



FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA

**“Ingesta de edulcorante no calórico comercial durante adolescencia
disminuye la transmisión sináptica inhibitoria en corteza prefrontal
medial en ratones adultos.”**

Nicole Ximena Vidal Herrera

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia

Director(a) de Tesis:

Marco Fuenzalida Núñez

Instituto de Fisiología

Co-Director(a) de Tesis:

Gonzalo Jorquera Olave

Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos (INTA)

2024

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue posible gracias al financiamiento de:

Proyecto PUENTE UVA 20991, Dr Marco Fuenzalida Núñez, Instituto de Fisiología, Universidad de Valparaíso

Proyecto FONDECYT 11220927 (IR: GJ), Dr Gonzalo Jorquera Olave, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Chile

Beca Programa de Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencias, Universidad de Valparaíso

Proyecto 2030 “MaquiMind”: Alimento funcional para la salud mental, Instituto de Fisiología y Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de Valparaíso. [Parcialmente financiado]

Proyecto ANID-MILENIO (NCN2023_032 M Fuenzalida PI), EpiNeuro, Universidad de Andres Bello y Universidad de Valparaíso. [Parcialmente financiado]

AGRADECIMIENTOS

El siguiente trabajo de investigación representa a mis primeros pasos en el mundo de la neurociencia. Quiero expresar mi profundo agradecimiento a aquellos que han estado conmigo desde que esta idea se gestó como un sueño, y quienes me acompañaron en su realización. Sin embargo, quiero hacer un reconocimiento especial:

A mi mamá María Mercedes, por ser el viento que siempre sopla mis alas

A mi Papá Remberto, por heredarme la resiliencia y la perseverancia

A mis hermanas Mariela y Daniela, por alentarme y acompañarme siempre en cada paso

A mis sobrinos Santiago y Antonia, por existir en mi vida y ser el motor de esta misma

A Juan Ahumada, por llegar a mi vida y ser mi mejor resultado más inesperado de este postgrado

A Cami Cerna, quién me enseñó y recibió con los brazos abiertos desde el día uno que pisé el laboratorio

A mi tutor Marco Fuenzalida, por confiar en mí desde el primer día, alentándome en seguir el camino de la neurociencia

A mi co-tutor Gonzalo Jorquera, quién me dio su apoyo en los momentos más importante de este programa

Al programa de Magister, por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de investigar

A mí, por resistir y llegar hasta aquí.

INDICE

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	6
ABREVIATURAS	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 Adolescencia	8
3.2 Corteza prefrontal	9
3.3 Adolescencia y alimentación	11
3.4 Edulcorantes no calóricos	12
3.5 Planteamiento del problema	14
4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
5. OBJETIVOS	15
5.1 OBJETIVO GENERAL	15
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	16
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
9. RESULTADOS	22
9.1 Efecto de la ingesta de SCs en el peso e ingesta de alimento y agua	22
.....	23
.....	23
9.2 Propiedades eléctricas de la membrana y excitabilidad de neuronas piramidales de la CPFm capa II/III	23
9.3 Transmisión sináptica inhibitoria en neuronas piramidales de corteza prefrontal medial de animales tratados con sucralosa y vehículo	25
9.4 Transmisión sináptica excitatoria en neuronas piramidales de CPFm de animales tratados con SCs y vehículo.	27
9.5 Transmisión sináptica inhibitorias evocada en neuronas piramidales de CPFm de animales tratados con SCs y vehículo.	29
9.6 Cambios en la plasticidad por agotamiento de vesículas en grupo tratados con sucralosa	30
9.7 Efecto del tratamiento de SCs en la memoria y aprendizaje	31
9.8 Efecto de la ingesta de SCs en el comportamiento ansioso	33
10. DISCUSION	34
11. CONCLUSIONES	41
12. BIBLIOGRAFÍA	44

1. RESUMEN

La adolescencia es un periodo crítico en el neurodesarrollo. Durante esta etapa Los circuitos inhibitorios GABAérgicos de la corteza prefrontal (CPF) se encuentran en una transición de maduración, siendo un periodo de alta susceptibilidad a los cambios del medio, en consecuencia, una perturbación durante esta etapa es altamente probable que conlleve a una modificación en las redes neuronales en la etapa adulta. Además, este periodo se caracteriza por un incremento en el requerimiento energético, manifestándose en un aumento en la ingesta de alimentos, dando lugar a que los adolescentes consuman alimentos altamente calóricos principalmente de azúcares refinados y grasas.

Debido a los problemas metabólicos que implica una alimentación alta en calorías, diversos países han implementado normativas alimenticias que ayuden a disminuir el aporte calórico en los alimentos. La industria alimentaria para poder adecuarse a estas medidas ha debido modificar la formulación de sus productos usando distintos aditivos, entre estos los edulcorantes no calóricos (ENC), siendo la sucralosa (SCs) el más utilizado. Según la FDA la SCs cumple con las normativas sanitarias, sin embargo, la recomendación en niños y adolescentes aún es controversial. La asociación americana de pediatría mencionó que el uso de edulcorante en etapa infantil y adolescente carece de estudios suficientes, por lo tanto, sugiere un uso moderado en este grupo etario.

En el presente estudio, investigamos si el consumo de SCs durante la adolescencia afecta la transmisión sináptica inhibitoria en la CPF de ratones adultos. Usando técnica de electrofisiología, este trabajo muestra que la ingesta de SCs disminuye la transmisión sináptica inhibitoria en neuronas piramidales de la CPF. Estos resultados demuestran que la SCs durante un periodo crítico del neurodesarrollo es capaz de modificar circuitos neuronales lo que sugiere que podría tener un impacto negativo en la plasticidad sináptica.

2. ABSTRACT

Adolescence is a critical period of neurodevelopment that involves significant neocortical remodeling. During this period, synaptic transmission in the prefrontal cortex (CPF) undergoes significant remodeling. Proper inhibitory function is critical during this period, and any environmental perturbations can have long-lasting effects, particularly on GABAergic transmission, which is highly sensitive to environmental changes. In addition, adolescence is characterized by an increase in energy needs, which leads to increased food intake, especially high-calorie foods such as refined sugars and fats.

Consumption of such foods can lead to metabolic and cognitive deficits, which has led several countries to implement food regulations to reduce caloric intake. To address this issue, the food industry has turned to non-caloric sweeteners (NCS), with sucralose being the most commonly used. However, concerns have been raised by the FDA and the American Association of Pediatrics about the lack of sufficient studies on the use of low-calorie sweeteners in children and adolescents. Therefore, more research is needed to determine the potential effects of NCS on neurodevelopment, metabolic health and cognitive function in this vulnerable population. In this study, we investigated whether intake sucralose during adolescence affect synaptic transmission inhibitory in CPF adult mice. Using electrophysiology techniques, our result showed that SCs intake decreased frequency synaptic transmission inhibitory spontaneous and evoked, but no affect memory and learning in adult mice. These findings suggest that sucralose impairs GABAergic transmission in the PFC, which could negatively affect synaptic plasticity. Our study highlights the need for caution when using SCs in adolescents.

ABREVIATURAS

CPF: Corteza prefrontal

OFC: Corteza orbitofrontal

CPFm: Corteza prefrontal medial

DLPFC: Corteza dorsolateral

PyNs: Neuronas piramidales

VTA: Área ventral tegmental

SCs: Sucralosa

5HT: Núcleos del Raphe

Veh: Vehículo

IDA: Ingesta diaria admisible

ENC: Edulcorante no calórico

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

SNC: Sistema nervioso central

EPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias

sEPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas

mEPSC: Corrientes postsinápticas excitatorias miniatura

IPSC: Corrientes postsinápticas inhibitorias

sIPSC: Corrientes postsinápticas inhibitorias espontáneas

STP: Short-term depletion

RM: Cotencial de membrana

I: Corriente

R: Resistencia

V: Voltaje

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Adolescencia

La adolescencia es un periodo de continuo crecimiento físico, maduración sexual, desarrollo social y conductual caracterizada por una marcada impulsividad, búsqueda de novedad e inestabilidad emocional. En modelos murinos este periodo se ha descrito según el desarrollo y maduración sexual. En hembras se ha determinado que la adolescencia se inicia cuando presentan su primera ovulación la cual se observa externamente con la apertura vaginal, mientras que en machos cuando ocurre un aumento en los niveles de testosterona que se determina con la separación del prepucio del pene (Schenider et al., 2013), **comprendiendo desde los días 25 – 60 posterior al nacimiento**. Desde el punto de vista neurobiológico, durante este periodo el cerebro experimenta una importante remodelación tanto estructural como funcional, caracterizándose por un incremento en la mielinización, refinamiento en las conexiones sinápticas y a un aumento en la poda sináptica (Reichelt et al., 2016, Caballero et al., 2014). Esta maduración estructural neuronal es parte fundamental del neurodesarrollo, donde cualquier perturbación durante esta etapa puede dar como resultado una modificación en las redes neuronales en la vida adulta. Por lo tanto, la adolescencia es una etapa altamente susceptible a los cambios, donde cualquier perturbación del medio podría generar alteraciones a largo plazo (Reichelt et al., 2016, Caballero et al., 2014, Moretón et al., 2019). Si bien los procesos mencionados anteriormente están presentes en las distintas áreas cerebrales, la corteza prefrontal (CPF) es particularmente más sensible a las modificaciones medioambientales o epigenéticas durante esta etapa del desarrollo (Reichelt et al., 2016).

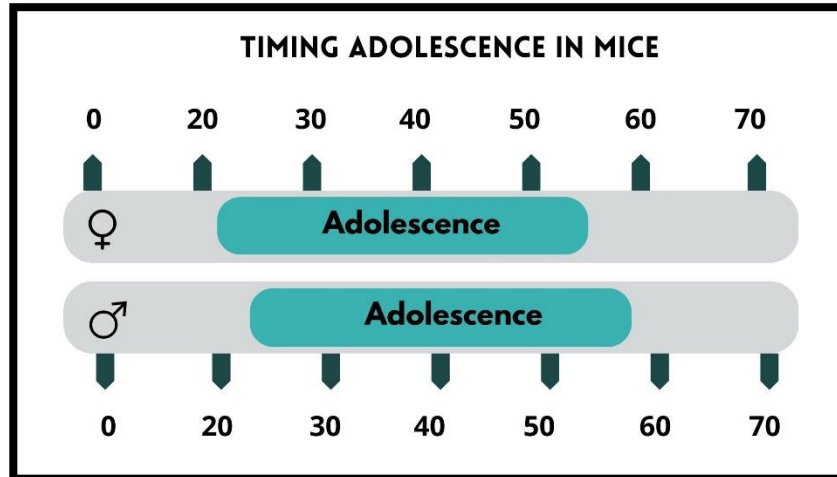


Figura 1. Modificado Shneider 2013:.. Figura línea de tiempo del periodo de adolescencia en ratos machos y hembras, los números representan los días posterior al nacimiento.

3.2 Corteza prefrontal

La CPF es la estructura cerebral evolutivamente más desarrollada, implicada en procesos cognitivos complejos como la memoria de trabajo, la toma de decisiones y la motivación (Kolks et al., 2022).

La CPF presenta distintas regiones como corteza orbitofrontal (OFC) y dorsolateral (DLPFC); en animales el homólogo de la DLCPF es la corteza prefrontal medial (CPFm). Se ha observado que lesiones en la CPFm de roedores y primates reduce el rendimiento en pruebas de aprendizaje y memoria de trabajo demostrando la importancia de la CPFm en estos procesos cognitivos (Vijayraghavan et al., 2021).

La CPFm está organizada en 6 capas: I, II/III, IV, V, VI, cada capa se caracteriza por presentar distinta organización de neuronas piramidales las cuales pueden tener proyecciones de largo alcance a otras zonas subcorticales como también interactuar a través de conexiones locales (Anastasiades et al., 2021). Las entradas a la CPFm desde zonas subcorticales pueden provenir desde el tálamo, amígdala, hipocampo o área ventral tegmental (VTA) y del raphe (5HT), estas aferencias sinaptan a las

cuando termina la adolescencia y empieza la adultez?

neuronas de la CPFm en distintas capas, por ejemplo, la capa 5 recibe entradas desde el hipocampo, mientras que en la capa 2 se genera un circuito recíproco entre neuronas corticales y de la amígdala (Anastasiades et al., 2021).

Los circuitos excitadores de la CPF al igual que otras estructuras cerebrales están integrados en una poderosa red inhibitoria compuesta por distintas clases de interneuronas GABAérgicas (Whissell et al., 2015; Somogyi y Klausberger, 2005). **De todas las neuronas GABAérgicas neocorticales casi en su totalidad pertenecen a uno de los tres grupos definidos por la expresión de parvalbúmina (PV), somatostatina (SST), o del receptor de serotonina ionotrópico 5HT3a (5HT3a-R)** (Rudy et al., 2011). Los circuitos GABAérgicos a través de la inhibición establecen una ventana temporal que permite integrar la actividad sináptica tanto excitatoria como inhibitoria en las neuronas piramidales (PyNs) y regular el disparo de potenciales de acción en PyNs, lo cual es esencial para regular el balance Excitación–Inhibición (E/I) (Xue et al., 2014).

Considerando la importancia de los circuitos inhibitorios para el funcionamiento y la maduración de la CPFm, una alteración del sistema GABAérgico durante periodos críticos del desarrollo, como la adolescencia, conlleva a un mal funcionamiento de la CPFm y de diversas funciones cognitivas asociadas. Es relevante destacar que alteraciones en la función de las sinapsis GABAérgicas están asociadas a la patogenia de diferentes trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos (Lewis D et al., 2005).

3.3 Adolescencia y alimentación

En humanos y modelos murinos, son varias las estructuras cerebrales encargadas del control cognitivo y hedónico del comportamiento alimentario, como la corteza insular (IC), CPF, incluyendo la DLPFC y la OFC (Huang et al., 2021). Durante la niñez y adolescencia estas regiones presentan grandes cambios estructurales, funcionales y de conectividad (Dennis et al., 2014). Cerca del inicio de la adolescencia el cerebro experimenta una importante remodelación tanto estructural como funcional, caracterizándose por un incremento en la mielinización, refinamiento en las conexiones sinápticas y a un aumento en la poda sináptica (Reichelt et al., 2016, Caballero et al., 2014). El desarrollo asincrónico de los sistemas neuronales que subyacen a la búsqueda de recompensas y a la autorregulación parecen ser esenciales para explicar las diferencias en el funcionamiento entre el cerebro adolescente y el del adulto (Giedd et al., 2006; Gogtay et al., 2004). Durante la adolescencia existe un aumento fisiológico en el requerimiento calórico el que se ve representado con un incremento en el apetito, llevando muchas veces a ingerir alimentos altamente calóricos (Byrne et al., 2021). La calidad nutricional de estos alimentos son principalmente productos altos en grasas saturadas y azúcares refinados teniendo características organolépticas altamente palatables. El excesivo consumo de estos alimentos ha conllevado a que los adolescentes presenten tempranamente problemas metabólicos, problemas de aprendizaje y memoria (Reichelt et al., 2016, 2018). Aunque en humanos aún es controversial la relación directa entre dietas alta en grasas y/o azúcares y déficit cognitivo, en modelos animales, se ha demostrado que una dieta alta en grasa durante la adolescencia genera un deterioro cognitivo, mostrando un menor rendimiento en pruebas conductuales y disminución de la transmisión sináptica excitatoria en las PyNs de corteza prefrontal (Moretón et al., 2019). Adicionalmente se mostró que una dieta alta en grasa durante la pre-adolescencia deteriora la interacción social y genera un comportamiento similar a la ansiedad

(Yang, Y et al., 2020). Estos antecedentes sugieren que la alimentación durante esta etapa puede ser fundamental para el desarrollo y el funcionamiento de la CPF.

3.4 Edulcorantes no calóricos

En función del alto consumo de alimentos elevados en calorías y las consecuencias en la salud que genera en niños y adolescentes, algunos países para poder contrarrestar este problema han decretado leyes para disminuir el aporte calórico de los alimentos. En Chile el año 2016 se promulga la ley 20.606 “Ley del etiquetado nutricional” cuyo principal grupo objetivo son niños y adolescentes. Esta ley establece la implementación de sellos de advertencia frontal obligatorio en los alimentos procesados preenvasados que superen los límites preestablecidos de contenido de azúcares, grasas saturadas, sodio y energía (Corvalán et al., 2013). Frente a esta situación la industria alimentaria ha utilizado como herramienta eficaz la sustitución del azúcar por edulcorantes no calóricos (ENC), permitiendo mantener el dulzor de sus productos y a la vez cumplir con la normativa establecida (Venegas et al., 2020).

El consumo de ENC en niños y adolescente ha aumentado en los últimos años (Venegas et al., 2020, Martínez et al., 2020). Profesionales de la salud y autoridades médicas consideran estos aditivos como un medio de control calórico y glicémico conservando el sabor dulce de los alimentos. Uno de los ENC más utilizados en la industria alimentaria es la sucralosa (SCs). La SCs es un ENC no metabolizado por nuestro organismo y es 600 veces más dulce que el azúcar (AlDeeb et al., 2013). Fue aprobada por la FDA el año 1998 y es considerada segura para su consumo siempre y cuando no se supere la ingesta diaria admisible (IDA), para la sucralosa la IDA es de 0 – 15mg/kg de peso /día (WHO/FAO 1995). Si bien cuenta con la aprobación de la FDA, la sugerencia de consumo en niños y adolescentes es controversial y difiere en cada país (Duran et al., 2018). El año 2010 la Academia Americana de Pediatría informó que el uso de ECN en niños y adolescente no se ha

estudiado adecuadamente por ende sugiere que el consumo de este edulcorante debe ser limitado en la dieta de estos grupos etarios (Sylvetsky et al.,2011).

Los estudios que se han preocupado de determinar el efecto de edulcorantes como la sucralosa en humanos y modelos animales son escasos, y estos apuntan a que el uso de sucralosa en etapas tempranas podría alterar la salud manifestándose principalmente en cambios metabólicos como la desregulación del control de la glicemia, aumento del peso corporal y modificaciones en la composición de la microbiota intestinal (Sylvetsky et al.,2011).

A la fecha las investigaciones respecto al uso de sucralosa en etapa infantojuvenil y sus efectos en el comportamiento con registros electrofisiológicos son escasas. Existe un reporte en animales adultos en el cual la administración por 6 semanas distintos ENC entre ellos sucralosa, mostró que ratas que consumieron sucralosa manifestaron un deterioro en el aprendizaje de evitación pasiva y un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en hipocampo, sugiriendo una alteración en el funcionamiento del hipocampo y conductas dependiente de esta estructura límbica (Erbas et al.,2018). En experimentos realizados en nuestro laboratorio que buscaban determinar como el consumo de lactobacillus GG afecta la trasmisión sináptica inhibitoria, observamos que la sucralosa usada para facilitar el consumo del probiótico disminuyó la transmisión inhibitoria en rebanadas de hipocampo, apoyando la idea que el consumo de ENC puede modificar la función cerebral.

3.5 Planteamiento del problema

Desde una perspectiva neurobiológica, la adolescencia se revela como un periodo extraordinariamente propenso a las influencias del entorno, las cuales podrían acarrear consecuencias significativas en la etapa adulta, especialmente en lo que respecta a la salud mental. La alimentación surge como un factor crucial, ya que puede desempeñar un papel protector o, por el contrario, manifestarse como un factor de riesgo para promover un estado inflamatorio que agrave condiciones o enfermedades. Existen informes que indican que una dieta rica en grasas o azúcares puede generar efectos perjudiciales a nivel de la transmisión sináptica, así como en los procesos de aprendizaje y memoria.

Dada esta problemática, tanto entidades políticas como la industria alimentaria han modificado la composición de los productos alimenticios, sustituyendo el azúcar por edulcorantes no calóricos (ENC), siendo la sucralosa uno de los más ampliamente utilizados. No obstante, hasta el momento, no existen pruebas concluyentes acerca de si el uso de sucralosa durante la adolescencia podría tener efectos en el sistema nervioso central (SNC).

En este contexto, surge la siguiente interrogante: ¿Puede el consumo de sucralosa durante la adolescencia afectar la transmisión sináptica inhibitoria de la CPFm?.

4. HIPÓTESIS Y/O PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El uso de edulcorante no calórico comercial en la adolescencia **disminuye la transmisión sináptica** inhibitoria en la corteza prefrontal medial en un modelo murino.

Que antecedentes apoyan esta hipótesis en la formulación?

5. OBJETIVOS

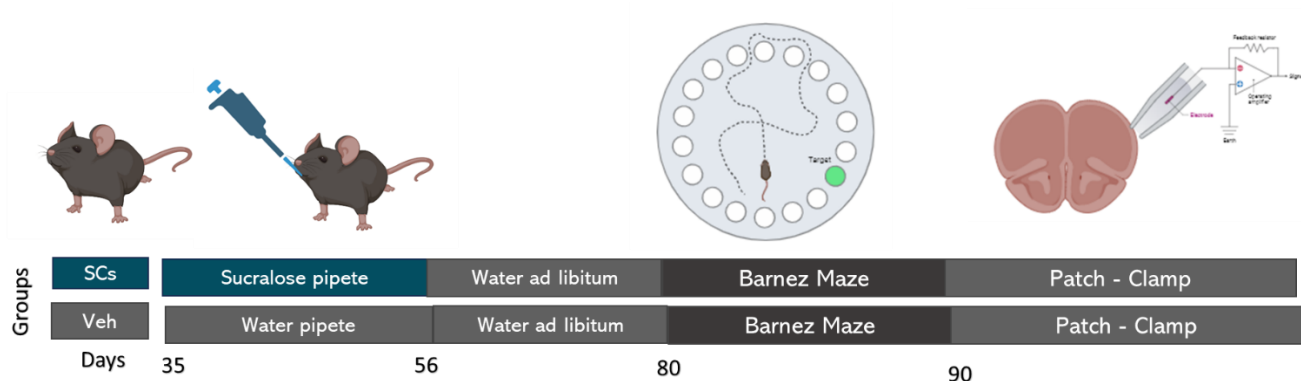
5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar si la ingesta de edulcorante no calórico comercial durante la adolescencia disminuye la transmisión sináptica inhibitoria en ratones.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Evaluar modificaciones en la memoria de trabajo de ratones adultos tratados con edulcorante no calórico comercial durante adolescencia.
- ii) Determinar si la ingesta de edulcorante no calórico comercial durante la adolescencia modifica las propiedades **eléctricas** de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal medial de ratones adultos.
- iii) Determinar si el consumo de edulcorante no calórico comercial durante adolescencia modifica la transmisión inhibitoria y excitatoria y si altera el balance excitación inhibición en corteza prefrontal medial **de ratones adultos**.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



Esquema diseño experimental: Grupo SCs se administró a través de una pipeta Splenda desde p35 hasta p56; grupo Veh se administró agua. En P80 se aplicó prueba de conducta Barnes Maze, posteriormente se realizaron registros electrofisiológicos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 24 ratones machos y hembras de la cepa c57BL/6. Los ratones fueron destetados en p21 y se dividieron en 2 grupos: grupo sucralosa (SCs) y grupo vehículo (Veh). El grupo SCs se le administró 10mg/kg de un edulcorante no calórico comercial en base a sucralosa (*Splenda*) durante la etapa adolescente de un modelo murino (P35 a P56). El Veh recibió sólo agua. Los animales se mantuvieron en el bioterio con ambiente controlado (T° y humedad) y ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El acceso a la comida fue ad libitum controlando la ingesta semanal. Esta investigación se realizó con la aprobación bioética cuyo código es: **CBC35/2022**.

Tratamiento con edulcorante no calórico:

Se administró un edulcorante comercial de marca internacional *Splenda*, este edulcorante de uso comercial se ha utilizado en **estudios previos** y responde a las características químicas generales de los edulcorantes en base a sucralosa (dextrosa 95,8%, maltodextrina 3% sucralosa 1,2%). Se administró 10mg/kg/día con micropipeta. Se diluyó 1 gramo de *Splenda* en 1 ml de agua. Al grupo vehículo se les administró de la misma manera agua.

Barnes Maze

La prueba de *Barnes Maze* es una prueba que evalúa el aprendizaje y memoria espacial donde los animales aprenden la relación entre las señales distales en el entorno circundante y una ubicación de escape fija. **Esta prueba se aplicó en etapa adulta P82–P90**. Los animales fueron transportados en una caja hacia la sala de conducta donde se dejaron durante 20 a 30 minutos para su ambientación. Todos los parámetros medio ambientales fueron controlados y registrados (T°, luz y humedad).

Barnes Maze es una plataforma circular que consta de 16 agujeros espaciados uniformemente alrededor del perímetro. En uno de los orificios se monta un tubo de escape donde el animal puede refugiarse del estímulo estresante que en este caso es una fuente de luz (400 – 500 LUX) ubicada en el techo de la sala, los otros 15 agujeros se dejan vacíos. Se ubicaron las señales visuales en las paredes de la sala de conducta. La prueba constó de 2 fases adquisición y recuperación: la fase adquisición se dejó al animal en el centro de la plataforma permitiéndole explorar hasta que encontrara el agujero con la vía de escape, esta fase constó de 4 pruebas por día durante 4 días consecutivos; la fase de recuperación se realizó al quinto día y consistió en una sola prueba donde se dejó al animal en el centro de la plataforma permitiéndole explorar, pero esta vez fue sin la salida

de escape. Los parámetros que se evaluaron en la fase de adquisición y recuperación son el número de sesiones exitosas donde el animal encuentra la vía de escape, latencia para encontrar la salida, distancia recorrida hasta la salida de escape y el número de errores (cuando el animal entra al agujero equivocado). Además, durante la etapa de recuperación se midió el tiempo que el animal estuvo en el cuadrante objetivo donde el escape fue localizado. Para esta prueba medimos 2 parámetros: Latencia y eficacia de la ruta. La latencia primaria se refiere al tiempo que tarda el animal en ubicar la salida, al posicionar su nariz en el agujero de escape, mientras que la latencia secundaria es el tiempo que demora el animal en llegar al escape.

El registro se realizó a través de un sistema de cámaras (acquisition at 30 FPS and 640x480 pixels, camera model C920, Logitech Co) y para el análisis se utilizó el software Any Maze (ANY-maze v.7.09, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

Open Field

Este procedimiento se realizó en la sala de conducta del laboratorio donde los parámetros temperatura, humedad y luz estaban controlados ($T^{\circ} 22^{\circ}\text{C} \pm 1$, Humedad 50%, iluminación 300 ± 10 lux). Los animales fueron expuestos durante 5 minutos en el centro de una caja de acrílico gris (40x 40 x 40 cm). Posicionamos al animal al centro de la plataforma y cuantificamos el tiempo de permanencia en el centro y los bordes El registro se realizó a través de un sistema de cámaras (acquisition at 30 FPS and 640x480 pixels, camera model C920, Logitech Co.) y los datos fueron analizado con el programa ANY MAZE.

Preparación de rebanadas

Para obtener las rebanadas de corteza prefrontal (CPF), en etapa adulta (P95-100) los ratones fueron anestesiados con isoflurano y posteriormente decapitados. El cerebro se extrajo rápidamente y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial (ACSF) frío (4°C) en mM: 124,00 NaCl, 2,69 KCl, 1,25 KH₂PO₄, 2,00 MgSO₄, 26,00 NaHCO₃, 2,00 CaCl₂, 10,00 glucosa. Luego utilizando un vibrátomo se realizaron cortes de CPF de 300 µm, los que posteriormente se dejaron incubando en una cámara con ACSF con burbujeo de carbógeno durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo los cortes fueron transferidos a una cámara de 2 ml fijada a un microscopio (NIKON, modelo Eclipse FN1, Tokio, Japón) equipada con microscopia de contraste de interferencia diferencial infrarrojas (DIC y objetivos de inmersión en líquido (40x)). Las rebanadas fueron perfundidas con ACSF con gas carbógeno a 1 ml por minuto a temperatura ambiente.

Registro electrofisiológico

Los registros electrofisiológicos se realizaron mediante la técnica de Patch-Clamp en configuración célula completa (whole-cell) en los somas de las neuronas piramidales de la capa 2/3 de la CPFm situando el electrodo de estimulación en la misma capa 2/3 con una distancia de 100µ (Figura 2). Las pipetas de registro tuvieron una solución intracelular de metasulfonato de potasio en mM: KMeSO₄ 134, KCl 10, HEPES 10, NaCl 5, ATP-Mg⁺² 2.5 and GTP-Na⁺ 0.3 (pH = 7.3 ajustada a un Ph 7.2–7.3) y una solución intracelular de gluconato de cesio en mM: Cs-Gluconato 100, HEPES 10, EGTA 10, Na₂-ATP 4, TEA-Cl 10 y MgCl₂-6H₂O 1, ajustada a un pH 7.2–7.3 con CsOH. El electrodo de registro tuvo una resistencia de 4-6 MΩ conectado a un amplificador EPC-7 (Heka Instruments) y fueron filtrados a 3kHz, muestreados entre 4 a 10 kHz a través de un conversor análogo-digital (ITC-16 Intrutech) y almacenados en el software Pulse FIT (Heka Instruments). Para el análisis de los registros se utilizará el software Clampfit 10.4. Los experimentos para fijación de voltaje se

realizaron con una solución de gluconato de cesio para el registro de las corrientes postsinápticas inhibitorias (IPSC), fijando voltaje a 0 mV y metasulfonato de potasio para las corrientes postsinápticas excitatorias (EPSC) fijando voltaje -65mV. Para el estudio de la eficacia sinápticas inhibitorias se registraron las IPSC espontáneas (sIPSC) y las IPSC evocadas (eIPSC). Se aplicó un protocolo de pulsos pareados (PP) para las eIPSC y eEPSC, este protocolo consiste en aplicar dos estímulos de igual intensidad separados por un intervalo determinado (30, 70, 100 y 300 ms). Para los registros con fijación de corriente se realizaron con una solución interna de metasulfonato de potasio. Se registró el potencial de membrana en reposo de la célula y se aplicaran tres protocolos

- 1) RAMPA: un pulso continuo de corriente de -100 pA a 500 pA durante 500 ms para registrar los cambios de potencial de membrana en el tiempo
- 2) curva intensidad/voltaje (I/V) en la que se aplicarán 10 pulsos de corriente de 50 pA desde -100 pA a 350 pA en 250 ms y se registraran los potenciales postsinápticos luego de cada pulso.

Para evaluar cambios en el vaciamiento de vesículas aplicamos el protocolo *Short-term depletion* (STP, ver metodología) el cual es considerado como un experimento preliminar para evaluar cambios en la plasticidad a corto plazo. Este protocolo implica la aplicación de 20 pulsos de corriente a una frecuencia de 10 Hz lo que provoca el agotamiento de las vesículas tras la liberación de neurotransmisores por parte de la neurona presináptica.

Análisis Estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó GraphPad Prism®, version 8.0. los resultados se expresan como la media \pm error estándar de la media (SEM), para indicar diferencias estadísticamente significativas se utilizará una significancia de $P < 0,05$. La prueba estadística a utilizar fue ANOVA de dos vías cuando corresponda. El tamaño del efecto esperado y la muestra fue calculado por el programa G Power con un análisis de poder (T test).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Figura	Análisis estadístico	Softwares gráficos
Cálculo nº animales	Anova – Two Way	G Power
Tabla 1	Anova – Two Way	Tabla Word
Figura 2	T test	GraphPad
Tabla 2	T -test	Tabla Word
Figura 3	T-test	GraphPad
Figura 4	T-test	GraphPad
Figura 5	Anova – Two Way	GraphPad
Figura 6	Anova – Two Way	GraphPad
Figura 7	Anova – Two Way	GraphPad
Figura 8	Anova – Two Way	GraphPad
Figura 9	T- test	GraphPad

9. RESULTADOS

9.1 Efecto de la ingesta de SCs en el peso e ingesta de alimento y agua.

Los edulcorantes no calóricos son sustitutos del azúcar que se caracterizan por no tener un aporte calórico, para este trabajo utilizamos uno en base a sucralosa. Con el propósito de examinar si el uso de este edulcorante no calórico tiene efectos sobre el peso y la ingesta de alimentos en los animales, se procedió a cuantificar semanalmente tanto el peso como la cantidad de alimentos consumidos.

Durante el tratamiento no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso de los animales (valor de $p = 0.38$) ni en su consumo de agua (valor de $p = 0.83$), sin embargo, se registró un aumento significativo en la ingesta de alimentos en el grupo SCs en comparación al grupo Veh (Tabla 1).

n ?

Grupo	Promedio peso (g)	Ingesta comida (g)	Ingesta de agua (ml)
Hembras			
Hembras Veh	21.6 ± 0,07 ^a	50.17 ± 7.3 ^a	150.0 ± 10.12 ^a
Hembras SCs	21.8 ± 0,02 ^a	101.0 ± 1.3 ^b	165.8 ± 10.9 ^a
Machos			
Machos Veh	26.6 ± 0,03 ^a	74.17 ± 1.9 ^a	177.5 ± 11.49 ^a
Machos SCs	25.5 ± 1,3 ^a	113.0 ± 4.1 ^b	198.3 ± 7.1 ^a

Tabla 1. Control incremento de peso, ingesta de comida y alimento animales SCs y vehículo. La cantidad de comida y agua fue pesada 1 vez por semana y corresponde a la ingesta consumida por caja (3 a 4 animales por jaula).

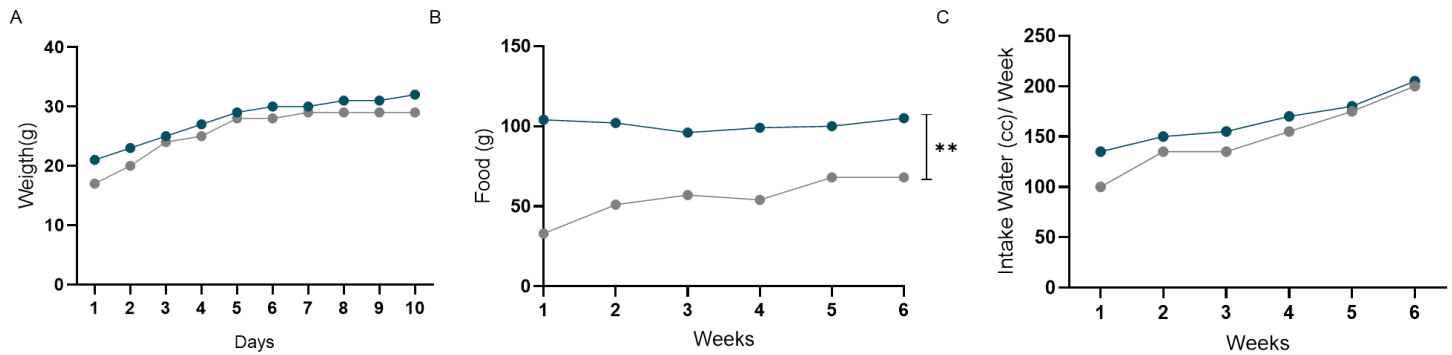


Figura 2. Ingesta de SCs durante la adolescencia genera un aumento en la ingesta de comida. En gris grupo azúcar grupo SCs y gris grupo Veh(A) Control de peso (g) en días; (B) gráfico ingesta de comida semanal; (C) gráfico ingesta de agua semanal.

Electrofisiológicas

9.2 Propiedades eléctricas de la membrana y excitabilidad de neuronas piramidales de la CPFm

capa II/III

La comunicación entre las neuronas depende de su capacidad para responder a estímulos, esta respuesta produce cambios rápidos en el potencial de membrana. La generación y mantención del potencial de membrana en reposo es importante para las células excitables, cambios en su excitabilidad pueden producir alteraciones en el funcionamiento de la célula (Kandel ., et al 1997) Es por esto, que caracterizamos las propiedades eléctricas de las neuronas piramidales de la CPFm de capa II/III en los animales SCs y Veh.

Los experimentos realizados indican que el potencial de membrana en animales tratados con sucralosa, presentan un potencial de membrana de $-68,3 \text{ mv} \pm 1,34$, mientras que los animales controles presentan un potencial de membrana de $-67,2 \text{ mv} \pm 1,08$, no observándose diferencias entre los grupos (P value = 0,59) tabla N°3.

Las propiedades eléctricas de las neuronas determinan el curso temporal y amplitud de los potenciales sinápticos generados, siendo importantes para la transmisión de señales eléctricas. La fijación de corrientes (current-clamp) permite registrar cambios en los potenciales de membrana (mV) mientras se inyecta un pulso de corriente a la célula a través del electrodo de registro. La relación entre la intensidad de corriente inyectada y cambios en el voltaje de membrana nos permite

calcular las propiedades eléctricas pasivas de las neuronas a partir de una curva de intensidad corriente–voltaje (I-V). Para calcular la resistencia del potencial de membrana (Rm), se aplicó Ley de Ohm la cual establece que la intensidad de corriente (I) que atraviesa un circuito es directamente proporcional al voltaje (V) e inversamente proporcional a la resistencia (R). El resultado del cálculo de Rm para el grupo sucralosa fue de $151,5 \pm 9.04$ mV mientras que para el grupo control fue de $130,3 \pm 5,13$ mV. (P value = 0,08).

Las neuronas se comportan como un circuito de resistencia y capacitor (RC) donde la membrana sería el capacitor (C) y los canales iónicos la resistencia (R). El voltaje cambia exponencialmente en el tiempo, por lo que es posible establecer una constante de tiempo (tau) y la capacitancia de la membrana (Cm) de las neuronas. Es por esto que calculamos *tau* y Cm de las neuronas piramidales de CPFm, donde *tau* para el grupo SCs fue de 27,6 y la Cm 165,9, no observándose cambios estadísticamente significativos en comparación al grupo Veh (Tabla 2).

	Vehículo (N=5)	Sucralosa (N= 7)
Potencial membrana en reposo (mV)	-67.2	-68.3
Rm (MΩ)	130.3	151.5
Tau (ms)	24.9	27.6
Cm (pF)	169.5	165.9
Umbral de disparo (mV)	-45.9	-42.2
Frecuencia de disparo (pA)	4.0	3.5
Amplitud (pA)	103.4	113.0
Half-Width pA (ms)	2.29	1.78

Tabla 2. Propiedades pasivas y activas de neuronas piramidales de CPFm capa II/III

revisar las unidades de medida e indicar diferencias con *

9.3 Transmisión sináptica inhibitoria en neuronas piramidales de corteza prefrontal medial de animales tratados con sucralosa y vehículo

Las corrientes postsinápticas inhibitorias se generan tras la liberación del neurotransmisor GABA desde la neurona presináptica a una postsináptica, la cual activa sus receptores generando la abertura de los canales de ion cloruro generando cambios en las corrientes de entrada y de salida de la neurona. En condiciones experimentales se conocen como corrientes espontáneas postsinápticas inhibitorias (sIPSC) (Hsia, et al 1998). Para evaluar si el consumo de sucralosa afecta las sIPSC, registramos la actividad de las neuronas piramidales en CPFm capa II/III, fijando el voltaje a 0mV en presencia de APV y CNQX.

En las figuras 3B y C se muestran los efectos del consumo de sucralosa sobre las sIPSC. El consumo de sucralosa disminuye de manera significativa las frecuencias de los eventos sIPSC, siendo $1,3 \pm 0,3$ Hz para el grupo SCs (figura 3B) y $4,13 \pm 0,5$ Hz para el grupo Veh. En cuanto a la amplitud de sIPSC no se observaron diferencias entre los grupos, siendo en promedio $28,7 \pm 1,89$ para el grupo SCs y $29,06 \pm 2,09$ para el grupo Veh (figura 3C). Además, medimos las corrientes independientes de potencial de acción (mIPSC), en la cual también se observa una menor frecuencia en los mIPSC de grupo SCs ($0,6 \pm 0,05$) en comparación al grupo Veh ($1,05 \pm 0,09$) (figura 3E); en cuanto a la amplitud de los mIPSC estos no presentan diferencia entre los grupos (SCs $20,72 \pm 1,16$ y Veh $19,71 \pm 0,82$) (figura 3F).

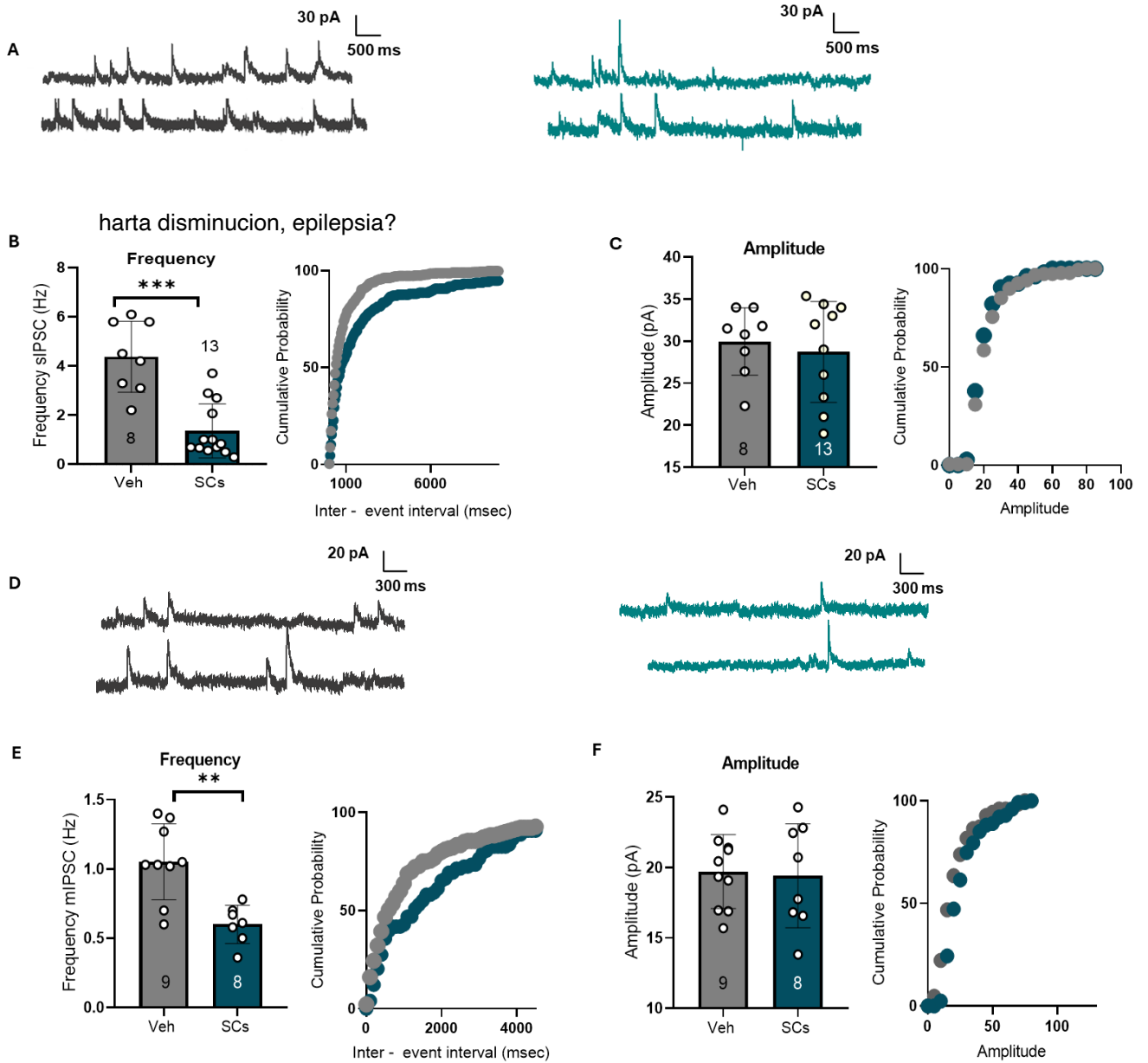


Figura 3. Efecto del consumo de sucralosa sobre la transmisión sináptica inhibitoria en PyN CPFm capa II/III. (A) trazos representativos de sIPSC. (B) análisis cuantitativo (Hz) de sIPSC y (C) amplitud. (D) análisis cuantitativo (Hz) de mIPSC y (E) amplitud.

9.4 Transmisión sináptica excitatoria en neuronas piramidales de CPFm de animales tratados con SCs y vehículo.

Las neuronas reciben entradas sinápticas tanto inhibitorias como excitatorias, la regulación de ambas sinapsis es fundamental para el correcto funcionamiento del circuito. Los resultados presentados de la transmisión sináptica inhibitoria indican una menor frecuencia en los eventos, por ende, fuimos a registrar la actividad de las sinapsis glutamatérgicas en las neuronas piramidales de de CPFm. Para esto fijamos el voltaje a -65mV y registramos las corrientes postsinápticas excitatorias.

Los resultados de la cuantificación de la frecuencia de eventos indican que no existen diferencias entre los grupos que recibieron sucralosa y el grupo vehículo (Veh $1,2 \pm 0,14$; SCs $1,2 \pm 0,17$) (figura 4B). De manera similar, al analizar la amplitud de estos eventos, tampoco se observan diferencias entre los dos grupos mencionados (figura 4C).

En relación con las corrientes independientes de potencial de acción, la frecuencia de los mEPSC no presenta diferencias entre el grupo que recibió sucralosa y el grupo de vehículo (Veh $0,47 \pm 0,06$; SCs $0,43 \pm 0,03$) (figura 4E). En cuanto a la amplitud de los mIPSC tampoco no se observan diferencias significativas entre los grupos (Veh 21.75 ± 1.2 ; SCs 19.02 ± 2.2) (figura 4F).

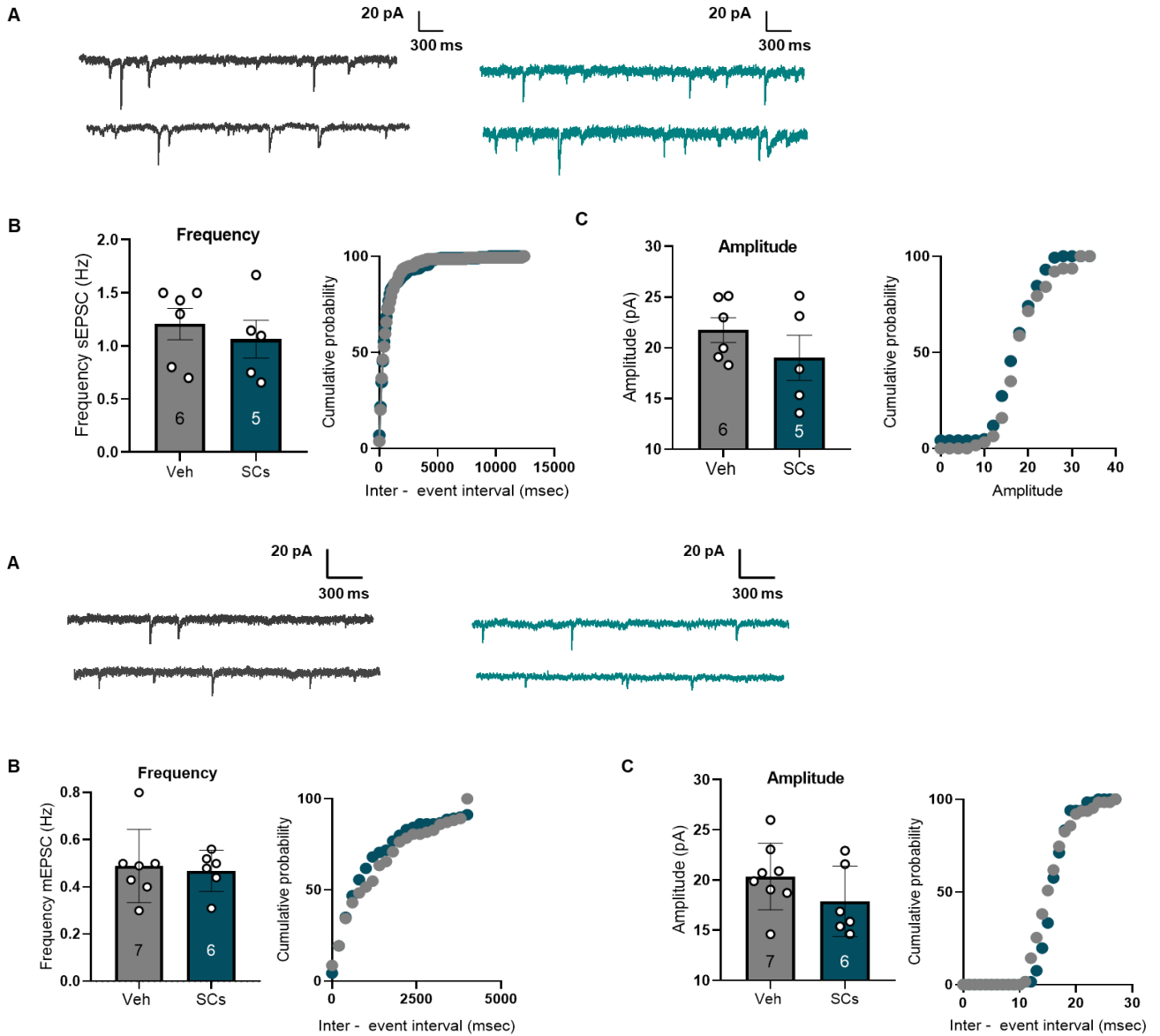


Figura 4: Efecto del consumo de sucralosa sobre la transmisión sináptica excitatoria en CPFm capa II/III. (A) trazos representativos de sEPSC. (B) análisis cuantitativo (Hz) de sEPSC y (C) amplitud. (D) Trazo representativo mEPSC. (E) Análisis cuantitativo (Hz) de mEPSC y (F) amplitud.

9.5 Transmisión sináptica inhibitorias evocada en neuronas piramidales de CPFm de animales tratados con SCs y vehículo.

En el resultado anterior observamos una menor frecuencia en los sIPSC e mIPSC lo que sugiere que podría ser un problema presináptico. La llegada del potencial de acción desde los terminales sinápticos a la neurona presináptica incrementa la probabilidad de liberación (Pr) de los neurotransmisores. Para evaluar si la ingesta de SCs genera un efecto en la Pr de las neuronas GABAérgicas sobre las neuronas piramidales en CPFm, evaluamos la IPSC evocadas (eIPSC) utilizando un protocolo de pulsos pareados. Este protocolo calcula la razón entre la amplitud del segundo pulso respecto al primero (PPR). En la figura 5^a se muestran los trazos representativos de los registros obtenidos, en estos se observa que el segundo pulso es menor que el primero (depresión por pulsos pareado).

En la figura 5 se observa la PPR a distintos intervalos de tiempo (30, 70, 100 y 300 ms), el análisis estadístico indica que al intervalo de 100ms el grupo SCs presenta una menor Pr que el grupo vehículo siendo estadísticamente significativa (Anova – 2V P = 0,062).

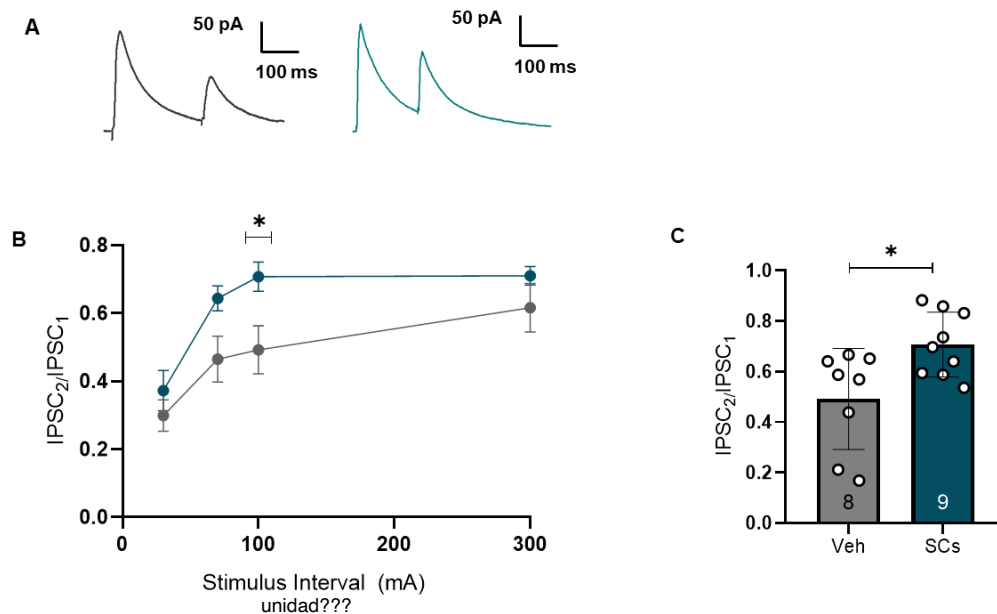


Figura 5. efecto del consumo de sucralosa sobre las corrientes inhibitorias post-sinapticas evocadas (eIPSC): (A) trazos representativos de pulsos pareados (PP) en un intervalo de 100 ms en fijación de voltaje a 0mV (B) razón IPSC₂/IPSC₁ a 30, 70, 100 y 300 ms. (C) derecha, gráfico a 100 ms grupo Vehículo y grupo sucralosa (P = 0,06).

9.6 Cambios en la plasticidad por agotamiento de vesículas en grupo tratados con sucralosa.

Cambios en la Pr puede generar un cambio en la plasticidad sináptica. Para estudiar posibles cambios en la plasticidad, aplicamos el protocolo denominado STP que consiste en la aplicación de 20 pulsos de corrientes de 10Hz provocando el agotamiento de las vesículas desde la neurona presináptica (ver metodología). Con el objetivo de determinar si la ingestión de sucralosa afecta el agotamiento de las vesículas, se llevó a cabo dicho protocolo. En los resultados se observa un mayor agotamiento de vesícula en el grupo SCs en comparación al grupo control, siendo estadísticamente significativa (Figura 6: ANOVA – 2V).

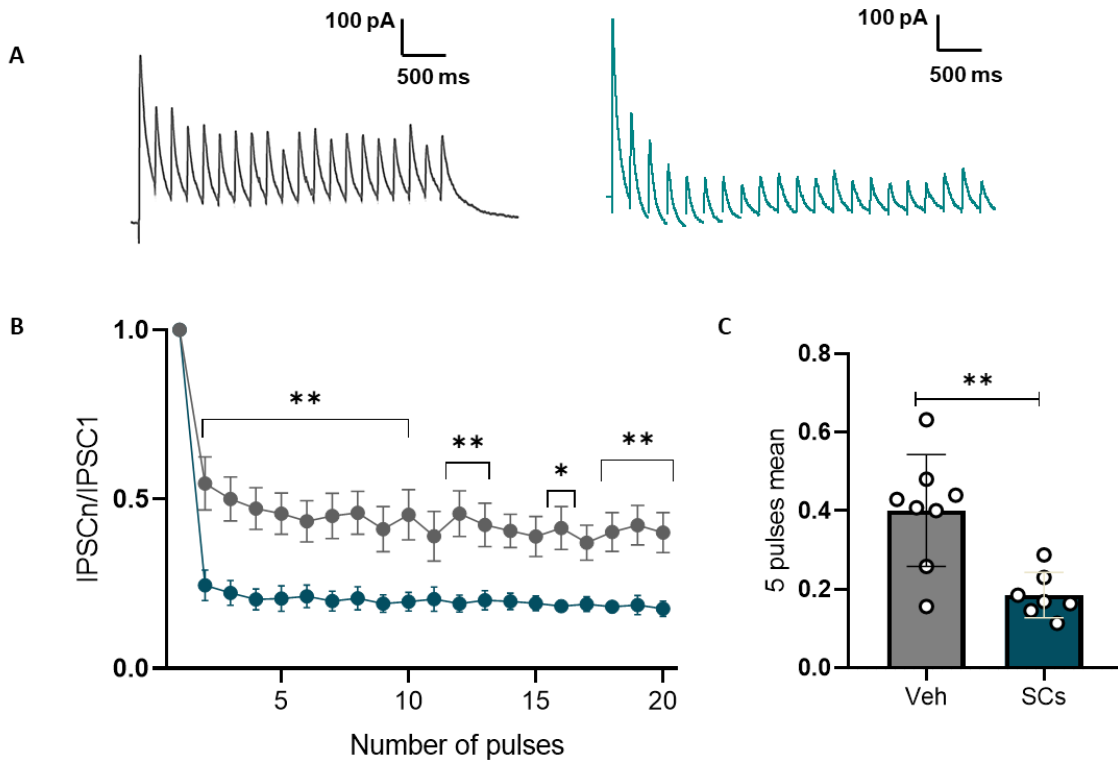


Figura 6. efecto del consumo de sucralosa sobre el agotamiento de vesículas: (A) trazos representativos *short-term depletion* en un intervalo de 100 ms en fijación de voltaje a 0mV (B) razón IPSCn/IPSC1 20 pulsos de corriente 10Hz. (C) Gráfico del promedio de 5 pulsos.

100 ms?, 500 ms barra calibracion?

9.7 Efecto del tratamiento de SCs en la memoria y aprendizaje

Cambios en la sIPSC podría tener un impacto en el circuito neuronal, los que podrían manifestarse en cambios en el comportamiento. La CPFm está involucrada en la regulación tanto a nivel emocional como también en la consolidación de la memoria y aprendizaje. Para determinar si la ingesta de sucralosa durante la adolescencia genera efectos en la consolidación de la memoria y aprendizaje, aplicamos una prueba conductual: *Barnes Maze*. El análisis cuantitativo para ambos parámetros no se observan diferencias entre los grupos (figura 7).

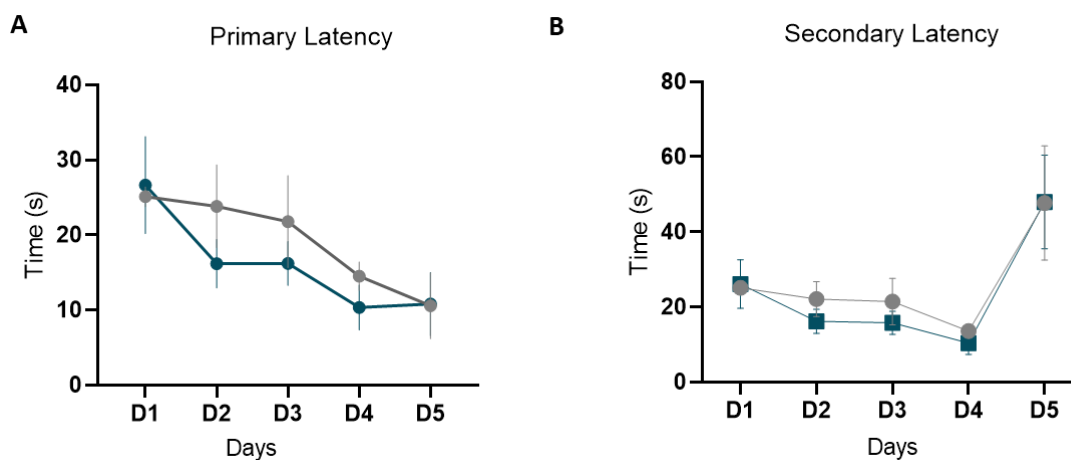


Figura 7. efecto del consumo de sucralosa en latencia primaria y secundaria: (A) Latencia primaria: tiempo en que el animal demora en encontrar el escape (B) latencia secundaria: tiempo que demora el animal en llegar al escape. Veh n=8; SCs n= 10.

La eficacia de la ruta que toma el animal para encontrar su destino es un indicador de estrategia. Cuantificamos la eficacia de la ruta tanto primaria como secundaria, sin embargo, tampoco observamos diferencia entre los grupos (figura 8).

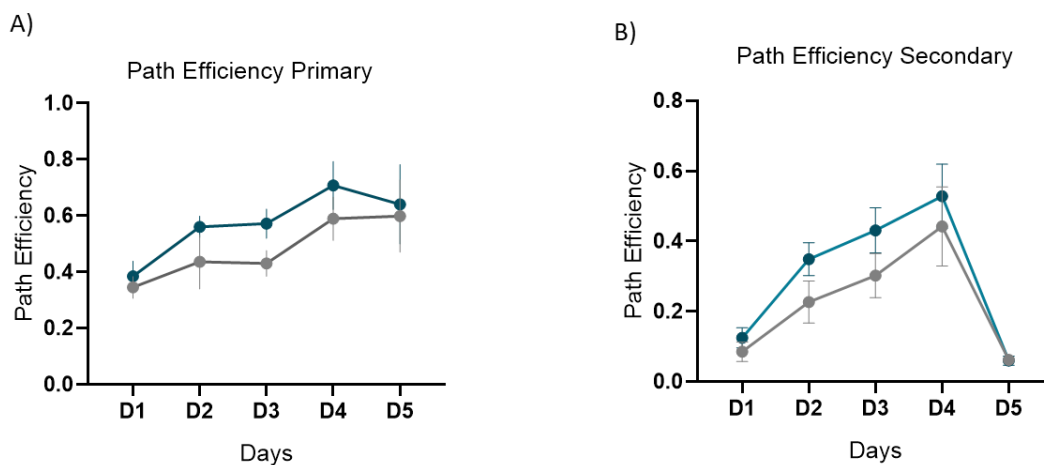


Figura 8. Efecto del consumo de sucralosa en la eficacia de la ruta: (A) eficacia de la ruta primaria (B) eficacia de la ruta secundaria. Veh n=8; SCs n= 10

Se evaluaron otros indicadores: distancia, velocidad media y n° de errores, no observándose diferencias significativas entre los grupos (ver anexos).

9.8 Efecto de la ingesta de SCs en el comportamiento ansioso.

Cómo no se observaron cambios las pruebas de memoria y aprendizaje, fuimos a evaluar el comportamiento ansioso de los animales tratados con SCs.

La CPFm modula la actividad de otras estructuras subcorticales como estructuras del sistema límbico. Para evaluar si los animales tratados con SCs exhiben niveles más elevados de ansiedad, se aplicó el test conductual de campo abierto u *open field*. En análisis cuantitativo de permanencia en el centro de la arena no muestra diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, sin embargo, al momento de analizar el tiempo en los bordes, muestra que los animales tratados con SCs permanecen menos tiempo en la periferia en comparación al grupo Vehículo (Figura 9).

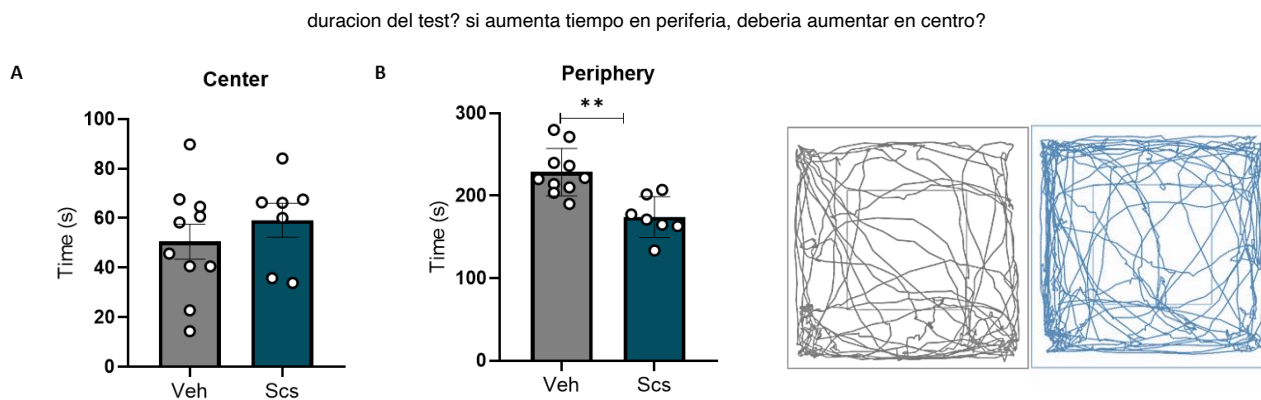


Figura 9. Efecto del consumo de SCs en el comportamiento ansioso: (A) Tiempo en el centro de la plataforma (B) tiempo en la periferia de la plataforma. (C) Mapa de trayectoria recorrida. Veh n=10; SCs n= 7.

Además, hicimos la separación por sexo, y se observa el mismo comportamiento tanto para machos y hembras del grupo SCs. (Ver anexos).

10. DISCUSION

Los resultados de esta investigación muestran la primera evidencia sobre los efectos neurobiológicos de la ingesta de sucralosa (SCs) durante la etapa juvenil de un modelo murino, donde encontramos una afectación **en la en la** transmisión sináptica inhibitoria y un **aumento** del comportamiento ansioso en los animales. Estos resultados toman una gran relevancia debido a que la ingesta de edulcorantes no calóricos en este grupo etario va en aumento. Recientemente Duran y colaboradores, informan que la ingesta de alimentos con ENC en Chile ha aumentado en un 82% posterior a la nueva ley de etiquetado nutricional (Durán et al 2020), siendo la SCs la más consumida. A pesar de esto, actualmente no existen reportes que investiguen el efecto de la ingesta de SCs durante la adolescencia sobre el sistema nervioso y sobre la corteza **prefrontal** (CPF), región cerebral esencial para entre otras funciones el control de la ingesta de alimentos.

agregar referencias

Nuestros resultados son el primer acercamiento en donde observamos una menor frecuencia en la transmisión sináptica inhibitoria tanto espontánea como miniatura en la CPFm y a su vez una menor probabilidad de liberación, lo que respalda que el efecto es presináptico. La transmisión GABAérgica regula la actividad sináptica estableciendo una ventana temporal que permite a las PyNs integrar las entradas excitatorias e inhibitorias y así regular el potencial de acción. Cuando la transmisión GABAérgica se ve afectada, la integración sináptica también se afecta, lo que a mayor escala podría significar un problema en la plasticidad sináptica.

El protocolo de STD mediante una serie de pulsos eléctricos genera una liberación de vesículas con neurotransmisores que van disminuyendo en los distintos intervalos de tiempo, provocando una disminución transitoria de la fuerza sináptica. Este agotamiento vesicular permite tener una estimación de la capacidad plástica que tiene el circuito cortical en diferentes condiciones. Nuestros resultados sugieren que las sinapsis GABAérgicas de los animales alimentados con SCs vaciaron sus vesículas de neurotransmisores en un porcentaje mayor que las sinapsis registradas en el grupo de

ratones vehículo. Según literatura, son varios los factores que pueden explicar la reducción de la liberación de neurotransmisores, como, por ejemplo: el agotamiento de las vesículas, modificaciones en la probabilidad de liberación, la inactivación de los sitios de liberación, la desensibilización del sistema y la disminución del ingreso de calcio en el terminal sináptico (Fioravante et al., 2011). Por lo tanto, se requiere a futuro otro tipo de técnicas, más específicas para determinar la causa de estas diferencias, como experimentos que modifiquen la concentración de calcio extra e intracelular, farmacología que bloquen canales de calcio o técnicas que permitan medir y analizar la formación de vesículas en el terminal sináptico, las cuales están fuera del alcance de esta investigación. Nuestros resultados demuestran la importancia de llevar a cabo futuros experimentos, más específicos, que permitan evaluar si estos cambios sinápticos juegan un papel relevante en la inducción de distintas formas de plasticidad sináptica en la corteza prefrontal medial durante el periodo juvenil, ya que podrían traer consecuencia en la etapa adulta volviendo al sistema más susceptible a desarrollar enfermedades neuropsiquiátricas.

Las interneuronas GABAérgicas de la CPFm y sus inervaciones a otras regiones subcorticales son esenciales para la ejecución de comportamientos complejos como la memoria de trabajo, el comportamiento social y la expresión del miedo. La CPFm recibe entradas sinápticas de distintas regiones subcorticales como el hipocampo y la amígdala. Es por esto que cambios en la eficacia de la transmisión inhibitoria en la CPFm durante la adolescencia implican un sistema más susceptible al desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas en la etapa adulta.

Como se mencionó al inicio, a la fecha no existen investigaciones que estudien como la ingesta de SCs afecta la función del SNC en adolescentes, sin embargo, existen investigaciones en modelos animales y en adultos humanos que pueden proporcionar información relevante sobre este tema. Erbas y colaboradores investigaron el efecto de 3 ENC, uno de ellos SCs. Administraron SCs por vía oral durante 6 semanas a ratas adultas, seguido del test de aprendizaje de evitación pasiva (PAL).

Los resultados revelaron que los animales tratados con SCs exhibieron un deterioro en el aprendizaje de evitación pasiva, así como un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilar gliar (GFAP) en el hipocampo ventral. A pesar de la literatura descrita, en nuestro estudio, al aplicar el test Barnes Maze no se observaron diferencias significativas en la memoria entre el grupo tratado con SCs y el grupo de control vehículo. Aunque estas pruebas conductuales evalúan aspectos diferentes, ambas consideran la memoria como un indicador común. Es importante destacar que el test PAL incluye la evaluación de la flexibilidad cognitiva, la cual es un comportamiento dependiente de la corteza prefrontal, sugiriendo así la consideración de pruebas conductuales que midan la flexibilidad cognitiva en futuras investigaciones.

Diversos estudios realizados en humanos adultos también han investigado el efecto de la ingesta de SCs en el SNC. En uno de estos estudios, se proporcionó a un grupo de 21 adultos sanos y con peso normal una bebida endulzada con azúcar, mientras que a otro grupo se le ofreció una bebida con SCs. Después de la ingesta de las bebidas, se les administró a ambos grupos un test en el que tenían que evaluar la apetencia de varios alimentos. Se observó que el grupo que consumió la bebida con SCs mostró un aumento en la motivación para consumir alimentos dulces en comparación con el grupo que consumió la bebida endulzada con azúcar (Shanon et al., 2017). Otro estudio evaluó a través de una resonancia magnética la activación de las áreas cerebrales posterior a la ingesta de bebidas endulzadas con SCs o azúcar, los resultados revelaron que las mujeres obesas que consumieron bebidas con SCs mostraron una mayor actividad en la ínsula y la corteza orbitofrontal. Estos hallazgos son significativos, ya que son los primeros y únicos estudios en humanos que demuestran cómo los SCs pueden afectar las estructuras cerebrales asociadas con la búsqueda de alimentos.

La literatura nos muestra que la ingesta de SCs genera una mayor necesidad de ingerir alimentos. El comportamiento de búsqueda de alimento es un proceso complejo crítico para la supervivencia y

requiere la integración de múltiples estímulos sensoriales ambientales e internas. Esto requiere la participación de la función cognitiva y ejecutiva, atribuida a la CPFm y a otras zonas subcorticales. La CPFm participa en la ingesta hedónica de alimentos y el control sobre este, a su vez recibe entradas sinápticas desde la amígdala e hipocampo y proyecta hacia hipotálamo y núcleo accumbens. Estas estructuras regulan la ingesta de alimentos tras la liberación de distintos neuromodulares como dopamina y serotonina y neurotransmisores como glutamato y GABA. La transmisión sináptica inhibitoria esta mediada principalmente por el neurotransmisor GABA, diversos autores han informado que la activación como el bloqueo del receptor GABA impacta en la ingesta de alimentos en modelos animales. Por ejemplo, el bloqueo del receptor GABA en el hipotálamo de ratas aumenta la ingesta de alimentos altamente palatables, mientras que la activación en núcleo accumbens aumenta la ingesta de alimentos altos en grasas (Joshi et al., 2022). En un estudio donde activaron los receptores GABA-A de la CPFm, se observó que los animales aumentaron notablemente la ingesta de alimento, mientras que en este mismo estudio la activación en la corteza insular disminuyó la ingesta y el tiempo de duración. Estos resultados indican una heterogeneidad regional en el control frontal del comportamiento alimentario. Nuestros resultados muestran que la ingesta de SCs durante la adolescencia afecta la transmisión sináptica inhibitoria, disminuyendo la liberación del neurotransmisor GABA, lo que, basado en la literatura descrita, si bien no se ve un efecto en la memoria, si podría afectar el control de la búsqueda e ingesta de alimentos, lo que sugiere realizar test de conductas que evalúen este comportamiento.

Los ENC se posicionan en el mercado como una buena alternativa para sustituir el azúcar, cuyo público específico son personas con obesidad, sobre peso y diabetes. Por esto mismo se promulga la nueva ley de etiquetado. Sin embargo, desde que los ENC están más presentes en los productos alimenticios, los índices de obesidad y diabetes no han disminuido, por el contrario, esto van en aumento. Existen diversos estudios muestran los efectos agudos y a largo plazo de los ENC que

pueden contribuir a resultados metabólicos negativos, incluido el aumento de peso y la adiposidad en niños y adultos (Betty et al.,2021).

En nuestra investigación, notamos que al cuantificar la cantidad de comida restante en las jaulas de los animales del grupo SCs durante una semana, se encontró una menor cantidad en comparación con el grupo Veh, lo que sugería una mayor ingesta de alimentos. No obstante, se observó que la comida no era ingerida, sino más bien triturada. Esto se explica ya que los animales tuvieron un comportamiento de roer, en el cual los animales muelen la comida. El comportamiento de roer se asocia a conductas ansiosas, es por esto que se evaluó el comportamiento ansioso sin embargo los animales no presentaron un comportamiento más ansioso, lo que nuevamente se sugiere aplicar test conductual más robustos. La ansiedad ejerce un impacto significativo en los hábitos alimenticios. Las personas que experimentan ansiedad tienden a mostrar un comportamiento impulsivo al consumir alimentos, especialmente aquellos ricos en calorías (Francois et al., 2022), lo que podría desencadenar un patrón compulsivo de alimentación. Los estudios en modelos animales han demostrado que el estrés y ansiedad puede influir de manera variable en la ingesta calórica, aumentándola en algunos individuos y reduciéndola en otros. Por ejemplo, un estudio que empleó un modelo de estrés mediante restricción calórica buscó simular las dietas restrictivas observadas en seres humanos (Francois et al., 2022). Los resultados revelaron que, en el grupo de animales con sobrepeso, el estrés indujo una hiperfagia tanto en ratones machos como hembras. Esto sugiere que la ansiedad, el estrés y el sobrepeso están asociados con un aumento en la ingesta de alimentos. Desde el punto de vista sináptico, la sinapsis inhibitoria juega un papel fundamental en los trastornos ansiosos, siendo el blanco terapéutico de diversos fármacos con función ansiolítica. La CPFm recibe y proyecta sus axones a zonas subcorticales, siendo la amígdala cerebral una de estas. esta estrecha relación entre amígdala y CPFm es fundamental para moldear la actividad límbica y

regular las emociones. Se ha informado en modelos animales que las interneuronas GABAérgicas de la CPFm ejercen un control inhibitorio significativo sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas, influyendo en la respuesta autónoma a estímulos amenazante. Esto sugiere que la neurotransmisión GABAérgica dentro de la CPF podría ser fundamental para la regulación de la actividad de la amígdala relacionada con las emociones y el procesamiento de la ansiedad (Blair et al. 2008; Taylor and Whalen 2015).

Teniendo en cuenta nuestros hallazgos y la evidencia previamente mencionada, parece que el enfoque clínico nutricional actual y las políticas públicas en Chile para abordar el sobrepeso y la obesidad en la población podrían estar más cerca del problema que de la solución. Adolescentes y niños con obesidad y sobre peso son quienes consumen en mayor proporción productos con SCs (Duran et al., 2020), a su vez personas con este mismo estado nutricional son quienes presentan un mayor diagnóstico de enfermedades neuropsiquiátricas tales como estrés crónico, trastorno ansioso generalizado y depresión (Amiri et al., 2011).

Los trastornos metabólicos y las enfermedades neuropsiquiátricas representan una carga significativa para la salud pública en Chile, planteando desafíos tanto para los individuos afectados como para los sistemas de atención médica. Luego de nuestros resultados y la evidencia ya descrita, surge una pregunta latente sobre si el uso de SCs podría influir en la integridad de los circuitos neuronales en personas con obesidad, exacerbando los síntomas ansiosos y/o depresivos. Esta hipótesis sugiere una posible explicación para el aumento del deseo de consumir alimentos en individuos con obesidad, lo que a su vez puede contribuir a la persistencia de los indicadores metabólicos desfavorables. Sin embargo, se requieren investigaciones para validar estas hipótesis y comprender completamente sus implicaciones clínicas.

Los programas y guías alimentarias para niños y adolescentes actuales están enfocadas en prevenir la obesidad y las enfermedades crónicas no transmisibles. Se han establecido distintas estrategias que incentivan disminuir el consumo de alimentos con un mayor aporte calórico, azúcares, grasas y sodio. Entre ellas podemos encontrar la ley N° 20.606, guías alimentarias del MINSAL “Guía de alimentación del adolescente 11-18 años, la que recomienda el consumo de lácteos sin azúcar, evitar bebidas y alimentos azucarados, sugiriendo el consumo de alimentos con menos sellos de advertencia.

Actualmente se desconocen estrategias públicas que consideren la alimentación como un factor protector en el neurodesarrollo, por lo tanto, consideramos que nuestros resultados podrían ser un antecedente de suma importancia para que en un futuro se generen programas con un enfoque integrativo en el cual se integre la alimentación como estrategia de prevención del desarrollo de trastornos neuropsiquiátricos y a la vez la importancia del neurodesarrollo en el manejo de la obesidad y sus comorbilidades.

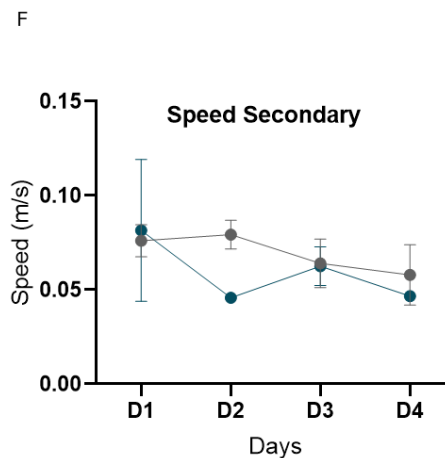
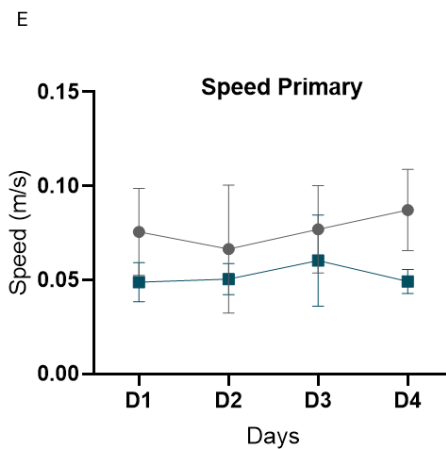
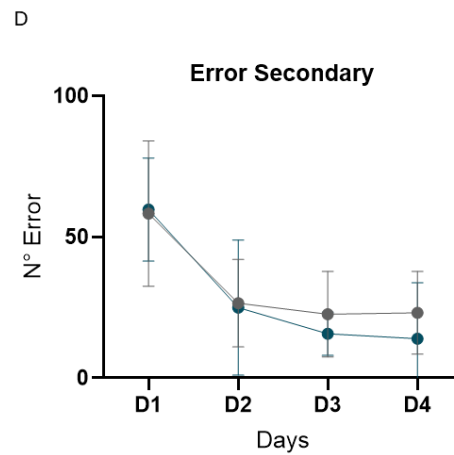
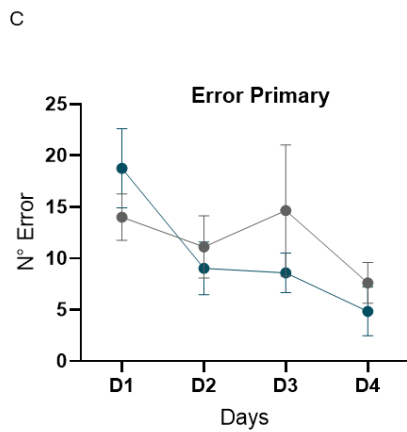
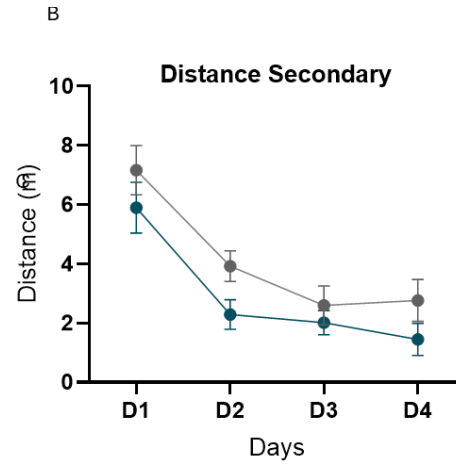
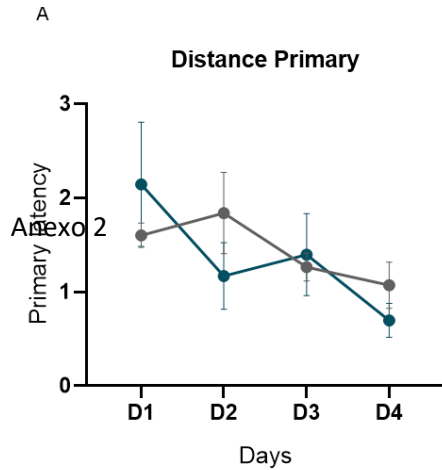
11. CONCLUSIONES

Los hallazgos de esta investigación permiten concluir que la ingesta de SCS durante un período crítico del neurodesarrollo disminuye la transmisión sináptica inhibitoria, evidenciada por una reducción en la frecuencia de los sIPSC y mIPSC. Además, se observó una disminución en la probabilidad de liberación en el grupo SCs en comparación con el grupo de Veh, lo que sugiere que la disminución en los sIPSC y mIPSC tiene un origen presináptico. Asimismo, se detectó una disminución en el vaciamiento de vesículas, lo que sugiere que la ingesta de SCs podría inducir cambios en la plasticidad neuronal.

Es necesario realizar investigaciones adicionales utilizando técnicas más específicas para comprender los mecanismos subyacentes y las consecuencias a largo plazo de estos cambios sinápticos. Considerando la asociación entre la ingesta de SCs y el aumento del deseo de consumir alimentos, así como los efectos observados en la transmisión sináptica, es esencial abordar estos interrogantes en futuros estudios para avanzar en la comprensión de los efectos de los edulcorantes no calóricos en la salud metabólica y neuropsiquiátrica.

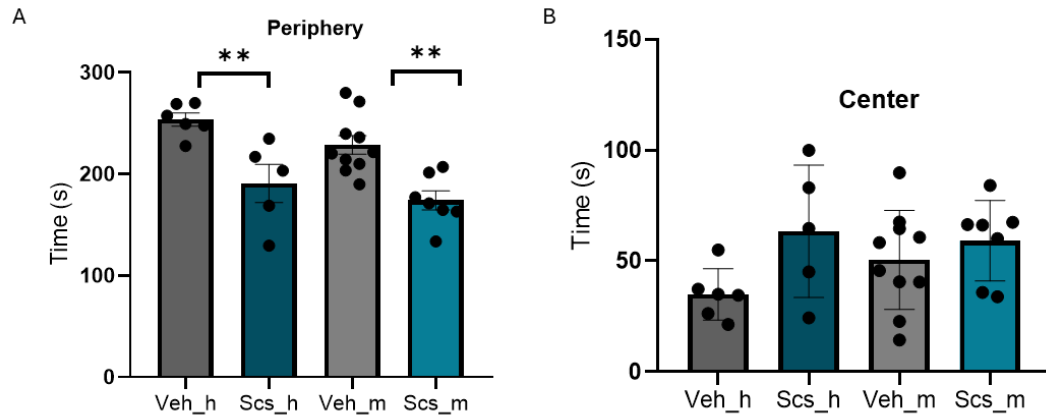
Anexos

Anexo 1: Barnes Maze. Efecto del consumo de sucralosa en la distancia recorrida, errores y velocidad: (A) distancia primaria :distancia que el animal recorre antes de encontrar el escape (B) distancia secundaria: distancia que recorres el animal hasta llegar al escape.(C) Error primario: n° de errores antes de encontrar el escape (D) Error secundario: n° de errores después de encontrar el escape (E) Velocidad primaria: velocidad recorrida antes de encontrar el escape (F) velocidad secundaria: velocidad recorrida después de encontrar el escape.



Anexo 2: Open Field, Efecto del consume de sucralosa en comportamiento ansioso en ratones machos y hembras: (A) Tiempo en el centro de la plataforma (B) tiempo en la periferia de la plataforma.

Veh_m: vehículo macho; Veh_h: vehículo hembra; SCs_m: sucralosa macho; SCs_h:sucralosa hembra



12. BIBLIOGRAFÍA

- Anastasiades, P. G., & Carter, A. G. (2021). Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex. *Trends in Neurosciences*, 44(7), 550–563. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2021.03.006>
- AlDeeb, Omar A. A., Hoda Mahgoub, and Nagwa H. Foda. 2013. "Chapter Ten - Sucralose." In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, edited by Harry G. Brittain, 38:423–62. Academic Press.
- Best, J. R., & Miller, P. H. (n.d.). A Developmental Perspective on Executive Function. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2010.01499>.
- Broussard, John I., Laura Acion, Héctor De Jesús-Cortés, Terry Yin, Jeremiah K. Britt, Ramiro Salas, Mauro Costa-Mattioli, et al. 2018. "Repeated Mild Traumatic Brain Injury Produces Neuroinflammation, Anxiety-like Behaviour and Impaired Spatial Memory in Mice." *Brain Injury: [BI]* 32 (1): 113–22. <https://doi.org/10.1080/02699052.2017.1380228>
- Byrne, M. E., Shank, L. M., Altman, D. R., Swanson, T. N., Ramirez, E., Moore, N. A., Rubin, S. G., LeMay-Russell, S., Parker, M. N., Kaufman, R. E., Yang, S. B., Torres, S. L., Brady, S. M., Kelly, N. R., Tanofsky-Kraff, M., & Yanovski, J. A. (2021). Inhibitory control and negative affect in relation to food intake among youth. *Appetite*, 156, 104858. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104858>
- Corvalán, C., Reyes, M., Garmendia, M. L., & Uauy, R. (2013). Structural responses to the obesity and non-communicable diseases epidemic: the Chilean Law of Food Labeling and Advertising. *Obesity Reviews*, 14, 79–87. <https://doi.org/10.1111/obr.12099>
- Caballero, A., Flores-Barrera, E., Cass, D.K. et al. Differential regulation of parvalbumin and calretinin interneurons in the prefrontal cortex during adolescence. *Brain Struct Funct* 219, 395–406 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00429-013-0508-8>

- Cameron KM, Speakman JR. The extent and function of ‘food grinding’ in the laboratory mouse (*Mus musculus*). *Laboratory Animals*. 2010;44(4):298-304.
- Casperson, S. L., Johnson, L., & Roemmich, J. N. (2017). The relative reinforcing value of sweet versus savory snack foods after consumption of sugar- or non-nutritive sweetened beverages. *Appetite*, 112, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2017.01.028>
- Dennis, M. (n.d.). Prefrontal cortex: typical and atypical development. In J. Risberg & J. Grafman (Eds.), *The Frontal Lobes* (pp. 128–162). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545917.007>
- Dong, W., Wang, R., Ma, LN. et al. Influence of age-related learning and memory capacity of mice: different effects of a high and low caloric diet. *Aging Clin Exp Res* 28, 303–311 (2016). <https://doi.org/10.1007/s40520-015-0398-0>
- Durán Agüero, Samuel, Lissé Angarita Dávila, Ma Cristina Escobar Contreras, Diana Rojas Gómez, and Jorge de Assis Costa. 2018. “Noncaloric Sweeteners in Children: A Controversial Theme.” *BioMed Research International* 2018 (January): 4806534. <https://doi.org/10.1155/2018/4806534>
- Erbaş, Oytun, Mümin Alper Erdoğan, Asghar Khalilnezhad, Volkan Solmaz, Fulya Tuzcu Gürkan, Gürkan Yiğittürk, Hüseyin Avni Eroglu, and Dilek Taskiran. 2018. “Evaluation of Long-Term Effects of Artificial Sweeteners on Rat Brain: A Biochemical, Behavioral, and Histological Study.” *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 32 (6): e22053. <https://doi.org/10.1002/jbt.22053>
- Fioravante, D., & Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.02.003>
- Francois, M., Canal Delgado, I., Shargorodsky, N., Leu, C.-S., & Zeltser, L. (2022). Assessing the effects of stress on feeding behaviors in laboratory mice. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.70271>

- Gogtay, N., Nugent, T. F., Herman, D. H., Ordonez, A., Greenstein, D., Hayashi, K. M., Clasen, L., Toga, A. W., Giedd, J. N., Rapoport, J. L., & Thompson, P. M. (2006). Dynamic mapping of normal human hippocampal development. *Hippocampus*, 16(8), 664–672. <https://doi.org/10.1002/hipo.20193>
- Huang, Y., Kakusa, B.W., Feng, A. et al. The insulo-opercular cortex encodes food-specific content under controlled and naturalistic conditions. *Nat Commun* 12, 3609 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23885-4>
- Huang, Y., Kakusa, B.W., Feng, A. et al. The insulo-opercular cortex encodes food-specific content under controlled and naturalistic conditions. *Nat Commun* 12, 3609 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23885-4>
- Hsia, A. Y., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1998). Development of Excitatory Circuitry in the Hippocampus. *Journal of Neurophysiology*, 79(4), 2013–2024. <https://doi.org/10.1152/jn.1998.79.4.2013>
- Joshi, A., Schott, M., la Fleur, S. E., & Barrot, M. (2022). Role of the striatal dopamine, GABA and opioid systems in mediating feeding and fat intake. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 139, 104726. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2022.104726>
- Kesby, J. P., Kim, J. J., Scadeng, M., Woods, G., Kado, D. M., Olefsky, J. M., Jeste, D. v., Achim, C. L., & Semenova, S. (2015). Spatial Cognition in Adult and Aged Mice Exposed to High-Fat Diet. *PLOS ONE*, 10(10), e0140034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140034>
- Kolk, S. M., & Rakic, P. (2022). Development of prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 47(1), 41–57. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01137-9>
- Labouesse, M., Lassalle, O., Richetto, J. et al. Hypervulnerability of the adolescent prefrontal cortex to nutritional stress via reelin deficiency. *Mol Psychiatry* 22, 961–971 (2017). <https://doi.org/10.1038/mp.2016.193>

- Martínez, X., Zapata, Y., Pinto, V., Cornejo, C., Elbers, M., van der Graaf, M., Villarroel, L., Hodgson, M. I., Rigotti, A., & Echeverría, G. (2020). Intake of non-nutritive sweeteners in Chilean children after enforcement of a new food labeling law that regulates added sugar content in processed foods. *Nutrients*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/nu12061594>
- Moreton, E., Baron, P., Tiplady, S., McCall, S., Clifford, B., Langley-Evans, S. C., Fone, K. C. F., & Voigt, J. P. (2019). Impact of early exposure to a cafeteria diet on prefrontal cortex monoamines and novel object recognition in adolescent rats. *Behavioural Brain Research*, 363, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.003>
- Nanou, E., Lee, A., & Catterall, W. A. (2018). Control of Excitation/Inhibition Balance in a Hippocampal Circuit by Calcium Sensor Protein Regulation of Presynaptic Calcium Channels. *The Journal of Neuroscience*, 38(18), 4430. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0022-18.2018>
- Ouyang, Kevin, Sunil Nayak, Young Lee, Erin Kim, Michael Wu, Christopher S. Tallarida, and Scott M. Rawls. 2017. "Behavioral Effects of Splenda, Equal and Sucrose: Clues from Planarians on Sweeteners." *Neuroscience Letters* 636 (January): 213–17. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.017>
- Reichelt, A. C., Cirulli, F., Adriani, W., & Parkes, S. L. (2016). Adolescent Maturation Transitions in the Prefrontal Cortex and Dopamine Signaling as a Risk Factor for the Development of Obesity and High Fat/High Sugar Diet Induced Cognitive Deficits. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00189>
- Reichelt, A. C., Stoeckel, L. E., Reagan, L. P., Winstanley, C. A., & Page, K. A. (2018). Dietary influences on cognition. *Physiology & Behavior*, 192, 118–126. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2018.02.052>
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Developmental Neurobiology*, 71(1), 45–61. <https://doi.org/10.1002/dneu.20853>

- Ouyang, Kevin, Sunil Nayak, Young Lee, Erin Kim, Michael Wu, Christopher S. Tallarida, and Scott M. Rawls. 2017. "Behavioral Effects of Splenda, Equal and Sucrose: Clues from Planarians on Sweeteners." *Neuroscience Letters* 636 (January): 213–17
- Shaw, P., Greenstein, D., Lerch, J. et al. Intellectual ability and cortical development in children and adolescents. *Nature* 440, 676–679 (2006). <https://doi.org/10.1038/nature04513>
- Shum, B., & Georgia, S. (2021). The Effects of Non-Nutritive Sweetener Consumption in the Pediatric Populations: What We Know, What We Don't, and What We Need to Learn. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.625415>
- Somogyi, P., & Klausberger, T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *The Journal of Physiology*, 562(1), 9–26. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.078915>
- Sylvetsky, Allison, Kristina I. Rother, and Rebecca Brown. 2011. "Artificial Sweetener Use among Children: Epidemiology, Recommendations, Metabolic Outcomes, and Future Directions." *Pediatric Clinics of North America* 58 (6): 1467–80, xi. doi: 10.1016/j.pcl.2011.09.007
- Vijayraghavan, S., & Everling, S. (2021). Neuromodulation of Persistent Activity and Working Memory Circuitry in Primate Prefrontal Cortex by Muscarinic Receptors. *Frontiers in Neural Circuits*, 15. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.648624>
- Venegas Hargous, C., Reyes, M., Smith Taillie, L. et al. Consumption of non-nutritive sweeteners by pre-schoolers of the food and environment Chilean cohort (FECHIC) before the implementation of the Chilean food labelling and advertising law. *Nutr J* 19, 69 (2020)
- Whissell, P. D., Cajanding, J. D., Fogel, N., & Kim, J. C. (2015). Comparative density of CCK- and PV-GABA cells within the cortex and hippocampus. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00124>

- WHO. Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Geneva; 1995. [Acceso: 30 de octubre de 2017]
- Xue, M., Atallah, B. & Scanziani, M. Equalizing excitation–inhibition ratios across visual cortical neurons. *Nature* 511, 596–600 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13321>
- Yang, Y., Duan, C., Huang, L., Xia, X., Zhong, Z., Wang, B., Wang, Y., & Ding, W. (2020). Juvenile high–fat diet–induced senescent glial cells in the medial prefrontal cortex drives neuropsychiatric behavioral abnormalities in mice. *Behavioural Brain Research*, 395, 112838. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2020.112838>