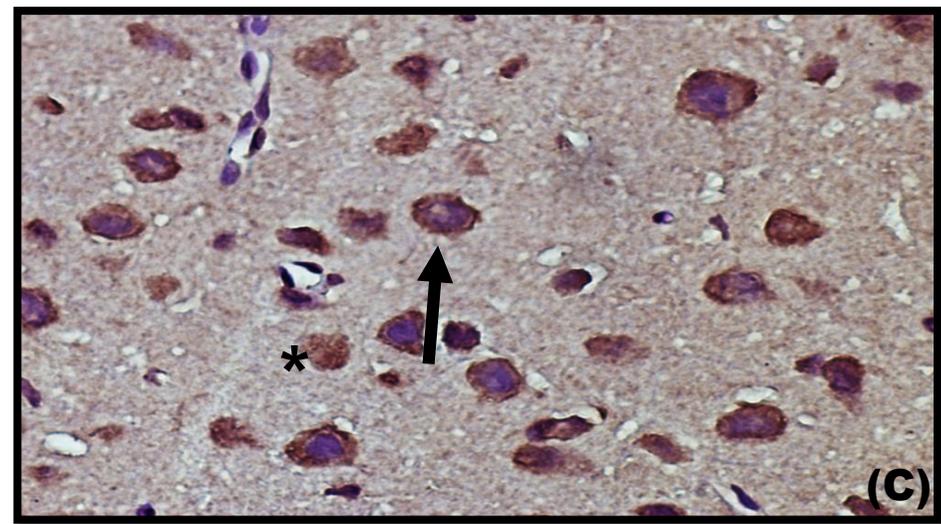
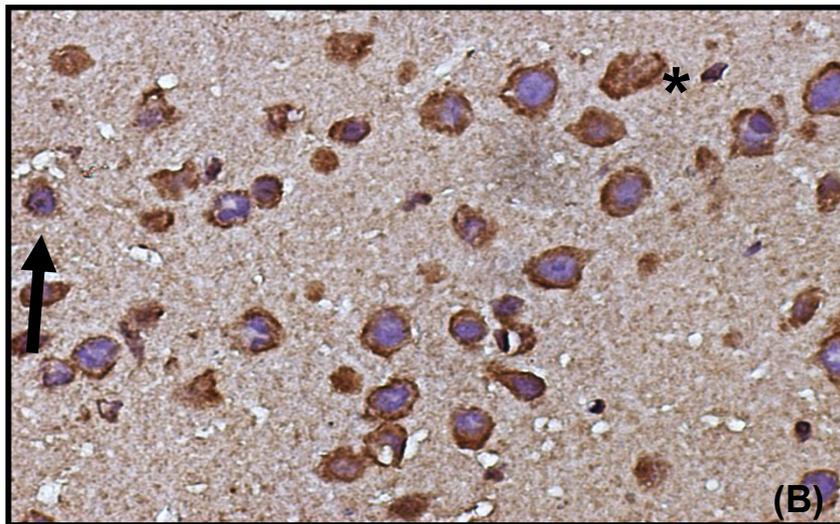
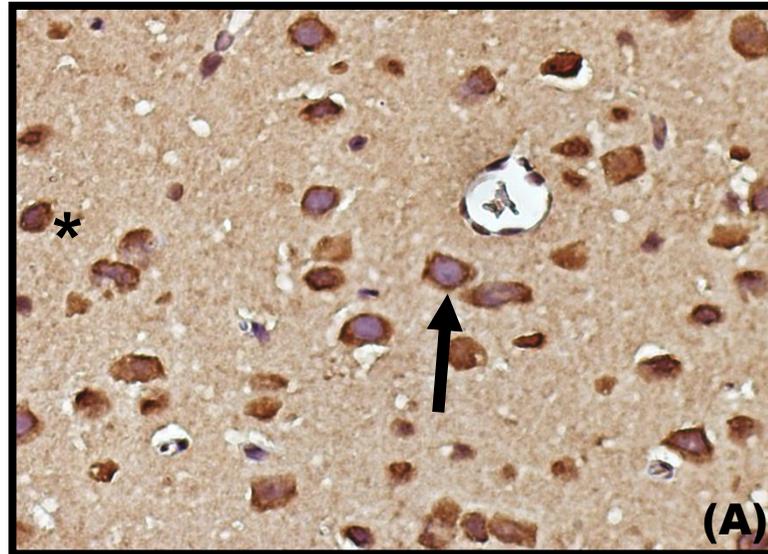


Figura 8.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar teñidas mediante la técnica de inmunohistoquímica para NSE. En las microfotografías se observan cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A), cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con acesulfamo de potasio (B) y cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con aspartamo (C), teñidas con la técnica de inmunohistoquímica para NSE. En los cortes histológicos de la corteza prefrontal del grupo control (A) se puede observar una gran cantidad de neuronas piramidales positivas a NSE (*) así como pocas neuronas NSE negativas (↑). En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con acesulfamo de potasio (B) y aspartamo (C) se puede observar una mayor cantidad de neuronas NSE negativas, al compararse con la corteza prefrontal del grupo control (A). Microfotografías tomadas a 400X

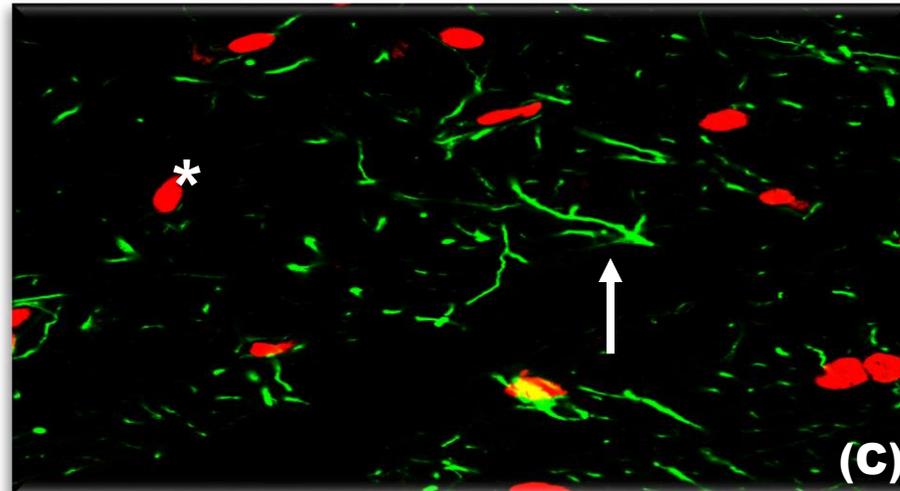
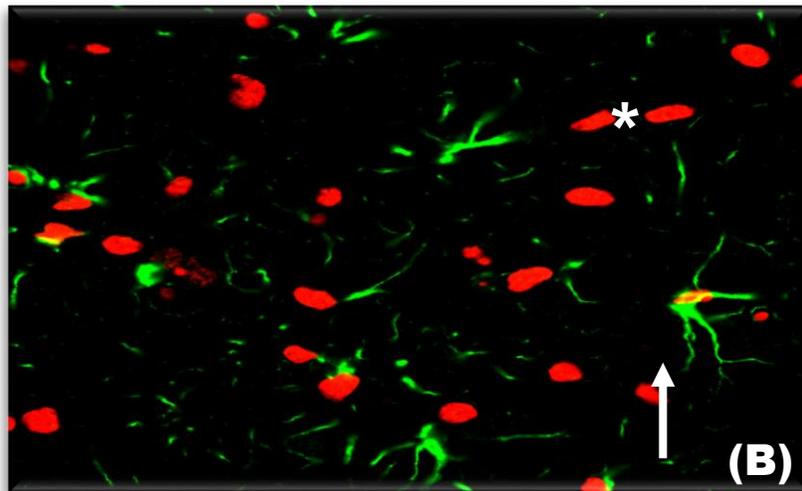
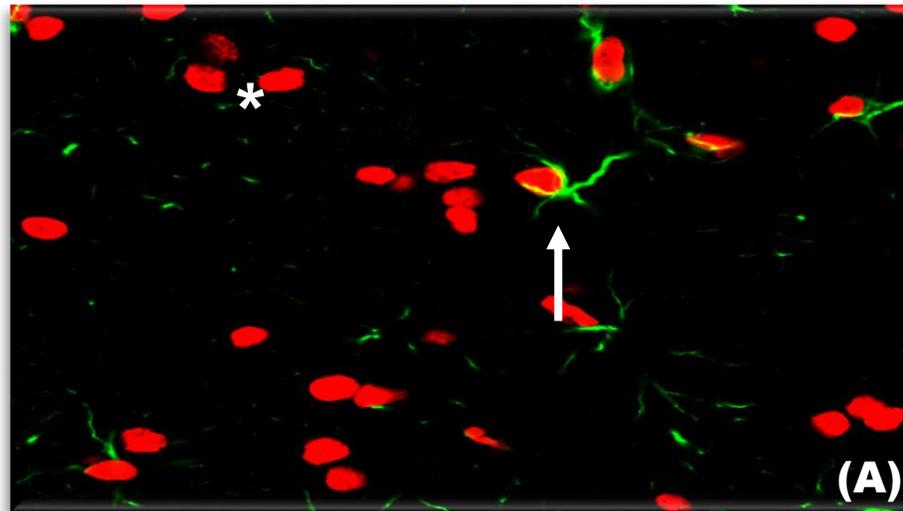


Figura 9.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar, teñidos con la técnica de inmunofluorescencia para GFAP. En las microfotografías se observan cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A), cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con acesulfamo de potasio (B) y cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con Aspartamo (C); todos teñidos con la técnica de inmunofluorescencia para GFAP. En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A) existe presencia de un gran número de neuronas piramidales (*) y pocos astrocitos GFAP positivos (estructuras verdes ↑) En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con Acesulfamo K (A) y Aspartamo (B) existe una mayor cantidad de astrocitos GFAP positivos comparado con los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A). Microfotografías tomadas a 400X.

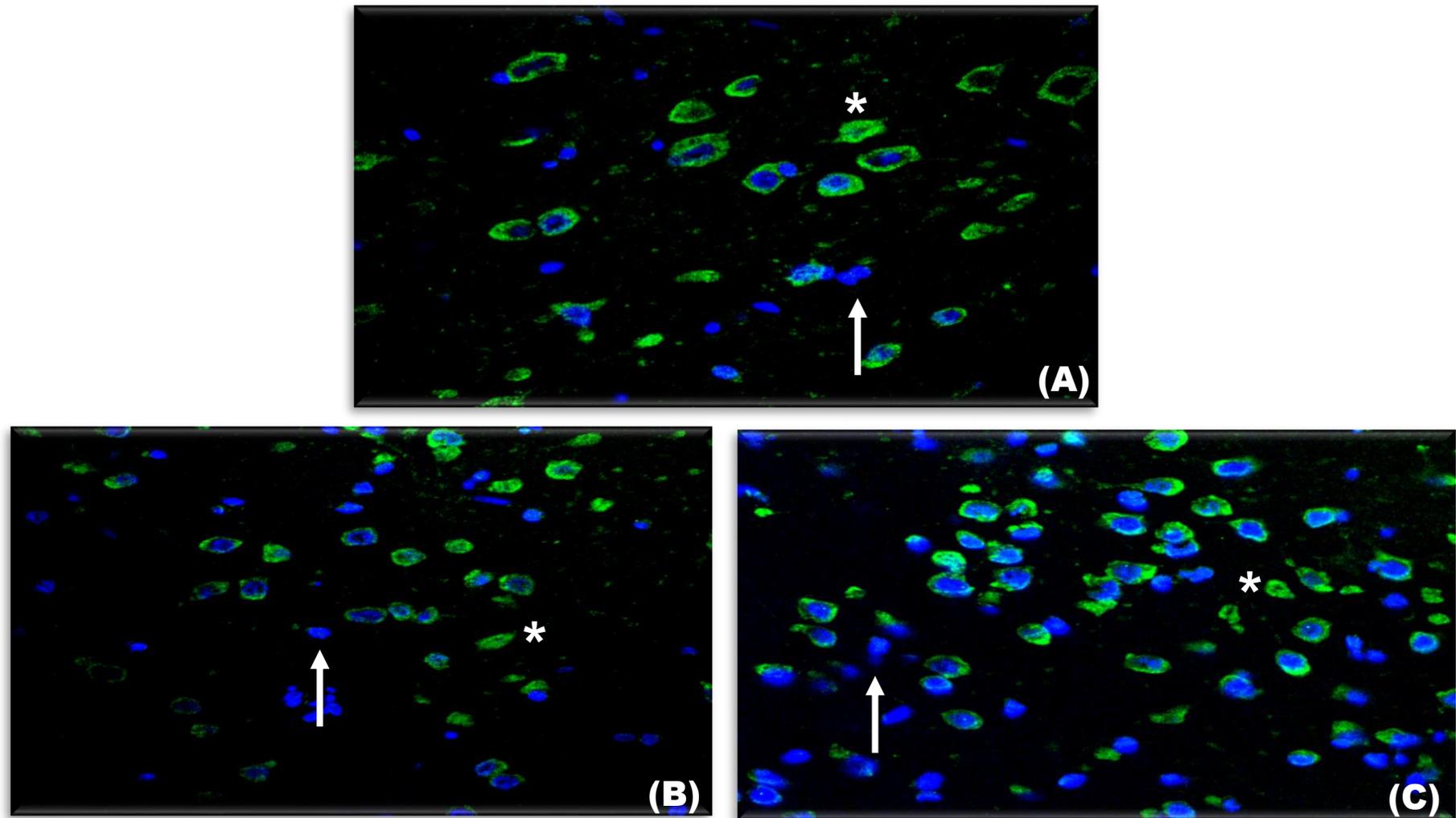
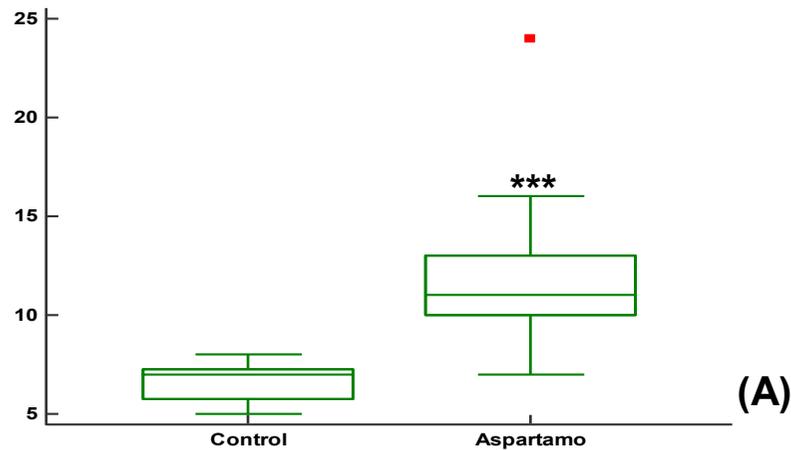
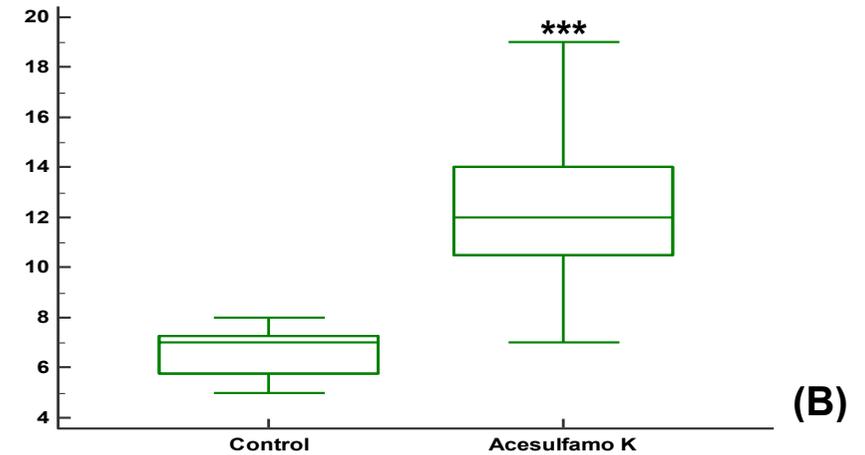


Figura 10.- Microfotografías de cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas Wistar teñidas mediante la técnica de inmunofluorescencia para NSE. En las microfotografías se observan cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas control (A), cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con Acesulfamo K (B) y cortes histológicos de la corteza prefrontal de ratas tratadas con Aspartamo (C), teñidas con la técnica de inmunofluorescencia para NSE. En los cortes histológicos de la corteza prefrontal del grupo control (A) se puede observar una gran cantidad de neuronas piramidales positivas a NSE (*) así como pocas neuronas NSE negativas (↑). En los cortes histológicos de la corteza prefrontal de las ratas tratadas con Acesulfamo K (B) y Aspartamo (C) se puede observar una mayor cantidad de neuronas NSE negativas, al compararse con la corteza prefrontal del grupo control (A). Microfotografías tomadas a 400X

Células GFAP positivas.



Células GFAP positivas.



Células GFAP positivas.

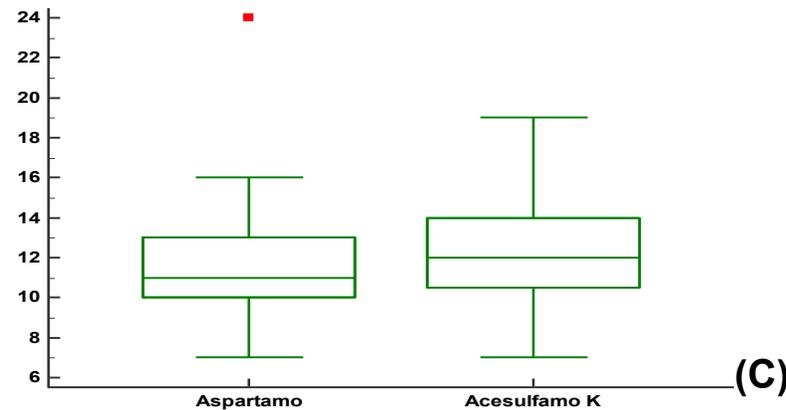


Figura.-11. Astrocitos GFAP positivos de la corteza prefrontal del grupo de ratas Wistar tratadas con Aspartamo y Acesulfamo K y controles. En las gráficas se observan la distribución de astrocitos GFAP positivos en la corteza prefrontal, de las ratas control comparadas vs el grupo tratado con aspartamo (A), grupo de ratas control comparadas vs el grupo de ratas tratadas con Acesulfamo K (B) y grupo de ratas tratadas con aspartamo comparadas vs grupo de ratas tratadas con Acesulfamo K. (C). Se determinó que la diferencia de media de astrocitos GFAP + es significativamente menor en las ratas del grupo control que en las ratas tratadas con aspartamo ($p=0.0001$). (B) La diferencia de medias de astrocitos GFAP + es significativamente menor en las ratas del grupo control que en las ratas del grupo tratado con Acesulfamo K ($p=0.0002$). (C) La diferencia de medias de astrocitos GFAP + no presenta diferencia significativa al comparar el grupo tratado con aspartamo con el grupo tratado con Acesulfamo K ($p=0.6399$).

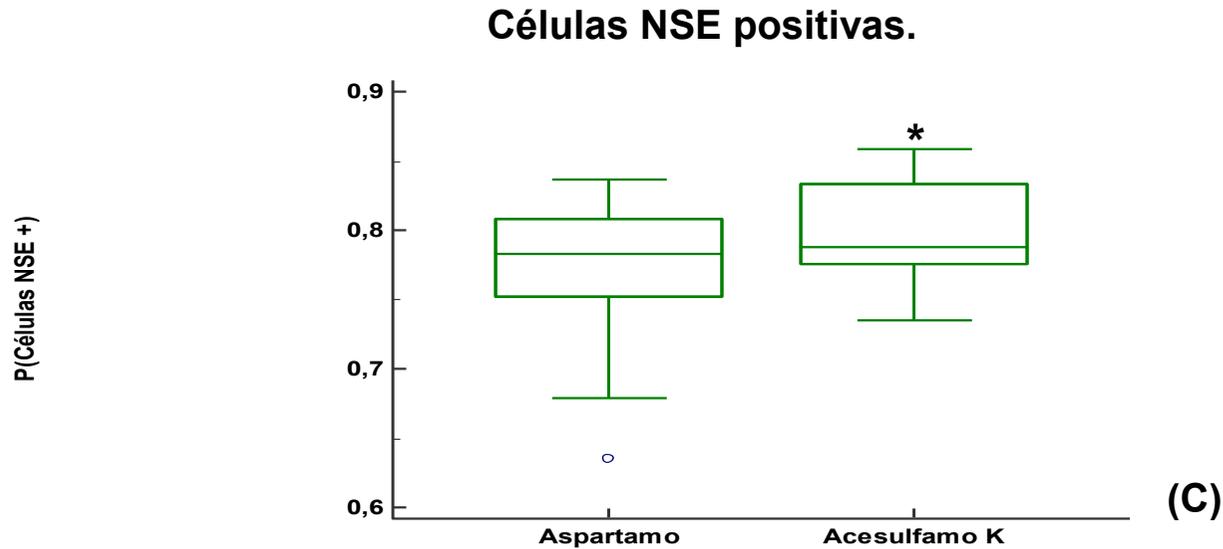
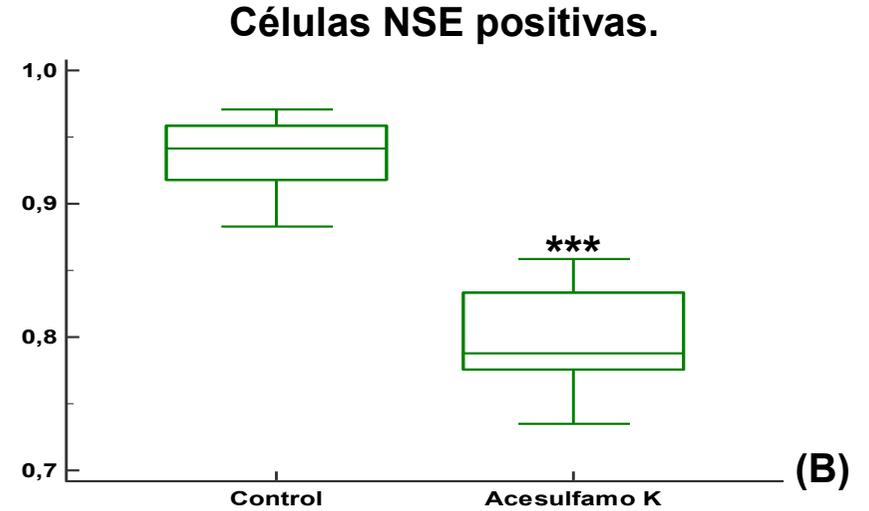
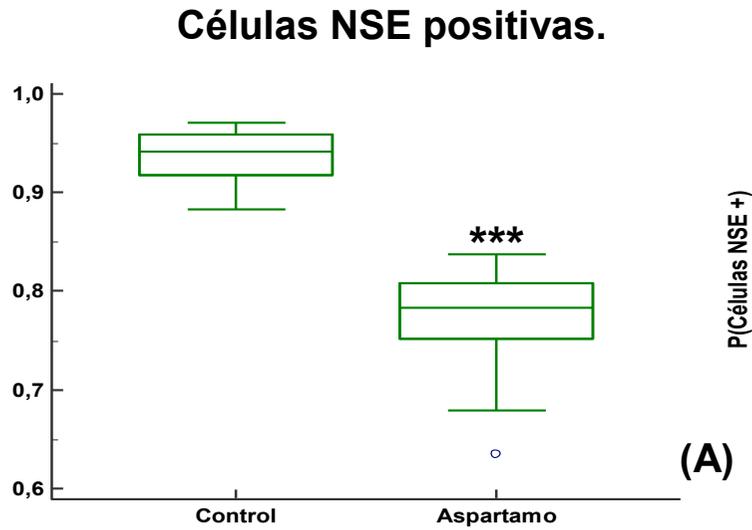


Figura.11 Neuronas NSE positivas de la corteza prefrontal de la rata Wistar tratadas con edulcorantes y controles. En las gráficas se observan la distribución de neuronas NSE + del grupo de ratas control comparadas con el grupo de ratas tratadas con aspartamo (A), grupo de ratas control comparadas con el grupo de ratas tratadas con Acesulfamo K. (B), grupo de ratas tratadas con aspartamo comparadas con el grupo de ratas tratadas con Acesulfamo K (C). Se determinó que los grupos de ratas tratadas con Aspartamo y Acesulfamo K obtuvieron una diferencia de medias significativamente menor de neuronas NSE + comparada con el grupo control ($p=0.0001$) (A, B). La diferencia de medias de neurona NSE + es poco significativa entre el grupo de ratas tratado con aspartamo comparadas con el grupo de ratas tratadas con Acesulfamo K ($p=0.0420$).

10. Discusión de resultados.

La técnica de hematoxilina – eosina permitió observar modificaciones estructurales de las neuronas piramidales en la corteza prefrontal de las ratas Wistar tratadas con edulcorantes, aspartamo y acesulfamo k, al ser comparadas con la corteza prefrontal de las ratas que no consumieron edulcorantes. Las modificaciones observadas a nivel de la corteza prefrontal de las ratas que consumieron edulcorantes, fueron: aumento de núcleos picnóticos, reducción de tamaño de las células piramidales, contracción del citoplasma, formación de vacuolas dentro del núcleo y halos rodeando a las neuronas. El conjunto de modificaciones estructurales observadas se han correlacionado con daño neuronal ocasionado por diferentes causas como puede ser: apoptosis, ansiedad, problemas locomotores, isquemia, consumo de agentes xenobióticos. [3,7,8,10,11,30] El daño a nivel de las neuronas piramidales se verificó con la disminución en la expresión de la NSE a nivel de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal de las ratas que consumieron edulcorantes. La NSE es una enzima glucolítica, que en estudios anteriores se ha utilizado como marcador de muerte neuronal, debido a que una disminución en la expresión de esta enzima conlleva a una disminución en el estado energético de la neurona, lo que se puede traducirse en proceso de muerte neuronal.[58-61]

La GFAP es un marcador específico de los astrocitos,[10,64] los astrocitos son células encargadas de mantener en homeostasis a las neuronas. [10,61-64] Cuando la homeostasis de las neuronas se rompe debido a diferentes factores, los astrocitos entran en proliferación celular, proceso conocido como astrogliosis. [40,42,61-64] Una proteína ampliamente utilizada para verificar la astrogliosis ha sido la GFAP.

En nuestro estudio la GFAP nos permitió determinar un proceso de astrogliosis debido al consumo de edulcorantes, aspartamo y acesulfamo de potasio, ya que la cantidad de células GFAP positivas en la corteza prefrontal de ratas que consumieron edulcorantes fue mayor que la cantidad de células GFAP positivas en las ratas que no consumieron edulcorantes.

La disminución en la viabilidad de las neuronas y el proceso de astrogliosis, debido al consumo de aspartamo, puede explicarse debido a que estructuralmente el aspartamo es muy parecido al glutamato. La semejanza entre el aspartamo y el glutamato puede provocar que el aspartamo se una a los receptores glutamatérgicos NMDA (N - metil - D - aspartato). [10, 28] La sobreestimulación de los receptores glutamatérgicos puede provocar que exista un aumento en el flujo de calcio al interior de la neurona. [10, 28, 65] El aumento en la concentración de calcio intracelular puede conllevar a que se activen mecanismos apoptóticos intracelulares, conllevando así a una disminución en la viabilidad de las neuronas. [30]

El parecido estructural entre el aspartamo y el glutamato promueve que el aspartamo se una a los receptores del glutamato (DMNA), (efecto directo). [28,65] La sobrestimulación neuronal debida a la activación de los receptores de glutamato promueve que se active en los astrocitos un ciclo conocido como glutamato – glutamina. [65, 66, 67] La finalidad de este ciclo es mantener en homeostasis la estimulación neuronal debido al glutamato, reciclándolo hacia el interior de la neurona. [65-68] Al aumentar la sobrestimulación neuronal debido al aumento de aspartamo en el espacio interneuronal promueve que los astrocitos traten de

contrarrestar este estímulo mediante un aumento en la cantidad de astrocitos presentes en la zona que presenta una sobrestimulación neuronal. [67,68].

El mecanismo por el cual el acesulfamo de potasio provoca aumento en el número de GFAP y disminución en la viabilidad neuronal aún es desconocido. Pero se cree que presenta un mecanismo similar al aspartamo. [69]

La unión del aspartamo a los receptores glutamatérgicos se debe principalmente al parecido estructural entre este edulcorante y el neurotransmisor excitatorio glutamato. Sin embargo el aspartamo y el acesulfamo de potasio no son muy parecidos estructuralmente. Las diferencias estructurales entre estos edulcorantes podrían conllevar a decir que el acesulfamo de potasio no tendría la capacidad unirse a los receptores glutamatérgicos. Pero recientemente se ha descubierto que los receptores glutamatérgicos comparten dominios de unión a edulcorantes parecidos a los dominios que presentan los receptores de la percepción del sabor. [69-72] La similitud en los dominios de los receptores del sabor y los receptores glutamatérgicos puede conllevar a que todos los edulcorantes tengan la capacidad de unirse a los receptores glutamatérgicos, sobrestimulando a la neurona y por consiguiente produciendo daño neuronal. Debido a esta similitud en los dominios de los receptores el acesulfamo de potasio podría funcionar como agonista de los receptores glutamatérgicos, sobrestimulando a la neurona y provocando un daño neuronal.

11. Conclusiones.

La cantidad de NSE y GFAP presente en la corteza prefrontal de ratas Wistar que consumieron aspartamo y acesulfamo k durante un periodo de 90 días; nos permitió determinar que el consumo de edulcorantes provoca daño neuronal a nivel de la corteza prefrontal. Además que la técnica de hematoxilina – eosina, nos permitió determinar que los edulcorantes, aspartamo y acesulfamo k, provocan modificaciones histológicas a nivel de la corteza prefrontal de la rata. De estos edulcorantes el que presento mayor daño fue el acesulfamo k.

Esto indica que los edulcorantes pueden causar cambios morfológicos si se consumen durante tiempos prolongados y que su daño depende de su acumulación.

12.- Referencias.

- [1] Barrera A., Rodríguez A., Molina A. Escenario actual de la obesidad en México Rev Med Inst Mex Seguro Soc 2013; 51 (3):292-99
- [2] Estefan J. Cuantificación de Aspartame y Acesulfame-k por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) [Tesis]. Honduras: Zamorano. Agroindustria alimentaria; 2007.
- [3] García J, Casado G, García J. Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación. Nutr Hosp 2013; 28(4): 17 -31.
- [4] Giannuzzi L, Molina S. Edulcorantes naturales y sintéticos: aplicaciones y aspectos toxicológicos. Acta Farm Bonaerense 1995; 14(2): 119 - 131.
- [5] Yan-zhen Z, Yan-chun Z, Li L, Yan Z. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. J Zhejiang Univ Sci B 2007; 8(7): 507 - 511.
- [6] Zygler A, Wasik A, Namiesnik J. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. Trends Analyt Chem 2009; 28(9): 1082 – 1102.
- [7] Ileana R. Gallegos. Efecto del consumo crónico de aspartamo y acesulfamo-K sobre la conducta, el peso corporal y la expresión de receptores serotoninérgicos en ratas Wistar. [Tesis] Instituto Politécnico Nacional. 2014.
- [8] Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Effect of long-term aspartame (artificial sweetener) on anxiety, locomotor activity and emotionality behavior in Wistar Albino rats. Bio Prev Nut 2014; 4(1): 39 – 43.

[9] Labra N, Vences A, Hernández N, Gómez J, Dorado V, Osnaya N, García R, Barragán G, Calderón D. Efecto de aspartame, fenilalanina y ácido aspártico sobre los niveles de glutatión y peroxidación de lípidos en cerebro de rata. Arch Neurocienc (Mex) 2008; 13(2): 79 – 83.

[10] Omar S. Effect of aspartame on the front cortex of adult male albino rats a light and electronic microscopic study. Egypt J Histol 2009; 32(2): 346 – 357.

[11] Cong W, Wang R, Cai H, Daimon C, Scheibye M, Bohr V, Turkin R, Wood W, Becker K, Moaddel R, Maudsley S, Martin B. Long-Term artificial sweetener acesulfame potassium treatment alters neurometabolic functions in C57BL/6J mice. PLOS – One 2013; 8(8): e70257. DOI: 10.1371/journal.pone.0070257

[12] Silvia Hernández. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. BIOMEDICINA, 2006, 2 (3) - 252-256

[13] Alonso J. Edulcorantes naturales. La granja 2010; 12(2): 3 – 12.

[14] Durán S, Quijada M, Silva L, Almonacid N, Berlanga M, Rodríguez M. Niveles de ingesta diaria de edulcorantes no nutritivos en escolares de la región de Valparaíso. Rev Chil Nutr 2011; 38(4): 444 – 449.

[15] Parra V. Desarrollo de endulzantes no calóricos, de alta potencia y funcionales en base a calcio y fibras dietética soluble [Tesis]. Chile: Universidad de Chile. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas; 2012.

[16] Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación, Tercera Sección, (Lunes 16 de julio de 2012).

[17] Herrera A. Los edulcorantes y su uso en niños. *Gastrohnutp* 2011; 13(2): 110-112.

[18] Calzada R, Ruíz M, Altamirano N, Padrón M. Características de los edulcorantes no calóricos y su uso en niños. *Acta Pediatr Mex.* 2013; 34: 141-153.

[19] Ferrer I, Thurman E. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chrom A* 2010; 1217(25): 4127 – 4134.

[20] NORMA Oficial Mexicana NOM-218-SSA1-2011

[21] Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. *Diario Oficial de la Federación, Tercera Sección, (lunes 16 de julio de 2012).*

[22] López L, Peña L. Plan estratégico para la creación de una empresa dedicada a la producción de edulcorantes a base de Stevia ® [Tesis]. Bogotá: Universidad Pontificia Javeriana. Facultad de Ingeniería; 2004.

[23] Whitehouse C, Boullata J, McCauley L. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN journal* 2008; 56(6): 251- 259.

[24] Azevedo F, Azoubel. Effects of Aspartame on the exocrine pancreas of rat fetuses. *Int. J. Morphol* 2006; 24(4): 679-684.

[25] Gayol M. Un análisis del consumo de aspartame desde la perspectiva de programas de investigación. *Problemas del Conocimiento en Ingeniería y Geología* 2003; 1: 99 – 113.

[26] Schmidt H. Avances en aditivos alimentarios y la reglamentación de los alimentos, Aplicaciones y comentarios de orden químico y tecnológico. Santiago: Fundación Chile, 1990: 66 – 67.

[27] Kumar A, Devi S. Aspartame induce alteration in electrolytes homeostasis of immune organs in Wistar albino rats. *Bio Prev Nutr* 2014; 4(2): 181 - 187.

[28] Humphries P, Pretorius E, Naudé H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nut* 2008; 62: 451 – 462. DOI:10.1038/sj.ejcn.1602866.

[29] Zyglis A, Wasik A, Namiesnik J. Retention behaviour of some high-intensity sweeteners on different SPE sorbents. *Talanta* 2010; 82(5): 1742 – 1748. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.07.070.

[30] Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biol* 2014; 2: 820 – 831. DOI: 10.1016/j.redox.2014.04.011.

[31] Bergstrom B, Cummings D, Skaggs T. Aspartame decreases evoked extracellular dopamine levels in the rat brain: An in vivo voltammetry study. *Neuropharmacology* 2007; 53(8): 967-974.

[32] Trocho C, Pardo R, Rafecas I, Virgili J, Remesar X, Fernández J, Alemany M. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci* 1998; 63(5): 337 – 349.

[33] Simintzi I, Schulpis K, Angelogianni P, Liapi C, Tsakiris S. The effect of aspartame metabolites on the suckling rat frontal cortex acetylcholinesterase. An in vitro study. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(12): 2397 – 2401.

[34] García A, Agiar L, Granada J. Muerte cerebral secundaria a intoxicación por metanol. Act Med Colom 2012; 37(4): 211 – 214.

[35] Fernstrom J. Dietary amino acids and brain function. J Am Diet Assoc 1994; 94(1): 71 – 77.

[36] Bowen J, Evangelista MA (2002). Brain cell damage from amino acid isolates: a primary concern from aspartame-based products and artificial sweetening agents. Public health information research [Revista en línea] 2002. [Consultada 22 de octubre del 2014]. Disponible en: <http://qualityassurance.synthasite.com/public-health-information-research.php>.

[37] National Institutes of Health. NIH. National toxicology program report on the toxicity studies of acesulfame (CAS No. 55589-62-3) in FVB/N-TgN (v-Ha-ras) Led (Tg.AC) hemizygous mice and carcinogenicity studies of acesulfame potassium in B6.129-Trp53tm1Brd (N5) haploinsufficient mice. 2005.

[38] Mukherjee A, Chakrabarti J .In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K: A non-nutritive sweetener. Food Chem Toxicol (1997) 35: 1177–1179.

[39] Pinel J. Biopsicología. 4a Ed. Madrid: Prentice Hall, 2001.

[40] Tortora G, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología. 13ª Ed. México

[41] Guyton A. Anatomía y fisiología del sistema nervioso central, neurociencia básica. 2ª Ed. Madrid: Médica Panamericana, 1994.

[42] Ira S. Fisiología humana.12ª Ed. México DF: McGraw Hill, 2011.

[43] Pascual J. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. Rev Neurol 2004; 38 (6): 565-581.

[44] Waxman S. Neuroanatomía clínica. 26ª Ed. México DF: McGraw Hill, 2001.

[45] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4a Ed. San Diego: Academic press, 1998.

[46] Zeman W, Maitland J. Craigie's neuroanatomy of the rat. New York: Academic press, 1965.

[47] Pablo E. Vázquez Borsetti. Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: Vías y receptores implicados. [Tesis] Barcelona. Universidad de Barcelona. 2008

[48] Noemí Santana Ramos. Receptores Monoaminérgicos: Mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos. [Tesis] Barcelona. Universidad de Barcelona 2007.

[49] Eduardo Rodríguez Yunt. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. Acta Bioethica 2007; 13 (1)

[50] Lady Andrea Polanco, Cristina Vargas-Irwin, Manuel Eduardo Góngora Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. Suma Psicológica 2011 Vol. 18 No 2: 141-148.

[51] NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

[52] Aluja AS, Gutiérrez GR, Ibarra EI, Lomelí FC. Declaración Mexicana y Principios Básicos de la Experimentación en Animales. Boletín de la Comisión Nacional de Bioética 1994;1(2):9-10

[53] Rodríguez Yunta Eduardo. Desafíos éticos de la investigación con animales, manipulación genética. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2012 ; 29(4): 535–540.

[54] Aluja AS. El buen uso de los animales de experimentación. Gac Méd Méx 1994 Vo1.131 No.1

[55] Aluja AS. Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) Gac Méd Méx 2002; 138(3):295-298.

[56] Pancholi V. Multifunctional α -enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci 2001; 58: 902 – 920.

[57] Sakimura K, Kushiya E, Takahashi Y, Suzuki Y. The structure and expression of neuron specific enolasa gene. Gene 1987; 60:103 - 113.

[58] Marangos P, Schmechel D, Parma A, Goodwin F. Developmental profile of neuron specific (NSE) and non neuronal (NNE) enolasa. Brain Res 1980; 190: 185 - 193.

[59] Schmechel D, Brightman M, Marangos P. Neurons switch from non neuronal enolasa to neuron specific enolasa during differentiation. Brain Res 1980; 190: 195 – 214.

[60] Peshavaria M, Day N. Molecular structure of the human muscle specific enolase gene (ENO3). Biochem J 1991; 275: 427 – 433.

[61] Gomes F, Paulin D, Moura V. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(5): 619 – 631.

[62] Brahmachari S, Fung Y, Pahan K. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *J Neurosci* 2006; 26(18): 4930 – 4939.

[63] Middeldrop J, Hol E. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 2011; 93: 421 – 443.

[64] O'Callaghan J, Sriram K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2005; 4(3): 433 – 442.

[65] A. Novelli, J.A. Reilly, P.G. Lysko and R.C. Henneberry. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res*, 451 (1988)205-212 205

[66] Jaramillo J. Metabolismo cerebral. *Anestesiología en neurocirugía*. Vol. 36. Supl. 1 Abril-Junio 2013. pp S183-S185.

[67] Mireille Bélanger, Pierre J. Magistretti. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues in Clinical Neuroscience* - Vol 11 . No. 3 . 2009

[68] Mireille Bélanger, Igor Allaman, and Pierre J. Magistretti. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism* 14, December 7, 2011. 14 (6): 724-38

[69] Talevi A, Enrique A, Bruno L. Anticonvulsant activity of artificial sweeteners: A structural link between sweet – taste receptor T1R3 and brain glutamate receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; 22: 4072 – 4074.

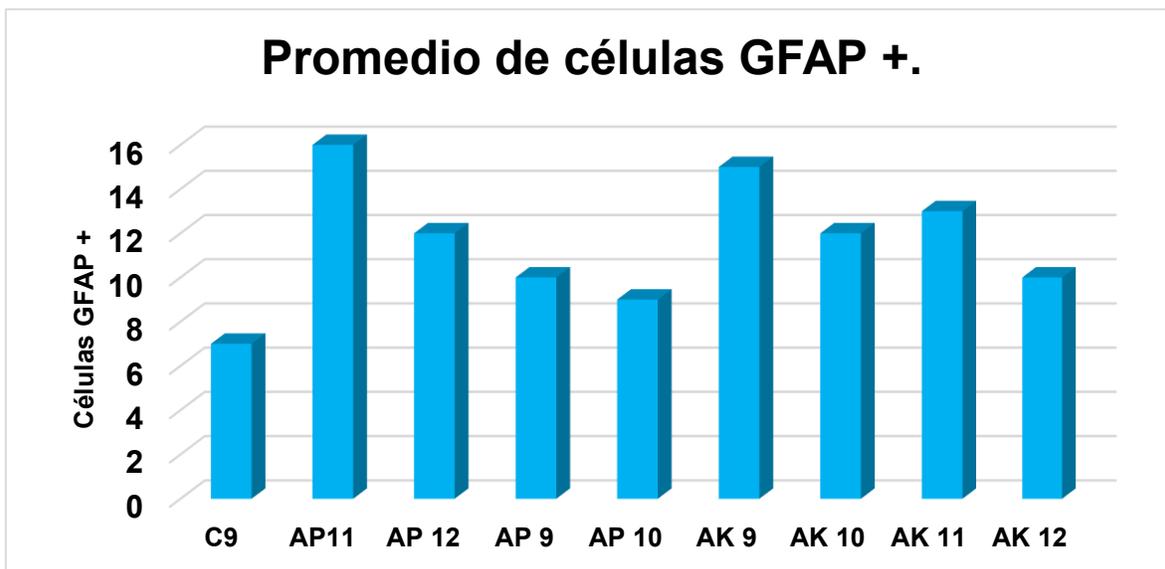
[70] Fernstrom J, Munger S, Sclafani A, E de Araujo I, Roberts A, Molinary S. Mechanism for sweetness. *J Nutr* 2012; 142(6): 1134S – 1141S.

[71] Chaudhari N, Landin A, Roper S. A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neurosci* 2000; 3(2): 113 – 119.

[72] Zhao G, Zhang Y, Hoon M, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba N, Zuker C. The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 2003; 115(31): 255 -266.

13.- Anexos.

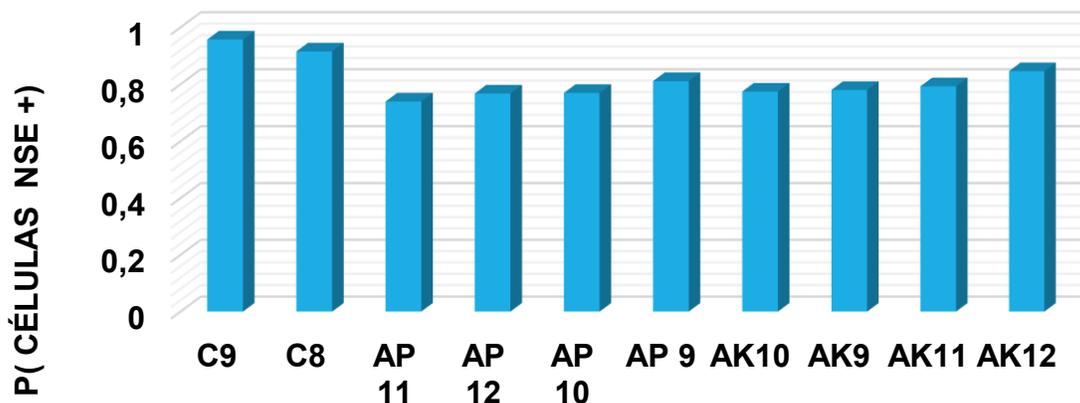
C9	AP11	AP 12	AP 9	AP 10	AK 9	AK 10	AK 11	AK 12
7	16	12	10	9	15	12	13	10



Promedio de células GFAP+ de la corteza prefrontal de ratas Wistar.

Media de NSE positas / 5 Campos a 40X									
C9	C8	AP 11	AP 12	AP 10	AP 9	AK10	AK9	AK11	AK12
0,95722	0,91544	0,73962	0,76767	0,76976	0,8112	0,7744	0,78004	0,79302	0,8462

Porcentaje de NSE positivas.



Promedio de células NSE positivas de la corteza prefrontal de rata Wistar.