



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efectos fisiológicos evidenciados a partir de cambios en hígado y riñón, asociados a la separación materna y al consumo de glutamato monosódico.

David Aguilar León

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología
Bogotá, Colombia
2019

Efectos fisiológicos evidenciados a partir de cambios en hígado y riñón, asociados a la separación materna y al consumo de glutamato monosódico.

David Aguilar León

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Fisiología

Directora:

Zulma Dueñas. Ph.D.

Línea de Investigación:

Estrés crónico

Grupo de Investigación:

Neurobiología y comportamiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología
Bogotá, Colombia

2019

*Es preciso entender la tesis como una ocasión
única para hacer algunos ejercicios que nos
servirán mientras vivamos.*

Umber Eco

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud en primer lugar a mis padres, quienes con su amor y esfuerzo me han ayudado a culminar un sueño más, gracias por inculcar en mi desde muy pequeño el ejemplo de voluntad y valentía.

A mi esposa, por ser esa persona incondicional que siempre ha estado a mi lado, luchando conmigo hombro a hombro para lograr cumplir nuestras metas.

A mi hijo, quien se ha convertido en ese motor que llena de energía y de ganas de seguir adelante.

A mi maestra Zulma Dueñas, quien compartió con nosotros sus valiosos conocimientos que nos hicieron crecer profesionalmente, gracias por su paciencia, dedicación, apoyo incondicional y amistad.

Y finalmente quiero agradecer a todas las personas que a lo largo de este proceso aportaron su granito de arena de manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

Resumen

La mayoría de los mamíferos comparten en las primeras etapas de vida un vínculo dado por la relación madre-hijo. Se ha demostrado que la interrupción de este vínculo dado por separación materna durante la lactancia (SMDL), genera efectos negativos en la vida posterior de las crías a corto, mediano y largo plazo, alterando la respuesta neuroendocrina y comportamental. Por su parte el l-glutamato (GLU) y su sal sódica, glutamato monosódico (GMS) tienen múltiples funciones en procesos vitales: en el sistema nervioso central de los mamíferos actúa como neurotransmisor excitatorio, debido a la interacción con receptores específicos distribuidos en el cerebro, sin embargo, el glutamato monosódico es ampliamente utilizado como aditivo alimentario para potenciar y mejorar la aceptación los alimentos y en modelos animales, su consumo crónico, se ha relacionado con neurotoxicidad, entre otras. En un trabajo previo del grupo se evidenció que ratas machos que habían sido sometidas a SMDL aumentaban el consumo de GMS, así como el peso corporal, si bien, no se alteraba el aprendizaje de una tarea. Teniendo en cuenta que estudios de otros grupos de investigación han mostrado que la ingesta crónica de GMS es tóxico para varios órganos como hígado, cerebro, timo y los riñones, el objetivo de este trabajo fue identificar en ratas Wistar macho si la separación materna y el consumo vía oral de GMS inducen alteraciones fisiológicas evidenciadas por cambios en el calcio intracelular o intersticial (acúmulos) y modificaciones morfológicas en hígado y riñón, comparadas con un grupo control.

Esos cambios se analizaron a partir de cortes y tinciones con hematoxilina/eosina, así como de identificación de acúmulos de calcio, comparados con el respectivo grupo control.

Palabras clave: Glutamato monosódico, separación materna, aditivo alimentario.

Abstract

Most mammals share in the early stages of life a bond given by the mother-child relationship. It has been demonstrated that the interruption of this bond given by maternal separation during lactation (SMDL) generates negative effects in the later life of the offspring in the short, medium and long term, altering the neuroendocrine and behavioral response. On the other hand, L-glutamate (GLU) and its sodium salt, monosodium glutamate (MSG) have multiple functions in vital processes: in the central nervous system of mammals acts as an excitatory neurotransmitter, due to the interaction with specific receptors distributed in the brain, however monosodium glutamate is widely used as a food additive to enhance and improve food acceptance and, in animal models, its chronic consumption has been related to neurotoxicity, among others. In a previous work of the group it was evidenced that male rats that had been submitted to SMDL increased the consumption of MSG, as well as the corporal weight, although, it did not alter the learning of a task. Considering that studies from other research groups have shown that chronic intake of MSG is toxic to several organs such as liver, brain, thymus and kidneys, the aim of this thesis is to identify in male Wistar rats whether maternal separation and oral consumption of MSG induce physiological alterations evidenced by changes in intracellular or interstitial calcium (accumulations) and morphological modifications in liver and kidney, compared to a control group.

These changes are intended to be analyzed from cuts and stains with hematoxylin/eosin, as well as the identification of calcium accumulations, compared with the respective control group.

Keywords: Monosodium glutamate, maternal separation, food additive.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	V
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	X
Lista de abreviaturas.....	XI
Introducción.....	1
1. Marco teórico.....	3
1.1 El glutamato monosódico (GMS).....	3
1.2 Los receptores glutamatérgicos.....	4
1.3 Separación materna.....	4
1.4 Separación materna y glutamato monosódico.....	5
1.5 Morfología hepática.....	6
1.6 Morfología renal.....	10
2. Antecedentes.....	12
3. Planteamiento del problema.....	16
4. Justificación.....	17
5. Objetivos.....	18
5.1 Objetivos específicos.....	18
6. Materiales y métodos.....	19

6.1	Crioprotección y corte.....	19
6.2	Tinciones.....	19
6.2.2	Tinción de hematoxilina-eosina.....	19
6.2.2.2	Tinción de Von Kossa.....	21
6.3	Análisis estadístico.....	22
6.4	Consideraciones éticas.....	23
7.	Resultados.....	24
7.1	Evaluación macroscópica del hígado.....	24
7.2	Evaluación microscópica del hígado.....	25
7.3	Numero de venas centrolobulillares.....	26
7.4	Evaluación Macroscópica del riñón.....	26
7.5	Evaluación microscópica del riñón.....	28
7.6	Numero de glomérulos.....	30
8.	Discusión.....	31
9.	Conclusiones.....	34
10.	Propuestas a futuro.....	34
11.	Bibliografía.....	35

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1: Cara visceral del hígado.....	7
Figura 2: Cara parietal del hígado.....	7
Figura 3: Vista de la localización anatómica del riñón.....	11
Figura 4: Tinción hematoxilina eosina hígado de rata.....	20
Figura 5: Tinción hematoxilina eosina riñón de rata.....	21
Figura 6: Tinción de Von Kossa para calcio.....	22
Figura 7: Vista macroscópica del hígado de los diferentes grupos experimentales.....	24
Figura 8: Hígado con tinción de hematoxilina eosina.....	25
Figura 9: numero de venas centrolobulillares	26
Figura 10: Vista macroscópica de los riñones de los diferentes grupos experimentales.....	27
Figura 11: Riñón con tinción de Von Kossa.....	28
Figura 12: Riñón 100µm grupo control con tención de hematoxilina eosina.....	29
Figura 13: Riñón con tención de hematoxilina eosina.....	32
Figura 14: Numero de glomérulos.....	33

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Parámetros morfométricos y fisiológicos y las estructuras asociadas del hígado de rata.....	10
---	----

Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Termino
GLU	L-glutamato
GMS	Glutamato monosódico
SMDL	Separación materna durante la lactancia
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico.
BHE	Barrera hematoencefalica
CAT	Capacidades antioxidantes
DMU	Dosis máxima de uso
H&E	Hematoxilina eosina
KA	Receptor kainato
NMDA	N-metil-D-aspartato
ROS	Especies reactivas de oxigeno
SNC	Sistema nervioso central

Introducción

El L-glutamato (GLU) y su sal sódica, glutamato monosódico (GMS) tienen múltiples funciones en procesos vitales; en el sistema nervioso central de los mamíferos actúa como neurotransmisor excitatorio, debido a la interacción con receptores específicos distribuidos en el cerebro. Además, al GLU se le ha relacionado con la potenciación a corto y largo plazo de la memoria y el aprendizaje. Igualmente estimula la maduración intestinal y aporta energía a las células epiteliales intestinales. Por otro lado, el GMS se usa para el consumo como aditivo alimentario aumentando la sensación de gusto umami, palabra japonesa que significa sabroso (Amaya-Farfán., 2013).

Se estima una ingesta diaria de 0,3 a 1,0 g en los países industrializados europeos (Beyreuther et al., 2007). Aunque los organismos reguladores de la inocuidad de los alimentos consideran que el consumo de GMS no causa daño, varios estudios en animales han puesto en duda la seguridad de los efectos que pueda tener su consumo, demostrando que el GMS es tóxico para varios órganos como hígado, cerebro, timo y riñones especialmente después de una exposición crónica (Pavlovic. 2009). Los datos publicados indican que la fibrosis renal está asociada con el consumo crónico de GMS y que el estrés oxidativo es la principal causa de lesión renal y cerebral (Sharma.2014). Se metaboliza en el hígado y se elimina a través del riñón (Adrienne. 1999).

Por lo tanto, valdría la pena estudiar los efectos del glutamato monosódico en ambos. De otra parte, el cuidado materno es crucial para un desarrollo adecuado de las crías y este tipo de comportamiento se puede clasificar como cualquier acción que tome la madre para nutrir, calmar y proteger a las crías (Kristal, 2009). Es por esto que el período postnatal se considera como una "ventana de vulnerabilidad", en la que la exposición a un factor de estrés crónico en una etapa temprana de la vida puede promover alteraciones cognitivas, neurobiológicas y de comportamiento significativas (Adriani y Laviola, 2004).

Los estudios han demostrado que los roedores expuestos a períodos diarios de separación en el comienzo de la vida presentaron mayor ansiedad y comportamiento depresivo (Carstens y Stein, 2004). Investigaciones exhaustivas, primero en ratas (Levine, 1957) y luego en ratones (Denenberg y Karas, 1959) han demostrado que los períodos cortos (15 min) de separación materna de las crías durante la etapa de lactancia dan lugar en la descendencia a que, en la etapa adulta, muestren una disminución de la reactividad suprarrenal en respuesta a un factor estresante. Así mismo, períodos más largos de separación madre-cría (entre 3 y 6 horas) inducen en el adulto, una respuesta exagerada del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal a un factor estresante (Meaney, 2001).

Con base en la literatura y en los antecedentes del grupo, que señalan la SMDL como un factor de riesgo para el aumento en el consumo de GMS, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la separación materna y el consumo de GMS a una dosis de 4 mg MSG por gramo de peso corporal, inducen cambios fisiológicos evidenciados a partir de alteraciones en número de células y acúmulos de calcio en hígado y riñón de ratas macho, comparados con un grupo control.

1. Marco teórico

1.1 El glutamato monosódico (GMS)

El GMS: (C₅H₈NO₄Na), es la sal sódica del glutamato, aminoácido no esencial que contiene el 78% de ácido glutámico y el 22 % de sodio y agua. (Alalwani, 2014). El GMS es ampliamente utilizado en todo el mundo como un potenciador del sabor de los alimentos (Contini et al, 2017). El glutamato es uno de los aminoácidos más comunes que se encuentran en la naturaleza y es el componente principal de muchas proteínas y péptidos de la mayoría de tejidos. El glutamato también se produce en el cuerpo y juega un papel esencial en el metabolismo humano (Alalwani, 2014). Una vez ingerido, es casi completamente metabolizado en el intestino y la mayoría del esqueleto de carbono se metaboliza en CO₂ o se utiliza para la síntesis intestinal de alanina, lactato, glutatión y arginina. La mayor parte de su nitrógeno se incorpora a la formación de otros aminoácidos como glutamina, prolina, aminoácidos de cadena ramificada y ciclo de la urea (Nakamura, 2013), dejando poco glutamato para ser absorbido en la vena porta. Sin embargo, la cantidad total del glutamato absorbido aumenta significativamente a medida que aumenta el nivel de glutamato ingerido en la dieta (Onaolapo, 2016).

El Glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central (SNC) de los mamíferos y ejerce diversas funciones fisiológicas, así como también, está involucrado en varias patologías.

1.2 Los receptores glutamatérgicos

Se han descrito dos grupos diferentes de receptores, para el glutamato en el SNC, ionotrópicos y metabotrópicos, los receptores ionotrópicos incluyen al N-metil-D-aspartato (NMDA), el receptor kainato (KA), y el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Hinoi *et al* 2004, Cotman, y Kahle 2000).

El receptor NMDA Se caracteriza por tener múltiples sitios de unión. Además del sitio para glutamato, posee sitios de unión a L-glicina, D-serina, Zn²⁺, poliaminas y un sitio de modulación redox. Este receptor es permeable a iones Ca²⁺ y Na⁺ pero presenta un bloqueo de Mg²⁺ sensible a voltaje. Asimismo, los receptores NMDA tienen un papel fundamental en la plasticidad sináptica (Ávila y Pérez 2016).

De manera general, los receptores AMPA y Kainato participan en la generación de corrientes postsinápticas excitadoras que son las responsables de iniciar los potenciales de acción. (Coyle 2006). Los receptores metabotrópicos están presentes en la membrana presináptica y postsináptica, de las neuronas glutamatérgicas, facilitando así la liberación de glutamato e incrementando la excitabilidad neuronal, respectivamente (Gregory. 2013); estos no forman canales iónicos y responden al estímulo de segundos mensajeros intracelulares, se asocian a proteínas G que activa a la fosfolipasa C, que produce la hidrólisis del fosfatidilinositol bifosfato y moviliza los depósitos intracelulares de Ca²⁺. (Schwendt y Jesova., 2011).

En general, la neurotoxicidad es inducida por la activación estos receptores glutamatérgicos y se han asociado con diversas enfermedades neurodegenerativas (Gill *et al* 2000).

1.3 Separación materna

Investigadores de diversos campos sugieren que la vida postnatal temprana es un período durante el cual todos los mamíferos dependen de una relación cercana con su madre. El apego madre-infante va más allá de la atención a las necesidades nutricionales, ya que comprende otras interacciones entre madre y cría incluyendo el comportamiento materno. (Gutman y Nemeroff, 2002). El cuidado materno es crucial para un desarrollo adecuado de las crías y este tipo de comportamiento se puede clasificar como cualquier acción que tome

la madre para nutrir, calmar y proteger a las crías (Rita et al 2011). El período postnatal se considera como una "ventana de vulnerabilidad", en la que la exposición a un factor de estrés crónico en una etapa temprana de la vida puede promover alteraciones cognitivas, neurobiológicas y de comportamiento significativas (Adriani y Laviola, 2004). Las especies de primates y roedores se han utilizado ampliamente como modelos para investigar las consecuencias de las interrupciones en la relación de descendencia materna, ya que permiten el análisis de los resultados de desarrollo de la descendencia en múltiples niveles de organización biológica al tiempo que permiten un control experimental sustancial. El más común de estos modelos implica la separación de la cría de la descendencia (es decir, separación materna).

Como ya se mencionó, varios estudios han demostrado que los roedores expuestos a períodos diarios de separación en el comienzo de la vida presentaron mayor ansiedad y comportamiento depresivo (Carstens y Stein, 2004), y que dependiendo del periodo que dure la separación, en etapas adultas se evidencia que, ante un factor estresante, se puede afectar parte del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal o la respuesta generalizada (Denenberg et al, 1959; Meaney, 2001).

Existe evidencia de que las madres expuestas a situaciones estresantes demuestran una disminución en la frecuencia del comportamiento materno en comparación con los animales no estresados (Autumn et al. 2008). Sin embargo, hay estudios que apuntan a un aumento en los comportamientos maternos, como lamer, amamantar o quedarse con los cachorros, después de exponer a la separación (Anier_K et al. 2014). Este aumento de la interacción entre la madre y las crías podría ser un intento de hipercompensar el cuidado materno, influenciado por períodos estresantes de separación y por la lejanía de las crías (George y Bordner, 2010).

1.4 Separación materna y glutamato monosódico.

Hasta la fecha no se ha encontrado bibliografía sobre la interacción del consumo de GSM y la SMDL, sin embargo, estudios experimentales en roedores han demostrado que la presencia de la madre durante la lactancia es crucial para prevenir la incidencia de efectos negativos e irreversibles en el desarrollo neurológico y cognitivo de la descendencia. Ratas adultas sometidas al estrés de la separación materna, presentan déficits de aprendizaje,

mayor vulnerabilidad a la depresión, aumento de la ansiedad y están en alto riesgo de desarrollar trastornos de alimentación en la edad adulta. (Hancock.2009)

También ha sido documentado que los animales que experimentaron episodios de separación materna durante el período neonatal muestran una clara preferencia por ingerir alimentos sabrosos (altamente palatables). Aún se desconoce si estos efectos son consecuencia de la disminución del contacto somato sensorial, reducción del suministro de nutrientes, del estrés o resultado de la combinación de estos factores. (Silveira et al 2004).

Evidencias encontradas por el grupo de neurobiología y comportamiento, de la Universidad Nacional de Colombia, sugieren que el estrés crónico generado por la separación materna en ratas Wistar estaría asociado a una tendencia de consumo mayor a sustancias palatables, para este caso edulcorantes, con alteraciones en la modulación de la ingesta, y demostrando además déficits cognitivos en la prueba de campo abierto. (*Aya-Ramos L, et. al., 2017*).

1.5 Morfología hepática

El hígado de rata es la estructura más craneal en el lado derecho de la cavidad abdominal, en la porción intratorácica, que entra en contacto íntimo con el diafragma. El hígado de la rata es un órgano multilobulado, cuya masa representa aproximadamente el 6% del peso corporal total. (Vdoviaková, Petrovová, & Krešáková, 2016)

El hígado se ubica sobre la cara caudal del diafragma extendiéndose a ambos lados del plano mediano desde el arco costal derecho hasta el izquierdo. Está dividido en los lóbulos derechos (lateral y medial), izquierdos (lateral y medial), cuadrado (muy pequeño) y caudado el cual presenta los procesos caudado y papilar (subdividido en parte dorsal y ventral). El proceso caudado toma contacto con el riñón derecho y el proceso papilar esta sobre la curvatura menor del estómago. No presentaba vesícula biliar (Möller & Vazquez, 2011).

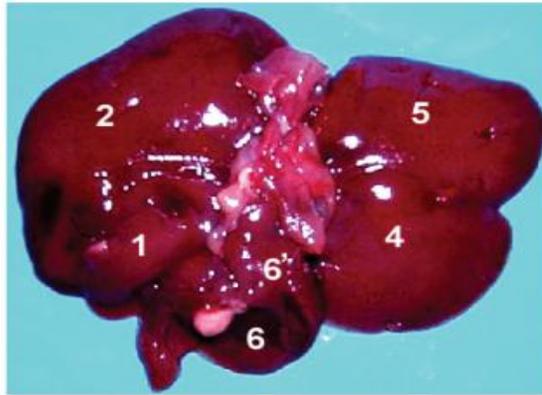


Fig. 1. Cara visceral del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 6. Proceso caudado del lóbulo caudado. Tomada de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022011000100012

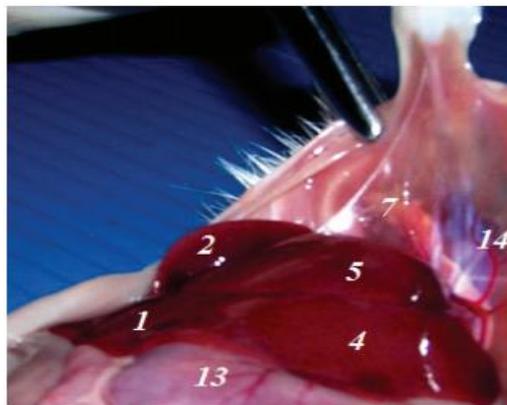


Fig. 2. Cara parietal del hígado. 1. Lóbulo lateral derecho; 2. Lóbulo medial derecho; 4. Lóbulo lateral izquierdo; 5. Lóbulo medial izquierdo; 13. Estómago; 14. Diafragma. Tomada de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022011000100012

El ligamento falciforme del hígado es un pliegue peritoneal delgado unido a la superficie convexa del diafragma y la superficie caudal de los músculos abdominales derechos. Este ligamento se origina en el peritoneo en la superficie convexa del hígado y se dirige hacia el ligamento coronario, que se inserta alrededor de la salida de la vena cava caudal. El

ligamento coronario del hígado se dividió en 2 partes: derecha e izquierda. Estos ligamentos sujetan el hígado al diafragma en una línea desde el ligamento triangular derecho del hígado a lo largo del lado derecho de la vena cava caudal y alrededor del margen ventral de la abertura caudal al ligamento triangular izquierdo. El ligamento triangular derecho une el lóbulo derecho con la pared abdominal dorsal. El ligamento triangular izquierdo adhiere el ángulo caudolateral del lóbulo izquierdo a la misma parte de la pared abdominal. El ligamento redondo es un engrosamiento insignificante del borde libre caudal del ligamento falciforme. El ligamento redondo del hígado es un vestigio de la vena umbilical. El omento mayor continúa hasta la curvatura mayor del estómago como el ligamento gastrosplénico. Los ligamentos hepatogástrica y hepatoduodenal son parte del omento menor y se extienden desde el área de la porta a la curvatura menor del estómago y la parte proximal del duodeno. (Vdoviaková, Petrovová, & Krešáková, 2016).

Las ratas de laboratorio no tienen vesícula biliar, solo tienen un conducto hepático común, que está formado por el conducto hepático derecho e izquierdo, localizado superficialmente al área portal y las ramas arteriales, ya que este es un sistema biliar extrahepático. Cada lóbulo del hígado tiene sus propios conductos biliares, que se presentan como vías biliares intrahepáticas. El conducto hepático derecho está formado por la confluencia del conducto del caudado y el lóbulo derecho. El conducto hepático izquierdo drena la bilis desde el lóbulo izquierdo y el cuadrado del hígado. En algunos casos, el lóbulo cuadrado se drena por conductos del lóbulo lateral derecho o izquierdo. Todos los conductos hepáticos se fusionan y forman un conducto común hepático, que conduce al duodeno. El conducto hepático común está situado ventralmente y hacia la derecha de la vena porta (Vdoviaková, Petrovová, & Krešáková, 2016).

El hígado tiene un suministro de sangre dual típico, que es la característica común de la vasculatura hepática y determina claramente la regulación y distribución del flujo sanguíneo. La arteria hepática es el vaso de resistencia, pero las venas extrahepáticas y hepáticas son vasos de capacidad. El flujo de sangre arterial hepática lleva sangre bien oxigenada al hígado. Las venas portales están parcialmente desoxigenadas, pero la sangre esplácnica rica en nutrientes fluye desde el sistema capilar de los órganos no pareados del sistema digestivo.

En las ratas la sangre oxigenada es suministrada por la arteria hepática, que es una rama de la arteria celíaca. La Arteria coeliaca es la primera rama no apareada y visceral que

abandona la pared ventral de la aorta abdominal, justo debajo de los pilares del diafragma. Tiene un tronco corto y desperejado, que surge al nivel de la tercera vértebra lumbar. Esta arteria suministra sangre al estómago, el bazo, el hígado, el páncreas y la parte craneal del duodeno, y se ramifica hacia la arteria esplénica, la arteria gástrica izquierda y la arteria hepática.

El sistema venoso está formada por la vena porta y sus afluentes. La vena porta es un vaso aferente sin válvulas que drena el flujo sanguíneo esplácnico desde el sistema capilar de los órganos no pareados de la cavidad abdominal al hígado. La parte extrahepática de la vena porta se encuentra en la parte posterior y lateral de la arteria hepática y el conducto hepático común (Vdoviaková, Petrovová, & Krešáková, 2016).

Histológicamente la estructura del hígado es relativamente sencilla puesto que es la repetición de una estructura básica denominada lobulillo hepático. Los lobulillos suelen estar separados entre sí por tejido conectivo. Tienen forma de prisma poligonal que mide de 1 a 2 mm de diámetro. En secciones transversales tiene una forma aproximada de hexágono con una vena central o centrolobulillar de gran diámetro. En los vértices del hexágono, entre lobulillos contiguos, se encuentran los espacios portales formados por tejido conectivo y por las denominadas tríadas portales, compuestas por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conductillo biliar. También poseen vasos linfáticos y fibras nerviosas.

Los hepatocitos suponen más del 75 % del hígado y se organizan en láminas o trabéculas con perforaciones, frecuentemente de una célula de espesor, que se fusionan entre sí para formar un entramado complejo de forma parecida a una esponja. Entre las láminas circulan los capilares sinusoidales que poseen un pequeño calibre, y entre el endotelio de éstos y los hepatocitos existen unos espacios acelulares denominados espacios perisinuosidales o espacios de Disse (Cotran, 2019).

Tabla1. Parámetros morfométricos y fisiológicos y las estructuras asociadas del hígado de rata.

Peso del hígado.	15.5 g
Volumen de hígado.	22.6 ml
Diámetro transversal del hígado.	8.5-9.0 cm
Diámetro dorsoventral del hígado.	4.8-5.2 cm
Diámetro craneocaudal del hígado.	3.2-3.5 cm
Flujo sanguíneo del hígado.	13.8 ml/min
Flujo sanguíneo a través de la arteria hepática.	2.0 ml/min
Flujo sanguíneo a través de la vena porta.	9.8 ml/min
Flujo biliar del hígado.	22.5 ml/día

Tomada de: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022011000100012

1.6 Morfología renal

Los riñones de las ratas poseen una forma de frijol, superficie lisa de color marrón oscuro con bordes convexos y cóncavos. El riñón derecho está ubicado más cranealmente que el riñón izquierdo. Anatómicamente, los riñones presentan caras ventrales y dorsales; bordes mediales y laterales; y polos cefálico y caudal. Ambos riñones por su cara dorsal, a través de la cápsula adiposa, se relacionan con la pared dorsal del abdomen. En la parte media de su borde medial, se encuentra el hilio renal con sus elementos: pelvis, vena y arteria renales. En la parte cefálica del borde medial se observa la impresión de la glándula suprarrenal. Desde el borde medial y hacia dorsal los riñones se relacionan con el músculo psoas mayor (Zapata & Vasquez , 2009).

Cada riñón está rodeado por una cápsula resistente de tejido fibroso blanquecino que se interrumpe a nivel del hilio renal, una concavidad situada en su borde interno, por la que penetran en el riñón el uréter y los vasos sanguíneos.

Aunque hay un gran número de variaciones individuales en la vascularización renal, cada riñón está irrigado por una arteria renal que se origina de la aorta y que, poco antes de llegar al hilio, se bifurca en sus ramas anterior y posterior. Las venas renales se sitúan por delante de las arterias y desembocan en la vena cava inferior (Rodríguez , 2013)

Microscópicamente la nefrona es la unidad estructural y funcional del riñón y comprende un elemento filtrante (corpúsculo renal de Malpighi) y un túbulo renal. El corpúsculo renal de Malpighi está compuesto por el glomérulo capilar y la cápsula de Bowman que lo recubre. Existe un espacio dentro de la cápsula, espacio de Bowman, hacia donde pasa el líquido filtrado procedente del glomérulo. La barrera de filtración del corpúsculo renal o membrana glomerular consta de tres capas: el endotelio de los capilares glomerulares, la membrana basal y una capa de células epiteliales especializadas con fenestraciones. Las células mesangiales se sitúan en la parte central del glomérulo entre las asas capilares, a veces penetrando en ellas de forma que conectan íntimamente con la célula endotelial.

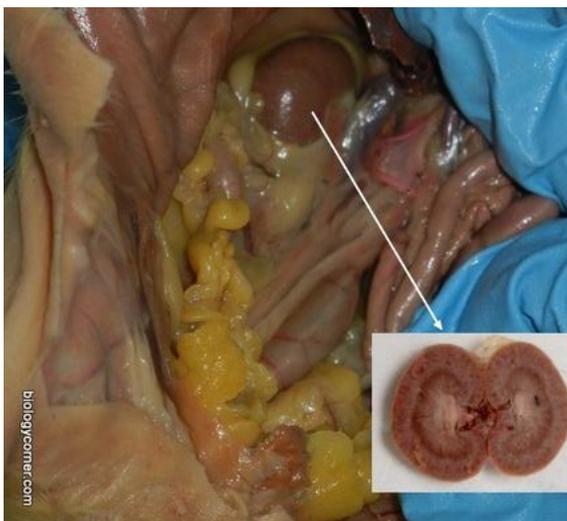


Fig. 3. Vista de la localización anatómica del riñón. Tomado de https://www.biologycorner.com/worksheets/rat_dissection07.html

El túbulo renal comienza con el túbulo proximal que inicialmente forma varias espiras (porción convoluta del túbulo proximal o túbulo contorneado proximal), seguida de una porción recta. El siguiente segmento es la rama delgada descendente del asa de Henle, que posee una morfología en horquilla, comenzando en su final con un ascenso

paralelo a la rama descendente. En las asas largas, la primera porción de la zona ascendente permanece delgada, denominándose rama delgada ascendente del asa de Henle. Más allá de esta región, las asas largas se ensanchan en la rama ascendente gruesa del asa de Henle, en cuya parte final existe una zona engrosada denominada mácula densa, en la que el túbulo transcurre entre las arteriolas que irrigan su propio glomérulo. Tras ella comienza la parte convoluta del túbulo distal o túbulo contorneado distal que, a través de los conductos conectores, llega a los tubos colectores corticales que entran en la médula, convirtiéndose en tubos colectores medulares externos e internos. Estos últimos se unen a otros y todos los de una pirámide renal convergen para formar una estructura que desemboca en la papila renal en uno de los cálices menores. (Rodríguez , 2013).

El aparato yuxttaglomerular está situado entre la primera porción del túbulo contorneado distal y las arteriolas aferente y eferente, pertenecientes al corpúsculo renal de su propia nefrona. Lo componen tres tipos de células: las células yuxttaglomerulares, que son células mioepiteliales que rodean el final de la arteriola aferente, las células de la mácula densa y las células de Goormaghtigh o del lacis, que son células mesangiales extraglomerulares que responden a múltiples mediadores y controlan la superficie de filtrado.

El corpúsculo renal y los túbulos contorneados se encuentran en la corteza renal; en cambio, el asa de Henle y la mayor parte de los túbulos colectores se sitúan en la médula renal. (Rodríguez , 2013).

2. Antecedentes

El uso creciente de aditivos en los alimentos ha despertado interés en la comunidad académica. A continuación, se resumen los principales estudios que se consideran más relevantes para este proyecto:

Ortiz et al (2006) demostró que altas concentraciones de GMS en ratas inducen efectos neurotóxicos como necrosis neuronal, estrés oxidativo en el hipocampo, la corteza cerebral, médula espinal, daños en los órganos circunventriculares y la retina especialmente durante el período neonatal, cuando la barrera hematoencefálica (BHE) es inmadura, igualmente se han demostrado daños en hígado y riñón.

Estudios realizados en los años 70, demostraron que la administración de altas concentraciones de glutamato, producía degeneración y muerte neuronal en ciertas regiones cerebrales y que estos efectos están relacionados con la excesiva excitación neuronal a través de la activación de sus receptores ionotrópicos específicos (Hinoi *et al* 2004).

Asimismo, la excitotoxicidad estimulada por el consumo de glutamato en forma de sales monosódicas se da cuando se consume en altas concentraciones (Choudhary *et al* 1996). También se ha demostrado que la administración de glutamato monosódico (GMS) a animales en desarrollo, induce destrucción en ciertas regiones del cerebro que carecen de una barrera hematoencefálica, como el núcleo arcuatus del hipotálamo que está involucrado en la regulación de las funciones neuroendocrinas (Olney 1990).

Varios estudios en animales han demostrado que el GMS es tóxico para varios órganos como el hígado, cerebro, timo y los riñones. Los datos publicados indican que la fibrosis renal está asociada con el consumo crónico de GMS y que el estrés oxidativo es la principal causa de lesión renal (Sharma 2014).

El estrés oxidativo es causado por la producción excesiva o la disminución de la eliminación de los radicales libres en las células, la mayoría de los cuales son radicales de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bashan 2009). Por lo tanto, el metabolismo renal excesivo del glutamato, como la ingesta crónica de GMS, puede ser una fuente de ROS. Se ha demostrado una disminución de los niveles de las principales enzimas antioxidantes y un aumento de la peroxidación de lípidos en los riñones de las ratas expuestas al GMS crónico (Thomas 2009). Además, se ha demostrado que altas dosis de glutamato inducen una toxicidad significativa en las células de cultivo renal (Leung. 2008).

Eman *et al* (2018) evaluó el efecto del GMS en el riñón de ratas y reportó desorganización en la estructura renal; atrofia glomerular parcial y completa con congestión intertubular marcada, vacuolizaciones, dilatación del espacio de Bowman, túbulos renales con marcada degeneración epitelial, citoplasma vacuolado, lumen dilatado y también observó infiltración celular inflamatoria.

Onaolapo y col. usaron ratones adultos suplementadas con GMS a 10 mg / kg y reportaron una mayor concentración plasmática de hormonas asociadas al estrés oxidativo y lesión neuronal.

Ememali et al. (2015) sugirieron alteraciones en la actividad cerebral, interrupción de las funciones renales y otros parámetros hematológicas después de la administración oral de 0.5-1.5 g / kg GMS a ratas macho durante 4 semanas utilizando solo agua destilada como control.

Boonnate et al. (2005) proporcionó GMS 2 mg / g de peso corporal a ratas adultas durante 1- 9 meses, reportando un efecto negativo sobre el páncreas.

Ochiogu et al (2015). Suministro GMS por vía oral a dosis de 0.25-1.00 g / kg durante 6 semanas y reportó reducciones en la liberación de gonadotropinas, hormona luteinizante, testosterona, colesterol total y reservas de esperma en la cola del epidídimo.

Sharma et al. (2013) alimentó ratas adultas con GMS 2 mg / g de peso corporal en agua potable y asoció la ingesta de GMS con lesión renal.

Okon et al. (2013) Administró GMS por vía oral a 4-8 mg / kg de peso corporal a ratas albinas maduras durante 4 semanas utilizando solución salina normal como control y concluyó un aumento significativo en el peso bruto de corazón.

Eweka et al (2011). Administraron por vía oral 0.04mg/kg y 0.08mg/kg de GMS a 24 ratas macho adultas Wistar y Los hallazgos histológicos mostraron cambios como la dilatación de la vena central, que contenía glóbulos rojos lisados, distorsiones cito-arquitectónicas de los hepatocitos, cambios atróficos y degenerativos en el hígado de los animales que recibieron dietas impregnadas con GMS. Además, los parámetros bioquímicos fueron significativamente más altos en los grupos con tratamiento que en los grupos de control ($P < 0,0001$). Estos cambios fueron más graves en el grupo que tenía 0.08 mg / kg de GMS mezclado en su alimentación. Concluyeron que el glutamato monosódico inducía daño hepático.

Igwebuike et al (2011). Administraron Solución de glutamato monosódico durante 6 semanas a ratas albinas macho y reportaron una interrupción del eje regulador hipotalámico-pituitario-testículo, así como una disminución de la testosterona sérica.

Baad-Hansen et al (2010). Reportaron que el consumo de glutamato monosódico (75-150 mg / kg) asociado a la ingesta de alimentos generó dolor de cabeza con sensibilidad muscular pericraneal y elevación de presión sanguínea sistólica en humanos.

Farombi y Onyema. (2006) administraron por vía intraperitoneal GMS a 4.0 mg / g a ratas adultas y reportaron el daño oxidativo en el hígado, riñón y cerebro.

En los seres humanos el hígado es el órgano glandular más grande del cuerpo, con un peso de entre 1,4 y 1,6 kg. Se encuentra debajo del diafragma en la región torácica del abdomen. Desempeña un papel importante en el metabolismo y tiene una serie de funciones en el cuerpo, incluyendo el almacenamiento de glucógeno, la síntesis de proteínas plasmáticas, la producción de bilis, un compuesto alcalino que ayuda en la digestión y la desintoxicación de la mayoría de las sustancias (Gartner et al 2000). Dado que el hígado está involucrado en el desempeño de estas funciones variadas, puede ser susceptible a lesiones resultantes de sustancias tóxicas.

Con base en los anteriores antecedentes se planteó un primer estudio, que es la tesis de Maestría titulada “Efectos de la separación materna sobre el consumo de glutamato monosódico y la memoria espacial en ratas macho”, aprobado por el comité de ética el 28 de Julio del año 2016, acta 013-169-16 y que tenía como objetivo determinar si la separación materna durante la lactancia (SMDL) influía en el consumo de glutamato monosódico (GMS) y si estos dos factores producían cambios en el aprendizaje, la memoria espacial y el peso de ratas macho separadas; comparadas con su grupo control. Los resultados de este estudio demostraron que los animales sometidos al paradigma de SMDL, se genera aumento en el consumo de GMS, posiblemente relacionado con un aumento de peso hallado en el mismo grupo experimental ($p < 0.05$). Adicionalmente en las pruebas aprendizaje y recobro, no se encontraron diferencias significativas para los individuos que se expusieron a SMDL, tendiendo un peor desempeño en las pruebas de memoria espacial cuando se compararon con sus respectivos controles. Los resultados mostraron que el estrés temprano podría estar asociado con cambios importantes en el consumo de alimentos. De todos los sujetos de ese estudio, se conservaron varios órganos que incluyen el hígado y el riñón, por eso este trabajo pretende responder otras preguntas que surgieron del trabajo original.

Debido al estímulo hedónico que despierta el consumo de glutamato Monosódico (GMS), es común su adición en la dieta como resaltador del sabor, lo cual ha generado controversia en la comunidad científica, por lo tanto se plantea, a partir de los órganos conservados, la continuidad del trabajo para analizar los efecto del GMS en órganos como hígado y riñón de ratas Wistar.

3. Planteamiento del problema

El uso de aditivos sin control y sin cumplir los niveles de tolerancia permitidos por la normatividad pueden llegar a ser perjudiciales para la salud del ser humano, por lo que se hace necesario controlar la dosis máxima de uso (DMU) que es “la concentración más alta de éste respecto de la cual la Comisión del Codex Alimentarius ha determinado que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y ha acordado que es inocua. En las comidas rápidas es común el uso de altas cantidades de GMS el cual es utilizado para hacerlos más agradables al paladar.

Un gran porcentaje de la población colombiana consume comidas rápidas, según la Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (ENSIN 2010) indica que el 39.5% de los colombianos consume usualmente alimentos manipulados en la calle y 25.3% realiza esta práctica semanalmente.

En Colombia existe una resolución específica para aditivos: la 2606 del 2009, en la que no aparece el glutamato monosódico con una regulación específica, por lo que el GMS es hoy de uso libre para los fabricantes de alimentos.

A pesar de la evidencia científica, aún no hay un consenso sobre el carácter perjudicial o no del glutamato y la Corte Constitucional, en su sentencia C-293 del 2002, consagra el principio de precaución ante la incertidumbre científica.

Por otra parte, evidencias encontradas por el grupo de neurobiología y comportamiento, de la Universidad Nacional de Colombia, sugieren que el estrés crónico generado por la separación materna en ratas Wistar estaría asociado a una tendencia de consumo mayor a sustancias muy palatables, para este caso edulcorantes, con alteraciones en la modulación de la ingesta y demostrando además déficits cognitivos en la prueba de campo abierto. (Aya-Ramos L, et al., 2017)

De acuerdo con lo expuesto anteriormente el objetivo de este proyecto fue determinar en ratas Wistar macho si la separación materna y el consumo vía oral de glutamato monosódico (GMS) inducen alteraciones fisiológicas evidenciadas por cambios en el calcio

intracelular o intersticial (acúmulos) y modificaciones morfológicas en hígado y riñón comparadas con un grupo control.

4. Justificación

Se han llevado a cabo numerosos trabajos en modelos animales del efecto del GMS sobre el SNC, así como estudios que relacionan los efectos del estrés crónico inducido por separación materna durante la lactancia. Sin embargo, trabajos que asocien estas dos variables, solo hay uno y corresponde a la tesis que antecede este proyecto, por eso se considera relevante analizar los efectos del consumo vía oral de GMS en órganos como hígado y riñón, siendo de gran importancia ya que se ha demostrado la presencia de receptores glutamatérgicos fuera del SNC. Lo anterior, aunado a que las dos condiciones: separación materna y consumo de GMS, son cada vez más frecuentes en nuestra sociedad, permitiría analizar en el modelo animal, las consecuencias de estas dos intervenciones y de acuerdo con los resultados, se podrían proponer estudios traslacionales y por qué no, mejoramiento de las políticas públicas en pro del bienestar de nuestros niños. En este sentido, el objetivo de este trabajo es estudiar si la separación materna y el consumo de GMS a una dosis de 4 mg MSG por gramo de peso corporal, inducen cambios morfológicos y acúmulos de calcio en hígado y riñón de ratas macho, comparados con un grupo control.

5. Objetivos

Analizar en ratas Wistar macho si la separación materna y el consumo vía oral de glutamato monosódico (GMS) inducen alteraciones fisiológicas evidenciadas por cambios en el calcio intracelular o intersticial (acúmulos) y modificaciones morfológicas en hígado y riñón comparadas con un grupo control.

5.1 Objetivos específicos

1. Identificar si la separación materna y el consumo vía oral de glutamato monosódico (GMS) inducen alteraciones en los niveles de calcio intracelular o intersticial en células de hígado y riñón de ratas.
2. Determinar si la separación materna y el consumo vía oral de glutamato monosódico (GMS) inducen cambios morfológicos en hígado y riñón, comparando con un grupo control.

6. Materiales y métodos

Es importante anotar que tanto la separación materna, como el consumo de glutamato y la perfusión de los animales, ya se realizaron, por eso solamente se describe la metodología correspondiente a este proyecto.

Se contó el número de células en corteza y médula y se analizaron los cambios en número y en estructuras como acúmulos de calcio intracelular que se determinarían con la Tinción De Von Kossa.

6.1 Crioprotección y corte

Tanto los riñones como los hígados estaban almacenados en solución fijadora: Paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos PBS. Para poder cortarlos en criostato, se procedió a crioprotegerlos en solución de sacarosa al 30% en PBS, durante 4 días. Posteriormente los órganos se coartaron a un máximo 20 micras y se mantuvieron en solución anticongelante hasta el momento de la tinción.

6.2 Tinciones

Para comparación morfológica, los cortes histológicos, fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) y para visualizar acúmulos de calcio se utilizó la coloración de VON KOSSA.

6.2.2 Tinción de hematoxilina-eosina

Método de tinción de rutina en histología y citología. Es una tinción basada en dos etapas, la primera una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina) y la segunda, una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo forma un colorante activo, la hemateina,

formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul/negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una gradación entre el rosa y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o lo hace muy débilmente). Se consigue así un buen contraste de las preparaciones microscópicas facilitando su observación.

Esta técnica de tinción comprende el siguiente proceso:

- Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
- Lavado con agua corriente.
- Diferenciación con alcohol-ácido.
- Lavado con agua corriente.
- Inmersión en agua amoniacal.
- Lavado con agua corriente (10-20 minutos).
- Tinción con eosina a temperatura ambiente.
- Inmersión en alcohol al 95 % para eliminar el exceso de eosina.
- Deshidratación y montaje.

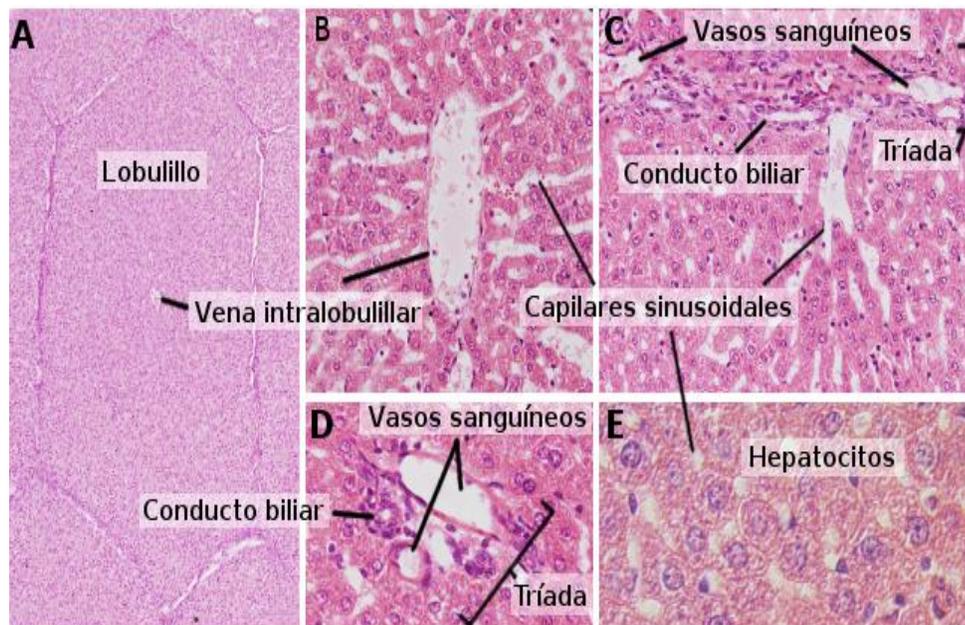


Fig. 4. Tinción Hematoxilina Eosina Hígado de Rata. Tomado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php#n>

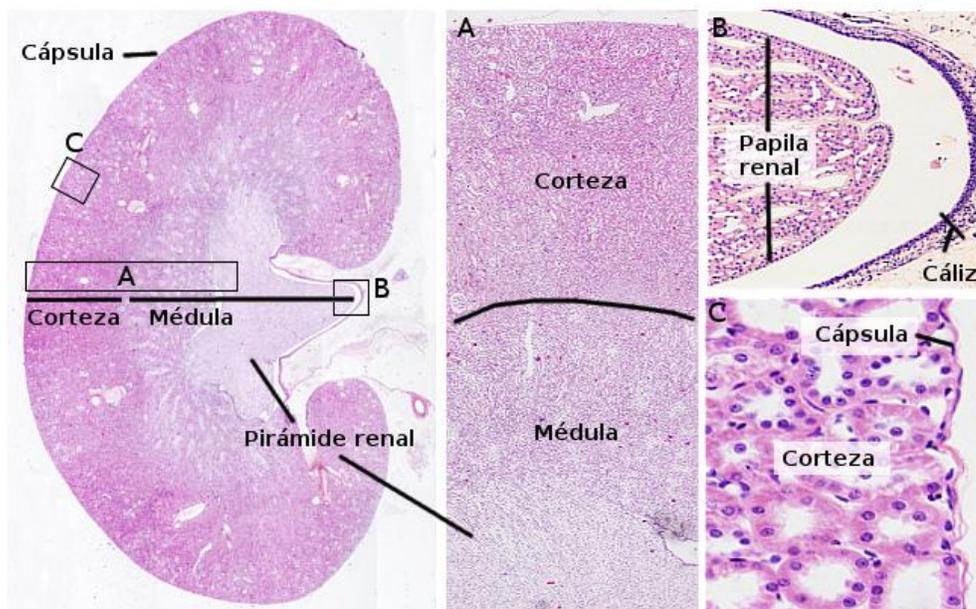


Fig. 5. Tinción Hematoxilina Eosina Riñón de Rata. Tomado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php#n>

6.2.2.2 Tinción de Von Kossa

Principio de la tinción. Los iones plata de la solución de nitrato de plata reaccionan con los iones carbonato y fosfato en los depósitos calcáreos almacenados y desplazan los iones calcio. Debido a una fuerte acción de la luz, estos iones plata son reducidos a plata metálica, la cual es evaluada de forma microscópica. Observándose de la siguiente manera, Calcio pardo a negro, Núcleos celulares rojo, Fondo rojo, Colágeno rojo

Esta técnica comprende los siguientes puntos:

- Nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos.
- Dos lavados de 5 minutos con agua destilada.
- Formol-carbonato de sodio durante 5 minutos.
- Agua corriente durante 10 minutos.

- Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Ácido fosfotúngstico-Orange G durante 7 minutos.
- Lavado rápido con ácido acético al 1 %.
- Lavado rápido con agua destilada.
- Deshidratación y montaje.

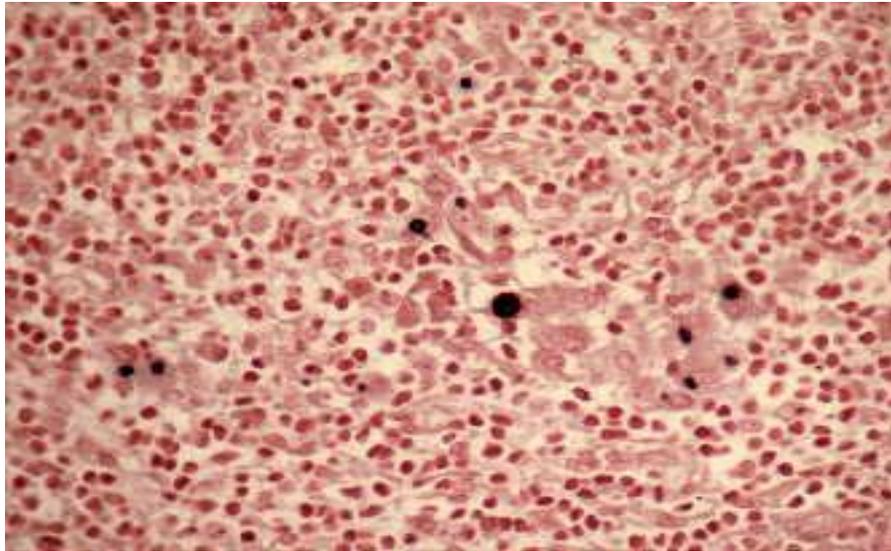


Fig. 6. Tinción de Von Kossa para calcio. Permite realzar las inclusiones que, en este caso, aparecen de color negro. Alberto Giménez Bascuñana Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Morales Meseguer; Murcia. España.

6.3 Análisis estadístico

En hígado se analizaron dos variables cuantitativas: número lobulillos y número de hepatocitos.

En riñón se hizo un conteo de las células de la corteza y se hizo medición entre el extremo externo de la corteza y el límite mayor de la pirámide renal (Fig. 2 distancia entre A y B).

En ambos órganos se intentó cúmulos de calcio. En todos los casos se comparó con su respectivo grupo control. En todos los casos, los datos se expresaron como el error estándar de la media, comparada con el grupo control

Para el análisis estadístico, si tienen un comportamiento normal, se aplicaron las pruebas t-Student y chi cuadrado, con la finalidad de comparar los grupos y establecer si hay diferencias estadísticamente significativas. Modelo logístico múltiple se utilizó para verificar las asociaciones entre variables, consumo de GMS, cambios morfológicos y acúmulos de calcio intracelular.

6.4 Consideraciones éticas

Este trabajo se llevó a cabo con tejidos(riñón e hígado) fijados en paraformaldehído al 4% que se obtuvieron de la primera parte de la investigación, pero igualmente todos los procedimientos que se realizaron en la primera investigación se basaron estrictamente en lo establecido por la Ley 84 de 1989, específicamente lo mencionado en el capítulo VI: Del uso de animales vivos en experimentos e investigación; así mismo la reglamentación estipulada en la Resolución N° 008430 de 1993 del ministerio de salud de Colombia, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, cumpliendo a cabalidad especialmente lo mencionado en Título V, en donde se mencionan los requisitos para llevar a cabo investigación biomédica con animales, teniendo en cuenta un soporte bibliográfico y científico previo sobre el tema y considerando su importancia para la prevención y control de la salud humana, como modelo animal y para el avance del conocimiento biológico acerca de los efectos del uso de glutamato monosódico en animales jóvenes. Para implementar este estudio se seleccionaron ratas de la cepa Wistar adquiridas legalmente, de las cuales se hizo uso del mínimo número requerido para obtener resultados que tengan alguna validación estadística y puedan ser considerados científicamente aceptables. Finalmente es importante mencionar que estos animales se mantuvieron dentro de las instalaciones del Bioterio de la Universidad Nacional de Colombia en condiciones óptimas para su mantenimiento, cumpliendo las reglamentaciones sanitarias vigentes. El proyecto precedente fue aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina el 28 de Julio del año 2016, acta 013-169-16 y éste fue aprobado

7. Resultados

7.1 Evaluación macroscópica del hígado

Macroscópicamente no se observaron cambios morfológicos en hígados en los grupos tratamiento y grupo control.

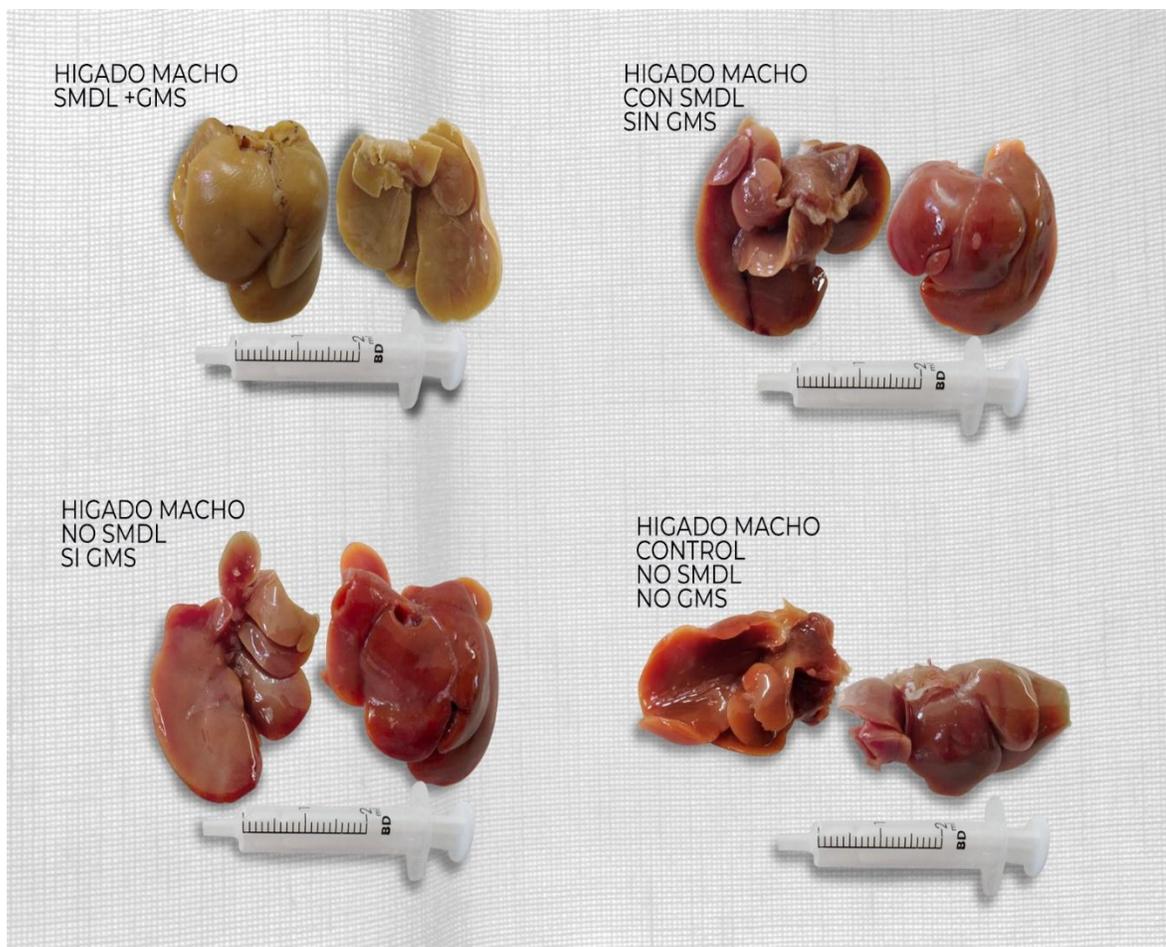


Fig.7. vista macroscópica del hígado de los diferentes grupos experimentales.

7.2 Evaluación microscópica del hígado.

La evaluación histopatológica realizada, mostró degeneración centrolobulillar moderada (figura A), acompañada de vacuolizaciones (figura B) y severa degeneración hepatocelular (figura C) en las ratas con SMDL y GMS.

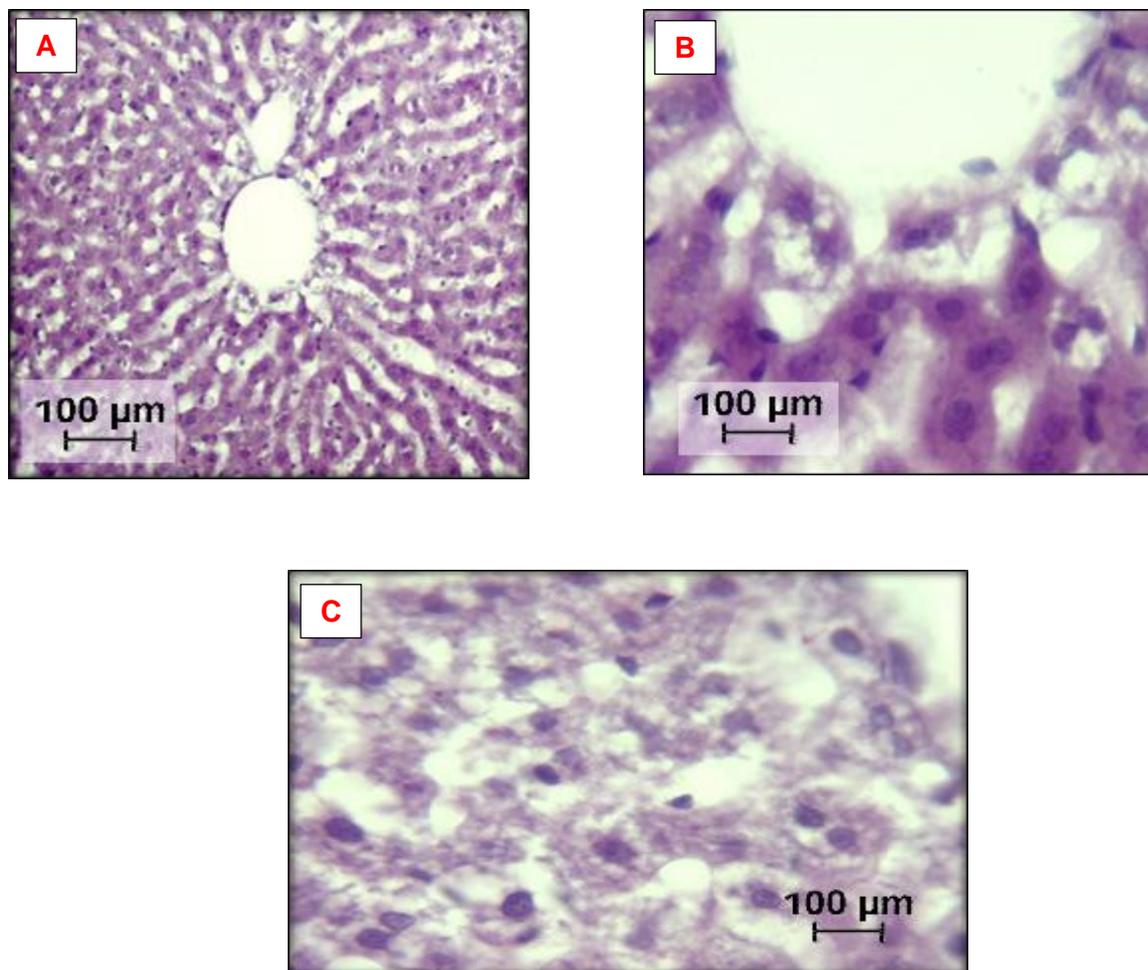


Fig. 8. Hígado con tinción de hematoxilina eosina. **A** corte histológico de hígado HE 100X SMDL,GMS lesión hepatocelular centrolobulillar., **B** Hígado HE 400X Si SMDL Si GMS Daño hepatocelular., **C** Hígado HE 400X SMDL, GMS severa Degeneración hepatocelular.

7.3 Numero de venas centrolobulillares

En hígado no se encontraron diferencias significativas en el número de venas centrolobulillares en los diferentes tratamientos. Se compararon los diferentes tratamientos teniendo en cuenta el número de venas centrolobulillares presentes en las diferentes profundidades de corte (E1, E2, y E3) grafica A, también se compararon los diferentes tratamientos teniendo en cuenta el número total de venas centrolobulillares grafica B.

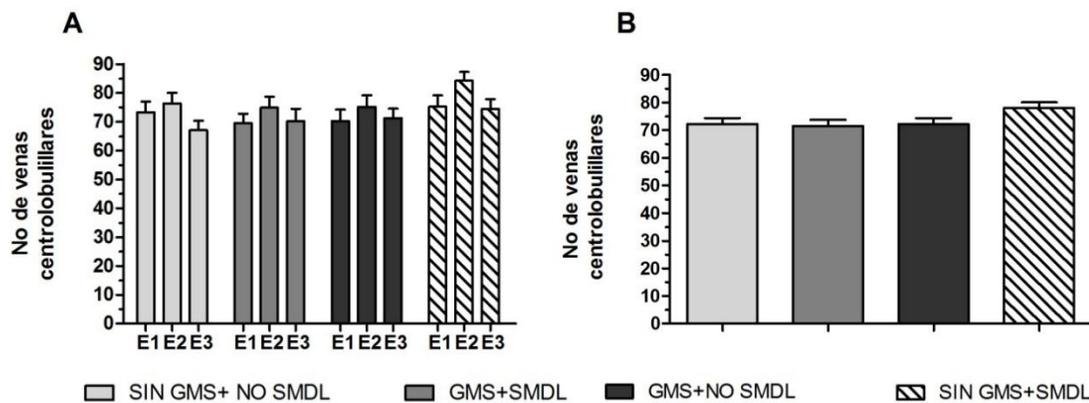


Fig. 9. Numero de venas centrolobulillares presentes en las diferentes profundidades de corte. Parte superficial del hígado (E1), parte media del lóbulo hepático (E2) y parte interna del lóbulo hepático (E3).

7.4 Evaluación macroscópica del riñón

Para este trabajo se contó con 15 riñones para el grupo control e igualmente para cada grupo experimental, para cada riñón se realizaron 3 cortes a nivel de corteza (E1), 3 cortes a nivel de la unión cortico medular (E2) y 3 cortes a nivel medular para un total de 9 cortes por riñón. Los promedios se obtuvieron de los 3 conteos realizados a cada corte.

Macroscópicamente no se observaron cambios morfológicos en riñón en los grupos tratamiento y grupo control.

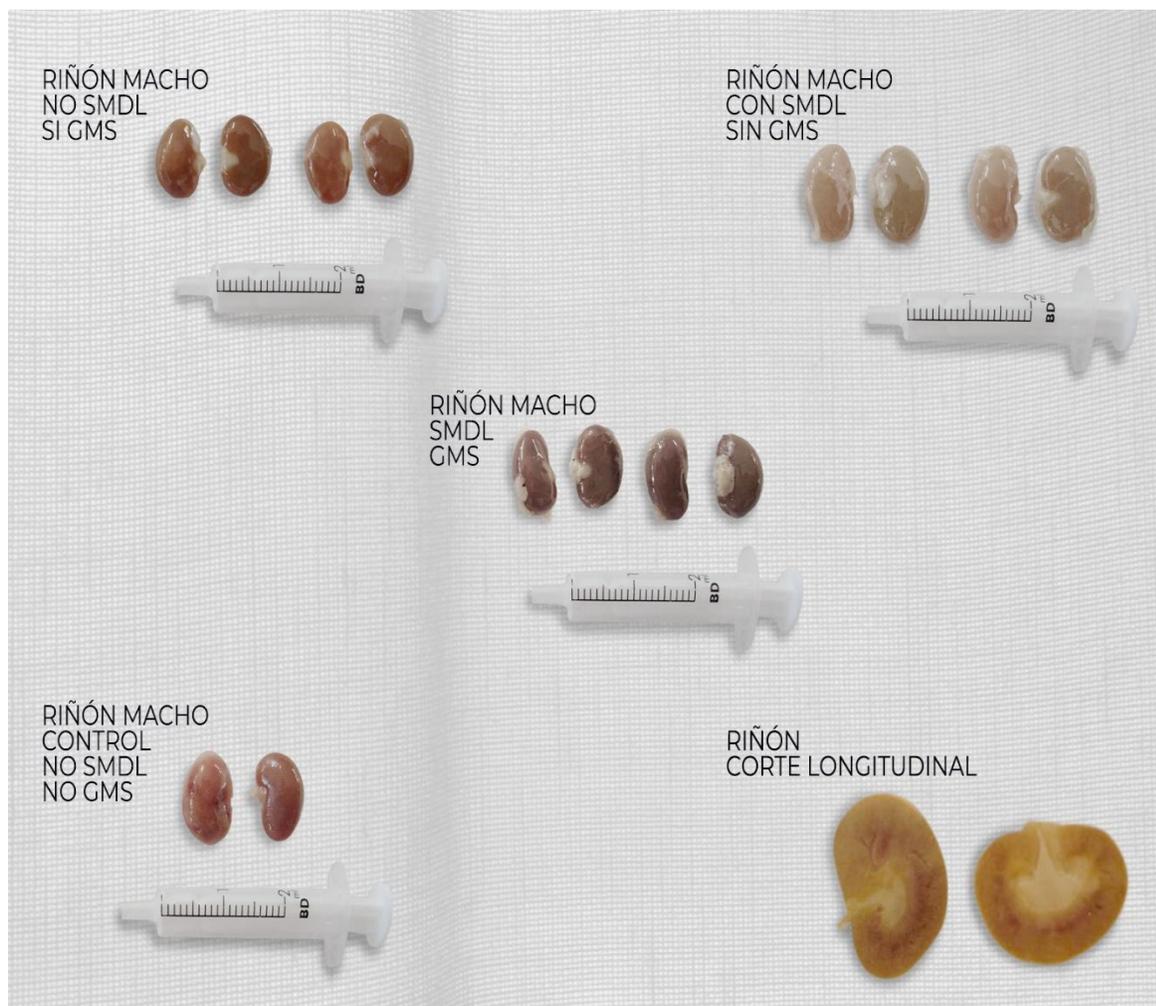


Fig.10. vista macroscópica de los riñones de los diferentes grupos experimentales.

7.5 Evaluación microscópica del riñón

No se observaron acúmulos de calcio en ninguno de los grupos experimentales.

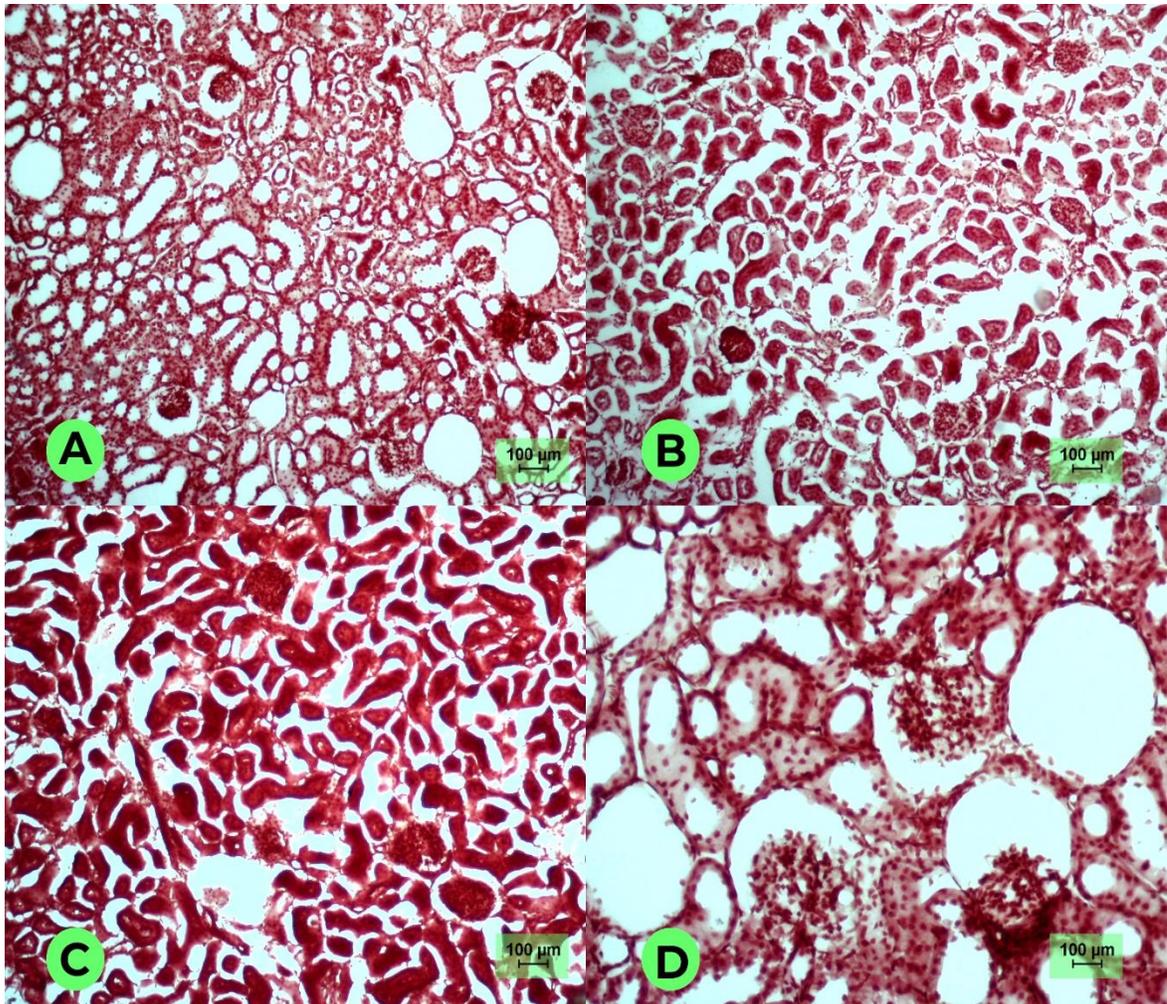


Fig. 11. Riñón con tinción de Von Kossa. **A** Riñón Von Kossa 100 μm grupo control., **B**. Riñón Von Kossa 100 μm No SMDL Si GMS., **C** Riñón Von Kossa 100 μm SMDL No GMS., **D** Riñón VK 100 μm SMDL, GMS.

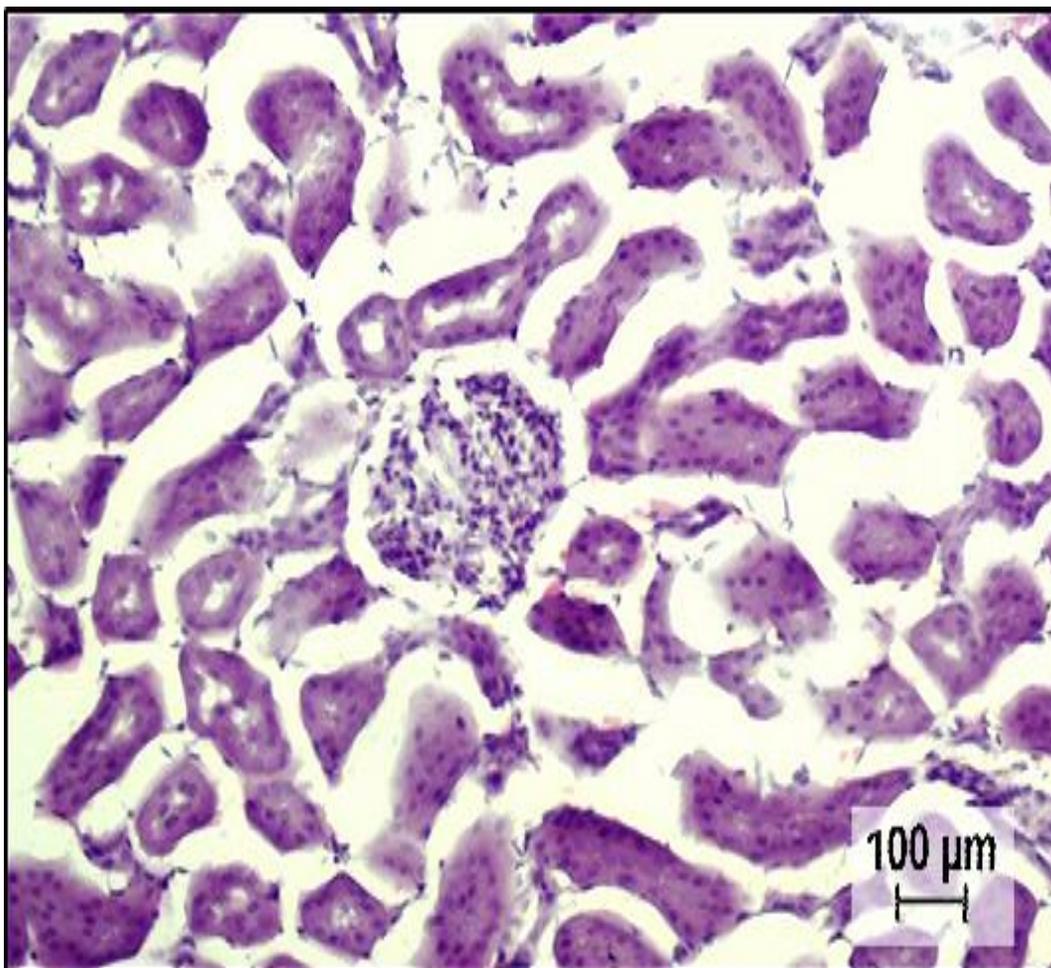


Fig. 12. Riñón 100μm grupo control con tensión de hematoxilina eosina. 40X grupo control

Los riñones de las ratas tratadas (GMS) mostraron desorganización de la estructura renal; glomérulo parcialmente atrofiado y dilatación del espacio de Bowman.

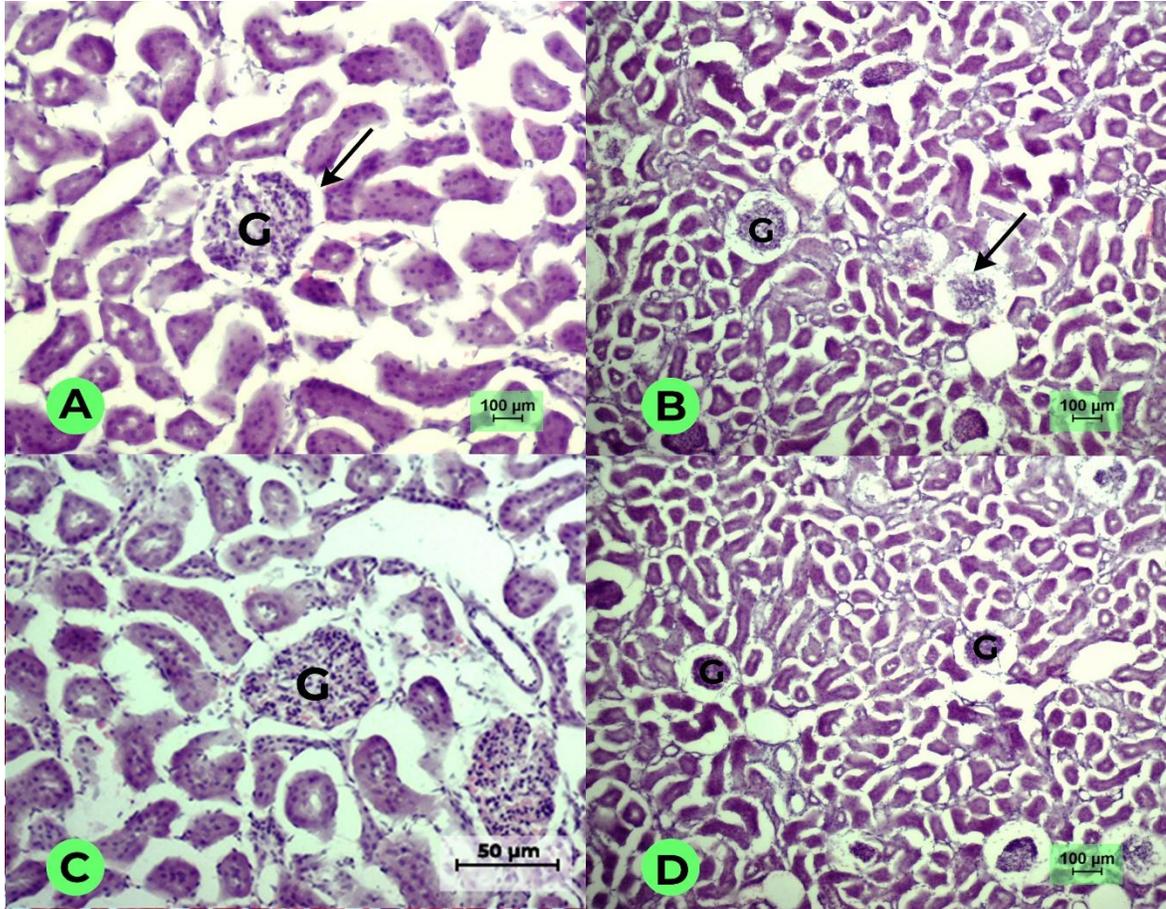


Fig. 13. Riñón con tención de hematoxilina eosina. **A.** Riñón HE Control 100 µm, **B.** Riñón HE 100 µm SMDL + GMS,. **C** Riñón HE 50 µm SMDL no GMS **.D** Riñón HE 100 µm No SMDL + GMS.

7.6 Numero de glomérulos

Con respecto al número de glomérulos Fig. A. de ratones expuestos a glutamato monosódico y separación materna. Se observaron diferencias significativas dentro del grupo control (a, b y c) entre las diferentes zonas evaluadas del riñón corteza (E1) unión cortico medular (E2) medula (E3) se realizó la comparación del número total de glomérulos en los diferentes tratamientos grafica B pero no se observó diferencia estadística significativa.

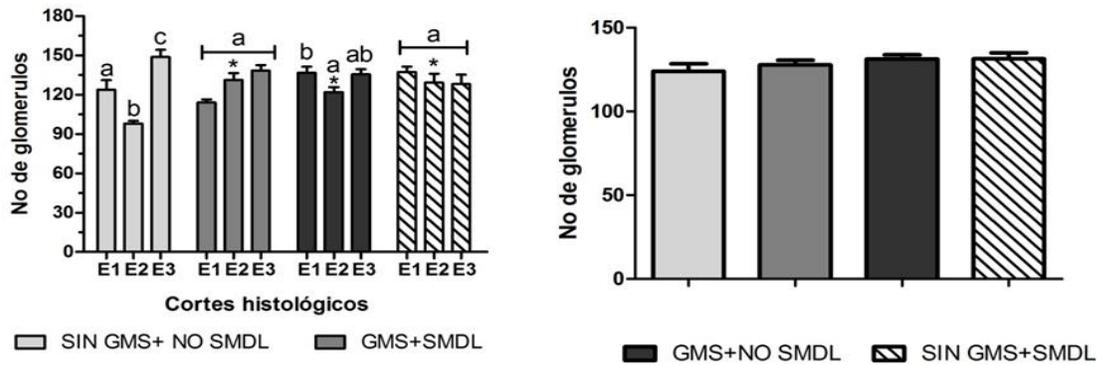


Fig.14. No de glomérulos. Se observaron diferencias significativas entre las diferentes zonas evaluadas del riñón: corteza (E1) unión cortico medular (E2) medula (E3). Las letras a, b y c son diferencias significativas entre E1, E2 y E3.

8. Discusión

En el presente trabajo se quiso analizar el efecto de la separación materna durante la lactancia y el consumo de glutamato monosódico, sobre dos órganos de las ratas: el hígado y el riñón, considerados fundamentales en el proceso de limpieza y eliminación de tóxicos. Si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, si es claro que la administración de GMS durante 30 días induce cambios morfológicos en hígado y riñón. Probablemente estas alteraciones aparezcan en estos dos órganos dado que son los principales responsables de la desintoxicación de compuestos extraños en el cuerpo (Tawfik, 2012).

El GMS es hidrosoluble y se disocia rápidamente en iones de sodio y glutamato libres. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro y la acción excitadora es mediada a través de los receptores de glutamato. Antes se pensaba que los receptores de glutamato estaban localizados predominantemente en el sistema nervioso central (SNC), estudios posteriores revelaron su existencia en algunos órganos fuera del SNC. (Sauganth et al 2012). Estos receptores en los tejidos periféricos son blancos potenciales para algunos componentes presentes en los alimentos y el medio ambiente. Se han identificado subtipos de receptores de glutamato en los riñones de ratas, por lo tanto, estos receptores

pueden desempeñar un papel importante en la fisiopatología del tejido renal (Gill, et al 2001).

Eman & cols 2018, reportaron un aumento significativo en suero de los niveles de ALT y AST en un grupo de ratas tratadas con GMS. Estos resultados son similares a los publicados por Eweka & cols 2011. Los niveles séricos de transaminasas se utilizan como indicadores de función hepática, estas enzimas son de localización citoplasmática y se liberan a la circulación sólo después de un daño hepatocelular (Al-Mamary, et al 2002).

El GMS se disocia fácilmente en sodio (Na) y L-glutamato, este último se transforma en glutamina. La acumulación de glutamina en los hepatocitos induce daño celular, liberando así transaminasas ALT y AST que aumentan su nivel en sangre en proporción al tamaño de la lesión (Boutry, et al 2011).

Eman & cols 2018. Reportaron un aumento significativo de malondialdehído (MDA) y una significativa disminución de las capacidades antioxidantes (CAT) en hígado de ratas que consumieron GMS, por lo anterior el consumo de GMS parece tener un efecto de estrés oxidativo, Esto puede explicar el incremento de las enzimas transaminasas hepáticas con el consumo de glutamato monosódico reportado por Boutry, et al 201. El radical libre producido reacciona con los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular que conducen al deterioro de la integridad de las membranas plasmáticas y las mitocondrias (Poli et al 1990). La degeneración centrolobulillar y atrofia glomerular reportada en el presente estudio podría estar relacionada con el efecto de los radicales libres sobre las membranas celulares.

La estimulación continua de los receptores de glutamato puede provocar daño osmótico, aumento de la concentración intracelular de calcio. Este desequilibrio de la homeostasis del Ca^{2+} desencadena la activación de varias vías enzimáticas y cascadas de señalización como la calmodulina, fosfolipasas, proteínas quinasas, proteasas, proteínas fosfatasa y sintasa de ácido nítrico que conduce a la generación de radicales libres (Said., 1999)

Los riñones de las ratas del presente estudio que consumieron GMS mostraron alteraciones estructurales. Atrofia glomerular, dilatación del espacio de Bowman y moderada degeneración tubular, estos resultados fueron previamente reportados Al-Agha.2007. Agha.2007.suministro 2 mg/g/pv de GMS disuelto en NaCl 0.9% durante 21 días a ratas albinas machos, las cuales mostraron cambios histopatológicos en el tejido

renal como pérdida parcial del borde en cepillos en los tubulos proximales, infiltración intersticial de células inflamatorias y atrofia glomerular., Abass,M.,et al, 2011.suministraron 830mg/kg de GMS durante 28 días a 12 ratas, los resultados mostraron un marcado aumento de creatinina y BUN en las ratas del grupo que consumió GMS en comparación con el grupo control acompañado de atrofia glomerulardegeneracio hídrica con dilatación tubular y congestión de vasos sanguíneos corticales., Eman & cols 2018.reportaron aumento de peso en ratas y daños en hígado y riñón asociados al estrés oxidativo.

Vercoutere et al 2004 reportaron que alimentos con aditivos, como el glutamato monosódico, causaban cambios en los corpúsculos renales, membrana celular de los túbulos contorneados y en la capsula de Bowmam, estos daños podrían atribuirse variaciones en el umbral del flujo sanguíneo renal y glomerular. El GMS llega al riñón a través de la arteria renal, se filtra en el glomérulo, se reabsorbe Y se acumula parcialmente generando daño en las células glomerulares y tubulares [37]. Al-Agha[39] (Abass y El-Haleem.

Moritz 2016 reporto que Factores como la dieta materna deficiente, elevadas concentraciones de hormonas de estrés materno o hipoxia durante la gestación puede causar que la descendencia tenga un mayor riesgo de padecer enfermedades crónicas, principalmente hipertensión y disfunción renal. El riñón ha sido identificado como altamente sensible a estos factores prenatales que generan una menor formación de nefronas; Jackson (1913) reportó un incremento en el peso del riñón en relación al peso corporal durante las primeras 3 semanas de vida lo que indica que durante este periodo de tiempo la nefrogénesis y la diferenciación funcional de la nefrona es más marcada.

Por lo anterior es posible que el estrés generado por la SMDL esté afectando la nefrogenesis durante las primeras semanas de vida y que se refleja con el menor número de glomérulos en el grupo de SMDL a pesar de no ser estadísticamente significativo.

9. Conclusiones

Si bien no se encontraron diferencias significativas, los resultados de este trabajo nos permiten mostrar que:

1. El consumo de GMS causa efectos tóxicos en el tejido hepático, como atrofia de los hepatocitos y vacuolizaciones del citoplasma, dilatación de las venas centrales y sinusoides.
2. Este estudio demuestra que el consumo de GMS induce cambios morfológicos en riñón, como son atrofia glomerular, dilatación del espacio de bowman y degeneración tubular.

10. propuestas a futuro

Realizar un estudio que nos permita correlacionar los daños morfológicos en hígado y riñón con medición de creatinina, BUN y aminotransferasas.

11. Bibliografía

1. Abass, M., El-Haleem, M.A.. (2011) Evaluation of monosodium glutamate induced neurotoxicity and nephrotoxicity in adult male albino rats, *J. Am. Sci.* 7 .264–276.
2. Adrienne Samuels (1999). The toxicity/safety of processed free glutamic acid (MSG): A study in suppression of information, *Accountability in Research*, 6:4, 259-310
3. Adriani W, Caprioli A, Ghirardi O, Ali SF, Aloe L, Laviola G. (2004). The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Behavioural Pharmacology*, 15 (341–352.).
4. Alalwani, A. (2014). Monosodium glutamate induced testicular lesions in rats (histological study). *Middle East Fertility Society Journal* 19, pp.274–280.
5. Al-Agha, S.Z. (2007). Histological, Histochemical and Ultrastructural Studies on the Kidney of Rats After Administration of Monosodium Glutamate, Al-Aqsa University, Gaza Palestine.
6. Al-Mamary, M., Al-Habori, M., Al-Aghbari, A M., Baker, M.M. (2002). Investigation into the toxicological effects of *Catha edulis* leaves: a short term study in animals, *Phytother. Res.* 16. 127–132.
7. Anier K, Malinovskaja K, Pruus K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A.. (2014). Maternal separation is associated with DNA methylation and behavioural changes in adult rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* (3):459-68.
8. Amaya-Farfán j; Morato PN; da Silva MV. (2013) Presencia del glutamato en alimentos. In: Reyes FGR (org). Editora Plêiade, São Paulo, Brasil. p. 91-114.
9. Autumn S. Ivy, Kristen L. Brunson, Curt Sandman, and Tallie Z. Baram (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: a clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience.* 154(3): 1132–1142
10. Avila Rojas, H., Perez neri, I., 2016 Glutamato para principiantes *Arch Neurocién* vol 21 No 3.
11. Aya-Ramos L, Contreras-Vargas C, Rico JL, Dueñas Z. (2017). Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* Jul 19;8(7):2592-2600

12. Baad-Hansen, L., Cairns, B., Ernberg, M., Svensson, P. (2010) Effect of systemic monosodium glutamate (MSG) on headache and pericranial muscle sensitivity, *Cephalalgia* 30 (1) pp 68–76.
13. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. (2009) Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.*;89(1):27–71.
14. Beyreuther, K., Biesalski, H. K., Fernstrom, J. D., Grimm, P., Hammes, W. P., Heinemann, U Walker, R. (2007). Consensus meeting: Monosodium glutamate—An update. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(3), 304–313. Retrieved from
15. Boonate, P., Warasawapati, S., Hipkiao, W., Suattra, P., Sharma, A., Selmi, C., Prasongwattana, V., Cha'on, U. (2015). Monosodium glutamate dietary consumption decreases pancreatic β -cell mass in adult wister rats, *Plos One* 10 (6) e0131595.
16. Boutry, C., Bos, C., Matsumoto, H., Even, P., Azzout-Marniche, D., Tome, D., Blachier, F., (2011). Effects of monosodium glutamate supplementation on glutamine metabolism in adult rats, *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 3 279–290.
17. Contini, M., Fabro, A., Mille, N., Benmelej, A., Mahieu, S. (2017). Adverse effects in kidney function, antioxidant systems and histopathology in rats receiving monosodium glutamate diet. *Experimental and Toxicologic Pathology* . 69 pp. 547–556.
18. Choudhary, P., Malik, V., Puri, S., Ahluwalia, P. (1996) Studies on the effects of monosodium glutamate on hepatic microsomal lipid peroxidation, calcium, ascorbic acid and glutathione and its dependent enzymes in adult male mice. *Toxicol Lett* .89,(1).71– 6.
19. Coyle JT. (2006) Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol Neurobiol*; 26: 365-84.
20. Denenberg V., Karas G. (1959) Effects of differential infantile handling upon weight gain and mortality in the rat and mouse. *Science*, . Vol. 130, Issue 3376, pp. 629-630
21. Ememali, M., Danielson, E., Bamidele, T. (2015). Effect of monosodium glutamate orally administered to male wister rats on some biochemical parameters, *J. Biol. Agric. Healthc.* 5 pp 24–28.

22. Eweka, A., Igbigbi, P., Ucheya, R. (2011). Histochemical studies of the effects of MSG on the liver of adult wistar rats, *Ann. Med. Health Sci. Res.* 1 pp 21–29.
23. Eman. A., Merhan. M., Sabreen .M. (2018). Evidence of the protective effect of l-arginine and vitamin D against monosodium glutamate-induced liver and kidney dysfunction in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Volume 108, December, Pages 799-808
24. Farombi, E., Onyema, O., (2006). Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in rats: modulating role of vitamin C, vitamin E and quercetin, *SAGE J. Hum. Exp. Toxicol.* 25.
25. 13. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Atlas of Histology*. 3rd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2000. pp. 294–301.
26. Gill, S., Pulido, OM.(2001). Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicol Pathol* 29: 208–223.
27. Gill, S., Mueller ,R., McGuire, P., Refined, O. (2000).Potential target sites in peripheral tissues for excitatory neurotransmission and excitotoxicity. *Toxicol Pathol* ,28(2),pp.277– 85.
28. .Gregory KJ, Noetzel MJ, Niswender CM. (2013) Pharmacology of metabotropic glutamate receptor allosteric modulators: structural basis and therapeutic potential for CNS disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* ; 115:.
29. Gutman DA, Nemeroff CB.(2002). Neurobiology of early life stress: rodent studies. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 2002 Apr;7(2):89-95.
30. Hancock S, Grant V. (2009) Early maternal separation increases symptoms of activity-based anorexia in male and female rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process.*; 35, 394–406.
31. Hinoi, E., Takeda ,T., Ueshima, T., Tsuchihashi ,Y., Yoneda, Y. (2004) Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur J Biochem*.271pp1–13.
32. Igwebuike, U., Ochiogu,I., Ihedinihu,B., Ikokide, J., Idika, I. (2011) The effects of oral administration of monosodium glutamate (MSG) on the testicular morphology

- and cauda epididymal sperm reserves of young and adult male rats, *Vet. Arch.* 81 pp 525–534.
33. Jackson.C. (1913). Postnatal growth and variability of the body and of the various organs in the albino rat. *Amer. J. Anat.* 15, 1-68.
34. Meaney. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161–1192.
35. Olney, J.(1990). Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* .30,pp.47–71.
36. Ortiz,G.,Quintero-Bitzer,K., Beas Zarate,C.,Rodriguez Reynoso ,S.,Larios Arceo,F. (2006). Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 60, Issue 2, pp 86-91.
37. Nakamura,H., Kawamata, Y., Kuwahara, T.,Torii,K., Sakai R.(2013). Nitrogen in dietary glutamate is utilized exclusively for the synthesis of amino acids in the rat intestine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 304: pp.100–108,
38. Okon, A.,Jacks,T., Amaza,D., Peters,T., Otong,E. (2013). Effect of monosodium glutamate (MSG) on the gross weight of the heart of albino rats *Scholars, J. Appl. Med. Sci.* 1 pp 44–47.
39. Onaolapo, O., Onaolapo,A., Akanmu,M.,Ogbola,O.(2016). Evidence of alterations in brain structure and antioxidant status following 'low-dose' monosodium glutamate ingestión. *Pathophysiology* 23 pp 147–156.
40. Ochiogu,I., Ogwu,D., Uchendu,C., Okoye,C., Ihedioha,J., Mbegbu,E. (2015). Effect of monosodium L- glutamate administration on serum levels of reproductive hormones and cholesterol, epididymal sperm reserves and testicular Histomorphology of male albino rats, *Acta Vet. Hung.* 63 pp 125–139.
41. Pavlovic V, Pavlovic D, Kocic G, Sokolovic D, Sarac M, Jovic Z. (2009).Ascorbic acid modulates monosodium glutamate induced cytotoxicity in rat thymus. *Bratisl Lek Listy.* ; 110(4):205–9.

42. Poli, G., Cottalasso, D., Pronzato, M.A., Chiarpotto, E., Biasi, F., Corongiu, F.P., Marinari, U.M., Nanni, G., Dianzani, M.U. (1990). Lipid peroxidation and covalent binding in the early functional impairment of liver Golgi apparatus by carbon tetrachloride, *Cell Biochem. Funct.* 8 1–10.
43. Rita Z.Nora D.(2011) Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci.* 12(11): 652–669.
44. Said, S. (1999). Glutamate receptors and asthmatic airway disease. *Trends Pharmacol Sci* 20: 132– 134.
45. Sauganth P., Abhilash M., Mathews V., Manju A., Harikumar N. (2012). Ameliorative effect of α -tocopherol on monosodium glutamate-induced cardiac histological alterations and oxidative stress. *J Sci Food Agric*; 92: 3002–3006.
46. Sharma, A., Prasongwattana, V., Cha'on, U., Selmi, C., Hipkayo, W., Boonnate, P., Pethlert, S., Titipungul, T., Intarawichian, P., Warasawapati, S., Puapiroj, A., VSitprijia, V., Reungjui, S. (2013). Monosodium glutamate (MSG) consumption is associated with urolithiasis and urinary tract obstruction in rats, *Plos One* 26 (9) e0075546.
47. Vercoutere, B., D. Durozard, D., Baverel, G., Martin, G. (2004). Complexity of glutamine metabolism in kidney tubules from fed and fasted rats, *Biochem. J.* 378 485–495.
48. Sharma A, Wongkham C, Prasongwattana V, Boonnate P, Thanan R, Reungjui S, et al. (2014) Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. *PLoS One.*; 9(12):
49. Schwendt, M., Jezova, D. (2001) Glutamate receptors and transporters in the brain and peripheral tissues. *Cesk Fysiol.* 50(2), pp. 43–56.
50. Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, et al. (2004). Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. *Physiol Behav.*; 80, 739–745.

51. Tawfik, MS., Al-Badr, N., (2012). Adverse effects of monosodium glutamate on liver and kidney functions in adult rats and potential protective effect of vitamins C and E, Food Nutr. Sci. 03 (05) 9.

52. Thomas M, Sujatha KS, George S. (2009) Protective effect of Piper longum Linn. on monosodium glutamate induced oxidative stress in rats. Indian J Exp Biol.;47(3):186–92

